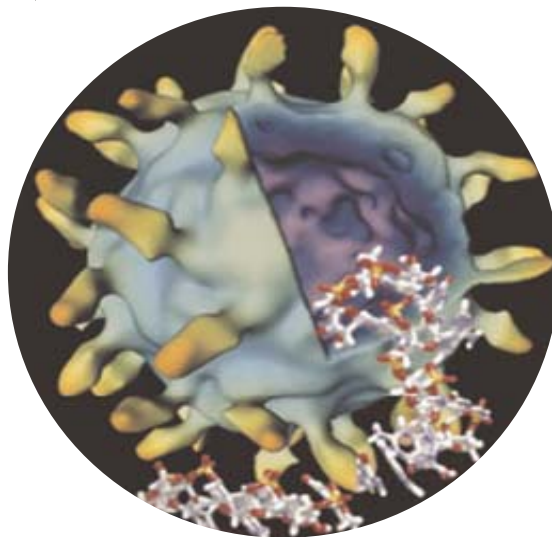


**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
“PEDRO KOURÍ”
IPK**

**SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA**

***“EVIDENCIAS SEROLÓGICAS Y
MOLECULARES DE LA CIRCULACIÓN DEL
VIRUS DE LA HEPATITIS E EN CUBA”***



**Tesis presentada en opción del grado científico de Doctor
en Ciencias Médicas.**

Autor: Dra. María Caridad Montalvo Villalba, MSc.

**Ciudad de la Habana
2011**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
“PEDRO KOURÍ”
IPK**

**SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA**

***“EVIDENCIAS SEROLÓGICAS Y
MOLECULARES DE LA
CIRCULACIÓN DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS E EN CUBA”***

**Tesis presentada en opción del grado científico de Doctor
en Ciencias Médicas.**

Autor: Dra. María Caridad Montalvo Villalba, MSc.

Asesor: Prof. Licel de los Ángeles Rodríguez Lay, Dr.C.

**Ciudad de la Habana
2011**

"Tu espíritu es el plumero de cualquier tela de araña. Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida Detrás de cada logro, hay otro desafío. Mientras estés vivo, siéntete vivo. Si extrañas lo que hacías vuelve a hacerlo. No vivas de fotos amarillas... Sigue aunque todos esperen que abandones. No dejes que se oxide el hierro que hay en ti. Haz que en vez de lástima, te tengan respeto. Cuando por los años no puedas correr, trota. Cuando no puedas trotar, camina. Cuando no puedas caminar, usa el bastón. ¡Pero nunca te detengas! "

Madre Teresa de Calcuta (1910-1997)

SÍNTESIS

Para demostrar la circulación del VHE en Cuba se aplicaron técnicas serológicas como la determinación de IgM e IgG anti-VHE y técnicas moleculares para identificar la presencia del genoma viral. Además, se evaluó la sensibilidad de diferentes líneas celulares a la multiplicación del VHE y se realizó el análisis filogenético de los aislamientos identificados. Se estudiaron muestras de brotes, casos clínicos esporádicos, graves y fallecidos por HVA de todo el país. Igualmente, se incluyeron muestras de población abierta y de un grupo de trabajadores de granjas porcinas de la provincia La Habana. El VHE fue el único agente etiológico en el 14,2% y 13% de los brotes y casos clínicos esporádicos, respectivamente, detectándose la co-circulación de este con el VHA. El 15% de los casos graves y fallecidos por FHF se produjeron por el VHE, tanto como único agente etiológico como co-infectando con otros virus hepatotropos. En el estudio de seroprevalencia con personas sin antecedentes de HVA, se detectó un 10% de positividad a los Ac totales anti-VHE, sugiriendo la presencia de infecciones subclínicas en la comunidad. Se demostró que los trabajadores de las granjas porcinas constituyen un grupo de riesgo para la exposición al VHE. Las células A549 fueron las más sensibles a la multiplicación del VHE autóctono y por primera vez se identificó que las células MRC5 pueden ser útiles para propagar el virus. Con los estudios filogenéticos se demostró por primera vez la circulación de dos genotipos del VHE en Cuba, detectándose el genotipo 1 en población abierta y el genotipo 3 en el grupo de riesgo. Los resultados obtenidos permitieron describir por primera vez el comportamiento endémico que tiene esta infección en nuestro medio.

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
<i>I. INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
I.1 Antecedentes	1
I.2 Hipótesis de trabajo	4
I.3 Objetivos	4
I.4 Novedad científica	4
I.5 Valor teórico y práctico	5
I.6 Publicaciones y eventos científicos	5
<i>II. CAPITULO DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i>	<i>6</i>
II.1 Definición de Hepatitis Viral	6
II.2 Historia de la hepatitis E	6
II.3 Agente infeccioso: el VHE	7
II.3.1 Clasificación	7
II.3.2 Serotipos y heterogeneidad genética	8
II.3.3 Morfología y propiedades físico-químicas	10
II.3.4 Genoma y proteínas	11
II.3.5 Antígenos y estructura antigénica	13
II.3.6 Estabilidad del virus	13
II.3.7 Replicación viral	14
II.3.8 Propagación en cultivos celulares	15
II.3.9 Rango de hospederos e infección experimental en animales	16
II.4. La Enfermedad: Hepatitis E	16
II.4.1 Patogénesis	16
II.4.2 Patología	17
II.4.3 Respuesta inmune	17

II.4.4 Cuadro clínico	18
II.4.5 Tratamiento	19
II.5 Diagnóstico de laboratorio	19
II.5.1 Laboratorio clínico	20
II.5.2 Laboratorio virológico	21
II.6 Epidemiología	25
II.6.1 Grupos de riesgo	26
II.6.2 Hepatitis E y embarazo	27
II.6.3 Prevención y control de la infección por el VHE	29
II.6.4 Vigilancia de la hepatitis E	30
II.7 Perspectivas	32
III. CAPITULO DE MATERIALES Y MÉTODOS	33
III. 1 Identificar si el VHE causa brotes, casos clínicos esporádicos, cuadros clínicos graves y fallecidos por HVA en Cuba, utilizando diferentes	33
III.1.1 Muestras	33
III.1.2 Diagnóstico serológico	33
III.1.2.1 Detección de anticuerpos IgM anti-VHE	34
III.1.2.1.1 Estuche producido por el CIGB	34
III.1.2.1.2 Estuche producido por Macfarlane	34
III.1.2.1.3 Estuche producido por Genelabs	35
III.1.2.2 Evaluación de la sero-positividad	36
III.1.2.3 Detección de anticuerpos IgM anti-VHA	36
III.1.3 Diagnóstico molecular	37
III.1.3.1 Muestras	37
III.1.3.2 Extracción del ARN	37
III.1.3.3 Amplificación del ARN-VHE	38
III.1.3.3.1 TR-RCP anidada para el MAL1	38
III.1.3.3.2 TR-RCP simple para el MAL2	39
III.1.3.3.3 TR-RCP anidada para el MAL2	40
III.1.3.3.4 Sensibilidad de las TR-RCP	42
III.2 Prevalencia del VHE y los factores de riesgo asociados en población	42

supuestamente sana	
III.2.1 Muestras	42
III.2.1.1 Encuesta sero-epidemiológica del municipio La Lisa	42
III.2.1.2 Encuesta sero-epidemiológica de Playa y Marianao	43
III.2.2 Detección de Ac IgG anti-VHE en el municipio La Lisa	44
III.2.3 Detección de Ac totales anti-VHE en Playa y Marianao	45
III.2.4 Evaluación de la sero-reactividad de los sueros	46
III.3 Prevalencia del VHE y los factores de riesgo asociados en un grupo de trabajadores de granjas porcinas	46
III.3.1 Muestras	46
III.3.2 Detección de anticuerpos totales anti-VHE	47
III.3.3.1 Determinación cuantitativa <i>in vitro</i> de la ALAT	47
III.3.3.2 Determinación cuantitativa <i>in vitro</i> de la ASAT	47
III.3.4 TR-RCP para la detección del genoma viral del VHE	47
III.4 Evaluación de la sensibilidad de varias líneas celulares para la multiplicación del VHE	48
III.4.1 Preparación de la suspensión de heces	48
III.4.2 Cultivos celulares	48
III.4.2.1 Aislamiento y propagación del virus	49
III.4.3 Identificación viral	49
III.4.3.1 Inmunofluorescencia Indirecta	49
III.4.3.2 Detección del ARN-VHE	50
III.5 Relación filogenética de los aislamientos cubanos	50
III.5.1 Muestras	50
III.5.2 Clonaje y secuenciación nucleotídica	51
III.5.2.1 Reacción de ligazón	51
III.5.2.2 Transformación y cultivo de colonias	51
III.5.2.3 Reacción de secuencia	52
III.5.2.4 Métodos empleados para analizar y comparar secuencias	53
III.6 Consideraciones éticas	54
III.7 Medidas de bioseguridad	54

III.8 Análisis estadístico	54
<i>IV CAPITULO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	<i>56</i>
IV.1 Identificar si el VHE causa brotes, casos clínicos esporádicos, cuadros clínicos graves y fallecidos por HVA en Cuba, utilizando diferentes ensayos inmunoenzimáticos	56
IV.1.1 Diagnóstico serológico	56
IV.1.2 Diagnóstico molecular	66
IV.2 Prevalencia del VHE y los factores de riesgo asociados en población supuestamente sana	69
IV.3 Prevalencia del VHE y factores de riesgo asociados en un grupo de trabajadores de granjas porcinas	78
IV.4 Evaluación de la sensibilidad de varias líneas celulares para la multiplicación del VHE	87
IV.5 Determinación de la relación filogenética de los aislamientos cubanos del VHE con otras cepas que circulan en el mundo	91
<i>V. DISCUSIÓN INTEGRADA</i>	<i>97</i>
<i>VI. CONCLUSIONES</i>	<i>102</i>
<i>VII. RECOMENDACIONES</i>	<i>103</i>
<i>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>104</i>
<i>ANEXOS</i>	<i>131</i>

LISTADO DE ABREVIATURAS

2BS: Línea celular diploide de pulmón humano fetal

aa: Aminoácidos

Ac: Anticuerpo o Anticuerpos

Ag: Antígeno o Antígenos

ALAT: Alanino aminotransferasa

AMV: virus de la mieloblastosis aviar (siglas del inglés aviar myeloblastosis virus)

Anti-VHA: Anticuerpos contra el virus de la hepatitis A

Anti-VHC: Anticuerpos contra el virus de la hepatitis C

ARN: Acido ribonucleico

ASAT: Aspartato aminotransferasa

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo (siglas del inglés American Type Culture Collection)

BSL-2: Laboratorios de nivel de seguridad 2 (siglas del inglés, Biological Safety Level-2)

CAE: Cebador antisentido externo

CAI: Cebador antisentido interno

CD: Clúster de diferenciación

CMV: Citomegalovirus

CsCl: Cloruro de Cesio

CSE: Cebador sentido externo

CSI: Cebador sentido interno

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfatados

DO: Densidad óptica

DOm: Densidad óptica de la muestra

DS: Desviación estándar

DTT: Dithiothreitol

E.coli: Escherichia coli

ECP: Efecto citopático

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético (siglas del inglés etilendiamine tetracetic acid)

EIE: Ensayo inmunoenzimático

ELISA: Ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida (siglas del inglés enzyme linked immunoabsorbent assay)

ET2.1: Proteína recombinantes del marco abierto de lectura 2 del VHE

FA: Fosfatasa alcalina

FH: Fibroblastos humanos

FHF: Fallo hepático fulminante

FIQC: Federación Internacional de Química Clínica

FNT-a: Factor de necrosis tumoral alfa

FRhK4: Línea celular de riñón de mono *rhesus* fetal (siglas del inglés fetal *rhesus* kidney)

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HBsAg: Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (siglas del inglés hepatitis B surface antigen)

HeLa: Células epiteliales humanas de carcinoma cervical

HEp-2: Células de carcinoma epidermoide de laringe humano

HVA: Hepatitis viral aguda

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IC: Intervalo de confianza

IFN-g: Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IgA: Inmunoglobulina tipo A

IgG: Inmunoglobulina tipo G

IgM anti-VHA: Inmunoglobulina tipo M contra el virus de la hepatitis A

IgM anti-VHE: Inmunoglobulina tipo M contra el virus de la hepatitis E

IgM: Inmunoglobulina tipo M

IL: Interleucina

IL-4: Interleucina 4

IME: inmunomicroscopía electrónica

LD: Límite de detección

LDH: Deshidrogenasa láctica (siglas del inglés lactate deshidrogenase)

LLC-MK2: Células epiteliales de riñón de mono *rhesus*

LNRHV: Laboratorio Nacional de Referencia para las Hepatitis Virales

MAL: Marco abierto de lectura

ME: Microscopia electrónica

MEGA: siglas del inglés, MegAligment

MEM: Medio esencial mínimo

MRC-5: Células diploides de fibroblasto de pulmón humano

MT: Metiltransferasa

NANB-TE: Hepatitis no virus de la hepatitis A no virus de la B de transmisión entérica

nt: nucleótidos

OPD: orto-fenilenediamina (OPD, siglas en inglés ortho-phenylenediamine)

OR: Razón de disparidad (siglas del inglés odds ratio)

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino (siglas del inglés phosphate buffer saline)

PBS-T₂₀: Tampón fosfato salino con Tween 20

pMAL2: proteína del marco abierto de lectura 2

pMAL3: proteína del marco abierto de lectura 3

Pol: Polimerasa

Pro: Prolina

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa

RdRp: Polimerasa del ARN, ARN dependiente (siglas del inglés ARN dependent ARN polymerase)

RNC: Región no codificante

RP: Riesgo de prevalencia

Sen-V: Virus Sen

SFB: Suero fetal bovino

TA: Temperatura ambiente

TGI: Tracto gastrointestinal

Th2: Células T cooperadoras 2 (siglas en inglés, T cell helper 2)

TMB: Tetrametilbenzidina

TR-RCP: Trascrición reversa-Reacción en cadena de la polimerasa

VC: Valor de corte

VEB: Virus de Epstein Barr

VHA: Virus de la hepatitis A

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VHD: Virus de la hepatitis D

VHE: Virus de la hepatitis E

VHG: Virus de la hepatitis G

VTT: Virus transmitido por transfusiones

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

La hepatitis E es una infección vírica definida epidemiológicamente como de transmisión entérica, su principal vía de propagación está relacionada con el consumo de aguas y alimentos contaminados. Esta entidad tiene una prevalencia elevada en zonas tropicales y sub-tropicales con condiciones higiénico-sanitarias deficientes. No obstante, las técnicas serológicas y moleculares, han demostrado que en los países desarrollados existe una incidencia y prevalencia de esta infección por encima de lo esperado, encontrando su justificación en la existencia de un reservorio zoonótico (Saeed y cols., 1992; Aggarwal y Naik, 2009).

Dentro de la epidemiología de la hepatitis E existen varios grupos de riesgo tales como: los trabajadores de comunales, los agricultores que utilizan fuentes de abastos de aguas no tratadas y el personal de salud (Vildosola y cols., 2000). Dado el carácter zoonótico de esta enfermedad y siendo el cerdo su principal reservorio, los individuos que trabajan con ganado porcino y los veterinarios, son poblaciones en riesgo de infectarse con este virus (Meng y cols., 2002).

El virus de la hepatitis E (VHE) es el agente etiológico de la hepatitis E. Este virus se identificó en 1983, contiene es una cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva y pertenece taxonómicamente a la familia *Hepeviridae*, género *Hepevirus* (Emerson y Purcell, 2004). Esta enfermedad evoluciona de forma aguda y su espectro clínico va desde formas asintomáticas o subclínicas hasta cuadros graves y severos, principalmente en mujeres embarazadas (Reyes y cols., 1991). No tiene tratamiento específico y la profilaxis esta encaminada al mejoramiento de las medidas higiénico-sanitarias. Si bien, hay varios candidatos vacunales en fase de ensayos clínicos, no existe una vacuna comercialmente disponible para prevenir la infección (Shrestha y cols., 2007).

La hepatitis E puede ser diagnosticada por pruebas serológicas, mediante la identificación de anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) anti-VHE de clase M (IgM) y G (IgG). La IgM se eleva al final del período de incubación y desaparece entre cuatro y cinco meses después del

comienzo de los síntomas, siendo considerada el patrón de referencia internacional en el diagnóstico específico del virus (Chen y cols., 2005). La IgG se mantiene elevada por un período prolongado, pero algunos autores sugieren que no confiere inmunidad de por vida (Myint y cols., 2006). Las pruebas moleculares que detectan los ácidos nucleicos del virus en heces y suero, son utilizadas para complementar el diagnóstico (Panda y cols., 2007). Asimismo, como parte del diagnóstico virológico, el VHE fue aislado y propagado en varias líneas celulares, siendo la línea de carcinoma de pulmón humano (A549) y la línea celular diploide de pulmón humano fetal (2BS), las que mostraron gran sensibilidad al virus (Huang y cols., 1995). No obstante, es importante señalar que actualmente los únicos reportes que existen sobre aislamiento y propagación del VHE fueron realizados con cepas obtenidas del continente asiático y en condiciones de laboratorio diferentes (Huang y cols., 1992; Huang y cols., 1999; Le y cols., 2001). A pesar de esto no se disponen de datos que estén relacionados con el cultivo de cepas circulantes en el continente americano.

Hasta la fecha, existe un solo serotipo viral, por lo que la infección con una cepa confiere inmunidad contra todas las que circulan en el mundo. Sin embargo, la variabilidad genética detectada por secuenciación nucleotídica, permitió agrupar a los aislamientos virales en genotipos y subtipos. Los genotipos se identifican con números del 1 al 4 y los subtipos se definen por letras (a-f). El genotipo 1 está representado por el prototipo aislado en Birmania y las cepas relacionadas de Asia y África. El genotipo 2 incluye al prototipo “mexicano” y varias cepas aisladas en Nigeria y Namibia. En el genotipo 3 se encuentran las cepas aisladas en los Estados Unidos (EE.UU.) a partir de humanos, que se relacionan con aislamientos porcinos; cepas de Argentina, Grecia, Italia, España y de otros países desarrollados. El genotipo 4 está formado por los aislamientos identificados en China y Japón (Lu y cols., 2006).

En América Latina los estudios de caracterización molecular del VHE son aún insuficientes, sin embargo en la región se identificó por primera vez el genotipo 2 en una epidemia de transmisión fecal-oral en Ciudad de México en 1986, donde también se demostró recientemente la presencia del genotipo 3, confirmando que las fuentes de infección fueron múltiples en aquel momento (Munne, 2010). En otros países de la región se ha reportado el genotipo 3 en aislamientos obtenidos de humanos y de cerdos en EE. UU, Brasil y Argentina (Schlauder y cols., 2000; Munne y cols., 2006). En Canadá este genotipo sólo se encontró en cerdos (Ward y cols., 2008).

En el Caribe, específicamente en Haití, un hallazgo de Gambel y cols. avala la presencia del genotipo 1 en soldados de las Naciones Unidas recién llegados de Bangladesh (Gambel y cols., 1998).

Los estudios moleculares permiten estudiar filogenéticamente las características genotípicas de las cepas aisladas del VHE. Desde que los mismos se implementaron, se utilizan para comparar los aislamientos según su procedencia geográfica y el huésped del cual ha sido obtenido. De este modo podemos observar como las cepas del VHE pueden mantener una agrupación geográfica relativa, cuyo comportamiento se desconoce en nuestro medio (Rodríguez-Iglesias y Pérez-Gracia, 2003).

En Cuba, las primeras evidencias de la infección por el VHE fueron aportadas por un estudio realizado en la Ciudad de la Habana por Lemus y cols. (2000), donde se demostró serológicamente que el virus circulaba en la capital. En esta investigación se tomaron muestras de donantes de sangre y de casos esporádicos con hepatitis viral aguda (HVA) que acudieron a instituciones ubicadas en la Ciudad de la Habana, lo cual restringía los hallazgos obtenidos a una región determinada del país. Igualmente, solo se incluyeron personas con edades por encima de 20 años, por lo que los datos relacionados con el estado de inmunidad contra el VHE en niños y adolescentes no pudieron obtenerse en esta investigación.

Es importante señalar que al analizar los informes de la vigilancia de las hepatitis virales del Laboratorio Nacional de Referencia para las Hepatitis Virales (LNRHV) recopilados desde 1994-1998, se observó que existían brotes, casos esporádicos, graves y fallecidos por HVA en población abierta que se quedaban sin clasificar. Estos eran negativos a los marcadores para el diagnóstico de los virus de la hepatitis A (VHA), B (VHB) y C (VHC), que se utilizaron en aquel momento.

Por otra parte, la creciente colaboración internacional que existía en nuestro país con zonas geográficas distantes que incluyen la mayoría de los continentes, principalmente áreas de alta prevalencia del VHE (Panda y cols., 2007) y los datos recopilados de los estudios de prevalencia realizados en países de América Latina con los que tenemos un amplio intercambio, sugerían que probablemente casos esporádicos de HVA importados pudieran estar relacionados con este virus (Pujol y cols., 1994; Pérez y cols., 1996; Gandolfo y cols., 2003).

Finalmente, dado que el VHE sigue un patrón de transmisión similar al VHA (vía entérica), que tiene una elevada prevalencia en Cuba (Aguilar, 2004) y la especial atención que presta nuestro Sistema de Salud al Programa Nacional de las Hepatitis Virales, se consideró extremadamente necesario conocer la relevancia clínica y epidemiológica de la hepatitis E en Cuba, en aras de implementar y fortalecer la vigilancia nacional de esta entidad nosológica.

I.2 Hipótesis de trabajo

El VHE circula en Cuba produciendo infecciones asintomáticas y sintomáticas, lo que sugiere que más de un genotipo viral pudiera estar circulando en nuestro medio.

Para dar respuesta a esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

I.3 Objetivos

General

Proporcionar evidencias virológicas y epidemiológicas sobre la circulación del VHE en Cuba.

Específicos

1. Identificar si el VHE causa brotes, casos clínicos esporádicos, cuadros clínicos graves y fallecidos por HVA en Cuba, utilizando diferentes ensayos inmunoenzimáticos.
2. Conocer la prevalencia del VHE y los factores de riesgo asociados en población supuestamente sana.
3. Estimar la prevalencia del VHE y los factores de riesgo asociados en un grupo de trabajadores de granjas porcinas.
4. Evaluar la sensibilidad de varias líneas celulares para la multiplicación del VHE.
5. Determinar la relación filogenética de los aislamientos cubanos del VHE con otras cepas que circulan en el mundo.

I.4 Novedad científica

- Por primera vez se aíslan, identifican y se caracterizan genéticamente los aislamientos cubanos del VHE.
- Se identifican las líneas celulares capaces de permitir el crecimiento de aislamientos autóctonos del VHE *in vitro*, en particular por primera vez se reporta la sensibilidad de las células MRC-5 a la infección por el VHE, certificadas para la producción de vacunas convencionales.

- Se identifica la relación filogenética de los aislamientos autóctonos del VHE con los linajes que circulan en el mundo, lo que permite predecir la sensibilidad de los estudios de diagnóstico serológico.
- Por primera vez se identifica la circulación autóctona del genotipo 1 en América y de 2 genotipos en Cuba (genotipo 1 en población abierta y genotipo 3 en el grupo de riesgo).

I.5 Valor teórico y práctico.

Estos resultados hicieron posible informar por primera vez a las autoridades de salud, que en Cuba existen brotes de HVA producidos tanto por el VHE como por la co-circulación del VHE con el VHA y de fallecidos por fallo hepático fulminante (FHF) causados por el VHE. Además, se identificaron las formas asintomáticas de esta enfermedad capaces de perpetuar el virus en la comunidad. Se fortaleció la Vigilancia Nacional de las hepatitis virales al introducir el diagnóstico serológico y molecular del VHE; y contar con los reactivos biológicos (antígenos obtenidos por cultivo y sueros controles) necesarios para el diseño de un sistema de diagnóstico cubano que permita descentralizar el diagnóstico de esta infección viral. La identificación del genotipo del VHE que circula en nuestro país, permitirá el diseño de futuros candidatos vacunales contra este patógeno. A partir de estos estudios el LNRHV del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), cuenta con las herramientas necesarias para realizar estudios de la epidemiología molecular del VHE en Cuba y lo ubica a la altura de sus homólogos en países desarrollados.

Los resultados presentados aquí han sido objeto de reconocimientos y premios, se destacan dos *Resultados Relevantes del IPK (2002 y 2007)*; *Premio Relevante XV Fórum Municipal de Ciencia y Técnica*; y *Premio Destacado XV Fórum Provincial de Ciencia y Técnica, 2002*. Además, *Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba, 2008*; *Mención en el Concurso Central del Premio Anual de Salud, 2008* y *Ponencia Destacada en el Fórum Provincial de Ciencia y Técnica, 2008*.

Los diferentes estudios realizados formaron parte de tres tesis: *Diploma, 2006 y 2007* y *Maestría en Virología, 2002*. Asimismo, el proyecto de investigación "*Aislamiento, identificación y caracterización del virus de la hepatitis E en Cuba*", financiado por el Ministerio de Salud Pública (MINSAP), Universidad de Melbourne, Victoria, Australia y el Centro Internacional de Genética y Biotecnología de Nueva Delhi, India fue incluido en esta investigación.

I.6 Publicaciones y eventos científicos de la tesis en Anexo I.

II. CAPÍTULO DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Definición de Hepatitis Viral

Las hepatitis virales son un conjunto de enfermedades clínicamente semejantes entre sí, pero de etiología y epidemiología diferentes, en la cual el hígado es el principal sitio de replicación. Es causada por al menos 5 virus y se nombran: la Hepatitis viral tipo A, causada por el virus de la hepatitis A (VHA), la Hepatitis viral tipo B, causada por el virus de la hepatitis B (VHB), la Hepatitis viral tipo C, causada por el virus de la hepatitis C (VHC), la Hepatitis viral tipo D, causada por el virus de la hepatitis Delta (VHD) y la Hepatitis viral tipo E causada por el virus de la hepatitis E (VHE). Otros virus pueden mostrar marcado hepatotropismo, entre ellos están el virus de la Hepatitis G (VHG), el virus transmitido por transfusiones (VTT) y el virus SEN (V-SEN), los cuales son controversiales. Algunos virus pueden ocasionalmente infectar el hígado: se incluyen al Citomegalovirus humano (CMV), el virus de Epstein-Barr (VEB), el virus de la Rubéola, el virus de la Fiebre Amarilla, el virus del Herpes Simplex, algunos Enterovirus y otros virus exóticos. La hepatitis E es una enfermedad caracterizada por la inflamación aguda del hígado, como consecuencia de la infección por el VHE (Harrison, 1999).

II.2 Historia de la hepatitis E

La hepatitis E fue reconocida como una entidad clínica diferente a partir de 1980, cuando se empleó un ensayo serológico, sensible y específico para la detección de Ac al VHA (anti-VHA), con vistas a determinar el agente etiológico de epidemias de transmisión hídrica, que se produjeron en la India en la década del 50 del siglo pasado. Basada en la similitud clínica y epidemiológica, entre estas epidemias y las epidemias de hepatitis A; se pensó en un inicio que el VHA era el responsable de estos eventos epidemiológicos (Khuroo, 1980; Wong y cols., 1980). Además, otro hallazgo importante fue que todas las personas involucradas en estas epidemias tenían evidencia serológica de infección pasada contra el VHA, lo que sugería que las epidemias no eran producidas por el mismo virus. Evidencias adicionales asociadas a la

elevada mortalidad por hepatitis en mujeres gestantes fueron reportadas a finales del siglo XIX. Cockayne, en 1912, describió la asociación entre la “ictericia catarral” (hepatitis viral) y la “atrofia amarilla aguda” (hepatitis fulminante) y reportó la asociación de la hepatitis fulminante con la gestación (Cockayne, 1912).

De este modo, una enfermedad que epidemiológicamente se parecía a la hepatitis A, ocurría en Europa antes del cierre de ese siglo, pero se restringía a los países de menos desarrollo, patrón que se venía repitiendo para la hepatitis A. Parece ser que la enfermedad a la cual se aplicó originalmente el término de “hepatitis infecciosa”, no fue la hepatitis A, como se pensaba anteriormente, sino la hepatitis E, o una mezcla de ambas formas de hepatitis (Purcell y Ticehurst, 1988).

La primera evidencia experimental directa de la existencia de otro agente responsable de hepatitis de transmisión hídrica, fue reportada, por Balayan y cols. quienes describieron la transmisión exitosa de hepatitis fecal-oral a voluntarios, utilizando una suspensión de heces de un paciente que residía en Tashkent, Uzbekistán; el cual presentaba una enfermedad infecciosa similar a la hepatitis A (Balayan y cols., 1983). Los voluntarios desarrollaron una hepatitis clínica severa a los 36 días de exposición al agente infeccioso. Las partículas virales fueron identificadas por inmunomicroscopía electrónica (IME) en las heces colectadas de los voluntarios de 28 a 45 días después de la ingestión. Además, se reportó la transmisión en monos *cynomolgus* inoculados con muestra fecal proveniente del mismo paciente y partículas similares a virus fueron recuperadas de sus heces.

Esta forma de hepatitis no A no B fue conocida como hepatitis no A no B transmitida entéricamente. La IME y la transmisión a primates fue la única forma de estudiar la hepatitis entérica no A no B, hasta que en 1990, Reyes y cols. clonaron y secuenciaron exitosamente parte del genoma del virus (Reyes y cols., 1990). Actualmente se conocen las secuencias nucleotídicas completas de varios aislamientos del virus y fue re-nombrado como el VHE.

II.3 Agente infeccioso: el VHE

II.3.1 Clasificación

Sobre la base de la detección de una partícula en forma de virus de 27 nanómetros (nm) en muestras de heces de brotes de hepatitis E y el hallazgo de un genoma de 7,6 kilobases (kb), en un inicio se pensó que pertenecía a la familia *Picornaviridae* (Balayan y cols., 1983). Sin embargo, con los estudios de comparación de secuencia nucleotídica y antigenicidad del VHE con el

virus salvaje del VHA y el poliovirus, se demostró que el VHE era diferente a los miembros de la familia *Picornaviridae* (Krawczynski, 1993).

Teniendo en cuenta su similitud morfológica con el virus Norwalk, el VHE fue provisionalmente ubicado en la familia *Caliciviridae*. Los estudios subsecuentes de microscopía electrónica (ME) y propiedades físico-químicas indicaron que el virus podría ser un Calicivirus. Esto estuvo respaldado por el análisis inicial del genoma viral, que reveló que el virus poseía tres marcos abiertos de lectura (MAL). Las proteínas no estructurales fueron localizadas en el extremo 5', las estructurales en el extremo 3' del genoma y los ARN mensajeros subgenómicos fueron detectados en las células hepáticas infectadas. No obstante, el orden de los genes del VHE difería de los Calicivirus.

Hasta ese momento la secuencia del VHE no tenía una relación cercana con ninguno de los virus identificados y se observó cierta semejanza con la secuencia del virus de la Rubéola. Además, el uso de codones lo asociaba bastante a este virus, que pertenece a la familia *Togaviridae* (Koonin y cols., 1992). Finalmente, luego de varios intentos de clasificación el Comité Internacional de Taxonomía Vírica ubicó al VHE como el único miembro del género *Hepevirus*, en la familia *Hepeviridae* (Mayo, 2005).

II.3.2 Serotipos y heterogeneidad genética

Aunque se ha identificado que existe una variabilidad genética entre las cepas del VHE, las evidencias de heterogeneidad serológica son limitadas, por lo que todos los aislamientos estudiados hasta la fecha pertenecen a un solo serotipo (Khudyakov y cols., 1993; Khudyakov y cols., 1994a; Panda y cols., 2007). Otros datos que apoyan estos hallazgos, son los experimentos de reto cruzado en primates con cepas diversas del VHE; los que indicaron que existía una protección cruzada tras la infección. La respuesta inmune humoral dirigida contra epítopes de la proteína de la cápside, presumiblemente estuvo relacionada con esta seroprotección (Tsarev y cols., 1994; Ghabrah y cols., 1998).

La secuencia genómica del VHE parece ser relativamente estable, aunque el genoma de cepas procedentes de áreas geográficas distantes puede variar. La estabilidad genómica ha sido comprobada por los estudios de identidad nucleotídica de cepas aisladas en un brote, donde se detectó que en países seriados en monos *cynomolgus*, no se produjeron desplazamientos genéticos importantes. No obstante, cuando existe una variabilidad genética considerable entre un aislamiento en comparación con otros de un mismo brote, probablemente se deba a casos

esporádicos de hepatitis E que son diagnosticados en el curso del mismo (Yin y cols., 1994; Panda y cols., 2007).

La secuenciación nucleotídica parcial y completa de varias cepas del VHE de Asia, África, Europa y América ha permitido la identificación de 4 genotipos del virus; donde se agrupan todos los aislamientos identificados hasta el presente (Panda y cols., 2007).

Las comparaciones filogenéticas y el análisis de las secuencias nucleotídicas, de las regiones estructurales y no estructurales del VHE, han definido al menos 9 grupos diferentes a partir de las cepas de referencia (Wang y cols., 2002). El grupo 1 está representado por el prototipo aislado en Birmania (Bur-82) y las cepas relacionadas de Asia (Hyd-87, I2, Np1) y África (Marrueco F12, T3) (Tam y cols., 1991; Chatterjee y cols., 1997; Aggarwal y cols., 1999; van Cuyck y cols., 2003). El grupo 2 incluye el prototipo mexicano (M1) y varias cepas aisladas en Nigeria (Nig7, Nig9); Namibia, Egipto y Chad (Buisson y cols., 2000; Maila y cols., 2004; Nicand y cols., 2005). En el grupo 3 se incluyen los aislamientos de los EE.UU. (US1, US2) obtenidos a partir de humanos (Schlauder y cols., 1998; Erker y cols., 1999), que se relacionan con cepas porcinas (swUS1, swJL325) (Meng y cols., 1997b). El grupo 4 está formado por cepas aisladas en Italia (It1) similares a cepas porcinas aisladas en Nueva Zelanda (swNZ) (Schlauder y cols., 1999; Garkavenko y cols., 2001). El grupo 5 lo forman aislamientos del VHE obtenidos en Grecia (Gr1) y España (Sp1, Sp2, BNC3, BNC4), estas últimas a partir de humanos y agua negras procedentes de mataderos de origen porcino (van der Poel y cols., 2001). El grupo 6 contiene otras cepas aisladas en Grecia (Gr2), mientras que el grupo 7 incluye cepas procedentes de Argentina (Ar1, Ar2) y Austria (Au1) (Schlauder y cols., 2000; Worm y cols., 2000). Los nuevos aislamientos chinos T11, T21 y HE-JA1 representan los grupos 8 y 9, respectivamente (Wang y cols., 2000; Wang y cols., 2001a; Wang y cols., 2001b; Nishizawa y cols., 2003).

Estos grupos se encuentran incluidos en los 4 genotipos mayores. Así, el genotipo 1 se corresponde con el grupo 1, el genotipo 2 incluye al grupo 2, el genotipo 3 engloba los grupos 3, 4, 5, 6 y 7 y por último en el genotipo 4 están los grupos 8 y 9 (Pérez-Gracia y Rodríguez-Iglesias, 2003).

La variabilidad genética del VHE no solo ha permitido identificar los genotipos, sino la presencia de subtipos dentro de un genotipo y la existencia de una diversidad nucleotídica menor entre los aislamientos que pertenecen a un mismo subtipo. Existen 24 subtipos

designados alfabéticamente, el genotipo 1 posee 5 subtipos (a-e), el genotipo 2, 2 subtipos (a-b), mientras que los genotipos 3 y 4, fueron subdivididos en 10 (a-j) y 7 (a-g) subtipos, respectivamente (Lu y cols., 2006).

Según la comparación del genoma completo de 75 aislamientos del VHE, la diferencia de nucleótidos entre los genotipos es de 23,6-27,7%, entre subtipos oscila de 6.2-18% y para los aislamientos de 2-10,2%. La divergencia nucleotídica es mayor para las cepas que pertenecen al genotipo 3 y 4, mientras que los aislamientos del genotipo 1 y 2 parecen ser más conservados (Lu y cols., 2006). Se observa que los genotipos 3 y 4 presentan características clínico-epidemiológicas distintas a los 1 y 2, por lo que se ha sugerido que estos últimos son más virulentos (Teo, 2007).

En esta década, la caracterización molecular de muestras provenientes de un brote en México demostró que no sólo estaba involucrado el genotipo 2, sino también el genotipo 3, confirmando que las fuentes de infección fueron múltiples (Munne, 2010). El genotipo 3 fue identificado en variantes humanas y de cerdos en EE.UU., Brasil y Argentina (Cooper y cols., 2005; Nakamura y cols., 2006; Munne, 2010). En Canadá este último genotipo se encontró en cerdos (Ward y cols., 2008).

Recientemente, la caracterización de las variantes aviares del VHE, que se segregan en tres subgrupos según su origen geográfico (Australia, Europa o EE.UU.) y que sólo tienen una homología del 50% con las cepas aisladas de mamíferos, reclaman que se les asigne un nuevo género a cada una dentro de la familia *Hepeviridae* (Bilic y cols., 2009; Johnne y cols., 2009).

II.3.3 Morfología y propiedades físico-químicas

El VHE es un virus no envuelto, con simetría icosaédrica, las partículas son esféricas con espículas y depresiones en forma de copa en su superficie similar a los Calicivirus; pero distinguible de la superficie lisa característica de los Picornavirus (VHA) (Balayan y cols., 1983; Ticehurst, 1991) (Figura II.1). El diámetro del VHE es de aproximadamente de 32 a 34 nm de diámetro, se ha observado que en los viriones derivados de heces y bilis de animales infectados con el virus, el tamaño varía de 27 a 34 nm y raramente 38 nm; con una media de 32,3 nm (Bradley y cols., 1988). La variabilidad en el diámetro del VHE reportada por los laboratorios, pudiera estar relacionada con la digestión proteolítica del virus en su paso a través del intestino, la sensibilidad a los ciclos de congelación y descongelación y a las condiciones de conservación de las preparaciones de heces (Panda y cols., 2007).

El VHE posee una densidad de flotación de 1,35 g/cm³ (Balayan et al., 1983) y 1,39 a 1,40 g/cm³ en cloruro de cesio (CsCl) (Fix y cols., 2000). En tanto, la densidad de flotación de las partículas de 32 a 34 nm es de 1,29 g/cm³ en tartrato de potasio/glicerol y el coeficiente de sedimentación de 183S (Balayan y cols., 1983; Bradley y cols., 1988). Las partículas defectivas del VHE sedimentan a 165S.

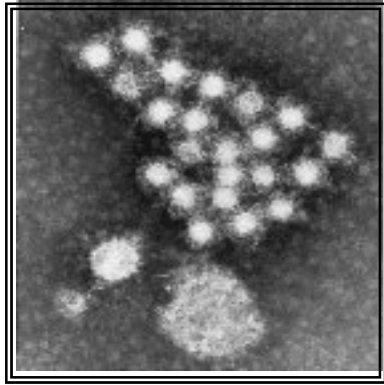


Figura II.1. Imagen de IME del VHE.

Fuente: Tomado del Field Virology 2007 (Emerson y Purcell, 2007).

II.3.4 Genoma y proteínas

El virión está compuesto por un genoma de ARN lineal monocatenario, de polaridad positiva y de 7,6 kb de longitud (Asher y cols., 1990; Tam y cols., 1991; Kabrane-Lazizi y cols., 1999). Además, posee una región no codificante (RNC) en el extremo 5' de 27 a 35 nucleótidos (nt), con una caperuza (Kabrane-Lazizi y cols., 1999). A continuación, le sigue el MAL1 de 5073 a 5124 nt y un segundo MAL (MAL2), que consiste en 1977 a 1980 nt, contiguo al MAL2 se ubica la región 3' no codificante con 65 a 74 nt, la que termina con 150 a 200 residuos de adenosina. El MAL3 de 366 a 369 nt en longitud que se solapa con el MAL1 en su extremo 5' y se extiende 325 a 328 nt por encima del MAL2. De esta forma, el VHE posee 3 MAL que son utilizados por el virus (Purcell y Emerson, 2001) (Figura II.2).

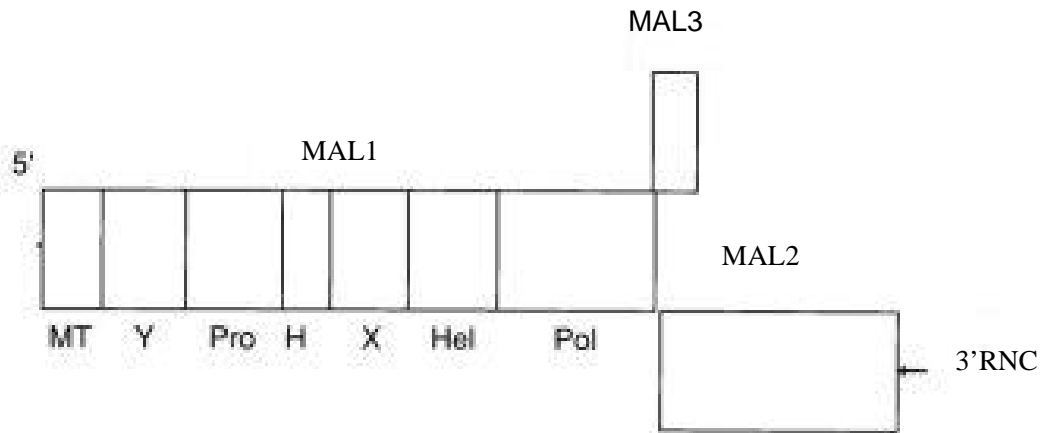


Figura II.2. Estructura genómica del VHE.

Fuente: Tomado del Field Virology 2007 (Emerson y Purcell, 2007).

A partir del MAL1 se traduce la poliproteína no estructural que posee 1693 aminoácidos (aa) e incluye la metiltransferasa (MT), una proteasa cisteína similar a la papaina (Pro), una ARN helicasa (Hel) y la ARN polimerasa ARN dependiente (Pol); junto a otros dominios proteicos (H,X,Y) con función desconocida (Tam y cols., 1991; Koonin y cols., 1992). El MAL2 codifica la poliproteína mayor de la cápside vírica y el MAL3 una fosfoproteína muy pequeña asociada al citoesqueleto (Purcell y Emerson, 2001).

Las proteínas identificadas en el MAL1 tienen las siguientes funciones (Panda, 2000; Magden y cols., 2001):

- Metiltransferasa: La presencia en el genoma del VHE de una estructura de caperuza con una guanina metilada en posición 7 (cap m⁷G) en el extremo 5' del ARN confirma el papel funcional de esta proteína.
- Proteasa similar a la papaina: esta involucrada en el procesamiento co y post-traduccional de la poliproteína viral no estructural y estructural.
- ARN helicasa: desenrolla la estructura terciaria del ARN, necesario para la replicación del genoma viral.
- ARN polimerasa ARN dependiente: participa en el proceso de replicación viral e interactúa con el extremo 3' no codificante, para dirigir la síntesis de la cadena complementaria del ARN.

La proteína estructural es producida por el MAL2 como un polipéptido de 559 a 660 aa, que tiene un dominio hidrofóbico en la porción amino terminal, seguida de una región rica en aa básicos, lo que confirma que la proteína del MAL2 (pMAL2) esta involucrada en la encapsidación del genoma, neutralizando el ARN cargado negativamente (Purdy y cols., 1993). La pMAL2 posee sitios potenciales de glicosilación, demostrados por análisis mutacional (Zafrullah y cols., 1999).

La proteína del MAL3 (pMAL3) codifica un polipéptido de 123 aa cuya función no ha sido definida (Tam y cols., 1991). Aunque, se ha observado que se une al citoesqueleto, por lo que pudiera participar en el ensamblaje de la nucleocápside viral (Zafrullah y cols., 1997). No existen evidencias de que la pMAL3 forme parte del virión maduro, sin embargo se considera que sea una proteína estructural del virus (Panda y cols., 2007).

II.3.5 Antígenos y estructura antigénica

Los principales epítopes del VHE se encuentran en el MAL2 y 3. Los antígenos del MAL2 son altamente conservados, en contraste con los del MAL3 que son más heterogéneos (Yarborough y cols., 1991). Por tanto las pruebas de diagnóstico serológico, que utilizan pMAL2 son ampliamente utilizadas y reactivas, mientras que las que utilizan antígenos del MAL3 parecen ser más específicas de cepas (He y cols., 1993; Khudyakov y cols., 1994a).

Epítopes lineales de células B fueron identificados en las proteínas derivadas de los tres MAL del VHE, no obstante los estuches que utilizan proteínas no estructurales del virus no han sido útiles en el diagnóstico (Kaur y cols., 1992). Los antígenos conformacionales presentes en el MAL2 y 3 son responsables de una respuesta inmune humoral potente contra el VHE (Li y cols., 1997a). Estos epítopes son neutralizantes y están localizados entre los aa 449 y 607, de la pMAL2 (Meng y cols., 2001; Zhou y cols., 2004). Se ha demostrado en ensayos *in vitro* que los Ac inducidos contra el péptido 452-617 del MAL2 son capaces de neutralizar tres genotipos (1-3) del VHE, lo que sugiere la existencia de un epítope neutralizante común (Schofield y cols., 2003). La pMAL2 y 3 fueron expresadas en *Escherichia coli* (*E. coli*) y en células de insectos para detectar anti-VHE por Western blot y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA siglas del inglés, enzyme linked immunoabsorbent assays) (Li y cols., 1997a; Mast y cols., 1998).

II.3.6 Estabilidad del virus

Aunque no se ha evaluado con exactitud, el VHE parece que es inactivado con los mismos agentes que inactivan al VHA, siendo más lábil al calor que este último. Además, la supervivencia del virus en el tracto intestinal sugiere que es relativamente estable a las

condiciones ligeramente ácida y alcalina. Otros autores exploraron la antigenicidad viral y demostraron que es afectada por pH ácidos (≤ 3) y temperatura de 56 grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos (min.) (Huang y cols., 1999b). La estabilidad del VHE se altera en presencia de concentraciones elevadas de sales, incluyendo el ClCs (Panda y cols., 2007).

Como partícula de ARN no envuelta, el VHE mantiene su infectividad al exponerse al trifluorotricloroetano (Ticehurst, 1991), al éter al 20%, cloroformo y Freón. Este microorganismo se inactiva en la autoclave (121°C durante 20 min.), por radiación ultravioleta (1.1 W a una profundidad de 0,9 cm durante 1 min.), por formalina (1:4 000 durante 72 horas a 37°C), o compuestos que contienen cloro, como el hipoclorito de sodio (10 mg/L a 20°C de 5 a 15 min.), por β -propiolactona (0,03% durante 72 horas a 4°C), por permanganato de potasio (30 mg/L durante 5 min.), por yodo (3 mg/L durante 5 min.), y con cloro (10 a 15 partes por millón durante 30 min.) (Tam y cols., 1991; Emerson y cols., 2005).

II.3.7 Replicación viral

El evento inicial del proceso de replicación del VHE es la unión del virus a su receptor, ubicado en los hepatocitos, en las células de los conductos biliares y del intestino. En modelos de ganado bovino infectados existen otros sitios de replicación extrahepáticos como los nódulos linfáticos, el bazo y las células mononucleares de sangre periférica (Williams y cols., 2001).

Existe un modelo del ciclo replicativo de este virus basado en las homologías de los dominios con otros virus de ARN, de polaridad positiva, perfectamente caracterizados (Anexo II):

- I. Después de la unión del virus a un receptor aún no identificado, sobre la superficie de las células hepáticas, el VHE se interna y pierde la cápside en el citoplasma por mecanismos desconocidos.
- II. El ARN genómico de sentido positivo, es traducido a una poliproteína no estructural que es codificada por MAL1. Esta es escindida en unidades individuales funcionales por proteasas celulares que incluyen metiltransferasas, proteasas, helicasas y polimerasas.
- III. La polimerasa generada puede utilizar el ARN como molde para la síntesis de ARN intermediarias de cadenas negativas, necesarias para la replicación (Jameel, 1999). Se ha postulado que esta replicación se inicia mediante la interacción de esta replicasa con el extremo $3'$ no codificante, probablemente en una asociación con las proteínas del hospedero (Agrawal y cols., 2001). Por su homología con las secuencias de los Alfavirus (mostrado como una región en forma de caja sobre el ARN de cadena negativa), se ha propuesto que las

cadena de ARN positivas, genómicas y sub-genómicas son sintetizadas en la región en forma de caja sobre los ARN intermediarios de cadena negativa.

- IV. Los ARN subgenómicos de 3,7 y 2,0 kb son traducidos en proteínas estructurales codificado por MAL2 (pMAL2) y posiblemente pMAL3 codificado por MAL3 respectivamente. Este paso ocurre en la etapa tardía de la replicación.
- V. Las subunidades de proteínas estructurales se ensamblan formando una cápside, que incluye ARN genómico de cadena positiva para formar la progenie viral; las que pueden infectar otras células o son excretadas como virus infecciosos. Las proteínas codificadas por MAL2 y MAL3 pueden jugar otras funciones, pero todavía se esperan por pruebas experimentales, para confirmar su papel en el ciclo de replicación viral (Jameel, 1999).

II.3.8 Propagación en cultivos celulares

En la actualidad no se cuenta con un sistema celular potente capaz de mantener de forma prolongada y eficiente el crecimiento *in vitro* del VHE, por lo que resulta difícil su disponibilidad para la producción de vacunas y para profundizar en los estudios básicos de replicación viral. Varios grupos de investigadores han intentado de forma independiente obtener la adaptación del VHE en líneas celulares humanas (A549, BEL7402, HeLa, KMB17, PLC/PRF/5 y 2BS) y de primates no humanos (LLC-MK2, FRhK4 y Vero); sin resultados concluyentes (Huang y cols., 1992; Huang y cols., 1999b; Le y cols., 2001). El primer aislamiento del virus se reportó en la línea FRhK4 co-cultivada con células de riñón de mono *cynomolgus*, infectadas con una suspensión de heces de un paciente con hepatitis E (Kazachkov y cols., 1992). Además, se constató que las líneas celulares 2BS, A549, PLC/PRF/5, LLC-MK2 y Vero fueron sensibles al virus (Huang y cols., 1992; Kazachkov y cols., 1992; Meng y cols., 1997b). El efecto citopático (ECP) como marcador de replicación viral no aparece constantemente en estos sistemas celulares estudiados. La detección del ácido nucleico por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP), de los antígenos del VHE por inmunofluorescencia (IF) y del virión por ME, ha permitido identificar la propagación del VHE en estos cultivos celulares (Tam y cols., 1997; Huang y cols., 1999a). La infección de hepatocitos humanos y de primates no humanos fue prevenida por la neutralización viral con sueros de títulos elevados de anti-VHE (Tam y cols., 1997; Meng y cols., 1998a).

La línea celular más utilizada para propagar el VHE han sido las células A549, donde los efectos que se observan en la monocapa están dados por un aumento de la refringencia, redondeamiento y desprendimiento de las células de la superficie de cultivo (Huang y cols., 1999b).

II.3.9 Rango de hospederos e infección experimental en animales

Varias especies de primates del viejo (chimpancés, *Macaca*) y nuevo (*Tamarins*, monos lechuza) mundo fueron utilizadas para los estudios de transmisión del VHE (Purcell y Emerson, 2001). En condiciones de laboratorio, se indujo la hepatitis E en *Macaca rhesus* y monos *cynomolgus* con buenos resultados; siendo la vía intravenosa más sensible que la oral. Se observó que la enfermedad en estos primates fue clínicamente semejante a la de los humanos (Tam y cols., 1997).

Diversas especies de animales son susceptibles a la infección por el VHE o agentes serológicamente relacionados con el virus (Meng, 2000). Estos incluyen cerdos, ciervos, caballos, ostras, jabalíes, conejos, gallinas y mangostas, donde la presencia del virus fue demostrada por aislamiento directo (Meng y cols., 1997b; Meng y cols., 1998c; Meng, 2009).

El rango de hospederos para el VHE esta determinado por las diferencias entre las cepas, los genotipos 1 y 2 se detectaron en humanos, en tanto los genotipos 3 y 4, fueron aislados en humanos y animales (Lu y cols., 2006). La transmisión del genotipo 1 del VHE a ganado porcino no se ha logrado, mientras que en primates no humanos fue confirmada por varios investigadores (Tam y cols., 1996; Huang y cols., 2004).

II.4. La Enfermedad: Hepatitis E

II.4.1 Patogénesis

Las evidencias sugieren que el VHE, similar a los otros virus de las hepatitis es no citopático, por lo que las manifestaciones clínicas y el daño hepático están determinados por la respuesta inmune del hospedero (Panda y cols., 2007).

El virus excretado en las heces de humanos y de animales infectados se supone que sea la fuente primaria de virus infeccioso en el ambiente. La infección natural con el VHE, usualmente sigue a la ingestión del virus presente en material contaminado con heces. El sitio primario de replicación no ha sido identificado, por lo que se presume que sea en el tracto gastrointestinal (TGI) y que alcance el hígado por la vena porta. El virus se replica en el citoplasma de los hepatocitos, para ser liberado hacia el torrente sanguíneo y la bilis

(Krawczynski y Bradley, 1989). En estudios realizados con voluntarios infectados por la ingestión oral del virus, la viremia fue detectada por TR-RCP a partir de los 22 días post-infección hasta una semana después del comienzo de los síntomas, o sea a los 30 días posterior a la exposición. Las partículas virales se observaron por IME a los 34 días y las enzimas hepáticas hicieron su pico a los 46 días de haber estado en contacto con el virus, con una recuperación clínica y bioquímica completa (Chauhan y cols., 1993).

Los anticuerpos de tipo IgM e IgG se detectan tempranamente en el curso de la enfermedad, la IgM anti-VHE hasta seis meses después de la infección; mientras que la IgG anti-VHE es relativamente de larga duración y de naturaleza protectora (Khuroo y cols., 1993; Myint y cols., 2006).

II.4.2 Patología

Los cambios histológicos en pacientes con hepatitis E están relacionados con una necrosis focal con infiltración mínima de células de Kuffer y leucocitos polimorfonucleares. Las lesiones locales son similares a una hepatitis tóxica medicamentosa. En el curso de la hepatitis aguda se observa una colestásis, inflamación lobular y degeneración de grado variable. Sin embargo, alrededor de la mitad de los pacientes tienen cambios morfológicos distintivos dados por una inflamación acompañada de necrosis focal; marcada colestásis intrahepática con tapones de bilis en los lóbulos. Estos tapones conducen a una formación pseudoductular con infiltración de células mononucleares (Ramalingaswami y Purcell, 1988). Hasta el momento, se desconoce si la infección por VHE deja secuelas y manifestaciones extrahepáticas (Emerson y Purcell, 2007).

II.4.3 Respuesta inmune

Los estudios en chimpancé, monos *rhesus* y en voluntarios humanos infectados experimentalmente, permitió definir el curso clínico y serológico de la infección por el VHE. En cuanto a la respuesta de Ac, la IgM anti-VHE aparece en el suero, desde el final del período de incubación y son detectadas de 3 a 6 meses después del inicio de los síntomas (Chauhan y cols., 1993). La IgG anti-VHE de naturaleza protectora puede ser detectada tempranamente y su incremento se produce desde la fase aguda, para luego decrecer durante la convalecencia. Varios estudios de seroprevalencia del VHE han reportado que la IgG persiste hasta 13 años posterior a la infección, por lo que la posibilidad de re-infecciones no puede ser excluida (Clayson y cols., 1995a; Aggarwal y Naik, 1997; Jameel, 1999). Por otra parte, en el curso de la

hepatitis E se produce IgA, la que es usada como marcador de infección reciente por muchos investigadores (Takahashi y cols., 2005; Tian y cols., 2006).

La respuesta inmune celular al VHE no ha sido bien caracterizada, en los primeros estudios realizados por Srivastava y cols. (2007) se observó una expansión de linfocitos T cooperadores CD 4+ (clúster de diferenciación) al ser estimulados con pMAL2, en pacientes, comparado con los controles. No obstante, la proporción de células CD4+/CD69+ y CD8+/CD69+ citotóxicas productoras de interferón gamma (IFN-g); factor de necrosis tumoral alfa (FNT-a) e interleucina 4 (IL-4) no se modificó posterior a la estimulación *in vitro*. Los experimentos de activación policlonal con miristato acetato de forbol e ionomicina mostraron una disminución del repertorio de células T productoras de IFN-g y FNT-a en pacientes infectados por el VHE. La limitada reactividad observada en el compartimiento periférico, pudiera ser consecuencia de la migración y secuestro de células inmune al hígado. Por otra parte, los ensayos de linfoproliferación demostraron que las células mononucleares de pacientes con hepatitis E, fueron capaces de proliferar cuando se estimularon con péptidos del MAL2 y 3. La expansión clonal frente a los péptidos del MAL2 fue restringida al alelo 010X del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) DR1 (Aggarwal y cols., 2007).

II.4.4 Cuadro clínico

El cuadro clínico de la hepatitis E puede ser extremadamente variable y va desde formas inaparentes o subclínicas, identificadas por las alteraciones bioquímicas o serológicas, hasta las formas más severas con ictericia, que pueden evolucionar al FHF (Smith, 2001). Los síntomas referidos por el paciente pueden ir desde leves y transitorios, hasta severos y prolongados. Las formas graves y fulminantes se observan principalmente en mujeres embarazadas, las que pueden alcanzar hasta un 25% de letalidad en el tercer trimestre de gestación (Herrera, 1993).

Después de un periodo de incubación de 15 a 60 días y como promedio 32 días, comienza la fase pre-ictérica que dura de 1 a 10 días (Khuroo, 1980; Balayan, 1983). Los pacientes infectados desarrollan síntomas y signos clínicos, semejantes a otras hepatitis virales. Estos incluyen: malestar general; anorexia; fiebre; dolor abdominal; nauseas; vómitos y hepatomegalia. Otros síntomas referidos son: diarrea, prurito, artralgia y erupción cutánea (Panda y cols., 2007). La fase ictérica se inicia abruptamente, con coloración amarilla de piel y mucosas, orinas oscuras y heces claras; en los casos no complicados dura de 15 a 40 días y la recuperación total tiene lugar en un mes. La ictericia se hace aparente cuando la bilirrubina

excede de 2,0 a 4,0 mg/dL (Emerson y Purcell, 2007; Radha Krishna y cols., 2009). La colestásis es un rasgo predominante en esta hepatitis y debe ser diferenciada de la obstrucción de los grandes conductos biliares (Khuroo, 1980).

En infantes se ha descrito dentro del espectro clínico de la HVA causada por el VHE, la presencia de peritonitis bacteriana espontánea, hipertensión portal y ascitis precipitada por la hipo-albuminemia asociada a la malnutrición (Poddar y cols., 2002).

La hepatitis E similar a lo que ocurre en la hepatitis A, no progresa a la cronicidad. Sin embargo, investigaciones recientes avalan que en pacientes en programas de trasplante y bajo terapia inmunosupresora, el ARN del VHE fue detectado por un periodo de tiempo prolongado (Navaneethan y cols., 2008). Haagsma y Kamar describieron que el VHE fue el responsable de la hepatitis crónica desarrollada en 10 de los 16 pacientes estudiados (Haagsma y cols., 2008; Kamar y cols., 2008).

II.4.5 Tratamiento

En la mayoría de los casos la infección por el VHE es autolimitada y es seguida por una recuperación completa del paciente, por lo que se orienta tratamiento de sostén. No es necesario el descanso forzado y prolongado, la terapia de apoyo está dirigida al alivio de los síntomas, que a veces son altamente estresantes. La dieta debe ser conforme al apetito del paciente, supliendo adecuadamente la cantidad de proteínas y calorías (Emerson y Purcell, 2007). Además, se debe evitar la ingestión de medicamentos hepatotóxicos y el consumo de alcohol. En la hepatitis fulminante es importante el reconocimiento temprano y manejo apropiado de las complicaciones del paciente, con el propósito de mantener las funciones vitales. El trasplante hepático parcial o total es una opción para el tratamiento de la insuficiencia hepática (Hussaini y cols., 1997).

II.5 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la hepatitis E se debe sospechar en brotes de hepatitis de transmisión fecal-oral que se presenten en países subdesarrollados, en particular si la enfermedad es más severa en mujeres embarazadas. En países desarrollados, no se debe descartar esta entidad en personas con sintomatología de HVA que hayan regresado de áreas endémicas. Las técnicas de laboratorio clínico y virológico permiten realizar el diagnóstico de esta infección viral. La exposición al virus puede detectarse directa o indirectamente en muestras de suero, bilis, hígado y heces (Pérez-Gracia y Rodríguez-Iglesias, 2003).

II.5.1 Laboratorio clínico

Las pruebas de funcionamiento hepático como la cuantificación de la alanina aminotransferasa (ALAT), la aspartato aminotransferasa (ASAT) y la bilirrubina complementan los datos clínicos, patológicos y epidemiológicos. Los estudios clínicos han demostrado que la elevación de los niveles de la ALAT sérica ocurre en forma de pico único, que aparece o coincide con el comienzo de la ictericia (Khuroo y cols., 1994). Aunque en algunos pacientes un patrón bifásico de elevación de las enzimas ha sido observado (Balayan, 1991).

En la hepatitis E, los valores de la ALAT no se elevan tanto como en la hepatitis A, raramente alcanzan más de 1 000 unidades por litro (U/L) y casi nunca son menores de 100 U/L. Estas se elevan durante el período de incubación tardío y se mantienen elevadas de forma constante una vez que aparecen los síntomas, alcanzando su máximo la semana siguiente a la aparición de la ictericia (Zhuang, 1991). El Centro para el Control de Enfermedades (CDC, siglas en inglés Center for Diseases Control) de Atlanta, estima que en la infección aguda las cifras anormales de ALAT y ASAT deben ser 2,5 veces por encima del valor normal (CDC, 2000). Los niveles de ALAT son significativamente más altos que los de la ASAT en la hepatitis no complicada resultando en un elevado radio ALAT/ASAT (mayor de 1,4). Cuando se desarrolla una necrosis severa, se libera ASAT mitocondrial en la sangre (Arús, 1998; CDC, 2000). En contraste, la disminución rápida de valores enzimáticos, inversión del índice ALAT/ASAT, con valores de bilirrubina que aumentan y una enfermedad clínica severa, constituyen eventos que indican un daño hepático grave y ensombrecen el pronóstico (Padrón, 1998). La relación ALAT/ASAT se ha empleado como índice pronóstico de la HVA (Zhuang, 1991).

La bilirrubina sérica total usualmente se eleva en el período de estado de la enfermedad y permanece por debajo de 10 mg/dL. Otros exámenes como la fosfatasa alcalina (FA) sérica, valor que puede incrementarse en las formas colestásicas de la enfermedad, que aparecen con frecuencia en la hepatitis E. Por otra parte, también se elevan los lípidos plasmáticos totales, triglicéridos, fosfolípidos y lipoproteínas en los pacientes con HVA y forman parte del patrón bioquímico de lesión del hepatocito. Los ácidos biliares séricos se elevan y su determinación en ayunas y post-pandrial puede ser útil para evaluar la evolución de las hepatitis aguda. Este puede utilizarse como parámetro sensible para definir la recuperación completa de la lesión hepática aguda (Arús, 1998).

II.5.2 Laboratorio virológico

El diagnóstico virológico es quien verdaderamente nos ayuda a comprobar la sospecha clínica y epidemiológica de la etiología de las hepatitis virales. Las técnicas diagnósticas están encaminadas a la detección del virus o sus componentes y la detección de Ac circulantes en respuesta a la entrada del agente. Los eventos virológicos, serológicos y clínicos subsecuentes a la exposición al VHE se muestran en el Anexo III.

La IME y la prueba de bloqueo de Ac fluorescentes, a pesar de ser poco sensibles, fueron los métodos utilizados en un inicio para el diagnóstico de la hepatitis E. Por su parte, la RCP ha demostrado ser una técnica sensible y específica, para detectar el genoma viral en bilis, sangre, heces y tejido hepático, pero por el costo de la misma no puede utilizarse para el diagnóstico de rutina. Los ensayos inmunoenzimáticos (EIE) constituyen una herramienta diagnóstica fácilmente disponible para la detección de la IgM e IgG anti-VHE. La IgM se mantiene como marcador de elección para diagnosticar infección aguda, mientras que la IgG anti-VHE se utiliza para estudios sero-epidemiológicos (Jameel, 1999).

Inmunomicroscopía electrónica: La IME permite detectar partículas virales de 27 a 34 nm directamente de las heces de un paciente infectado y los Ac contra el VHE según sea el diseño del ensayo, siendo los sueros de la fase aguda más reactivos que los convalecientes. La positividad fue detectada solo en un 10% de los casos (Ticehurst y cols., 1992b). Esta técnica aunque es específica tiene desventajas como medio diagnóstico (Goldsmith y cols., 1992), ya que requiere de un observador experimentado, tiempo, grandes cantidades de antígeno (Ag) y Ac. Además, con frecuencia el virus que se libera en las heces está degradado y se encuentran muy pocas partículas completas (Bradley y cols., 1988).

Bloqueo de anticuerpos fluorescentes: Este ensayo no es más que la detección semicuantitativa de Ac contra el VHE, utilizando como soporte las láminas de fluorescencia. La prueba detecta Ac que reaccionan con los Ag del virus, mediante el uso de una sonda inmunofluorescente preparada a partir de sueros; en los que previamente se demostró su especificidad por las partículas virales en pacientes con hepatitis E. Con esta técnica los sitios antigénicos del VHE quedan cubiertos con sueros de fase aguda o convaleciente de pacientes infectados, por lo se bloquea la unión de la sonda inmunofluorescente. Con este ensayo la prevalencia de anti-VHE en brotes de poblaciones geográficamente no relacionadas de África, América del Norte y Asia se ha movido entre 77 a 100% (Khuroo, 1980). La prueba de

bloqueo de anticuerpos fluorescentes es sumamente costosa y laboriosa, por lo que no es útil para sostener el diagnóstico de rutina.

Ensayos inmunoenzimáticos: Las proteínas recombinantes del VHE obtenidas de los aislamientos de Birmania, México y China, se han utilizado como sustrato antigénico para detectar anticuerpos IgM e IgG anti-VHE por Western blot o EIE (Naik y cols., 1992; Chau y cols., 1993; He y cols., 1993). Los EIE actualmente disponibles son capaces de detectar IgM anti-VHE en un 90% de las infecciones agudas, si el suero es tomado de 1 a 4 semanas después del comienzo de los síntomas (Favorov y cols., 1992; Goldsmith y cols., 1992; Bryan y cols., 1994). La IgM alcanza un pico de 1:1 000 a 1:10 000, durante las primeras 4 semanas de iniciada la hepatitis (Arankalle y cols., 1994). Después de los 3 meses, solo es detectable en un 50% de los pacientes con hepatitis E (Mushahwar y cols., 1993).

Los títulos de IgG anti-VHE puede persistir a niveles detectables por un periodo de tiempo variable. En un estudio hecho en pacientes pediátricos, se encontró que 2/3 de estos negativizaron la IgG a los 9 meses después del comienzo de la enfermedad, mientras que el 100% de los adultos jóvenes mantenían los títulos de IgG a los 20 meses de haberse infectado (Goldsmith y cols., 1992; Bryan y cols., 1994). En otro estudio los adultos se mantuvieron positivos a este marcador 14 años después de la infección (Khuroo y cols., 1993). Algunos autores atribuyen estas incongruencias a que las pruebas serológicas actuales difieren ostensiblemente en su sensibilidad y especificidad (Mast y cols., 1998).

Los dominios antigénicos del VHE han sido detectados en todas las proteínas codificadas por los tres MAL (Khudyakov y cols., 1999). Doce dominios fueron identificados en el MAL1 (principalmente en la polimerasa), seis dentro del MAL2 y tres en el MAL3 (Khudyakov y cols., 1994b). La mayoría de los EIE en placa o en membrana (Western Blot) para la detección de isotipos de IgM e IgG anti-VHE utilizan proteínas recombinantes de la región carboxiterminal del MAL2 y 3 expresada en *E. coli* (Yarbough y cols., 1991; Panda y cols., 1995). Las partículas similares a virus obtenidas por vía recombinante también fueron utilizadas para la serología anti-VHE (Li y cols., 2000).

Hasta el presente, existen varios EIE y un ensayo de inmunocromatografía disponible comercialmente para el diagnóstico de la hepatitis E. Estos incluyen los EIE para la detección de IgM e IgG de Genelabs Diagnostics (Singapur), el que utiliza cuatro proteínas recombinantes del extremo 3' terminal del MAL2 (42aa) y del MAL3 (33aa) de los aislamientos

de Birmania y México. La casa comercial de Biokit en España cuenta con un sistema de ELISA para la detección de IgM anti-VHE y en los protocolos no se refieren al aislamiento utilizado para obtener los Ag del virus. Los otros ensayos son para detectar IgM e IgG de la Abbott (DRG, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany), que utilizan como recubrimiento dos proteínas recombinantes del MAL3 (123aa) y del MAL2 (327aa) de la cepa de Birmania (Panda y cols., 2007). La casa comercial Mikrogen posee dos EIE de tipo indirecto con Ag recombinantes de los genotipos 1 y 2 denominados recomWell HEV IgM y recomWell HEV IgG, para la detección de ambos Ac (Herremans y cols., 2007).

La sensibilidad y especificidad de estos EIE no han sido bien establecidas, por lo que su aplicabilidad para estudios sero-epidemiológicos, es limitada (Worm y cols., 2002). En el análisis combinado de los tres EIE disponibles para detectar IgM se obtuvo una sensibilidad de 100%, especificidad de 99,5%, valor predictivo positivo de 75% y valor predictivo negativo de 100% (Panda y cols., 2007).

Se ha observado que la detección de IgA tiene un valor limitado en el diagnóstico de la hepatitis E. Asimismo, la determinación de los Ag del VHE, puede jugar un papel importante en el diagnóstico específicamente en el período de pre-seroconversión a anti-VHE (Elkady y cols., 2007).

Con los actuales EIE anti-VHE existentes en el mercado, pueden obtenerse resultados falsos negativos. Aunque hay un alto grado de homología entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas entre las cepas de un mismo genotipo, esta homología se reduce entre los aislamientos de diferentes genotipos (Ticehurst y cols., 1992a). Así, la identidad nucleotídica de las proteínas codificadas por el MAL2 y 3 es de 79.8% y 78,5%, y las aminoacídicas, 90,5 y 73,5%, respectivamente para genotipos diferentes (Tam y cols., 1991). Por tanto, el uso de Ag del VHE de un MAL o de un aislamiento puede conducir a resultados falsos negativos. En consecuencia, se requiere que se incorporen múltiples Ag del virus procedentes de más de un aislamiento para que los EIE permitan hacer el diagnóstico de la hepatitis E en diversas áreas geográficas (Arankalle y cols., 2007).

Las pruebas inmunoenzimáticas inicialmente se desarrollaron a partir de las variantes prototipo de los genotipos 1 y 2, para el diagnóstico de infecciones agudas en zonas endémicas. La interpretación de los resultados, cuando las mismas se utilizaban en estudios de prevalencia en zonas no endémicas, despertaba cierta cautela y también sospechas en relación a su

sensibilidad y especificidad. A pesar de la variabilidad genética sólo se ha demostrado un único serotipo, sin embargo el desarrollo de ensayos a partir de los genotipos 3 y 4 ha mostrado una mejoraría en el diagnóstico del VHE en zonas no endémicas donde estos son prevalentes (Munne, 2010).

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP): El clonaje y la secuenciación del genoma del VHE facilitaron un progreso significativo en el desarrollo de métodos para la identificación de la infección aguda por el VHE en muestras clínicas de pacientes y en animales de experimentación. La detección del genoma y su caracterización molecular confirma la infección, pero no siempre es posible. Aún contando con la tecnología para realizarla, requiere de la disponibilidad de muestras oportunas y conservadas apropiadamente.

Se han diseñado cebadores conservados para amplificar regiones en el genoma del virus localizadas en la helicasa, polimerasa y el extremo 3' del MAL2 (Chobe y cols., 1997; Meng y cols., 1997a). La TR-RCP simple y anidada son ensayos altamente específicos y permiten detectar el ARN del VHE en suero de fase aguda, monocitos de sangre periférica, heces y bilis (Ray y cols., 1991; Chauhan y cols., 1992; Nanda y cols., 1995); así como en aguas contaminadas y albañales (Jothikumar y cols., 1993; Pina y cols., 2000). La TR-RCP fue utilizada para la detección de moléculas de ARN intermediarias de cadenas negativas en la replicación del VHE en el hígado de animales infectados (Nanda y cols., 1994) y de cadenas positivas en el sobrenadantes de líneas celulares infectadas (Tam y cols., 1997).

El análisis molecular mediante el empleo de enzimas de restricción es otro método que se emplea para estudios de epidemiología molecular relacionados con la evolución y distribución geográfica del VHE (Aye y cols., 1993; Huang y cols., 1995). La TR-RCP es útil como prueba confirmatoria para evaluar el grado de protección observada en animales experimentales como parte del estudio de candidatos vacunales (Arankalle y cols., 1995). La RCP en tiempo real también se ha empleado para la cuantificación del genoma del VHE a partir de muestras clínicas (Jothikumar y cols., 2006).

La correlación de la TR-RCP en suero con la IgM anti-VHE ha sido observada en las primeras dos semanas de aparición de los síntomas, la que se reduce a medida que avanza la enfermedad (Clayson y cols., 1995b). Se estima que en algunos estudios, la RCP es mejor que la IgM anti-VHE, debido a la diferencia que existe en la sensibilidad de los EIE (Clayson y cols., 1998).

Esta prueba se emplea como la técnica de oro para la evaluación de los EIE, teniendo en cuenta que las muestras positivas pueden ser confirmadas (Panda y cols., 2007).

Wu y cols., recomiendan que el diagnóstico de la hepatitis E debe ser manejado con cuidado, por lo que se impone combinar los resultados de las técnicas serológicas y moleculares actualmente disponibles. La detección de ARN-VHE en suero o heces unido a la positividad a la IgM anti-VHE y seguida por una seroconversión a IgG anti-VHE apoyaría el diagnóstico de esta entidad (Wu y cols., 2009).

II.6 Epidemiología

Junto a la hepatitis A, la hepatitis E se considera una de las hepatitis de transmisión feco-hídrica, este patrón epidemiológico se reconoce en los países en vías de desarrollo, donde puede ocasionar epidemias relacionadas con el consumo de aguas contaminadas (Balayan y cols., 1990).

La infección es endémica en países en desarrollo de Asia, África y algunas regiones de Centroamérica (Emerson y Purcell, 2004), aunque históricamente los casos más problemáticos fueron confirmados en países del sur y sureste de Asia (Krawczynski, 1993).

A pesar de ser el hombre uno de los reservorios del virus, se ha demostrado que existen reservorios animales de la enfermedad, por lo que esta entidad constituye una zoonosis (Kumagai y cols., 2004; Billam y cols., 2005). El VHE es capaz de infectar perros, ovejas, cabras, vacas, aves, ratas y cerdos (Arankalle y cols., 2001; Haqshenas y cols., 2001).

La primera epidemia reportada de hepatitis E en Nueva Delhi, India, entre el período de 1955-56, fueron identificados 29 000 casos de hepatitis icterica después de la contaminación fecal del agua de beber en la ciudad (Khuroo y cols., 1995). Otra epidemia de hepatitis difundida por el agua se produjo en Cachemira en 1978 e involucró a 16 000 personas (Khuroo, 1980). También se han observado presuntas epidemias de hepatitis E en la República de Kirguizia, en la antigua Unión Soviética, entre 1955 y 1956 (Sergeev y cols., 1957). Epidemias similares a la hepatitis E se han reportado en el Sudeste Asiático, incluyendo a Birmania y Nepal (Shrestha y Misra, 1990). El mayor brote donde se reportaron 120 000 casos, ocurrió en el sur de la región Xianjiang Uighur, China, entre septiembre de 1986 y abril de 1988 (Zhuang y cols., 1991). Este afectó a 23 condados y ciudades y persistió durante 20 meses, con dos picos epidémicos.

En África, brotes de hepatitis E se reportaron en Sudán, con 6 861 casos y 87 fallecidos. En Chad se diagnosticaron 1 442 casos y 46 muertos, con una alta incidencia registrada en los campos de refugiados (Chen y cols., 2005). Estas epidemias no están confinadas solamente a los continentes de Eurasia y África, sino que también se han registrado en el continente Americano, en la Ciudad de México (Velázquez y cols., 1990). En otros países de América Latina se reportaron casos esporádicos de hepatitis E, tal es el caso de Argentina, Brasil, Bolivia y Venezuela (Abe y cols., 2006; Lopes Dos Santos y cols., 2010; Munne, 2010). En el Anexo IV se muestra el mapa mundial de las regiones endémicas y epidémicas de hepatitis E.

La HVA causada por el VHE fue reportada en residentes de países desarrollados como Australia, Francia, Israel, Holanda, España, Reino Unido y los EE.UU., sin estar relacionada con viajes de personas a países endémicos (Cowie y cols., 2005a).

Las epidemias diseminadas por el consumo de agua contaminada ocurren en brotes unimodales, con una curva de incidencia altamente comprimida o epidemias más prolongadas con múltiples picos de incidencia que pueden durar hasta más de un año (Li y cols., 1997b). Sin embargo, la transmisión directa de persona a persona es baja, ya que a continuación de las epidemias, usualmente no ocurren olas secundarias de la hepatitis E (Jameel, 1999; Cowie y cols., 2005b).

Datos recientes sugieren que la hepatitis E puede ser transmitida mediante las transfusiones sanguíneas, aun en los países con baja endemicidad o no endémicos para esta enfermedad (Mitsui y cols., 2004). La transmisión parenteral se produce especialmente en las áreas endémicas (Toyoda y cols., 2008). Se ha demostrado que es frecuente la transmisión vertical (de madre a hijo) en mujeres embarazadas infectadas en el tercer trimestre del embarazo, produciendo hepatitis grave en el recién nacido (Kumar y cols., 2001).

En cuanto al género, los varones son más afectados que las mujeres (Kumar y cols., 2001). Durante las epidemias la proporción de población afectada varía desde un 1% a un 15%, siendo más frecuente los casos entre adultos de 15-40 años (3 - 30%) que entre niños <14 años (0,25 - 10%) (Tsega y cols., 1992).

II.6.1 Grupos de riesgo

Teniendo en cuenta, la principal ruta de transmisión del VHE, se considera grupos de riesgo a los trabajadores de los servicios de agua potable y alcantarillado, así como los agricultores que utilizan fuentes de abastos de agua no tratadas (Vildosola y cols., 2000). También constituyen

grupos de riesgo (vía de transmisión parenteral) los donantes de sangre, las personas que reciben con frecuencia tratamiento inyectable debido al padecimiento de una enfermedad crónica y el personal de salud (Mitsui y cols., 2004). Las evidencias también sugieren que los pacientes hemofílicos, a los que se le administran factores de la coagulación tienen una elevada prevalencia de anti-VHE (Toyoda y cols., 2008).

La hepatitis E es considerada como una zoonosis, algunos trabajos han demostrado una gran similitud genómica entre cepas que infectan a cerdos y a humanos que trabajan directamente con estos animales (Meng y cols., 2002; Emerson y Purcell, 2003). Estos aislamientos fueron genéticamente identificados como genotipos 3 y 4 y se especula que la transmisión sea de cerdo a humano, por la elevada carga de virus que tienen sus excreciones (Zheng y cols., 2006). Experimentalmente, se ha demostrado que el VHE puede atravesar la barrera de la especie. Así se han infectado tanto a primates con el VHE porcino, como cerdos, corderos y ratas con el VHE humano (Maneerat y cols., 1996; Meng y cols., 1998b). Todos estos estudios, alertan de que aquellas personas que trabajan con cerdos y los veterinarios, presentan un alto riesgo de padecer la infección por el VHE. Hasta el momento se han publicado varios estudios que demuestran una elevada prevalencia de anti-VHE en personas que tenían una exposición ocupacional con ganado porcino (Drobeniuc y cols., 2001; Meng y cols., 2002; Withers y cols., 2002). Sí se confirma la posibilidad de que el VHE se transmita del cerdo al hombre, la utilización de tejidos y órganos de este animal como xenotrasplante, puede ser un problema a tener en cuenta, lo que haría que se considere un agente xenogénico potencial (Yoo y Giulivi, 2000).

Como se ha planteado los genotipos 3 y 4 tienen características zoonóticas, son considerados emergentes y los factores de riesgo más reconocidos son la ingestión de mariscos, carnes contaminadas crudas o poco cocidas y contacto directo con animales (Meng, 2000; Melenhorst y cols., 2007)

II.6.2 Hepatitis E y embarazo

Dada la importancia que tiene desde el punto de vista clínico y epidemiológico la hepatitis E en el embarazo, en este acápite se agruparon todos los datos relevantes relacionados con este tema. La hepatitis E tiene una baja mortalidad en la población general (1- 3%), pero en las mujeres gestantes principalmente en el segundo o tercer trimestre, la letalidad es mayor y alcanza hasta un 20% (Cowie y cols., 2005b).

La infección por el VHE tiene una elevada incidencia en las mujeres gestantes y durante las epidemias la enfermedad icterica ocurre nueve veces más en las gestantes que en las que no lo están. Se ha demostrado que es frecuente la transmisión vertical (de madre a hijo) en mujeres infectadas en el tercer trimestre del embarazo, produciendo hepatitis grave en el recién nacido (Kumar y cols., 2001). El VHE a diferencia de otros virus hepatotropos provoca una infección intrauterina con un incremento significativo de la morbilidad y mortalidad perinatal (Khuroo y cols., 1995). La causa de esta elevada letalidad es la hepatitis fulminante que desarrollan estas gestantes.

Países como la India, Irán y Sudán han reportado formas graves de hepatitis E en embarazadas (Khuroo, 1980; Guthmann y cols., 2006; Kumar y cols., 2006). Los datos recolectados en un brote de hepatitis E en Cachemira, mostraron que la frecuencia de hepatitis era mayor en las mujeres gestantes que en el resto de la población (Kumar y cols., 2006). Contradictoriamente, reportes de Europa y EE.UU. demostraron que el curso de la HVA en mujeres embarazadas, no difiere de las féminas no gestantes. Se especula que factores contribuyentes como la malnutrición, factores del huésped y el genotipo circulante (genotipo 1) están relacionados con estas formas graves (Beniwal y cols., 2003). Recientemente, se describió un FHF en una mujer no embarazada de España, infectada por el genotipo 3 del VHE, que consumía anticonceptivos orales (Mateos Lindemann y cols., 2010).

Los cambios hormonales (progesterona y estrógenos) que se producen fisiológicamente en la gestación, probablemente traen como consecuencias alteraciones secundarias provocadas por un estado de tolerancia inmunológica. Esto se expresa en una baja regulación de una proteína de 65 kilodalton (kDa) (p65) componente del factor nuclear kappa, predominio de la respuesta celular de células T cooperadoras 2 (Th2, siglas en inglés, T cell helper 2) (Pal y cols., 2005; Navaneethan y cols., 2008) y la susceptibilidad del hospedero a las formas graves; lo que esta genéticamente determinado por las moléculas del CMH. No obstante, la comunidad científica no se explica porque esta severidad no se presenta con el VHA, que tiene características epidemiológicas similares (Navaneethan y cols., 2008).

La coagulación intravascular diseminada interviene en la fisiopatología de los cuadros graves que se producen en la gestación, acompañada de encefalopatía, diátesis hemorrágica e insuficiencia renal. En este contexto, se plantea que la patogénesis de esta infección en las grávidas tiene su origen en una liberación desmedida de citocinas citotóxicas estimuladas por

las endotoxinas, como resultado del daño de las células de Kuffer, principal protección de los hepatocitos contra las toxinas generadas en el TGI. La liberación de prostaglandinas y leucotrienos, favorece la quimiotáxis de neutrófilos, el edema y la colestásis que se observa en las formas graves (Jameel, 1999).

Como la morbilidad y la mortalidad se presentan principalmente en las mujeres gestantes, durante las epidemias se le debe prestar especial atención a esta población. Por tanto, una vez que se cuente con la vacuna contra el VHE debe considerarse en las futuras estrategias de inmunización incluir a las mujeres en edad fértil de países endémicos, como un grupo prioritario a vacunar (Khuroo, 2008; Wu y Lang, 2009).

II.6.3 Prevención y control de la infección por el VHE

La hepatitis E es una enfermedad determinada ecológicamente y su control depende del mejoramiento de las condiciones higiénico-sanitarias de la población: cloración del agua, la higiene personal y ambiental, correcta disposición de los desechos líquidos y sólidos y la educación comunitaria. También puede ayudar la educación masiva durante y entre los brotes, con la recomendación de seguir las orientaciones y fomentar el consumo de agua hervida (Velázquez y cols., 1990). Los objetivos de la prevención son: proteger al paciente individual, reducir la incidencia de la enfermedad, bajar la tasa de infección en los grupos de riesgo, disminuir la tasa global de infección y erradicar la hepatitis por este agente viral (Emerson y Purcell, 2007).

Profilaxis pasiva: Hasta el presente, los intentos para prevenir la hepatitis E con la administración de suero inmune obtenido de plasma de áreas endémicas al virus, no han sido exitosos (Khuroo, 1991). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se llevaron a cabo antes del desarrollo de pruebas serológicas altamente sensibles, que permiten cuantificar los títulos de anti-VHE. Probablemente, aquellos lotes de Ig no tenían niveles protectoras de anti-VHE. En un brote de hepatitis E en Cachemira, el uso de globulina de suero inmune redujo considerablemente la mortalidad cuando se utilizó en el tercer trimestre de embarazo (Khuroo, 1991). Resultados preliminares en experimentos llevados a cabo en monos *cynomolgus* sugirieron, que los Ac contra el VHE adquiridos pasivamente, fueron capaces de modificar el curso de la enfermedad, pero no previenen la infección por el virus (Tsarev y cols., 1994). Se cree que la gammaglobulina preparada de donantes con altos títulos de anti-VHE o los Ac

monoclonales (Acm) contra el VHE, podrían ser útiles para prevenir la hepatitis E, durante las epidemias en un futuro no muy lejano (Schofield y cols., 2000).

Profilaxis activa: En estos momentos no se cuenta con una vacuna disponible comercialmente para prevenir la infección. La producción de un preparado vacunal contra el VHE es factible debido a la existencia de un solo serotipo.

Teniendo en cuenta, que el VHE no se replica bien en cultivo de células, el desarrollo de vacunas se ha focalizado en la obtención de candidatos por vía recombinante. La pMAL2 que corresponde a la cápside viral fue expresada en *E. Coli* y en células de insectos. Los estudios demostraron que los primates no humanos inmunizados quedaron protegidos contra el VHE (Tsarev y cols., 1997). Un estudio de fase II se realizó con un candidato, que contiene la proteína de la cápside del genotipo 1, expresada en células de insectos, producido por la GlaxoSmith Kline Biological, de Bélgica (Robinson y cols., 1998). Los resultados fueron muy alentadores, este preparado fue bien tolerado y mostró una eficacia de 95%, al ser administrado en población de alto riesgo de Nepal (Shrestha y cols., 2007).

Otros diseños de vacunas anti-VHE han sido evaluados a escala de laboratorio entre ellos se encuentran la vacuna de ácido desoxirribonucleico (ADN) del MAL2 que indujo respuesta de Ig anti-VHE en ratones (He y cols., 1997; He y cols., 2001). Las partículas recombinantes similares a virus, administradas por vía oral en animales, estimuló la respuesta inmune sistémica y a nivel de mucosa contra el VHE (Li y cols., 2001). La literatura describe otra formulación vacunal, que consiste en la proteína estructural del virus cubierta por lisosomas con un plásmido en su interior que codifica la misma región. Este inmunógeno indujo una potente respuesta humoral y celular contra el virus en animales de laboratorio (Arankalle y cols., 2006).

II.6.4 Vigilancia de la hepatitis E

La vigilancia y los sistemas de respuesta son críticos para el control efectivo de las enfermedades transmisibles. La vigilancia en pocas palabras quiere decir obtener datos para ejercer acciones, de ahí que el papel y el fortalecimiento de los laboratorios en cuestión sean importantes para un buen control. El estudio de brotes de HVA se realiza a través del envío y procesamiento de muestras de suero de pacientes seleccionados en el brote. Se recomienda que se seleccionen de 5 a 10 casos con elevación de los niveles de la ALAT, acompañada o no de síntomas o signos clínicos de hepatitis viral. El agente que frecuentemente se asocia a estos brotes es el VHA.

El sistema de vigilancia de las enfermedades es una herramienta para el control de las mismas, la que puede ser activa o pasiva. El objetivo de la vigilancia de las hepatitis virales es proveer información serológica, demográfica y epidemiológica, que pueda ayudar en la formulación de estrategias y políticas para la prevención y control de estas enfermedades. Una parte importante de esta vigilancia es detectar cambios en la incidencia y diseminación de la infección y la enfermedad en la población. Las hepatitis agudas y crónicas son enfermedades notificables a las autoridades de Salud Pública. En los EE.UU. la información en hepatitis se obtiene para tres sistemas de vigilancia (CDC, 2000, Fagan y Harrison, 2000).

La vigilancia se utiliza para analizar e interpretar las tendencias y patrones, identificar grupos de riesgo y determinar los mecanismos de transmisión. En la definición de caso se plantea que un caso agudo debe incluir una enfermedad de comienzo discreto e ictericia o valores elevados de ALAT por encima de 2,5 su valor normal (CDC, 2000). El criterio serológico que se usa para distinguir la hepatitis E en nuestro medio es la IgM anti-VHE positiva. Como alternativa se utiliza la TR-RCP para la detección de ARN-VHE en heces o suero del paciente.

La notificación obligatoria de la hepatitis viral se inició en Cuba en 1960 a través de tarjetas de Enfermedades de Declaración Obligatoria, en ellas estaban establecidos el reporte individual y detallado de los enfermos agudos con vivencias clínicas de la enfermedad y estudio de ALAT por encima de los valores de 12 U/L. En 1987 se implantó el nuevo Programa de Prevención y Control de las hepatitis virales con los objetivos de conocer la participación de las hepatitis A, B y no A no B dentro de las hepatitis virales, así como prevenir y controlar la transmisión de los virus A y B de las hepatitis. Se estableció la clasificación operacional por tipo a partir de la realización del Ag de superficie de la hepatitis B (HBsAg) a todo enfermo agudo diagnosticado, considerando como hepatitis B los que tuviesen resultados positivos. Los resultados del HBsAg negativos en los enfermos fueron considerados casos de hepatitis A, sin antecedentes de exposición a sangre o hemoderivados, o riesgo parenteral. Otro hecho importante fue la incorporación del diagnóstico de la hepatitis B y C en 1992 y 1995, respectivamente con estuches de producción nacional. En 1993, por acuerdo del MINSAP y a sugerencia de la Dirección Nacional de Epidemiología, se propone que el Laboratorio de Hepatitis del IPK pase a ser LNRHV, siendo incorporada la detección de IgM anti-VHA en 1994 (Rodríguez L, 1994). No es hasta 1998, que comienza el diagnóstico de la hepatitis E en el LNRHV.

II.7 Perspectivas

Aunque, existen múltiples interrogantes sobre biología, patogénesis, epidemiología e inmunología del VHE que aún permanecen sin esclarecer; las investigaciones relacionadas con esta entidad han tenido gran impacto para la comunidad en general. Primero, el agente causal se identificó en 1983 y ya fueron identificados cuatro genotipos virales, los que están mundialmente distribuidos con una relativa ubicación geográfica. La vacuna recombinante esta a punto de culminar su ensayo clínico y se espera que proteja contra todas las variantes genéticas del virus.

En cuanto a la zoonosis, Ac contra el VHE se han detectado en numerosas especies de animales, siendo el cerdo el principal reservorio en gran parte del mundo. Se espera que las investigaciones futuras determinen cuales reservorios animales son importantes para la infección a humanos. Definir si la infección por el VHE se comporta como una epizootia o enzootia y si accidentalmente en esta cadena de eventos el hombre se expone al virus.

Otros datos importantes que se necesitan esclarecer son las causas por las cuales los VHA y VHE de transmisión entérica poseen epidemiologías diferentes, aún cuando ambos circulan en una misma área geográfica. Asimismo, se debe dilucidar como el virus se mantiene en la comunidad en los períodos ínter-epidémicos, su elevada patogenicidad en mujeres embarazadas y las posibles dianas terapéuticas en el manejo de esta enfermedad.

III. CAPÍTULO DE MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos de la tesis fueron desarrollados según los objetivos específicos que se plantearon para llevar a cabo la investigación.

III.1 Identificar si el VHE causa brotes, casos clínicos esporádicos, cuadros clínicos graves y fallecidos por HVA en Cuba, utilizando diferentes ensayos inmunoenzimáticos.

III.1.1 Muestras

Se colectaron 382 muestras de suero procedentes de 49 brotes de HVA de todo el país en el período 1998-2005, correspondientes a la región Occidental, Central y Oriental (Anexo V). En particular 190 sueros obtenidos de 18 brotes reportados de 1998-2003 fueron estudiados por edades e instituciones, 62 sueros se colectaron de instituciones cerradas: círculos infantiles, escuelas primaria y secundaria (individuos menores de 15 años) y 26 sueros de instituciones cuyas personas tenían 15 años o más de edad. El resto de las muestras (102) se obtuvieron en población abierta e incluían sujetos de todas las edades.

Además, fueron evaluadas muestras de suero de 153 casos clínicos esporádicos de todo el país. El criterio de inclusión para estos casos esporádicos fue la negatividad a HBsAg, anti-VHC y tener un cuadro de hepatitis viral con evolución atípica (prolongada y polifásica) y colestásis. Igualmente, se estudiaron 77 sueros de pacientes con diagnóstico de FHF (graves o fallecidos) procedentes de todo el país, en los que se buscaron otros marcadores virales como: IgM anti-VHA, HBsAg e Ig total anti-VHC.

III.1.2 Diagnóstico serológico

III.1.2.1 Detección de anticuerpos IgM anti-VHE

A continuación se describen los tres estuches comerciales que se emplearon en el período estudiado. En el Anexo VI aparece la distribución de las muestras según los estuches utilizados.

III.1.2.1.1 Estuche producido en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de la Habana, Cuba (Lemos y cols., 2000): Este se utilizó para la detección de IgM anti-VHE de 13 brotes (82 sueros) y se empleó solamente en 1998, ya que no se produjo por falta de disponibilidad de reactivos. Las microplacas del EIE (NUNC Polysorp) fueron recubiertas con 0.06 miligramos (mg) de una proteína recombinante pura de 17 kDa hexahistidina, que contenía epítopes de la proteína codificada por el MAL3 de una cepa de la India del VHE (genotipo 1, subtipo 1a). Las muestras de suero fueron diluidas 1:20 con una solución tampón (50 miliMolar [mM] Tris-HCl pH 7,4; suero fetal bovino [SFB, Eurobio] al 10% tratado con calor, seroalbumina bovina 0,5% y timerosal 0,01%). Las muestras fueron dispensadas a 100 μ L/pozo e incubadas durante 30 min. a 37 °C en incubadora INCUBATOR (ALP, Co., LT, Tokio, Japón). Después de seis lavados en lavador Washer 430 (Biomerieux) con solución fosfato salina (PBS, siglas en inglés phosphate buffer saline) (Sigma) que contenía Tween-20 (PBS-T₂₀) (Merck) al 1%, las placas se incubaron con 100 μ L/pozo de anti-IgM humana conjugada con peroxidasa (HeberBiotec, Habana), por 30 min. a 37 °C. Luego de seis lavados, se añadió 100 μ L/pozo de solución de fosfato citrato que contenía 0,015% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Merck) y 0,05% de orto-fenilenediamina (OPD, siglas en inglés ortho-phenylenediamine) (Sigma) el que se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente (TA, 20-24 °C), cuando se desarrolló el color la reacción se detuvo con 50 μ L/pozo de 2,5 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (BDH). La intensidad del color fue medida a 492 nm en un lector de ELISA Reader 250 (Biomérieux). El valor de corte (VC) se determinó como dos veces la media de la absorbancia de los controles negativos. Las muestras con absorbancia mayor o igual que el VC fueron consideradas como positivas.

III.1.2.1.2 Estuche producido en el Instituto para Investigaciones Médicas de Macfarlane Burnet, Victoria, Australia, (MBC/AMRAD Hepatitis E IgM diagnostic kit) (Anderson y cols., 1999): Este fue empleado para la detección de IgM anti-VHE de 20 brotes (176 sueros), 100 casos clínicos esporádicos de HVA y 37 casos graves y fallecidos. El principio del ensayo fue el de un EIE indirecto donde la fase sólida estaba recubierta con un Ag recombinante del MAL2, obtenido de un aislamiento chino (genotipo 1, subtipo 1b) acoplada a la proteína de fusión GST expresada en la *E. coli*. La proteína denominada GST-MAL2.1 contiene los últimos 267 aa del extremo carboxilo terminal del MAL2. Las muestras y los controles del ensayo fueron añadidos a razón de 100 μ L/pozo, previamente diluidas 1:300

en una solución suministrada con el estuche. Se procedió a incubar la placa durante 50 min. a TA, para posteriormente lavar cada pocillo de 4 a 6 veces con los reactivos suministrados por el fabricante. La anti-IgM humana conjugada con la enzima peroxidasa de rábano picante (Sigma) se dispensó a 100 μL /pozo y se incubó en las mismas condiciones anteriormente descritas. Después de los lavados, se adicionó la solución de sustrato constituida entre otros componentes por H_2O_2 y 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB), la que se mantuvo durante 12 min. en cámara oscura y a TA. Finalmente, después de la adición de la solución de parada las placas fueron leídas a 450 nm con filtro de referencia de 615-620 nm. El VC se determinó calculando la media de la densidad óptica (DO) de los controles positivos, multiplicado por una constante 0.4. Las muestras con DO mayor o igual que el VC fueron consideradas como positivas.

III.1.2.1.3 Estuche HEV IgM ELISA 3.0 producido por Genelabs Diagnostics

(Singapur) (Chen y cols., 2005): Este fue utilizado para la detección de IgM anti-VHE en 16 brotes (124 sueros), 53 casos clínicos esporádicos y 40 casos graves y fallecidos. En este EIE tipo indirecto la fase sólida estaba recubierta con un Ag recombinante del MAL2, denominado MAL2.1. Este fue construido como una proteína de fusión que contenía el fragmento MAL2.1 (del aa 394 al 660) obtenido de la cápside de un aislamiento chino (genotipo 1, subtipo 1b) y un patrón de 6-histidina (6xHis-MAL2.1). Esta proteína de fusión se expresó en la *E. coli*. Los controles y las muestras se trabajaron a una dilución 1:21. Se añadió 100 μL del diluyente a los pozos de la placa y luego se dispensaron 5 μL de control negativo, positivo y muestras según el protocolo establecido. La placa se incubó 30 min. a 37 °C y una vez transcurrido el tiempo se lavó 6 veces con solución de lavado suministrada por el fabricante, en lavador Washer 430 (Biomériux). Posteriormente se adicionó 100 μL del conjugado, un monoclonal de anti-IgM humana marcado con peroxidasa, el que se trabajó a una dilución de 1:200. Se incubó el conjugado en las condiciones antes referidas y después se procedió a los pasos de lavado para eliminar el conjugado no unido. Luego se dispensó el sustrato 100 μL de la solución de sustrato TMB, el que se incubó durante 15 min. en cámara oscura a TA. Luego se añadió solución de parada 1 normal (N) de ácido hidrociorhídrico. Para determinar la absorbancia se leyó la placa a 450 nm con filtro de referencia de 620 nm. La validez del ensayo se consideró si la absorbancia de los controles negativos y el blanco fueron $\leq 0,100$ y la del control positivo $\geq 0,500$ una vez que se sustrajo la media de los blancos. El VC se calculó como la suma de la

constante 0,4 a la media de la absorbancia de los controles negativos. Un resultado fue considerado positivo si la razón DO de la muestra/VC fue ≥ 1 .

Los casos esporádicos, graves y fallecidos por FHF fueron también evaluados para otros marcadores virales como HBsAg (UMELISA HBsAg PLUS), para la confirmación del HBsAg en suero (UMELISA HBsAg CONFIRMATORY TEST) y para anti-VHC (UMELISA HCV), todos estos juegos diagnósticos y equipamiento fueron producidos por TECNOSUMA Internacional, Habana, Cuba.

III.1.2.2 Evaluación de la sero-positividad de las muestras obtenidas de brotes con dos estuches de IgM anti-VHE: En total se estudiaron un total de 33 brotes donde estaban incluidos 258 sueros de 1998 al 2003 con los estuches IgM anti-VHE del CIGB y de Macfarlane Burnet. Se evaluó el índice de positividad de 82 sueros correspondientes a 13 brotes con el estuche producido por el CIGB. Esta se comparó con la positividad obtenida con el de Macfarlane Burnet cuando fueron evaluados 176 sueros de 20 brotes.

III.1.2.3 Detección de anticuerpos IgM anti-VHA (Rodríguez L, 1994): Este EIE tipo captura fue desarrollado y producido por el IPK. Las placas Immuno module MaxiSorp F8 EIA (NUNC, Dinamarca) fueron recubiertas con 100 μ L de Ac anti-IgM humana (Sigma) e incubada toda la noche a TA. Después, que los Ac fueron absorbidos los pozos fueron lavados con PBS y las uniones no específicas se bloquearon con sacarosa y albumina sérica bovina (Sigma) al 1 y 4%, respectivamente. Los pozos fueron lavados 3 veces con PBS-T₂₀ (BDH) al 0.05% y 50 μ L de sueros diluidos 1:1000 con PBS-T₂₀ (BDH) fueron añadidos e incubados durante 1 hora (hr.) a 37 °C. Los controles positivos y negativos fueron tratados de la misma forma. Después de 4 lavados, se añadió el VHA previamente cultivado en la línea celular fibroblasto de riñón de mono *rhesus* (FRhK4-1688-CRL) procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC) (ATCC, 1992). El virus se diluyó 1:5 con PBS-T₂₀ (BDH) y se incubó por 2 hr. a 37 °C. Después de 4 lavados con PBS-T₂₀ (BDH) al 0.05%, los Ac humanos anti-VHA purificados y conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (Type-VI, Sigma), se adicionaron a cada pocillo. La placa fue incubada 1 hr. a 37 °C y posteriormente lavada 5 veces para revelar la reacción con sustrato OPD y H₂O₂ (Sigma). Transcurridos, de 15-30 min. a TA, la reacción se detuvo con H₂SO₄ (BDH) al 12,5%. La lectura de la placa se realizó en un lector de EIE (ELISA Reader 250, Biomérieux) a 492 nm de longitud de onda. El

VC se calculó como 2,1 veces la media de los controles negativos. De esta forma las muestras con un absorbancia mayor o igual al VC fueron consideradas positivas.

III.1.3 Diagnóstico molecular

III.1.3.1 Muestras

Se colectaron de 1999 al 2008 un total de 262 muestras clínicas, de ellas 57 sueros y 205 heces obtenidas de brotes y casos clínicos esporádicos positivos a la IgM anti-VHE con los estuches de IgM anti-VHE (Macfarlane Burnet, Australia y de Genelabs Diagnostic, Singapur) empleados y con menos de un mes de evolución del cuadro clínico. Se emplearon 3 tipos de TR-RCP, una para el MAL 1 (región de la polimerasa) y dos para el MAL2 (región de la cápside). Para realizar los estudios moleculares se tuvieron en cuenta las medidas necesarias para evitar las contaminaciones de las RCP: como la utilización de puntas con barrera, guantes, materiales nuevos y estériles. Además el uso de diferentes locales para los pasos de extracción del ARN, preparación de mezclas, montaje de la primera y la segunda reacción, así como el chequeo de la corrida electroforética (Kwok y Higuchi, 1989).

III.1.3.2 Extracción del ARN

La extracción se realizó mediante el método de TRIzol (Life Technologies, Gibco BRL; Grand Island, N.Y., USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se emplearon 750 μ L de TRIzol y luego de añadirse los 150 μ L de suero, la mezcla se homogenizó con vortex (Genie) durante 15 segundos (seg.). Esta se dejó reposar por 10 min. a TA para posteriormente adicionarle 200 μ L de cloroformo (Sigma). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 seg. y se incubó nuevamente a TA por un período de 10 min. La centrifugación se llevó a cabo a 10 000 gravedades (g) durante 15 min. a TA (20-25°C) en una centrifuga Eppendorf. Transcurrido ese tiempo se transfirió la fase acuosa, a un tubo nuevo que contenía 500 μ L del alcohol isopropílico (Sigma) y se agitó también de forma vigorosa en vortex durante 15 seg., para proseguir con el paso de precipitación a -70 °C por 1 hr. A continuación, se centrifugó a 10 000 g por 20 min. a 4 °C. Pasado este tiempo, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado de ARN con 800 μ L de etanol (BDH) al 70%, se agitó manualmente y luego se centrifugó en iguales condiciones que el paso anterior. Todo el etanol se removió con mucho cuidado y se dejó secar el ARN precipitado con los viales destapados y finalmente, se resuspendió con 20 μ L de agua libre de RNasa y DNasa (Sigma). En cada proceso de extracción del ácido nucleico se utilizaron como controles negativos agua libre de RNasa y

DNasa, a los cuales se les realizó todo el procedimiento descrito, así como la amplificación mediante TR-RCP. Con las muestras de heces, primero se realizó una suspensión del material fecal al 10% en agua libre de RNasa y DNasa (Sigma). Luego de haber sido homogenizada la suspensión, ésta se clarificó a través de la centrifugación a 20 000 g por 15 min. El ARN se extrajo utilizando 200 μ L de esta suspensión sobre 750 μ L de TRIzol siguiendo los pasos ya descritos para los sueros.

III.1.3.3 Amplificación del ARN-VHE

III.1.3.3.1 TR-RCP anidada para el MAL1

Esta técnica se empleó para amplificar el segmento de MAL 1 del genoma viral correspondiente a los nt comprendidos del 4254 al 4560, los cuales codifican para la proteína no estructural RdRp (Zhai y cols., 2006). Primeramente, se realizó la TR-RCP en un paso, con el estuche One Step PCR (QIAGEN, Hilden, Germany). La reacción se montó en tubos eppendorf de 200 μ L a un volumen final de 50 μ L, en los que se añadió 5 μ L del ARN extraído (aproximadamente 100 nanogramos [ng]) a una mezcla que contenía los siguientes componentes: 10 μ L de Solución Tampón, 2 μ L de enzima (One Step RT-PCR Enzyme mix), 2 μ L de Trifosfato de desoxinucleotidos (10 mM), 1 μ L cebadores sentido (MJC1) y antisentido (MJC2) externos a 50 picomoles (pm) cada uno (Tabla III.1) y se completó con agua libre de RNasa y DNasa (Sigma). Como control positivo se utilizó 2 ng de un plásmido que tenía insertado el MAL 1 (TOPO-MAL 1) de un aislamiento de la India (cepa Yam67) (Jameel y cols., 2002). La mezcla de reacción para la TR-RCP se colocó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) con el siguiente programa: para efectuar la TR primeramente se incubó la mezcla de reacción a 50 °C durante 30 min. Luego de la inactivación de la enzima de la TR a 94 °C por 2 min., las mezclas fueron sometidas a 35 ciclos de desnaturalización (95 °C x 30 seg.); hibridación (55 °C x 45 seg.) y extensión (72 °C x 60 seg.), seguida de una elongación final de 72 °C x 10 min. La RCP anidada se preparó para un volumen final de 50 μ L que contenía 5 μ L de ADN amplificado en la TR-RCP; con tampón de amplificación 10X [Tris-HCl 10 mM, pH 9,2, KCl, 75 mM, MgCl₂, 15 mM (Sigma)]; trifosfato de desoxinucleotidos (dNTP, 0,2 mM cada uno, Sigma); cebadores sentido (MJC3) y antisentido (MJC4) internos a 50 pm cada uno (Tabla III.1) y la enzima Taq ADN polimerasa (2,5 UD, Promega, Madison, WI, USA). Se empleó el mismo termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) y programa de RCP descrito, omitiendo el paso de la TR.

Tabla III.1. Cebadores empleados en la TR-RCP anidada para la amplificación de la RdRp del VHE (Zhai y cols., 2006).

Cebadores	Secuencias de base(5'–3')	Posición*
MJC1	CATGGTAAAGTGGGTCAGGGTAT	CSE 4213 - 4235
MJC2	AGGGTGCCGGGCTCGCCGGA	CAE 4576 - 4595
MJC3	GTATTTTCGGCCTGGAGTAAGAC	CSI 4232 - 4253
MJC4	TCACCGGAGTGYTTCTTCCAGAA	CAI 4561 - 4583

Leyenda: CSE - Cebador sentido externo; CAE - Cebador antisentido externo

CSI – Cebador sentido interno; CAI – Cebador antisentido interno.

* Posición nucleotídica de la cepa prototipo de Birmania: Bur82, M73218.

Los productos fueron detectados aplicando 6 μ L del producto de la TR–RCP anidada más 2 μ L del indicador de corrida (Blue/Orange 6X Dye, Promega, Madison, WI, USA), los que se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa (Promega, Madison, WI, USA) al 2% teñido con bromuro de etidio (BDH, 0,1 μ g/mL). La electroforesis se llevó a cabo en cámara submarina horizontal utilizando para ello como tampón de corrida la solución amortiguadora Tris Borato (0,4 M de Tris; 0.5 M de ácido bórico), EDTA (0,01 M de ácido etilendiamina tetracético, Sigma) (TBE) 1X. La corrida se realizó a 110 voltios (V) hasta que las bandas alcanzaron las tres cuartas partes del gel (35 min. aproximadamente). Mediante el transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision™), las bandas del ADN amplificado fueron visualizadas. La talla correcta de la amplificación se determinó mediante la comparación con el patrón de migración del marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (DNA ladder 100bp, Promega, Madison, WI, USA) (Sambrook y cols., 1989). Los resultados positivos presentaron una banda a la altura de los 306 nt correspondiente al gen de la RdRp (Zhai y cols., 2006).

III.1.3.3.2 TR-RCP simple para el MAL2

Los cebadores empleados en la TR-RCP simple fueron referidos por Schlauder y cols. e hibridaron con el MAL2 desde la posición 6298–6494 según la cepa de Birmania Bur82, del VHE (Schlauder y cols., 1999).

Una vez que se obtuvo el ARN viral este fue desnaturalizado al calentarse a 70 °C por 10 min. en el termociclador Eppendorf e inmediatamente colocado en hielo. La TR se realizó con una

mezcla que contenía tampón de la TRa (Tris-HCl [10 mM, pH 8,3]; KCl [50 mM]; MgCl₂ [3mM]; dithiothreitol [10mM]); dNTP (0,5 mM cada uno, Promega, Madison, WI, USA); cebador antisentido (45 pm); inhibidor de RNasa (20 UD) (Promega, Madison, WI, USA); la enzima TR AMV (AMV siglas del inglés, *Avian Myeloblastosis Virus*) (5 UD, Promega, Madison, WI, USA) y 5 µL del ARN viral desnaturalizado; para un volumen total de 25 µL. La mezcla fue incubada 1 hr a 42 °C y luego calentada durante 15 min. a 70 °C, para inactivar la enzima, se utilizó el termociclador antes referido.

La RCP simple fue preparada para un volumen final de 50 µL que contenía 5 µL de ADN complementario (ADNc), tampón de amplificación 10X [Tris-HCl 10 mM, pH 9,2, KCl, 75 mM, MgCl₂ 15 mM (Sigma)]; trifosfato de deoxinucleotidos (dNTP, 0,2 mM cada uno Sigma), cebadores sentido y antisentido (50 pm cada uno) (Tabla III.2) y la enzima Taq ADN polimerasa (2,5 UD, Promega, Madison, WI, USA). La mezcla fue sometida a 35 ciclos de desnaturalización (95 °C x 30 seg.); hibridación (55 °C x 45 seg.) y extensión (72 °C x 60 seg.); seguida de una elongación final de 72 °C x 7 min. Como control positivo se utilizó 2 ng de un plásmido que tenía insertado el MAL2 (PSG-MAL2) de un aislamiento de la India (cepa Yam67) (Jameel y cols., 2002). El producto de la RCP de 197 pb fue separado en gel de agarosa (Promega, Madison, WI, USA) al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision™), realizando el mismo procedimiento de Sambrook y cols. (1989) y descrito en el acápite III.1.3.3.1.

Tabla III.2. Cebadores empleados en la TR-RCP simple para la amplificación de la cápside del VHE (Schlauder y cols., 1999).

Cebadores	Secuencias de base(5'-3')	Posición*
S2	GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG	CS 6298 - 6321
A2	TGCTTGTTCRYTGGTTRTCATAATC	CA 6494 - 6470

Leyenda: CS - Cebador sentido; CA - Cebador antisentido.

* Posición nucleotídica en la cepa de Birmania Bur82, M73218.

III.1.3.3.3 TR-RCP anidada para el MAL2

Este método se utilizó para amplificar el segmento del MAL2 del genoma viral a la región comprendida entre los nt 5960 y 6295, los cuales codifican para la proteína estructural (cápside)

(Li y cols., 2005). Primeramente, se realizó la TR-RCP en un paso, con el estuche One Step PCR (QIAGEN, Hilden, Germany). La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 200 μL a un volumen final de 50 μL , donde se añadió 5 μL de ARN extraído (aproximadamente 100 ng) a una mezcla que contenía los siguientes componentes: 10 μL de solución tampón, 2 μL de enzimas (One Step RT-PCR Enzyme mix), 2 μL de dNTP (10 mM), 1 μL cebadores sentido (HEV-F1) y antisentido (HEV-R2) externos a 50 pm cada uno (Tabla III.3) y se completó con agua libre de RNasa y DNasa (Sigma). Como control positivo se utilizó 10 ng de un plásmido que tenía insertado el MAL2 (PSG-MAL2) de un aislamiento de la India (cepa Yam67) (Jameel y cols., 2002). La mezcla de reacción para la TR-RCP se colocó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) con el siguiente programa: para efectuar la TR primeramente se incubó la mezcla de reacción a 50 °C durante 30 min. Luego de la inactivación de la enzima TR a 94 °C por 2 min., las mezclas fueron sometidas a 35 ciclos de desnaturalización (95 °C x 30 seg.); hibridación (55 °C x 1 min.) y extensión (72 °C x 60 seg.), seguida de una elongación final de 72 °C x 10 min.

La RCP anidada se preparó para un volumen final de 50 μL que contenía 5 μL de ADN amplificado en la TR-RCP; con tampón de amplificación 10X [Tris-HCl 10 mM, pH 9,2, KCl, 75 mM, MgCl_2 15 mM (Sigma)]; trifosfato de deoxinucleotidos (dNTP, 0,2 mM cada uno, Sigma); cebadores sentido (HEV-F2) y antisentido (HEV-R1) internos a 50 pm cada uno (Tabla III.3) y la enzima Taq ADN polimerasa (2.5 UD) (Promega, Madison, WI, USA). El termociclador utilizado fue el Eppendorf Mastercycler personal. Las mezclas de la RCP anidada fueron sometidas a una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min., para proseguir con 35 ciclos de desnaturalización (95 °C x 30 seg.); hibridación (55 °C x 45 seg.) y extensión (72 °C x 60 seg.), seguida de una elongación final de 72 °C x 7 min.

Los productos amplificados a la altura de los 377 nt correspondiente al gen de la cápside fueron separados en gel de agarosa (Promega, Madison, WI, USA) al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz (Spectroline® Bi-O-Vision™), realizando el mismo procedimiento de Sambrook y cols. (1989) y descrito en el acápite **III.1.3.3.1**.

Tabla III.3. Cebadores empleados en la TR-RCP anidada para la amplificación de la cápside del VHE (Li y cols., 2005).

Cebadores	Secuencias de base(5'–3')	Posición*
HEV-F1	GGBGTBGCNGAGGAGG	CSE 5903 - 5922
HEV-R2	TGYTGGTTRTCRTARTCCTG	CAE 6486 - 6467
HEV-F2	TAYCGHAAAYCAAGGHTGGCG	CSI 5939 - 5968
HEV-R1	CGACGAAATYAATTCTGTCG	CAI 6316 - 6297

Leyenda: CSE - Cebador sentido externo; CAE - Cebador antisentido externo

CSI – Cebador sentido interno; CAI – Cebador antisentido interno.

* Posición nucleotídica en la cepa de Myanmar, D10330.

III.1.3.3.4 Determinación de la sensibilidad de las TR-RCP

La sensibilidad analítica de cada prueba de TR-RCP fue evaluada mediante la determinación del límite de detección (LD) o mínima cantidad de ADN requerida para la amplificación, lo cual se realizó utilizando diluciones exponenciales (desde 20 ng hasta 2×10^{-6} ng) de ADN. Se tomaron 2 ng de ADNc del MAL 1 y MAL2 de la cepa Yam 67 del VHE (Jameel y cols., 2002), insertado a un plásmido (TOPO-MAL 1 y PSG-MAL2) y las diluciones oscilaron desde 10^7 hasta 10^2 copias de genoma viral / μ L (Morán y cols., 2000).

III.2 Prevalencia del VHE y los factores de riesgo asociados en población supuestamente sana

III.2.1 Muestras

Se realizaron dos estudios en población supuestamente sana del municipio La Lisa y en individuos que cumplían esta misma condición pero que no tenían antecedentes de HVA y residían en los municipios Playa y Marianao.

Diseño de la investigación: Se utilizó un diseño analítico observacional de corte transversal para ambos estudios (La Lisa, Marianao y Playa).

III.2.1.1 Encuesta sero-epidemiológica del municipio La Lisa

Durante el 2002, fue seleccionado el grupo de estudio mediante un muestreo bietápico con selección aleatoria en la primera etapa y sistemática en la segunda, teniendo en cuenta la población total supuestamente sana de la municipalidad, comprendida entre 5 y 55 años de edad. En la población estudiada se incluyeron alrededor de 70 familias agrupadas en 10 consultorios del Médico de la Familia, 5 de los cuales se ubicaban en zonas insalubres. Después

de obtener el consentimiento y la aprobación de cada individuo para participar en este estudio (Anexo VII), se realizó una entrevista personal donde se recopiló información de interés en cuanto a factores de riesgo epidemiológicos (género, edad, riesgo parenteral de exposición al VHE y hábitos culturales) asociados a la infección por el VHE, los que previamente habían sido reportados en la literatura (Anexo VIII). Se colectaron un total de 209 muestras de suero de voluntarios pertenecientes al municipio La Lisa, ubicado en Ciudad de la Habana. Del total de voluntarios, 132 fueron mujeres y 77 hombres, distribuidos en los siguientes grupos de edades: 5-15 (22); 16-25 (36); 26-35 (58); 36-45 (56) y 46-55 (37). Este municipio fue escogido por la alta prevalencia del VHA reportada en esta área geográfica (Aguilar, 2004). Además de las características socio-demográficas, territoriales e higiénico-sanitarias las cuales están estrechamente relacionadas con la incidencia de HVA en la comunidad (Jiménez y cols., 2002).

III.2.1.2 Encuesta sero-epidemiológica de los municipios de Playa y Marianao

Los municipios de Playa y Marianao de la Ciudad de la Habana fueron seleccionadas aleatoriamente para realizar la recolección de muestras a partir de personas supuestamente sanas y sin antecedentes clínicos (ictericia) de HVA. Se estimó el tamaño de la muestra con el paquete estadístico EPINFO versión 6,3 (sección stat calc para encuesta poblacional) para una prevalencia poblacional esperada de un 5% y un resultado elevado de 7%. Todos los participantes dieron su consentimiento para participar en este estudio (Anexo IX). El tamaño de la muestra fue de 456 personas a encuestar y para tomar los sueros respectivos, llegándose a obtener un total real de 469 personas (196 pertenecientes al municipio Playa y 273 al municipio Marianao). Por género se estudiaron 202 (43,1%) hombres y 267 (56,9%) mujeres, con una edad media de $31,9 \pm 14,3$ años de edad. Teniendo en cuenta la edad, se incluyeron 47; 70; 87; 128; 76 y 61 individuos entre 5 y 11; 12 y 20; 21 y 30; 31 y 40; 41 y 50; 51 y 60 años de edad, respectivamente. Este estudio se realizó de abril a septiembre del 2003. La selección de personas se hizo aleatoriamente, a partir de los censos de población, existentes en los consultorios de los médicos de familia de todos los policlínicos, en los respectivos municipios; de forma tal que la selección de la población participante quedó distribuida proporcionalmente y todos tuvieron la misma probabilidad de ser escogidos. Toda la población seleccionada fue encuestada (Anexo X) obteniéndose información demográfica y epidemiológica; así como las muestras de sueros para la determinación de Acs totales anti-VHE.

Individuos supuestamente sanos: Se incluyeron aquellas personas que no mostraban síntomas ni signos de enfermedad infecciosa aguda en el momento del estudio.

Individuos sin antecedentes de HVA: Se consideraron los individuos supuestamente sanos sin antecedentes clínicos (presencia de ictericia) de HVA.

Criterios de inclusión: Se incluyeron todas aquellas personas de ambos sexos con edades entre 5 y 55 años para el estudio de La Lisa. En la encuesta sero-epidemiológica de Playa y Marianao se incluyeron individuos entre 5 y 60 años, sin antecedentes clínicos de HVA.

Criterios de exclusión: Tener síntomas y signos de enfermedad infecciosa aguda en el momento del estudio.

Criterios de salida después de la inclusión: Si la persona una vez que fue incluida en el estudio decide por voluntad propia abandonar la investigación.

III.2.2 Detección de anticuerpos IgG anti-VHE (Encuesta sero-epidemiológica del municipio La Lisa) (Anderson y cols., 1999): El sistema comercial empleado fue suministrado por el Instituto para Investigaciones Médicas de Macfarlane, Victoria, Australia. En este EIE de tipo indirecto, el Ag de recubrimiento consistía en una proteína recombinante acoplada a la proteína de fusión GST, que fue expresada en la bacteria *E coli*. Esta proteína presentaba un epítipo conformacional altamente conservado e inmunogénico, que permitía detectar de manera óptima los Ac de tipo IgG anti-VHE durante la fase convalescente. En esta proteína denominada GST-MAL2.1 están contenidos los últimos 267 aa del extremo carboxilo terminal del MAL2 (cepa China, genotipo 1, subtipo 1b). Una vez recubierta la placa, se añadieron 100 µL de las muestras previamente diluidas 1:300 en una solución suministrada con este ensayo, e igual cantidad del control negativo suministrado por el fabricante. El control positivo empleado en este estuche comercial, fue un suero estándar evaluado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el VHE, el cual fue diluido 1:200, 1:1600 y 1:6400 en la solución previamente mencionada y se añadió por duplicado al igual que el control negativo (100 µL).

Luego de 50 min de incubación 20-25 °C en cámara húmeda, cada pocillo se lavó 6 veces con una solución de lavado y se añadieron 100 µL por pozo de Ac de oveja anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante. Seguido a otro período de incubación durante 50 min., con 20-25 °C en cámara húmeda, la placa se lavó 6 veces con la solución de lavado y se añadieron 100 µL por pozo de sustrato constituido entre otros componentes por H₂O₂ y TMB.

La placa se incubó bajo las condiciones descritas durante 15-20 min. y la reacción se detuvo con la solución de parada del estuche (100 μ L/pozo). Finalmente, la placa se leyó en un lector automático ELISA Reader 250, Biomérieux a una longitud de onda de 450 nm. El VC del ensayo se determinó como el producto de la media de la DO del control positivo (diluído 1:6 400), por una constante de 0,9. Todas las muestras con valores de DO mayores o iguales que el VC, fueron consideradas positivas y las de valores de DO menores, fueron negativas. Solo las muestras que presentaron valores de DO entre el VC y 10% menor que este, fueron repetidas por duplicado como sugería el fabricante.

III.2.3 Detección de anticuerpos totales anti-VHE (Encuesta sero-epidemiológica de los municipios Playa y Marianao) (Hu y cols., 2008): El ensayo de Genelabs Diagnostics Pte Ltd., Singapur, fue utilizado con Ags recombinantes de la región estructural del genoma viral para detectar la presencia de Ac anti-VHE en muestras de suero o plasma. El EIE se basó en un principio sándwich de doble antígeno. Los pocillos de las microplacas estaban recubiertos con Ag recombinantes del VHE correspondientes a la región estructural del virus, procedentes de los aislamientos asiáticos (genotipo 1, subtipo 1b), denominado ET2.1 (proteína recombinante del MAL2). Se añadió 80 μ L del diluyente de muestra a cada pocillo de la placa. Seguidamente, se adicionó 20 μ L de suero previamente equilibrado a TA (20-25 °C) para dar una concentración final de 1:5. Los controles positivos y negativos se trataron igual que las muestras. Luego se procedió a incubar la placa durante 30 min. a 37 °C. La placa se cubrió con una membrana adhesiva en cámara seca, para evitar la evaporación del contenido de cada pocillo. A continuación se lavaron 6 veces los pocillos en lavador Washer 430 (Biomérieux) para eliminar los Ac no unidos y se añadió 100 μ L del conjugado que consistió en la proteína recombinante ET2.1 marcada con peroxidasa, suministrado por el productor listo para el uso. Los Ags marcados no ligados que estaban en exceso, fueron eliminados mediante los 6 ciclos de lavado. Después se añadió 100 μ L de una solución de sustrato TMB y se incubó por un período de 15 min. a 37 °C. La presencia de Acs específicos anti-VHE estuvo indicada por el cambio de coloración de azul a amarillo, luego de la adición de la solución de parada suministrada con el estuche. La intensidad del color fue dada en unidad de absorbancia mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 450 nm con filtro de referencia de 620 nm, la que fue proporcional a la cantidad de Acs presentes en la muestra. La lectura se realizó en un lector de ELISA Reader 250, Biomérieux. Para el control de calidad se utilizaron

los valores de la media de DO de los controles negativos $\leq 0,100$ nm, mientras que la de los controles positivos fue $\geq 0,500$ nm. El VC se determinó mediante la suma de 0,2 a la media de controles negativos. Las muestras con absorbancia mayor o igual al VC se consideraron inicialmente reactivas (positivas) y fueron reevaluadas en duplicados antes de una interpretación final.

III.2.4 Evaluación de la reactividad de los sueros obtenidos en la encuesta sero-epidemiológica de los municipios Playa y Marianao con el EIE empleado (Gambel y cols., 1998; Cowie y cols., 2005)

Se realizó un análisis de frecuencia del nivel de reactividad de cada suero ante la proteína recombinante del MAL2 del VHE empleadas en el EIE para la detección de Ig totales anti-VHE de Genelabs Diagnostics Pte Ltd., Singapur, (Hu y cols., 2008). La reactividad se expresó como el cociente del valor de la DO de la muestra/VC (DOm/VC) de la placa en la que se evaluó la muestra. Asimismo, se evaluó la media y la desviación estándar (DS) de la DO de las muestras positivas y negativas.

III.3 Prevalencia del VHE y los factores de riesgo asociados en un grupo de trabajadores de granjas porcinas

III.3.1 Muestras

Se incluyeron trabajadores de cuatro granjas porcinas de la provincia La Habana durante el período de tiempo comprendido entre febrero y marzo del 2007. El universo de estudio estuvo constituido por 106 trabajadores de cuatro granjas porcinas de provincia Habana [Anafe (41); Jigue (21); Virana (10) y Caonao (34)]. Previo a la toma de muestra de suero, los trabajadores manifestaron su disposición y dieron su consentimiento informado para participar en el estudio (Anexo XI). Además, se pudieron coleccionar 57 muestras de heces del total de trabajadores incluidos en la investigación.

Se diseñó un modelo de encuesta donde se recogieron datos generales, demográficos, ocupacionales, hábitos higiénicos, antecedentes de ictericia y otros factores de riesgo asociados a la hepatitis E (Anexo XII). De las 106 personas estudiadas, 19,8% (21/106) fueron femeninas y 80,1% (85/106) masculinas. El promedio de edad fue de 39,9 y ésta osciló entre 18 y 70 años. Los sueros y las heces fueron conservados a -20 y a -70 °C, respectivamente hasta su uso.

Diseño de la investigación: Se realizó un estudio observacional con componente analítico.

Criterios de inclusión: Se incluyeron todas aquellas personas que estaban vinculadas directa o indirectamente al trabajo con cerdos, que mostraron su disposición para participar en la investigación.

Criterios de exclusión: Tener síntomas y signos de enfermedad infecciosa aguda.

Criterios de salida después de la inclusión: Si la persona una vez que fue incluida en el estudio decide por voluntad propia abandonar la investigación.

III.3.2 Detección de anticuerpos totales anti-VHE

Se empleó el EIE para la detección de Ig totales anti-VHE de Genelabs Diagnostics Pte Ltd., Singapur, (Hu y cols., 2008), descrito anteriormente en el acápite **III.2.3**.

III.3.3.1 Determinación cuantitativa *in vitro* de la ALAT en suero humano con activación por fosfato de piridoxal

La ALAT se cuantificó a las muestras de suero positivas a las Ig totales anti-VHE, utilizando el método estandarizado por la Federación Internacional de Química Clínica (FIQC) (Bergmeyer y cols., 1986b; Heins y cols., 1995). La actividad del analito de cada muestra fue leída automáticamente en el sistema Roche/Hitachi cobas c, a una longitud de onda de 340 nm y el cálculo se expresó en U/L. Los intervalos y límites del control se adaptaron a los requisitos individuales del laboratorio. El intervalo de medición osciló de 4-600 U/L. Según el género se estableció como valores normales de ALAT de 0-41 U/L para los hombres y de 0-31 U/L para las mujeres (Klauke y cols., 1993).

III.3.3.2 Determinación cuantitativa *in vitro* de la ASAT en suero humano con activación por fosfato de piridoxal

La ASAT se cuantificó a las muestras de suero positivas a las Ig totales anti-VHE, utilizando el método estandarizado por la FIQC (Bergmeyer y cols., 1986a; Heins y cols., 1995). La actividad del analito de cada muestra fue leída automáticamente en el sistema Roche/Hitachi cobas c, a una longitud de onda de 340 nm y el cálculo se expresó en U/L. Los intervalos y límites del control se adaptaron a los requisitos individuales del laboratorio. Según el género se estableció como valores normales de ASAT de 0-38 U/L para los hombres y de 0-32 U/L para las mujeres (Klauke y cols., 1993).

III.3.4 TR-RCP para la detección del genoma viral del VHE

La extracción del ARN se hizo a partir de muestras de suero y heces de personas positivas a las Ig totales anti-VHE. La extracción del ARN se realizó siguiendo la metodología descrita en el

acápites **III.1.3.2**. La TR-RCP anidada amplificó la región RdRp incluida en el MAL 1 cuyo protocolo fue descrito en el acápites **III.1.3.3.1**.

III.4 Evaluación de la sensibilidad de varias líneas celulares para la multiplicación del VHE

Esta se realizó siguiendo el protocolo descrito por Huang y cols con algunas modificaciones (Huang y cols., 1992; Huang y cols., 1995b; Huang y cols., 1999a).

III.4.1 Preparación de la suspensión de heces

La muestra de heces fue colectada de un paciente cubano (ECV/2349-03) con diagnóstico clínico, serológico y molecular de hepatitis E; en los primeros 15 días después del inicio de los síntomas y elevación de las aminotransferasas (ALAT y ASAT). El espécimen fue conservado a -70°C hasta su uso. La suspensión se preparó al 10% (peso/volumen) en medio esencial mínimo (MEM) (Sigma) libre de SBF y suplementado con ampicilina (100 U/mL) y estreptomycinina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma). Inmediatamente, fue homogenizada con vortex (Genie) y luego clarificada por centrifugación (centrifuga Eppendorf) a 6 000 g, durante 15 min. a TA (20-25 $^{\circ}\text{C}$). Se tomaron 900 μL de la fase acuosa que se mezcló con 100 μL de cloroformo (Sigma), después de agitarse se centrifugó en las condiciones anteriormente descritas y se extrajo el sobrenadante para inocularlo en el cultivo celular.

III.4.2 Cultivos celulares

Para el aislamiento viral se utilizó la línea celular A549 con un rango de pases de 104-114 procedentes de la ATCC (ATCC, 1992). Estas crecieron en frascos plásticos de 25 centímetros² (cm^2) (Corning-Costar) a 37 $^{\circ}\text{C}$ (Incubadora, Sanyo), hasta que la monocapa llegó a ser semiconfluente. Para el crecimiento de las células se empleó MEM Dulbecco modificado (Invitrogen) con pH 7,2 ajustado con bicarbonato de sodio al 1% (Sigma), suplementado con SBF al 10% (Eurobio), ampicilina (100UI/mL) y estreptomycinina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma).

Para evaluar la capacidad de propagación del VHE en varias líneas celulares fueron utilizadas las células diploides de fibroblasto de pulmón humano (MRC-5) en el rango de pases de 18-28. Se utilizaron otras líneas celulares como las de carcinoma epidermoide de laringe humano (HEp-2) rango de 258-268 pases; las células epiteliales de riñón de mono *rhesus* (LLC-MK2) con pases de 142-152; las células derivada de fibroblasto de riñón de mono *rhesus* (FRhK4) con pases de 49-59 y las células epiteliales humanas de carcinoma cervical (HeLa) pases de 112-122, todas estas células procedían de la ATCC (ATCC, 1992). Las líneas celulares antes

mencionadas crecieron en MEM, excepto las células FRhK4 que crecieron con medio Dulbecco, suplementado con SBF al 10%, ampicilina y estreptomycin (Sigma) con las concentraciones antes referidas. Estas células fueron servidas en tubos de poliestireno de 16x125 milímetros (mm) con la monocapa semiconfluente.

III.4.2.1 Aislamiento y propagación del virus

Para aislar el virus en A549, el medio de crecimiento se decantó y se inoculó la monocapa con 500 µL de la suspensión de heces, la que se mantuvo en contacto con las células durante 1 hr a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se completó con medio de mantenimiento (MEM, 2% SBF y antibióticos) y las células fueron observadas diariamente con el microscopio óptico invertido (Olympus) de 9-11 días en búsqueda del ECP descrito con anterioridad por Huang y cols. (1999b). Cuando el ECP llegó a ser de 3 cruces (75% de la monocapa afectada) los frascos fueron congelados a -70 °C. Para los pases sucesivos las células y el sobrenadante se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación con el propósito de liberar el virus intracelular, luego se clarificó el sobrenadante, mediante una centrifugación a 2 000 g y se inoculó en la nueva monocapa. Para la propagación del virus en las células MRC5, LLC-MK2, HEp-2, FRhK4 y HeLa se tomó 100 µL del sobrenadante del 3er pase en las células A549. Este se mantuvo en contacto 1 hr. a 37 °C con la monocapa de cada línea celular. Luego, se procedió a completar hasta 1 mL de medio de mantenimiento en correspondencia con el sistema celular empleado. Las células fueron observadas diariamente hasta los 11 días, con cambios de medio de mantenimiento semanal.

El ECP se cuantificó según la superficie de la monocapa que presentaba cambios morfológicos y fue dado por: 25% (1 cruz); 50% (2 cruces), 75% (3 cruces) y 90% (4 cruces). Las células A549 fueron sub-cultivadas hasta el 5to pase, mientras que para el resto de las células se realizaron tres pases a ciegas (Huang y cols., 1995a; Melnick, 1996).

Como controles celulares se dejaron las líneas celulares empleadas sin inocular en cada subcultivo que se realizó.

III.4.3 Identificación viral

III.4.3.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Esta se realizó según lo descrito por Kazachkov y cols. (1992) y se empleó para detectar la expresión de Ags virales en las líneas celulares empleadas. Después de completar el tiempo de cultivo del virus, las células fueron desprendidas de la superficie donde crecían, con golpes

secos y fuertes dados al exterior del frasco de cultivo, para ser fijadas en láminas portaobjetos (Thermo Scientific). Se tomó 1 mL del medio que se dispensó en tubos Eppendorf de 1,5 mL, los que fueron centrifugados (Centrifuga Eppendorf) a TA a 2 000 g por 10 min. Luego de eliminar el medio de mantenimiento, las células fueron sometidas a dos lavados con PBS 1X. Posteriormente, se resuspendieron en el mismo tampón y se gotearon en las láminas para ser fijadas con acetona, durante 15 min a 4°C. Como fuente de Ac para detectar la expresión de Ags del virus se utilizó una mezcla de sueros de títulos altos de Ig totales anti-VHE detectados por estuches diagnósticos comerciales de Genelabs Diagnostic (Singapur). Después de añadir los Ac diluidos 1:40 con PBS 1X, las láminas se incubaron 30 min. a 37 °C en cámara húmeda (Incubadora, Sanyo) y luego de tres lavados con PBS se añadió el conjugado anti-Ig humana/isotiocinato de fluoresceína (Sigma) diluido 1:40 con azul de Evans (Sigma). La muestra se mantuvo en contacto con el conjugado 30 min. a 37 °C en cámara húmeda y al cabo de este tiempo se hicieron tres lavados con PBS 1X. A las láminas después de secadas se les añadió glicerina buferada sobre la cual se colocó el cubre objeto. Las muestras fueron observadas en el microscopio de fluorescencia (Olympus). Los resultados fueron dados en positivos (% de células infectadas) y negativos, teniendo en cuenta el control de células no infectadas, a las que se les aplicó mismo procedimiento.

III.4.3.2 Detección del ARN-VHE:

Para la extracción se tomaron 200 µL del sobrenadante de cada línea celular, recogido una vez completado el tiempo de cultivo y la extracción se realizó mediante el método de TRIzol, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La región del genoma amplificada correspondió al MAL2 (Li y cols., 2005), donde se empleó la TR-RCP simple cuyo protocolo fue descrito en el acápite **III.1.3.3.2**.

III.5 Relación filogenética de los aislamientos cubanos del VHE con otras cepas que circulan en el mundo

III.5.1 Muestras

Se caracterizaron genéticamente 16 productos amplificados del MAL 1 (RdRp) obtenido de muestras de heces provenientes de brotes, casos esporádicos (12 muestras) y del grupo de riesgo identificado en el estudio (4 muestras). Dos especímenes de heces procedentes de un caso clínico esporádico y de un brote que fueron positivos para el MAL 1 lo fueron además para la TR-RCP anidada para el MAL2 (región de la cápside) y se secuenciaron.

III.5.2 Clonaje y secuenciación nucleotídica

Se clonaron 14 productos de RCP, 12 del MAL 1 y dos del MAL2. Los productos de la TR-RCP con la talla esperada fueron purificados utilizando el estuche comercial QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

III.5.2.1 Reacción de ligazón

El ADN purificado fue ligado con el vector pGEMT Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA, Madison, WI, USA), siguiendo el protocolo orientado por el fabricante. Esto se logró incubando toda la noche a 4 °C la reacción siguiente: 5 µL de 2X de solución tampón de ligazón (Tris-HCl, 60 mM, pH 7,8; MgCl₂ 20 mM; DTT 20 mM, ATP 2 mM; 10% polietilenglicol); 1 µL de plásmido p-GEMT Easy Vector; 1 µL de T4 ligasa, 2 µL de ADN de RdRp (25 ng), para un volumen final de 10 µL a completar con agua libre de ARN y ADNasa (Sigma).

III.5.2.2 Transformación y cultivo de colonias

Las células competentes *E. coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA) fueron transformadas añadiendo 5 µL de la reacción de ligazón a 800 µL de células competentes, estas fueron colocadas en hielo durante 30 min. y luego en un bloque térmico (Wise-Therm) a 42 °C por 90 seg. Estas células transformadas fueron incubadas nuevamente en hielo por 5 min. y posteriormente se les adicionó 1 mL de medio Luria-Bertani (LB) [extracto de triptona 1% masa/volumen (m/v), extracto de levadura 0,5% m/v y cloruro de sodio 1% m/v, pH 7,4 (Sigma)] y mantenidas en viales de 1,5 mL a 37 °C (Incubadora, Sanyo) durante 1 hr. Las células fueron centrifugadas a 6 000 g por 5 min. para eliminar el medio y se le añadió 100 µL de medio nuevo para resuspender las células (Sambrook y cols., 1989).

Las bacterias fueron sembradas en placas petri (BioRAD, USA) que contenían 30-35 mL de LB sólido con ampicilina (15 gr de agar/L de LB, ampicilina 100 µg/mL; inductor de la expresión del gen de la galactosidasa 0,5 mM; enzima X-Gal 80 µg/mL) y fueron incubadas en una incubadora a 37 °C (Sanyo) toda la noche. Las colonias blancas (indicador de haber incorporado el inserto) fueron recogidas y puestas a crecer en medio LB líquido en agitación constante toda la noche a 37 °C a 200 rpm. en una saranda (Shaking Incubator NB-205). El plásmido con el inserto fueron extraídos al centrifugar 3 mL de cultivo de células a 20 000 g (Centrifuga Eppendorf) durante 2 min. Para la extracción del ADN y purificación de plásmidos se utilizó un estuche comercial High Purity Plasmid Miniprep (RBC, India) y se

siguieron las recomendaciones de los productores. Luego de los pasos de lisados de células, el ADN precipitado fue resuspendido en agua de calidad biología molecular. Los plásmidos obtenidos de esta forma quedaron listos para chequear la presencia del inserto (Sambrook y cols., 1989).

La liberación del producto de la RCP insertado se produjo por el tratamiento del ADN plasmídico con la enzima de restricción EcoRI (Promega, Madison, WI, USA). Se emplearon 4 UD de EcoRI, solución amortiguadora EcoRI 1X, 16 μL agua para un volumen final de 20 μL , incubación a 37 °C durante 4 hr. e inactivada por 10 min. a 65 °C en un termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) (Wang y cols., 2001). La talla del producto clonado fue chequeada por corrida en gel de agarosa (Promega, Madison, WI, USA) al 2%, en las condiciones antes descritas en la TR-RCP anidada para el MAL 1 (acápite III.1.3.3.1). La concentración del ADN se determinó en un espectrofotómetro (GeneQuant RNA/DNA Calculator Spectrophotometer) y se envió para secuenciar de 10 a 15 μL de cada producto clonado a una concentración ≥ 100 ng/ μL . Al menos tres colonias por cada fragmento clonado fueron seleccionadas para la secuenciación, la que se realizó en un laboratorio comercial especializado (Macrogen Inc, Seoul, Corea).

En el resto de los aislamientos (4 muestras) los productos amplificados obtenidos directamente de muestras clínicas, fueron purificados utilizando QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Una vez purificados se chequearon en gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio (Sigma) 0,05 mg/mL en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision™). La secuenciación se realizó en el secuenciador automático Beckman Coulter (CEQ™ 88000 Genetic Analysis, System Beckman Coulter, USA).

III.5.2.3 Reacción de secuencia

La reacción de secuencia se realizó con el estuche Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la reacción se utilizaron tubos Eppendorf de 200 μL , el volumen final fue 20 μL , que contenía 8 μL de DTCS Quick Star Master Mix, cebador para secuencia 2 μL (5 pmol/ μL), molde de ADN que se dispensó de 2 a 4 μL según la concentración y la talla del fragmento a secuenciar ($\sim 10\text{-}13$ ng/ μL). Para alcanzar el volumen adecuado se completó con agua libre de RNasa y DNasa, suministrada con el estuche. La mezcla se colocó en un termociclador

(Eppendorf Mastercycler personal) con el siguiente programa: 96 °C x 20 seg., 50 °C x 20 seg., 60 °C x 4 min., estos pasos fueron repetidos 30 veces.

Al concluir la reacción, esta fue detenida con una mezcla de solución de parada y glicógeno, suministrada con el estuche. El producto de la secuencia fue precipitado con etanol (Sigma) frío al 95% (volumen/volumen), después de la centrifugación a 20 000 g (Centrifuga Eppendorf) por 10 min. a 4 °C, el producto fue resuspendido en 40 µL de solución de carga (formamida), suministrada por el fabricante. Las muestras fueron transferidas a los pozos de la placa (PN 609801), y se le añadió una gota de aceite mineral. La placa se introdujo en el secuenciador, para la lectura de las secuencias nucleotídicas.

Los cromatogramas y las secuencias obtenidas fueron analizados y editados usando el programa Sequencher™ Version 4.9 (Genes Codes Corporation, USA). Posteriormente, las secuencias fueron depositadas en el GenBank y los números de acceso de los aislamientos en población abierta fueron: en brotes CUB10-1999 (EU165504); CUB11-1999 (EU165502); CUB13-1999 (EU1655019); CUB19-1999 (EU165500), CUB24-1999 (EU165499), CUB27-2005 (EU165498); CUB68-2005 (EU165496), CUB71-2005 (EU165495), casos esporádicos: CUB9-2005 (EU165503), CUB1803-2003 (EU165494), CUB2-2005 (EF493155) y CUB53-2005 (EU165497). Los números de acceso en el estudio de trabajadores de granjas porcinas fueron: CUB15-2008 (FJ769237), CUB19-1999 (FJ948818), CUB25-2008 (FJ769238) y CUB28-2008 (FJ948819). Para el MAL2 los números de acceso al GenBank fueron: CUB10D-1999 (EU284749), CUB2D-2005 (EU284748) estos productos se obtuvieron de un brote y un caso esporádico, respectivamente.

III.5.2.4 Métodos empleados para analizar y comparar secuencias

Los datos de cada una de las secuencias fueron primeramente analizadas con el programa Chromas (versión 1,3, Griffith University, Brisbane, Queensland, Australia). Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas separadamente utilizando el ClustalX 2.0 (Larkin y cols., 2007). El análisis filogenético se realizó usando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2 parámetro, método Neighbor Joining. Un total de 37 secuencias disponibles en el Banco Internacional de Genes (GenBank, sitio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) fueron comparadas con las secuencias de la región de la RdRp y de la cápside (Anexo XIII). Para evaluar la robustez de los grupos filogenéticos generados se realizó un análisis de re-muestreo (bootstrap, del inglés) evaluado estadísticamente 1 000 réplicas de los árboles (Felsenstein,

1985), obtenidos con los paquetes contenidos en el programa MEGA versión 4,0 (Tamura y cols., 2007).

III.6 Consideraciones éticas

Todo el procedimiento experimental que se expone en el presente trabajo ha sido formulado en Proyectos de Investigación aprobados por el Comité de Ética del IPK, que actúa en conformidad con las leyes y reglamentos vigentes dictados por el MINSAP y el Ministerio de Ciencia Tecnología y Medioambiente. Estos contemplan los principios enunciados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial para las investigaciones médicas en seres humanos. A los participantes en los estudios observacionales y de prevalencia se les brindó toda la información necesaria sobre la investigación en cuestión que incluyó entre otros elementos, los objetivos, importancia, beneficios, su derecho de retirarse de la investigación cuando así lo hubiesen considerado sin necesidad de dar explicaciones y que no se tomarían represalias en cuanto a su posterior atención y seguimiento por los profesionales de la salud ante cualquier patología que presentasen. Además, se les ofreció un tiempo prudencial para que pensarán y decidieran su participación en el estudio y en caso afirmativo firmaron el documento preparado al efecto (Consentimiento Informado). Se garantizó la confidencialidad y la información generada en cada estudio, a los que solo los investigadores relacionados con el tema tuvieron acceso. Los datos y las muestras obtenidas no fueron utilizados para fines diferentes a los que se autorizó. En los casos de individuos menores de 16 años, se les solicitó el consentimiento para participar en la investigación a sus tutores, en presencia de testigos.

III.7 Medidas de bioseguridad

Al manipular las muestras humanas y los aislamientos del VHE para sus análisis se tomaron las precauciones requeridas por bioseguridad en los laboratorios de nivel de seguridad 2 (BSL-2, siglas del inglés, Biological Safety Level-2), para evitar infecciones por el VHE u otros microorganismos.

III.8 Análisis estadístico

Los resultados se presentaron en tablas y gráficos utilizando los programas Microsoft Office Word y Microsoft Office Power Point 2007 y se expresaron en porcentajes; distribuciones de frecuencias y en medias, +/- DS.

En los estudios de prevalencia, los datos obtenidos en las encuestas así como los resultados de las pruebas serológicas y moleculares fueron procesados con la utilización de los programas

estadísticos Epi Info versión 6,02 (CDC, Atlanta, GA) y NCSS PASS 2000, versión 97. Se calcularon las prevalencias de Ac totales anti-VHE.

Para analizar la asociación de los factores de riesgo y la positividad al anti-VHE se realizaron análisis univariado y bivariado con el empleo del riesgo de prevalencia (RP) y la razón de disparidad (OR, siglas del inglés odds ratio). Se calcularon los correspondientes intervalos de confianza (IC) de un 95%. La $p < 0,05$ fue tomada como medida de asociación altamente significativa.

IV. CAPÍTULO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Identificar si el VHE causa brotes, casos clínicos esporádicos, cuadros clínicos graves y fallecidos por HVA en Cuba, utilizando diferentes ensayos inmunoenzimáticos.

Para conocer las características sero-epidemiológicas de la infección por el VHE en Cuba fue necesario realizar el estudio etiológico de los brotes, casos clínicos esporádicos, graves y fallecidos por HVA. En particular para el estudio de los brotes se incluyó el marcador de infección aguda de hepatitis A (IgM anti-VHA), dado que el VHA y el VHE comparten la misma vía de transmisión entérica. Estos permitieron identificar la implicación de la hepatitis E en estos eventos epidemiológicos.

IV.1.1 Diagnóstico serológico

a) Estudio etiológico de brotes y casos clínicos esporádicos

En total se evaluaron 49 brotes procedentes de todo el país, de ellos 25 (51%) fueron positivos para la IgM anti-VHA como único marcador, 7 (14,2%) positivos para la IgM anti-VHE y en 16 (32,6%) brotes se demostró la presencia de marcadores para ambos virus (Tabla IV.1). Un brote quedó sin clasificar, pues fue serológicamente negativo a los virus estudiados. Individualmente, de los 382 sueros colectados en los brotes antes referidos, 207 (54,1%) resultaron positivos para la IgM anti-VHA y 24 (6,3%) positivos para la IgM anti-VHE. En 37 (9,7%) sueros se identificó la co- infección (VHA/VHE) y 114 (29,8%) muestras fueron negativas para ambos marcadores.

La elevada positividad al VHA encontrada en los brotes no fue sorprendente, ya que el patrón de endemidad para este virus en Cuba fue demostrado en estudios anteriores, en los que se estima que el 73,9% de la población cubana tiene Ac contra el VHA (Aguiar, 2004). A principio de la década del 90 del siglo pasado Balmaseda y cols. (1994) estudiaron 56 brotes de hepatitis viral y en 34 de ellos se confirmó como agente causal el VHA, lo que representó el 62,5%.

Se detectaron brotes positivos a la IgM anti-VHE como único marcador o en asociación con la IgM anti-VHA en todas las regiones del país, obteniéndose un mayor índice de positividad al VHE en las provincias de Ciudad de la Habana y Matanzas, con 12,2% (6/49) y 8,1% (4/49), respectivamente.

Los datos aquí mostrados, en cuanto a la elevada positividad al VHA con respecto al VHE (51% vs 14,2%) en los brotes, sugiere que aunque los VHA y VHE co-circulan en Cuba, país con clima tropical; probablemente la resistencia del VHA le permite una mejor supervivencia en estas condiciones ambientales ocasionando una alta morbilidad. Por otra parte desde el punto de vista serológico, la IgM anti-VHA aparece precozmente y se mantiene detectable hasta 6 meses después de la infección; contrariamente la IgM anti-VHE disminuye hasta hacerse indetectable a partir de los 3 meses del contacto infectante (Myint y cols., 2006). Este hallazgo coincide con los estudios de prevalencia de ambos virus realizados en países endémicos de regiones tropicales y sub-tropicales (Arankalle y cols., 2001; Scott y cols., 2009). Además, se conoce que estos virus tienen características clínicas y epidemiológicas diferentes: el período de excreción del VHA es de 2 semanas, la cantidad de partículas virales excretadas es alta, al igual que la tasa de ataque secundario. Debido a su resistencia a los agentes físicos y químicos, el VHA permanece infeccioso durante mucho tiempo bajo las condiciones ambientales. En tanto, el VHE se excreta hasta 4 semanas posterior a la infección, pero a concentraciones bajas, las partículas virales son frágiles *in vitro* y su viabilidad en el ambiente es poco conocida (Buisson y cols., 1993).

Tabla IV.1. Detección de la IgM anti-VHA y anti-VHE en brotes y casos clínicos esporádicos de HVA. Cuba, 1998-2005.

Marcadores virales (IgM)	Brotes n (%)	Sueros colectados en brotes n (%)	Casos clínicos esporádicos n (%)
anti-VHA positivo	25 (51)	207 (54,1)	54 (35,2)
anti-VHE positivo	7 (14,2)	24 (6,3)	20 (13)
anti-VHA/anti-VHE positivos	16 (32,6)	37 (9,7)	12 (7,8)
anti-VHA/anti-VHE negativos	1 (2)	114 (29,8)	67 (43,6)
Total	49	382	153

Fuente de datos: Libro de entrada de muestras, LNRHV, IPK. Leyenda: n, número total.

El hallazgo de la co-circulación del VHA y el VHE en brotes no fue algo inesperado, debido a que comparten la misma vía de transmisión. Esto fue descrito por Lemos y cols. quienes encontraron un 14,1% de co-infecciones en casos de HVA en un estudio realizado en población de la capital cubana (Lemos y cols., 2000). Coursaget y cols. (1998) en la República de Djibouti detectaron por primera vez un brote de HVA de transmisión hídrica involucrando el VHA y el VHE, donde la cantidad de positivos para el VHE fue más elevada que para el VHA (39% vs 33%).

La infección dual con VHA y VHE detectada en este estudio se produjo por la existencia de personas susceptibles de infectarse con ambos virus, lo que difiere de lo encontrado en Nepal donde los habitantes de este país adquieren inmunidad para la hepatitis A en los primeros años de vida, disminuyendo el índice de infección por este virus a medida que aumenta la edad (Clayson y cols., 1995).

A diferencia de los datos obtenidos en algunos países de Asia, África y en América (México), en el período estudiado no se produjeron epidemias explosivas de hepatitis E, a pesar de que se detectaron brotes positivos a la IgM anti-VHE sola o en combinación con el VHA. Como se conoce, en las grandes epidemias de hepatitis E la mayoría de los individuos infectados se exponen a una fuente primaria de contaminación (grandes suministros de agua para el consumo), acompañada de una baja tasa de ataque secundaria (en contraste con la hepatitis A) (Aggarwal y Naik, 1992). Aunque estas razones no son suficientes, probablemente factores del virus dado por una baja patogenicidad de la cepa que circula en nuestro medio y factores propios del hospedero relacionados con la inmunogenética, justifiquen estos resultados (Chandra y cols., 2008).

Igualmente, en Egipto con una prevalencia del VHE (67,7% de anti-VHE) compatible con regiones hiperendémicas para el virus, no se recogen antecedentes de epidemias. Los investigadores atribuyeron estos hallazgos a la presencia de Ac anti-VHE producidos por infecciones asintomáticas en la infancia, estos provocan que las re-exposiciones al VHE actúen como una reactivación natural sin producir ninguna manifestación clínica (Stoszek y cols., 2006b).

De los 153 casos clínicos esporádicos de HVA evaluados 54 (35,2%) fueron positivos a la IgM anti-VHA, 20 (13%) positivos a la IgM anti-VHE y 12 (7,8%) resultaron positivos para ambos marcadores (Tabla IV.1).

El marcador serológico de infección aguda del VHA, predominó en los casos esporádicos evaluados, similar a lo obtenido por Lemus y cols. (2000). El porcentaje encontrado de la IgM anti-VHE como único marcador (13%), coincide con el estudio antes referido donde se reportó un 16,4% de positividad para este Ac en personas de la capital atendidas en la consulta de gastroenterología del hospital “Carlos J Finlay” (Lemos y cols., 2000). En cuanto a los marcadores de hepatitis A y E (7,8%), nuestros resultados difieren de lo descrito en Singapur donde se detectó un 20% de co-infecciones en casos esporádicos de HVA (Chow y cols., 1997).

La detección de la IgM anti-VHE en los casos clínicos esporádicos difieren en diferentes partes del mundo. En un estudio realizado en el Sur de España con el objetivo de detectar infección aguda por el VHE en pacientes con valores anormales de ALAT, en los cuales otros tipos de hepatitis fueron excluidos, el 8,9% resultaron positivos para la IgM anti-VHE (Pérez-Gracia y cols., 2004). En otra investigación conducida en Beijing, región endémica para el VHE entre los años 1995 y 2000 en pacientes con HVA se obtuvo un 33% de positividad para la IgM anti-VHE (Lu y cols., 2001), siendo este porcentaje más elevado que el detectado en la presente investigación.

En general, el comportamiento de la positividad a la IgM anti-VHE como único marcador en brotes y casos esporádicos fue similar. Asimismo, cuando analizamos el número de sueros positivos individualmente obtenidos de brotes, una sexta parte (16%) de los mismos fueron positivos a la IgM anti-VHE solo o en combinación con la IgM anti-VHA. Este resultado fue diferente para los casos esporádicos, alcanzando un valor de 20,8%. La selección que se hizo de los pacientes teniendo en cuenta la evolución atípica y la negatividad a los marcadores serológicos de diagnóstico del VHB y el VHC, pudo haber contribuido a estos resultados.

No debemos pasar por alto que el 29,8% de los sueros colectados de brotes fueron negativos a los Ac anti-VHA y anti-VHE, lo que pudiera estar relacionado con una selección inadecuada de casos sospechosos de HVA que se hizo en los brotes estudiados, así como problemas con la temperatura de conservación y transporte de los sueros al LNRHV. Otro aspecto que pudo haber influido no solo en el estudio de brotes sino en el 43,6% de los casos clínicos esporádicos negativos fue la sensibilidad de los EIE para detectar Ac contra el VHE. Esta varía considerablemente de 42 a 98%, unido a la propia cinética de los títulos de IgM anti-VHE que generalmente son bajos y transitorios (Panda y cols., 2007). Mientras que la respuesta de IgM

anti-VHA es potente, lo que se traduce en una producción de altos niveles de esta Ig y el ELISA de IgM anti-VHA empleado tiene una sensibilidad y especificidad elevada, comparable con los que se comercializan internacionalmente {Rodríguez L, 1994 #2218}.

Un análisis adicional debe hacerse con el 43,6% de los casos clínicos esporádicos que al mismo tiempo fueron negativos al HBsAg y al anti-VHC, marcadores utilizados para definir el tipo de HVA en aquel momento en el LNRHV. Teniendo en cuenta la serología de la infección por VHB, no podemos descartar que los casos estudiados estuvieran en el periodo de ventana de esta entidad, donde la IgM anti-core es el único marcador serológico positivo y no estaba disponible en el laboratorio. En cuanto a la hepatitis C, esta entidad generalmente es asintomática, aunque en las primeras 8 semanas de la infección aguda antes del período de sero-conversión esta se diagnóstica a través de técnicas moleculares altamente sensibles, como la TR-RCP (Aksu y cols., 1999), la que no se realizaba en el laboratorio. No obstante, no podemos descartar que otros microorganismos aún no identificados pudieran estar involucrados en estas formas clínicas.

En general, estos resultados demuestran que existe el riesgo permanente de infecciones de transmisión fecal-oral en Cuba y que las formas epidemiológicas de presentación de la hepatitis E tanto en brotes como en casos esporádicos de HVA es común en nuestro medio, siendo un patrón que se presenta en países endémicos para esta entidad (Aggarwal y Naik, 2009). Los hallazgos sugieren que se impone desarrollar estrategias de prevención y control de la hepatitis E en Cuba.

Teniendo en cuenta las características epidemiológicas de la infección por VHA y VHE, se evaluó la presencia de IgM anti-VHA y anti-VHE por grupos de edades, en instituciones cerradas y en población abierta (Tabla IV.2). La mayoría de los casos en los tres grupos estudiados resultaron positivos a la IgM anti-VHA, y en menor proporción fueron positivos a la IgM anti-VHE. Especialmente, en la población cerrada menor de 15 años se encontraron personas susceptibles a la infección por el VHE, patrón que se reporta usualmente en países endémicos al VHE (Aggarwal y Naik, 2009). En un estudio llevado a cabo en niños del norte de la India integrantes de una población urbana, se encontró que el 42,8% resultaron positivos a la IgM anti-VHE y en niños de áreas rurales fue 47,3% (Mathur y cols., 2001).

En la población co-infectada con el VHA y el VHE se detectaron positivos en todos los grupos de edades, oscilando desde 25,8% en individuos menores de 15 años de edad a 15,4% en individuos de 15 años o más procedentes de centros cerrados.

Contrariamente a lo esperado, en países que no son endémicos, los estudios de prevalencia de IgG anti-VHE mostraron que desde muy temprana edad los individuos se exponen al virus, pero en un porcentaje menor. Así en un reporte de Taiwán, país no endémico se detectó una prevalencia de 3,4% en niños preescolares de áreas urbanas y 3,9% entre los niños aborígenes (Lin y cols., 2004). Igualmente, en Japón, Goto y cols. (2006) detectaron que el 3,3% de los niños eran positivos a este marcador.

En muchas regiones del mundo donde se han reportado brotes de hepatitis E, la enfermedad es responsable de una proporción considerable de hepatitis aguda esporádica tanto en niños como en adultos (Panda y cols., 2007). Los índices de positividad a la IgM anti-VHE encontrada en población abierta (13,7%) no difiere de lo obtenido en el estudio de brote (14,2%), predominando el marcador de infección aguda del VHA (75,3%).

Kumar y cols. (2006) describieron co-infección del VHA con el VHE en 24 (80%) niños hindúes menores de 15 años de edad con HVA, resultado 3,5 veces superior al nuestro. La presencia de Ac totales anti-VHE como evidencia de infección por el virus, fue detectada en el 5% de los niños menores de 10 años de edad en países donde la enfermedad es endémica (Krawczynski, 2007), por tanto estos hallazgos nos permiten sugerir que la endemicidad del VHE debe ser considerada en nuestro medio.

Tabla IV.2. Distribución de la positividad a la IgM anti-VHA y anti-VHE según los grupos de edad, 1998-2003.

Marcadores virales	IgM anti-VHA positiva n (%)	IgM anti-VHE positiva n (%)	IgM anti-VHA/ IgM anti-VHE positivo n (%)	Total n (%)
Instituciones cerradas (<15 años)	41 (66,1)	5 (8,0)	16 (25,8)	62
Instituciones cerradas (≥ 15 años)	21 (80,8)	1 (3,8)	4 (15,4)	26
Población abierta*	75 (73,5)	14 (13,7)	13 (12,7)	102
Total	137	20	33	190

Fuente de datos: Libro de entrada de muestras, LNRHV, IPK.

Leyenda: n, número total; *, se incluyeron todas las edades.

b) Estudio etiológico de casos graves y fallecidos por FHF

En la vigilancia de las hepatitis virales durante el período 1998-2005, se incluyó el estudio etiológico de los casos graves y fallecidos por FHF, aquí se evaluaron todos los marcadores que se realizaban en el laboratorio en aquel momento para clasificar el cuadro de hepatitis viral grave. De esta forma se observó que de los 77 sueros recibidos de todas las provincias del país con este criterio, en 40 (51,9%) de ellos se pudo conocer la etiología del cuadro y el resto 37 (48%) no pudo ser clasificado con los marcadores disponibles.

En la Tabla IV.3 se muestran los resultados de las 40 muestras clasificadas. La IgM anti-VHE se observó sola o en combinación con otros agentes en el 15% de los casos. El VHB fue el agente que se comportó con mayor positividad con 45% (18/40), seguido del VHA con 32,5% (13/40), los VHC y el VHE aportaron el 2,3 y 5%, respectivamente. La combinación del VHB con el VHE fue la más observada, aunque sólo en el 5% de los casos (2/40). La asociación de

tres agentes se recogió en un caso. Si buscamos la positividad del VHB sólo o en combinación con otros agentes, encontramos que este virus aportó el 57,5% de los casos (23/40) y el VHA alcanzó el 40% (16/40). De forma global el VHB y el VHA aportaron el 92,5% (37/40) de la positividad en casos graves o fatales clasificados como HVA.

Tabla IV. 3. Clasificación etiológica por marcadores serológicos de virus hepatotropos de los casos graves y fallecidos por FHF, Cuba. 1998-2005.

ETIOLOGÍA	Positivos	
	n	%
VHA	13	32,5
VHB	18	45
VHC	1	2,5
VHE	2	5
VHA + VHE	1	2,5
VHA + VHB	1	2,5
VHB + VHE	2	5
VHB + VHC	1	2,5
VHA + VHB + VHE	1	2,5
Total	40	100

Fuente de datos: Libro de entrada de muestras, LNRHV, IPK.

Leyenda: n, número total.

Con respecto a la vigilancia de las HVA en casos graves y fallecidos por FHF, el VHE como único agente etiológico o en combinación con otros virus hepatotropos (VHA, VHB, VHC), estuvo involucrado en estos cuadros de evolución grave. Entre los casos reportados dentro de esta categoría no se encontraban gestantes ni pacientes pediátricos. Como refiere la literatura internacional, hasta un 25% de las gestantes, generalmente en el tercer trimestre de embarazo desarrollan formas graves de hepatitis al infectarse con el VHE (Stoszek y cols., 2006a; Jayanthi y Udayakumar, 2008). No obstante, existen opiniones contradictorias referentes a determinadas zonas geográficas, donde el curso de la hepatitis E no difiere en las mujeres embarazadas de las que no lo están; siendo reportada una alta tasa de mortalidad en países endémicos de Asia y África (Benival y cols., 2003).

Con respecto a la población pediátrica en América Latina (Argentina), Munne y cols. detectaron que el VHE fue el agente etiológico de fallo hepático agudo en infantes (Munne y

cols., 2006). En Asia específicamente en la India un estudio similar realizado en Calcuta demostró que la hepatitis E fue diagnosticada en el 46,6% de los casos graves y fatales de niños admitidos en la atención terciaria (Samanta y Ganguly, 2007).

Existen estudios de FHF donde el VHE fue el principal agente etiológico, así en Bangladesh país con alta endemicidad del VHE, se detectó que el 56,5% de los FHF en población abierta estaban relacionados con esta infección (Mahtab y cols., 2008). En este mismo trabajo el VHB le siguió en orden de frecuencia, siendo diagnosticado en el 34,8% de los casos. Khuroo y cols. (2003), encontraron un 43,9% de positividad al VHE en FHF en la India; seguido por el VHB (13,9%), VHC (7,2%), el VHA (2,1%) y agentes no A no E en el 31,1% de los casos.

Los hallazgos relacionados con la detección del VHE como causa de FHF en nuestro medio no difieren de lo reportado en países endémicos; sin embargo, en algunos de ellos se reportan altas tasas de incidencia de formas complicadas y graves de la enfermedad ocasionadas por este virus (Mahtab y cols., 2008). Factores relacionados con la virulencia de las cepas del VHE circulantes y las características inmunogenéticas de la población en cuestión podrían justificar las diferencias en la incidencia de FHF ocasionados por el VHE (Meng, 2009b).

Las co-infecciones en países en desarrollo, donde el VHA y VHE son endémicos, producen complicaciones severas con una ictericia marcada, acompañada de coluria y movimiento patológico de los indicadores de la función hepática: aumento de la bilirrubina, fosfatasa alcalina y de la ALAT (Arora y cols., 1996; Sarguna y cols., 2007).

El 31,1% (37/77) de los casos con síntomas y signos de HVA negativos a los marcadores serológicos de hepatitis A, B, C y E empleados en este estudio, sugiere que probablemente otros agentes que tienen tropismo hepático, cuyo diagnóstico no fue incluido en la presente investigación pudieron estar determinando estas formas clínicas.

c) Evaluación de la sero-positividad de muestras obtenidas de brotes con dos estuches de IgM anti-VHE

En este acápite es importante señalar que la mayoría de los investigadores han demostrado que el empleo de Ag recombinantes del VHE obtenidos de genotipos diferentes al que circula en la región donde se aplique el diagnóstico influye en la sensibilidad y especificidad de los EIE y consecuentemente en la reactividad del ensayo (Yu y cols., 2003; Bendall y cols., 2010). Teniendo esto como antecedente, en este trabajo se evaluó la reactividad de dos ELISAs IgM anti-VHE en muestras de suero obtenidas de brotes.

Se estudiaron un total de 33 brotes y 258 sueros con los estuches IgM anti-VHE del CIGB (13 brotes y 82 sueros) y con el de Macfarlane Burnet, (20 brotes y 176 sueros). Se pudo constatar una elevada positividad en los brotes analizados con el estuche comercial producido por el CIGB al compararlo con el de Macfarlane Burnet, (11/13, 84,6% vs 10/20, 50%). Las mismas observaciones fueron obtenidas con los sueros analizados (34/82, 41,5% vs 19/176, 10,8%). Estos resultados discordantes podrían obedecer a las diferencias en la incidencia de la infección por el VHE en los diferentes brotes estudiados, más que a la sensibilidad y especificidad de los ensayos utilizados. No obstante, es interesante reconocer que las proteínas recombinantes se obtuvieron del MAL y de aislamientos diferentes; en el caso del ensayo del CIGB del MAL3 del aislamiento de la India y el de Macfarlane Burnet utiliza el antígeno MAL2.1 de un aislamiento chino (Anderson y cols., 1999). Ambos virus pertenecen al mismo genotipo 1, pero a subtipos diferentes.

De acuerdo a los MAL utilizados, Ma y cols. (2009) reportaron que existen epítopes altamente reactivos en el extremo carboxilo terminal del MAL2 y 3; y en el amino terminal del MAL2 para la detección de IgM anti-VHE; este autor señala además que para lograr una buena sensibilidad las proteínas deben ser obtenidas de un mismo genotipo. Otros investigadores sugieren que para lograr una elevada sensibilidad de los estuches para la detección de IgM e IgG anti-VHE estos deben contener una mezcla de proteínas del MAL 2 y 3 (Ruan y cols., 1998).

Los Ag del MAL2 son altamente conservados, en contraste con los del MAL3 que son más heterogéneos (Yarborough y cols., 1991). Por tanto, las pruebas de diagnóstico serológico, que utilizan pMAL2 son ampliamente utilizadas y reactivas, mientras que las que utilizan Ag del MAL3 parecen ser más específicas de cepas (He y cols., 1993; Khudyakov y cols., 1994). Teniendo en cuenta los reportes de la literatura y los resultados encontrados en este trabajo en cuanto a la diferencia en la positividad con los dos estuches evaluados que igualmente utilizan el mismo principio (ELISAs indirectos), pensamos que dicho fenómeno probablemente esté relacionado con la diferencia genética de los aislamientos, que aunque pertenecen a un mismo genotipo, se ubican genéticamente en diferentes subtipos [subtipo 1a (aislamiento de la India) y 1b (aislamiento de China)]. Los hallazgos sugieren que el VHE que circula en Cuba probablemente tiene más homología antigénica con los aislamientos de la India que con los que circulan en China.

Es importante señalar que el ensayo del CIGB fue utilizado por Lemos y cols (2000), quienes obtuvieron resultados muy similares a los nuestros con respecto a los casos esporádicos. Lamentablemente, pese a la elevada sero-positividad obtenida con este estuche de Ig-M anti-VHE del CIGB, no se pudo seguir utilizando porque no se disponía de los reactivos para mantener su aplicación en el diagnóstico.

Al analizar los resultados encontrados en cuanto a la diferencia en la sero-reactividad de los EIE empleados y su posible asociación con los subtipos del VHE, no encontramos datos en la literatura relacionados con estas observaciones. En general, la comunidad científica internacional vinculada con este tema atribuye la diferencia en la sensibilidad y especificidad de los EIE a la diversidad de genotipos circulantes sin llegar al nivel de subtipos; por lo que nuestras evidencias son novedosas y probablemente se necesiten diseñar protocolos de investigación que apoyen o refuten estas observaciones.

IV.1.2 Diagnóstico molecular

La detección de ácidos nucleicos del VHE se utiliza con fines diagnósticos y para los estudios de epidemiología molecular del virus. Se ha planteado por varios autores que para hacer el diagnóstico del VHE se deben combinar los marcadores serológicos y moleculares. Esto se recomienda debido a las limitaciones que tienen los EIE en cuanto a su sensibilidad, por lo que en países endémicos y particularmente en períodos de epidemias en los casos con cuadros clínicos sugestivos de hepatitis E y con IgM anti-VHE negativa es necesario realizar las pruebas moleculares para demostrar la presencia del virus (Kumar y cols., 2007; Panda y cols., 2007).

En esta parte de la investigación se introdujeron tres protocolos de TR-RCP uno para el MAL1 y dos para el MAL2, siguiendo estrictamente las recomendaciones de los autores. Estos ensayos fueron desarrollados para la detección simultánea de los 4 genotipos del virus, utilizando cebadores que hibridaban con las regiones conservadas del VHE (Schlauder y cols., 1999; Li y cols., 2005; Zhai y cols., 2006).

Paralelamente, con la introducción de las TR-RCP en el diagnóstico molecular del VHE se evaluó la sensibilidad de cada uno de los protocolos estudiados. El LD para la TR-RCP anidada del MAL 1 (Zhai y cols., 2006) específica para la región de la RdRp fue de 10^3 copias de genoma/ μ L, similar a la TR-RCP simple del MAL2 (Schlauder y cols., 1999), mientras que para la TR-RCP del MAL2 anidada (Li y cols., 2005) fue de 10^5 copias/ μ L.

Estos resultados indicaron que la TR-RCP anidada para el MAL1 mostró una elevada sensibilidad para el diagnóstico, al igual que la TR-RCP simple para el MAL2. La TR-RCP anidada para el MAL2 fue la menos sensible. Datos sobre la evaluación del LD con estos tres protocolos no fueron encontrados en la literatura, pero existe un reporte de Li y cols. que utilizaron la TR-RCP anidada para el MAL2 en muestras IgM anti-VHE positivas y no detectaron la presencia del ARN viral; por tanto, este hallazgo no difiere de los resultados obtenidos por esta técnica (Li y cols., 2006b).

Con los datos recopilados en el curso de la evaluación de la sensibilidad se pudo identificar los ensayos más sensibles y de esta manera continuar su puesta en marcha según la disponibilidad de reactivos.

Se evaluaron un total de 57 sueros y 205 heces positivas a IgM anti-VHE, con cada uno de los protocolos introducidos. Con la TR-RCP anidada para el MAL1 (Tabla IV.4), se evaluó el mayor número de muestras dado que se conocía su elevada sensibilidad y se contaba con los reactivos necesarios para continuar el diagnóstico. Con esta técnica se obtuvo material genético del virus en el 18% (20/110) de las heces y en el 7,4% (2/27) de los sueros. Con la TR-RCP simple para el MAL2 el índice de positividad fue 24% (18/75) y 13,3% (4/30) para heces y suero, respectivamente. En tanto, la TR-RCP anidada del MAL 2 mostró una baja sensibilidad y se empleó solo en muestras de heces con un 20% (4/20) de positividad. Kumar y cols. encontraron un porcentaje de viremia en casos positivos de IgM anti-VHE de 9,4%, lo que no difiere de lo encontrado en este trabajo (Kumar y cols., 2007).

La detección del genoma del VHE fue mayor en heces que en suero (20,4% vs 10,5%), se ha descrito que después del inicio del cuadro clínico o de las alteraciones bioquímicas la viremia es corta y transitoria mientras que, la excreción en heces es más prolongada y se mantiene hasta 4 semanas (Panda y cols., 2007). No obstante, el VHE es detectable en heces y suero desde el final del período de incubación (Aggarwal y cols., 2000).

Aunque las muestras utilizadas en este estudio se conservaron adecuadamente (-70 °C), varios factores pudieran estar relacionados con la baja sensibilidad en general de las técnicas moleculares empleadas en este estudio. Uno de ellos pudo estar relacionado con las repetidas congelaciones y descongelaciones de los especímenes, lo que degrada el material genético del virus, así como la presencia de inhibidores en las muestras, principalmente de heces, que

pudieron interferir con las RT-RCP, lo cual fue descrito para el diagnóstico molecular del virus Norwalk (De León y cols., 1992).

Tabla IV.4. Comportamiento de la positividad de las muestras de heces y suero con cada una de las tres TR-RCP introducidas en el diagnóstico molecular del VHE.

Protocolos de TR-RCP	Suspensión de heces +/n (%)	Sueros +/n (%)	Total +/n (%)
TR-RCP anidada MAL1	20/110 (18,1)	2/27 (7,4)	22/137 (16)
TR-RCP simple MAL2	18/75 (24)	4/30 (13,3)	22/105 (20,9)
TR-RCP anidada MAL2	4/20 (20)	N.R	4/20 (20)
Total	42/205 (20,4)	6/57 (10,5%)	48/262 (18,3)

Fuente de datos: Libro de entrada de muestras, LNRHV, IPK.

Leyenda: n, número total; TR-RCP, transcripción reversa, reacción en cadena de la polimerasa; MAL, marco abierto de lectura; N.R, no se realizaron.

Como se observa en la tabla IV.4, predominó una baja positividad (18,3%) con las TR-RCP empleadas. Recientemente, se puso en práctica la TR-RCP en tiempo real la que ha revolucionado el diagnóstico molecular del VHE, ya que la sensibilidad de esta técnica incrementó de 10 a 100 veces la detección del ARN viral en suero y heces, con respecto a las TR-RCP anidadas convencionales (Enouf y cols., 2006).

Finalmente, la introducción de las técnicas serológicas y moleculares, esta última para la detección del MAL1 y 2 fortalecieron el diagnóstico de la hepatitis E en el LNRHV, así como permitieron demostrar por primera vez la circulación autóctona del virus en Cuba. Específicamente, con el protocolo de TR-RCP simple para el MAL 2 se detectó la presencia del genoma del VHE en heces de un caso esporádico con clínica de HVA (Figura IV.1). Este paciente tuvo elevación de las enzimas hepáticas, fue negativo a los marcadores de los VHA, VHB y VHC. Además, no tenía antecedentes de viajes al exterior, este fue el primer resultado molecular que apoyó las evidencias serológicas de circulación del VHE en Cuba, sugiriendo la transmisión del virus en nuestro medio.

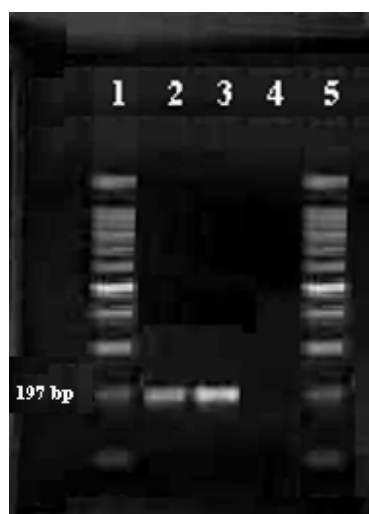


Figura IV.1. Productos amplificados del MAL2 obtenido a partir de muestra de heces de un paciente cubano con HVA. Carriles 1 y 5, peso molecular (DNA ladder 100 pb); carril 2, control positivo; carril 3, suspensión de heces (2349/03); carril 4, control negativo.

IV.2 Prevalencia del VHE y los factores de riesgo asociados en población supuestamente sana

a) Encuesta sero-epidemiológica en el municipio La Lisa

Para conocer la exposición al VHE y los factores asociados se realizó un estudio sero-epidemiológico de circulación del virus en una población del municipio La Lisa. De 209 muestras evaluadas en total 11 fueron positivas a la IgG anti-VHE para un 5,3% (IC 95%: 2,23 – 8,29). Esta prevalencia fue similar a la detectada en Indonesia país endémico del VHE, donde los valores oscilaron de 4 a 20% según la región estudiada (Wibawa y cols., 2004). Khuroo y cols. sugirieron que la sero-prevalencia de anti-VHE en áreas endémicas varía de 4 a 16% (Khuroo, 2008), datos muy cercanos a lo detectado en este estudio.

En la literatura se han referido diferentes variables como factores de riesgo para la exposición al VHE, las que fueron evaluadas en la población estudiada (Tabla IV.5). En este análisis se incluyeron variables demográficas, ambientales, clínicas y de riesgo parenteral de exposición al VHE, siendo incluida esta última debido al poco conocimiento epidemiológico que existía en aquel momento sobre esta entidad en nuestro medio. Los porcentajes de prevalencia de anti-VHE, según el género fueron muy similares para ambos sexos; igualmente sucedió con la variable color de la piel. Para evaluar el riesgo de adquirir hepatitis E, la edad se estratificó en tres grupos tomando en cuenta las distribuciones etarias realizadas en estudios similares y la

prevalencia de anti-VHE no se correlacionó con la edad. Con el resto de los factores estudiados (acupuntura; tatuajes; presencia de animales en la vivienda; intervenciones quirúrgicas; transfusión y antecedentes de hepatitis) no se constató asociación, lo que está en concordancia con otros estudios realizados sobre el tema (Bortoliero y cols., 2006).

Al analizar independientemente la edad como factor de riesgo, el porcentaje más elevado de detección de IgG anti-VHE se observó entre los 35 y 45 años, sin llegar a tener significación estadística. No obstante, coincide con la tendencia al incremento de la positividad de Ac anti-VHE con la edad, con lo reportado a nivel internacional (Tsega y cols., 1992; Santos y cols., 2002). Se obtuvo un descenso en los títulos de anti-VHE en individuos mayores de 46 años, lo que pudiera estar dado por la corta duración en el tiempo de estas Ig (Rapicetta y cols., 1999; Myint y cols., 2006).

Existen datos donde la prevalencia de hepatitis E no fue asociada a las variables consideradas de riesgo, aunque la mayoría de los estudios señalan que la edad y el sexo muestran una estrecha relación con la exposición al virus. Particularmente, los investigadores observaron que el sexo masculino se expone con mayor frecuencia al VHE, debido al tipo de actividad laboral que realizan (Arankalle y cols., 1995). Las profesiones consideradas de riesgo como los granjeros, veterinarios, trabajadores de albañales y trabajadores de la salud, que no fueron exploradas en esta investigación también se han asociado con la detección de anti-VHE (Assarehzadegan y cols., 2008; Zhu y cols., 2008).

El índice de positividad a los Ac contra el VHE encontrado en la población estudiada (5.3%) y el hallazgo de que el 4,9% (Tabla IV.5) de los sujetos con antecedentes de hepatitis fueron positivos a este marcador, sugiere que el virus es endémico y parece tener un impacto clínico considerable en esta área geográfica.

Tabla IV.5. Factores de riesgo asociados con la prevalencia del VHE en el municipio La Lisa.

Factores de riesgo	+/n	% Prevalencia	R.P (IC 95%)
Género			
Fem.	7/132	5,3	1
Mas.	4/77	5,2	1,02 (0,31-3,38)
Color de la piel			
Blanca	6/116	5,2	1
Negra	2/45	4,4	1,16 (0,24-5,55)
Mestiza	3/48	6,3	0,83 (0,22-3,17)
Edad (años)			
<35	2/37	5,4	1
35-45	5/63	7,9	0,68 (0,14-3,34)
>46	4/109	3,7	1,47 (0,28-7,72)
Acupuntura			
Si	2/21	9,5	1
No	9/188	4,8	1,99 (0,46-8,60)
Tatuaje			
Si	1/8	12,5	1
No	10/201	5,0	2,51 (0,36-17,32)
Animales-vivienda			
Si	8/139	5,8	1
No	3/70	4,3	1,34 (0,37-4,91)
Intervención Quirúrgica			
Si	2/41	4,9	1
No	9/168	5,4	0,9 (0,20-4,06)
Transfusión			
Si	2/41	4,9	1
No	9/168	5,4	0,91(0,20-4,06)
Antecedentes de Hepatitis			
Si	2/41	4,9	1
No	9/168	5,4	0,91(0,20-4,06)

Fuente de datos: Encuestas del LNRHV, IPK.

Leyenda: +, positivos a la IgG anti-VHE; n, número total; R. P, riesgo de prevalencia; Fem., femenino; Mas., masculino.

b) Encuesta sero-epidemiológica en los municipios de Playa y Marianao

Los estudios de seroprevalencia de anti-VHE en personas sin antecedentes de HVA son útiles para estimar la presencia de infecciones asintomáticas y el nivel de inmunidad de la comunidad (Panda y cols., 2007).

Es conocido que en la mayoría de las enfermedades infecciosas y en particular en las hepatitis virales, las infecciones subclínicas o asintomáticas son más frecuentes que los cuadros clínicos floridos de la enfermedad (Arús, 1998). Con el propósito de profundizar en los patrones epidemiológicos de esta entidad, fue necesario conocer el comportamiento de las infecciones asintomáticas producidas por este virus, por lo que se evaluó la prevalencia de Ig totales anti-VHE en sujetos sin antecedentes de HVA de los municipios de Playa y Marianao.

Se identificaron un total de 47 casos con Ac totales al VHE, de una muestra de 469 individuos, para una prevalencia general de 10% (IC 95%; 7,52 – 13,19), correspondiendo al municipio de Marianao una prevalencia de 12,1% (IC 95%; 8,58 – 16,69) y a Playa de 7,1% (IC 95%; 4,10 – 11,93) (Tabla IV.6). La presencia de anti-VHE encontrada en estos dos municipios, puso en evidencia que formas anictéricas o subclínicas de la enfermedad ocurrieron en estas comunidades. Estos resultados fueron más elevados que lo reportado por Lemos y cols. en donantes de sangre residentes en la Ciudad de la Habana (1,4%) (Lemos y cols., 2000).

Estos hallazgos fueron comparables con estudios previos realizados en Corea (11,9%) y Singapur (10,5%) (Chow y cols., 1996; Ahn y cols., 2005) y más elevados que lo reportado por Fukuda y cols. en un estudio similar realizado en Japón (5,3%) (Fukuda y cols., 2007).

En Marianao se detectó una prevalencia de anti-VHE más elevada que en Playa, con un límite superior del IC al 95% de 16,69% similar a lo encontrado en áreas endémicas del VHE (Wibawa y cols., 2004). Varios factores pudieran estar involucrados en estos hallazgos tales como la densidad poblacional de Marianao (6,474 habitantes/km²) que fue mayor con relación a Playa (4,884 habitantes/km²). Asimismo, los suministros de agua y la disposición de los albañales, no han aumentado su capacidad en relación con el incremento poblacional, siendo el municipio de Marianao el más afectado en este sentido (Jiménez y cols., 2002). Muchas veces el suministro de agua no se realiza de forma continua en estas localidades, por lo que los pobladores necesitan almacenar agua para uso doméstico y en ocasiones la consumen sin previo tratamiento (hervir), lo que pudiera justificar la exposición al VHE y por supuesto a otros microorganismos. Tampoco se debe descartar fallos en la cloración del agua en las

fuentes de abastos que impidan la inactivación de agentes patógenos. Otro factor es que las áreas no urbanas son tres veces más frecuentes en Mariano que en Playa y es común que las personas que residen en zonas rurales se dediquen a la cría de cerdos y aves para autoconsumo, lo que dado el patrón zoonótico de transmisión de esta entidad podría estar relacionado con la elevada prevalencia de anti-VHE encontrada en Mariano (Jiménez y cols., 2002). Resultados similares obtuvo Álvarez-Muñoz y cols. quienes detectaron en México una elevada prevalencia de anti-VHE (10,5%) en habitantes de zonas rurales (Alvarez-Muñoz y cols., 1999).

Al analizar por grupo de edades la prevalencia de anti-VHE de los 47 individuos positivos de ambos municipios, se detectaron 2 casos en el grupo entre 5 y 11 años de edad con Ac al VHE, obteniéndose una prevalencia de 4,2% (IC 95%; 0,74 – 15,72). Ambos menores procedían del municipio de Mariano para una prevalencia de 7,1% (IC 95%; 1,24 – 24,95) (Tabla IV.6).

La detección de Ig totales anti-VHE en niños confirma la susceptibilidad que tiene este grupo de exponerse al VHE, este hallazgo sustenta la positividad a la IgM anti-VHE encontrada en el estudio de brotes por grupos de edad, en menores de 15 años (Tabla IV.2). En concordancia con estos resultados Buti y cols. (2008), encontraron un 4,6% de IgG anti-VHE en niños con edades que oscilaban de 6 a 15 años. Por el contrario, en países hiperendémicos como Egipto e India la prevalencia de anti-VHE fue elevada en niños, con 26% y 28,7% , respectivamente (Aboulata y cols., 2005).

Tabla IV.6. Prevalencia de Ig total anti-VHE por grupos de edades en los municipios Marianao y Playa, 2003.

Grupos de Edades (años)	Ig total anti-VHE		Total
	+/n (% prevalencia)		+/n (% prevalencia)
	(IC 95%)		(IC 95%)
	Marianao	Playa	
5-11	2 /28 (7,1) (1,24 – 24,95)	0/19 (0) (0)	2/47 (4,2) (0,74 – 15,72)
12-20	3/44 (6,8) (1,77 – 19,70)	0/26 (0) (0)	3/70 (4,2) (1,11 – 12,83)
21-30	5/50 (10) (3,32 – 21,81)	2/37 (5,4) (0,66 – 18,19)	7/87 (8) (3,29 – 15,87)
31-40	11/ 76 (14,4) (7,45 – 24,42)	5/52 (9,6) (3,19 – 21,02)	16/128 (12,5) (7,32 – 19,50)
41-50	8/43 (18,6) (8,39 – 33,40)	3/33 (9) (1,91 – 24,33)	11/76 (14,4) (7,45 – 24,42)
51-60	4/32 (12,5) (3,51-28,99)	4/29 (13,7) (3,88 – 31,66)	8/61 (13,1) (5,83 – 24,21)
Total	33/273 (12,1) (8,58 – 16,69)	14/196 (7,1) (4,10 – 11,93)	47/469 (10) (7,52 – 13,19)

Fuente de datos: Encuesta epidemiológica, LNRHV, IPK.

Leyenda: n, número total; IC, intervalo de confianza.

En este mismo estudio se evaluaron diferentes factores de riesgo asociados con la prevalencia global de anti-VHE (Tabla IV.7). Al analizar el género se detectó un porcentaje elevado de mujeres 10,8% (29/267) positivas al anti-VHE con relación a los hombres 8,9% (18/202). Sin embargo, no se detectó asociación significativa con esta variable. La edad se estratificó en tres grupos, el valor más elevado de personas positivas a Ig total anti-VHE se encontró en el grupo de 41 a 60 años (13,8%). Estos individuos tuvieron un riesgo 3,2 veces mayor de tener anti-VHE que el resto de los sujetos ubicados en otros grupos de edades; siendo este hallazgo estadísticamente significativo ($p=0,01$; Prueba exacta de Fisher). En relación con este factor de riesgo, la prevalencia de anti-VHE coincidió con otras encuestas serológicas similares, las que detectaron un incremento de la prevalencia de anti-VHE en este grupo de edad (Taremi y cols., 2007; Assarehzadegan y cols., 2008).

No se detectó ninguna correlación entre la presencia de anti-VHE y las ocupaciones consideradas de riesgo, uso de piercing, antecedentes de cirugía y transfusiones (Tabla IV. 7). En diferentes estudios se ha reportado una alta prevalencia de anti-VHE en hombres comparado con mujeres (Buti y cols., 2006; Assarehzadegan y cols., 2008) y con las ocupaciones consideradas de riesgo, en particular personas que trabajan con cerdos o con aguas negras (Pérez-Gracia y cols., 2007). Con respecto a esta última variable, en la presente investigación se encontraron personas positivas que eran amas de casas, manipuladores de alimentos y trabajadores de la salud (médicos, enfermera, técnicos de laboratorio). En relación con este riesgo, probablemente el bajo número de casos positivos a los Ac anti-VHE (5) al ser dividido en varios sub-grupos de ocupaciones, hicieron que esta variable careciera de significación.

Los resultados sugieren que las infecciones silentes por el VHE ocurren en estos municipios, por lo que las personas con presencia de Ig total anti-VHE fueron casos de infecciones subclínicas o tenían Ac circulantes contra el VHE de larga duración; lo que constituye una huella de esta infección viral. Factores virales, tales como la baja patogenicidad de la cepa o factores del hospedero como los inmunogénicos, podrían estar relacionados con estas formas de infección asintomáticas (Chandra y cols., 2008) .

Clayson y cols. (1998) plantearon que una infección inaparente pudiera ser una de las formas de exposición al VHE en adultos de áreas endémicas, lo que estaría relacionado con la dosis del inóculo y el estado de inmunidad previa al virus. Igualmente, esta observación pudiera justificar los hallazgos de infección clínicamente inaparente al VHE en las localidades estudiadas.

Es importante resaltar que las infecciones subclínicas contribuyen a perpetuar el virus en áreas endémicas, dado que mantienen su circulación en la comunidad de ahí la importancia epidemiológica de las mismas.

Tabla IV.7. Factores de riesgo asociados con la prevalencia global de Ig total anti-VHE, en dos municipios de Ciudad de la Habana, 2003.

Variables	Ig anti-VHE +/total	OR (IC 95%)	p
Género			
Femenino.	29/267	1	
Masculino	18/202	1,23 (0,7-2,2)	0,58
Edad (años)			
≤20	5/117	1	
21-40	23/215	2,5 (0,9-7,4)	0,07
41-60	19/137	3,2 (1,09-9,7)	0,01*
Ocupaciones de Riesgo			
No	42/415	1	
Si	5/54	0,91(0,32-2,23)	0,96
Uso de <u>piercing</u>			
No	32/295	1	
Si	15/174	0,79 (0,41-1,47)	0,42
Intervención quirúrgica			
No	26/303	1	
Si	21/166	1,47 (0,82-2,62)	0,21
Transfusión			
No	36/398	1	
Si	11/71	1,71 (0,84-3,27)	0,14

Fuente de datos: Encuesta epidemiológica, LNRHV, IPK.

Leyenda: OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; *, valor con significación estadística.

c) Evaluación de la reactividad de los sueros obtenidos en la encuesta sero-epidemiológica de los municipios Playa y Marianao con el EIE empleado

La sensibilidad de los EIE para detectar Ac anti-VHE es objeto de polémica, por lo que cada ensayo que este disponible en el mercado necesita ser validado con sueros provenientes de diferentes áreas geográficas (Herremans y cols., 2007). En esta investigación la sero-reactividad fue evaluada con el estuche para la detección de Ig totales anti-VHE de Genelabs Diagnostic, mediante un análisis de frecuencia del nivel de reactividad de cada suero ante las proteínas recombinantes del VHE empleadas en este ensayo.

Las muestras analizadas tuvieron un valor medio de reactividad DO/VC de 0,78 con una DS de 2,21. En la figura IV.2 se muestran las razones de DO/VC de las 469 muestras analizadas, donde el valor 1 de la escala del eje de las X se corresponde con el intervalo DOM/VC menor que 1 (muestras negativas). Los sueros positivos se ubicaron a partir del valor 2 del histograma con el intervalo entre 1 y 1,9, el valor 3 con el intervalo entre 2 y 2,9 y el valor 4 con cifras de DOM/VC mayores de 3.

El promedio de la DO de las muestras negativas fue 0,052 (0,026-0,258), mientras que para las muestras positivas fue 1,730 (0,269-4,06). La razón de DOM/VC en las muestras positivas a las Ig totales anti-HEV fue elevada ya que 28/47 (59,6%) muestras tuvieron valores ≥ 4 . El resto de los sueros se comportaron como sigue: 9/47 (19,1%) y 10/47 (21,2%) con valores que oscilaron de 1-2,9 a 3-3,9, respectivamente.

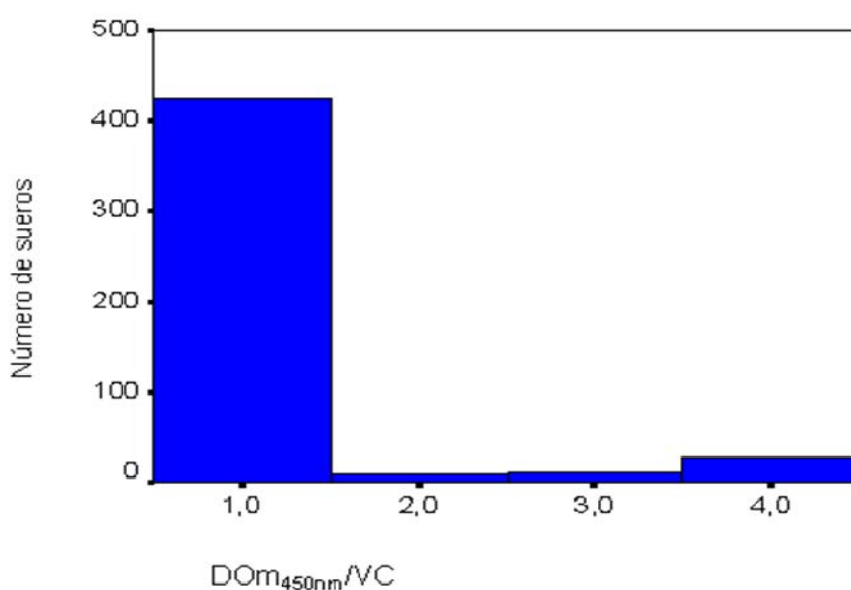


Figura IV.2. Histograma de frecuencia de los valores de DO/VC de las muestras analizadas con el estuche de Ig totales anti-VHE de Genelabs Diagnostic.

Leyenda: DO, densidad óptica; VC, valor de corte.

Las muestras positivas a Ig totales anti-VHE tuvieron altos valores de DO, lo que se traduce en una elevada reactividad con el ELISA empleado, cuyo principio fue de doble antígeno. Las placas de este EIE contenían proteínas recombinantes del MAL2 del genotipo 1 (aislamiento

de China, subtipo 1b) y según los productores este ensayo es sensible para todos los genotipos del virus (Hu y cols., 2008).

Según los reportes internacionales sobre la sensibilidad de los EIE anti-VHE, si el virus que circula en Cuba tuviera homología genética con el aislamiento de China utilizado en este EIE, una elevada reactividad podría ser esperada. Cowie y cols. en un estudio realizado en pacientes de Victoria, Australia, que viajaron a países endémicos de Asia, donde circulaba el genotipo 1 encontraron resultados similares a los nuestros (Cowie y cols., 2005). Anderson y cols. demostraron que sueros provenientes de una epidemia en Nepal poseían una elevada reactividad detectando valores DO/VC entre 4 y 6 en la mayoría de las muestras. Ambos autores, utilizaron un EIE que poseía las mismas proteínas recombinantes del EIE utilizado en esta parte de la investigación. Sin embargo, estos investigadores encontraron que los sueros positivos provenientes de donantes de sangre de Malasia y Australia, tenían una baja reactividad con valores de DO/VC ≤ 1 con este estuche, atribuyendo la diferencia a la circulación de cepas epidémicas y no epidémicas del VHE (Anderson y cols., 1999; Seow y cols., 1999).

Aunque la IgM anti-VHE no fue detectada en este estudio, no podemos descartar que la elevada DO de algunas muestras obedeciera a una infección reciente con el VHE, donde tanto la IgM, la IgA y la IgG pueden ser detectadas.

IV.3 Prevalencia del VHE y factores de riesgo asociados en un grupo de trabajadores de granjas porcinas.

Partiendo de que el cerdo es el principal reservorio del VHE y que la transmisión zoonótica es una de las vías de exposición al virus (Meng, 2000); se evaluó la seroprevalencia de anti-VHE y los factores de riesgo asociados en trabajadores de cuatro granjas porcinas de la provincia La Habana.

a) Detección de anticuerpos totales anti-VHE

La prevalencia de Ig totales anti-VHE encontrada fue 35,8% (38/106; IC 95%: 27,32-46,34), muy cercana a la reportada en personas que laboraban en instalaciones porcinas de Fujian, China (33,3%) (Yan y cols., 2007). Prevalencias menores fueron obtenidas en países altamente desarrollados; 11% detectó Bouwknecht y cols. en veterinarios de cerdos en Holanda (Bouwknecht y cols., 2008). En criadores de ganado porcino de Suecia, también se identificó una baja prevalencia de anti-VHE (13%) (Olsen y cols., 2006). En tanto, en Carolina del Norte,

EE.UU. se reportó 10,9% de IgG anti-VHE en personas vinculadas a la cría de estos animales (Withers y cols., 2002). En Moldavia la prevalencia de anti-VHE en individuos ocupacionalmente expuestos a cerdos fue superior a la obtenida en esta investigación (51,1%) (Drobeniuc y cols., 2001); al igual que la reportada por Zheng y cols. en China (75,9%) (Zheng y cols., 2006).

Al comparar nuestros resultados con los diferentes estudios de prevalencia del VHE realizados en Cuba en población abierta, detectamos que la prevalencia encontrada en estos trabajadores fue 25,7 veces mayor que la referida por Lemos y cols. en donantes de sangre (1,4%) de Ciudad de la Habana (Lemos y cols., 2000). Con relación al estudio de seroprevalencia en población abierta del municipio de La Lisa esta fue 6,7 veces mayor (35,8% vs 5,3%); mientras que con respecto a los municipios Playa y Marianao la detección de anti-VHE en estos trabajadores fue 3,5 veces mayor (35,8% vs 10%).

La diferencia en los valores de prevalencia de anti-VHE de los estudios antes mencionados pudiera estar asociada a la variabilidad en la sensibilidad de los estuches serológicos empleados. En el estudio de Lemos y cols. se utilizó un ELISA indirecto para detectar IgG anti-VHE con Ag recombinantes de un aislamiento de la India (genotipo 1) y en la encuesta sero-epidemiológica del municipio de La Lisa que utilizó un EIE indirecto con Ag recombinantes de un aislamiento de China (genotipo 1). Mientras que, el EIE utilizado en el estudio de los municipios Playa y Marianao, así como en este grupo de trabajadores fue el mismo, el cual estuvo basado en el principio de doble Ag y se emplearon Ag recombinantes del aislamiento de China referido en el estuche anterior.

Al relacionar la sensibilidad del EIE empleado, con los estudios de epidemiología molecular del VHE que realizaron otros autores en personas infectadas que trabajaban con cerdos; es importante señalar que con frecuencia se encontraba el genotipo 3 en mayor proporción que el genotipo 4 del virus (Purcell y Emerson, 2001; Meng, 2009b). Si este comportamiento fuese similar para este grupo estudiado, probablemente la prevalencia encontrada en estos trabajadores estaría siendo subestimada, lo que sugiere que una prevalencia mayor podría ser esperada.

La prevalencia de anti-VHE detectada en la población estudiada, demuestra que los trabajadores de las granjas porcinas de la provincia La Habana deben ser considerados un

grupo de riesgo en la epidemiología del VHE en Cuba, hallazgo que no difiere de los reportes mundiales revisados (Drobeniuc y cols., 2001; Meng, 2009a).

b) Factores de riesgo asociados con la prevalencia de Ig totales anti-VHE

En cuanto a los factores de riesgo relacionados con la exposición al VHE (Tabla IV.8), se observó que la población estudiada estuvo compuesta fundamentalmente por hombres, la detección de Ig total anti-VHE fue elevada en el género masculino con respecto al femenino, lo cual no fue estadísticamente significativo.

Tabla IV.8. Factores de riesgo asociados a la presencia de anti-VHE en los trabajadores de las granjas porcinas de Provincia Habana, 2007.

Variables	Ac totales anti-VHE		OR (IC 95%)
	+/n	% prevalencia	
Género			
Femenino	5/21	23,8	0,54 (0,18-1,43)
Masculino	33/85	38,8	1,14 (0,91-1,31)
Grupos de edades (años)			
18-29	6/28	21,4	0,47(0,18-1,09)
30-39	9/25	36	1,07 (0,71-1,89)
40-49	9/25	36	0,98 (0,54-1,78)
50-59	8/20	40	1,12 (0,61-2,06)
60-70	6/8	75	2,25 (1,38-3,66)*
Tiempo de trabajo (años)			
<5	11/48	22,9	0,48 (0,27-0,87)
5-14	19/36	52,7	1,25 (1,23-3,24)*
>14	8/22	36,3	0,99 (0,40-2,29)
Animales domésticos			
Si	29/86	33,7	0,77 (0,44-1,35)
No	9/20	45	1,31 (0,74-2,29)
Intervenciones quirúrgicas			
Si	13/38	34,2	0,91 (0,53-1,55)
No	25/68	36,7	1,10 (0,64-1,88)
Trabajo directo con cerdos			
Si	29/74	39,1	0,9 (0,48-1,60)
No	9/32	28,1	1,05 (0,75-1,40)

Fuente de datos: Encuesta epidemiológica, IPK 2007.

Leyenda: n, total de muestras analizadas; OR, Odd riesgo; IC, intervalo de confianza; *, significación estadística.

En la literatura internacional se recogen numerosos estudios, donde se correlaciona el sexo con la prevalencia del VHE. Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por Drobeniuc y cols. quienes no encontraron correlación entre estas variables (Drobeniuc y cols., 2001). Sin embargo, en una comunidad ocupacionalmente expuesta a cerdos se detectó que la exposición al virus estaba asociada con el sexo masculino (Zheng y cols., 2006). En población abierta se reporta una mayor prevalencia de anti-VHE en hombres, pues se plantea que estos tienen un riesgo ocupacional mayor por el tipo de trabajo que realizan (Aggarwal y cols., 2002). Además, se ha referido que en las zonas rurales estos usualmente consumen agua de beber de fuentes de abasto contaminadas (Toole y cols., 2006).

Por grupos de edades (Tabla IV.8) la positividad al marcador serológico del VHE se elevó y alcanzó un 75% en el grupo de edad de 60-70 años. Estos individuos tuvieron un riesgo 2,25 veces mayor de exponerse al VHE, que el resto de las personas estudiadas; siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p=0,01$, Prueba exacta de Fisher). Estos hallazgos concuerdan con lo obtenido en individuos de Moldavia que por su ocupación estaban en contacto con cerdos, donde la detección de anti-VHE en personas mayores de 40 años fue significativamente mayor que aquellas con edades comprendidas entre 18-30 años (65,7% vs 40%) (Drobeniuc y cols., 2001; Meng y cols., 2002). Li y cols. en comunidades rurales de China que mantenían cerdos en los alrededores de las casas, encontraron que la prevalencia de Ig totales al VHE aumentaba después de los 30 años (Li y cols., 2006a).

Con relación al tiempo laboral, se identificó que la prevalencia de anti-VHE fue 22,9% para aquellos trabajadores que llevaban menos de 5 años laborando en este sector. Esta se incrementó a 52,7% (5-14 años), para caer a 36,3% en individuos con más de 14 años de trabajo. La presencia de anti-VHE se correlacionó positivamente ($p=0,004$, Prueba exacta de Fisher) con el tiempo de servicio de 5-14 años, con un OR 1,25 veces mayor, que el resto de los intervalos estudiados.

En otras investigaciones similares se detectaron resultados análogos (Drobeniuc y cols., 2001; Zheng y cols., 2006). En particular, Zheng y cols. empleando intervalos de tiempo laboral

similares a los nuestros, encontraron que la prevalencia de anti-VHE en estos trabajadores fue más elevada en los que tenían un tiempo de servicio mayor de 14 años (Zheng y cols., 2006).

La caída de los anti-VHE de 54,1% (5-14 años) a 36,3% en trabajadores con más de 14 años de labor en estas instalaciones, sugiere que probablemente los Ac declinen con el tiempo. Este hallazgo se produce a consecuencia de la corta persistencia en el tiempo de las Ig totales contra el VHE, cuyo fenómeno ha sido ampliamente descrito, siendo una característica particular de la respuesta inmune inducida por este agente viral (Dawson y cols., 1992; Anderson y cols., 1999). Hasta el presente, en nuestro país no se recogen antecedentes de investigaciones similares, que avalen este comportamiento en grupos poblacionales con riesgo de infectarse con el VHE, por lo que no se pueden hacer comparaciones al respecto.

Analizando la asociación entre la prevalencia de Ac totales anti-VHE y la tenencia de animales domésticos, se detectó que 33,7% de las personas positivas criaban animales, pero no hubo asociación significativa con esta variable, lo que sugiere que en la población estudiada esta condición no constituyó un factor de riesgo. No obstante, se ha sugerido que el contacto doméstico con cerdos está asociado a la transmisión zoonótica del virus (Meng, 2000). La presencia de Ac anti-VHE se ha detectado en diferentes animales domésticos tales como perros, roedores, gatos, aves y otros mamíferos. Sin embargo, la identificación de material genético del virus se demostró en cerdos, aves, roedores y mangostas (Okamoto y cols., 2004; de Deus y cols., 2007).

En cuanto a las intervenciones quirúrgicas, el 34,2% de estas personas que refirieron este antecedente fueron positivas a Ig totales al VHE, sin mostrar asociación con esta variable. Sin embargo, en un estudio de seroprevalencia realizado en Cataluña la detección de anti-VHE fue positivamente correlacionada con las cirugías menores (Buti y cols., 2006). Las intervenciones quirúrgicas se consideran un riesgo en la epidemiología de esta enfermedad, ya que la transmisión parenteral del virus durante el período de viremia constituye otra ruta de entrada de este agente infeccioso, condicionado por el uso de materiales mal esterilizados.

Teniendo en cuenta el tipo de actividad que realizaban, el 39,1% de los trabajadores positivos al anti-VHE desempeñaban labores directamente relacionadas con el ganado porcino tales como: maternistas, veterinarios y auxiliares de limpieza de naves, mientras el 28,1% de las personas que estaban ubicadas en ocupaciones no relacionadas con cerdos como cocineras, oficinistas, administrador, custodios y chóferes tenían anti-VHE (Tabla IV.8). Al evaluar este

factor se evidenció que a pesar de que una elevada proporción de trabajadores positivos desempeñaban labores relacionadas con ganado porcino, no se demostró una correlación significativa con esta condición, infiriéndose que esto no constituye un riesgo para los sujetos estudiados. Así que probablemente, existan otras fuentes de contaminación en el entorno laboral, que determinen la exposición al virus. Se plantea que la contaminación de fuentes de abastos de agua con residuales porcinos o la cocción inadecuada de sus productos cárnicos pudiera ser el origen de la contaminación; a la cual se exponen todos los trabajadores independientemente de su ocupación (Zheng y cols., 2006).

Existen autores que han demostrado que profesiones tales como: maternistas, encargados de cría de cerdos y limpiezas de naves, así como los veterinarios en especial de ganado porcino, están altamente relacionadas con la presencia de anti-VHE (Drobeniuc y cols., 2001; Meng y cols., 2002; Zheng y cols., 2006).

Con relación al uso frecuente de tratamiento inyectable, de adornos metálicos (piercing y aretes) y los tatuajes, no se obtuvo una asociación significativa con la presencia de anti-VHE, resultado que fue similar al que se obtuvo en la encuesta sero-epidemiológica de los municipios La Lisa, Playa y Marianao. Además, se observó que el hábito de hervir el agua de beber no fue común en la población estudiada y solo 3 trabajadores refirieron esta práctica doméstica, los que fueron negativos al anti-VHE.

En cuanto a la asociación entre el antecedente de HVA (ictericia) y la presencia de anti-VHE, se encontró que el 76,3% (29/38) de los individuos positivos no refirieron historia previa de síntomas y signos relacionados con esta enfermedad. Mientras que el 23,6% (9/38) refirieron historia de HVA. Varios autores han observado que la infección por el VHE cursa de forma asintomática en las poblaciones con riesgo de transmisión zoonótica del virus (Choi y cols., 2003; Ahn y cols., 2005). La ausencia de síntomas en estos individuos pudiera estar relacionada con el genotipo del VHE infectante. Se ha sugerido que las cepas que infectan a los cerdos pertenecen a los genotipos 3 y 4, siendo la primera poco virulenta, por lo que la severidad clínica de esta enfermedad podría estar relacionada con las características genéticas del virus y con la presencia en el individuos de una enfermedad hepática crónica de base (Okamoto, 2007).

c) Determinación cuantitativa de la ALAT y la ASAT en suero

Teniendo en cuenta que las Ig totales anti-VHE pueden detectar infecciones pasadas (IgG) o en cursos (IgM, IgA), se evaluaron los niveles de ALAT y ASAT en las personas positivas al anti-VHE con vistas a detectar posibles movimientos enzimáticos subclínicos. De las 38 muestras positivas, se pudieron estudiar 30, por ser insuficiente la muestra para determinar estos analitos.

Los valores medios de la ALAT fueron $16,2 \pm 9,7$ U/L (rango 5-41 U/L) y la media de la ASAT fue $64,58 \pm 31,4$ U/L (rango 36-132 U/L). En cuanto a la relación de las aminotransferasas (ALAT y ASAT) con la presencia de anti-VHE, se detectó que un elevado porcentaje de los sujetos positivos tenían cifras de ASAT (33.3%; 10/30) por encima de los límites normales, con respecto a la ALAT (3%; 1/30), lo cual fue estadísticamente significativo ($p=0.026$, Prueba exacta de Fisher). Este hallazgo no ha sido referido en la bibliografía consultada y en general, los artículos relacionados con el tema han mostrado resultados discordantes. Mitsui y cols. reportaron niveles normales de ALAT en casos de hepatitis E subclínica (Mitsui y cols., 2005; Minuk y cols., 2007), en contraste con otros trabajos que identificaron cifras elevadas de ALAT (Fukuda y cols., 2004; Gao y cols., 2004).

Se ha señalado que un movimiento de la ALAT se asocia fundamentalmente a lesión de las células hepáticas, mientras que, niveles de ASAT elevados están relacionados con procesos de necrosis (Bergmeyer y cols., 1986b; Bergmeyer y cols., 1986a). Como se conoce la ASAT no es un marcador específico y existen otros procesos extra-hepáticos que cursan con niveles anormales de esta enzima, los que no fueron descartados en la población estudiada.

d) Detección del genoma viral del VHE en suero y heces

La presencia de ARN-VHE en el suero como indicador de infección aguda fue evaluada en todas las muestras positivas al anti-VHE y se identificó la viremia, en el 5% (2/38) de las mismas. Zhao y cols. realizaron la cinética de la detección de ARN-VHE en suero y detectaron que la tasa de positividad declinaba con el curso de la enfermedad, siendo el promedio de 20,6 días, después del inicio de los síntomas (Zhao y cols., 2007). La detección de la viremia sugiere que, estos individuos estaban en un período de incubación tardío o período de estado de la hepatitis E, donde las Ig totales anti-VHE también son identificadas. Este hallazgo demuestra que el contacto con suero o plasma contaminado, pudiera constituir una ruta de entrada para el virus. La hepatitis E asociada a transfusiones fue reportada, dado que las personas que cursan

con cuadros asintomáticos o subclínicos acuden a donar sangre (Tamura y cols., 2007; Toyoda y cols., 2008).

En el grupo de riesgo estudiado, las personas con viremia mostraron niveles normales de ALAT, lo que coincide con la literatura revisada (Zhao y cols., 2007), sin embargo una de las dos personas con ARN-VHE tenía cifras anormales de ASAT.

En cuanto a la excreción viral, se pudieron evaluar 20 muestras de heces de las 38 personas positivas a las Ig totales anti-VHE. De ellas se confirmó la presencia de material genético del virus en el 60% (12/20) (IC 95%: 36,4-80) de las muestras estudiadas.

En la Tabla IV.9, se muestra la estratificación de la excreción del VHE como marcador de infección aguda y su correlación con las variables demográficas, de riesgo de exposición al virus y valores de las aminotransferasas séricas. Aunque el sexo femenino fue minoritario, se detectó que la excreción viral fue mayor en el sexo masculino, siendo estadísticamente significativa ($p=0,016$, Prueba exacta de Fisher). Esto confirma los hallazgos de Zheng y cols., (2006), quienes describieron que el índice de infección en el sexo masculino fue elevado.

Igualmente, se observó que la media de la edad y el tiempo laboral fue 41,5 años y 9,5 años, respectivamente, en las personas que excretaban el VHE en heces, sin estar estadísticamente asociadas. Esto sugiere que la infección aguda ocurre independientemente de la edad de la persona expuesta a riesgo, por lo que se podría esperar hepatitis E en edades donde los individuos deberían estar serológicamente protegidos, siguiendo el patrón de regiones endémicas (Aggarwal y Naik, 2009).

Tabla IV.9. Distribución de la excreción del VHE en heces, según sexo, edad, tiempo laboral y enzimas hepáticas.

Variables	ARN-VHE heces n=20		P
	Positivo	Negativo	
Género:% (ARN-VHE/n)			
Femenino	0 (0/3)	100 (3/3)	
Masculino	70,5 (12/17)	29,4 (5/17)	0,016*
Edad:(M±DS) años	41,5±11,2	38,7±11,6	0,59
Tiempo laboral: (M±DS) años	9,5±5,2	6,4±7,7	0,29
Enzimas: (M±DS) U/L			
ALAT	18,6±11,9	12,3±3,8	0,21
ASAT	49,7±37,2	32,5±13,8	0,24

Fuente de Datos: Encuestas IPK/2007.

Leyenda: n, total de muestras analizadas; M, media; DS, desviación estándar; *, $p < 0,05$.

Al profundizar en los datos relacionados con el tiempo de trabajo y la detección de ARN-VHE en heces, encontramos que 37,5% (3/8) personas con menos de 5 años de servicio fueron positivas, 77,7% (7/9) con 5-14 años y 66,6% (2/3) con más de 14 años. Según el tiempo de trabajo en los individuos con riesgo ocupacional se debe esperar que a medida que aumente el tiempo de exposición disminuyan las infecciones agudas.

La detección simultánea de IgG anti-VHE y ARN del virus fue descrita en un estudio sero-epidemiológico realizado en Marruecos (Benjelloun y cols., 1997). Esto pudiera estar justificado por una infección crónica, donde la infección primaria no se elimina debido a la presencia de cuasiespecies del VHE o a una mayor producción de Ac anti-VHE sub-neutralizantes con relación a los neutralizantes (Grandadam y cols., 2004; Zhang y cols., 2010). Otra de las causas es que el VHE evada el sistema inmune, asociándose a lípidos y proteínas o forme agregados virales, que no pueden ser neutralizados (Burton y cols., 2000).

El sistema inmune de mucosa es la primera línea de defensa frente a los microorganismos que tienen como puerta de entrada el TGI. Durante la infección por el VHE se producen altos niveles de IgA anti-VHE, las que inhiben la re-infección por exclusión inmune, neutralización intracelular del virus y por exclusión viral. Por tanto, el ARN del VHE detectado pudo obtenerse de virus que formaban inmunocomplejos en el TGI (Strugnell y Wijburg, 2010).

Las medias de la ALAT estuvieron dentro de los límites normales para ambos grupos, por lo que no hubo relación con la excreción viral en heces. Mientras que, la media de la ASAT se comportó por encima de las cifras de referencia (49,7 U/L) para los positivos, lo cual no fue estadísticamente significativo, al compararlo con los sujetos negativos. Los hallazgos de Mitsui y cols. concuerda con nuestros resultados, ya que encontraron que en ausencia de una elevación de la ALAT puede encontrarse ARN-VHE en suero y heces (Mitsui y cols., 2005). Con respecto a la ASAT, los resultados sugieren que probablemente en los individuos ocupacionalmente expuestos a cerdos, con una elevación de la ASAT por encima de la normalidad, debe tenerse en cuenta la infección por el VHE. Estos datos no han sido reportados en la literatura revisada, donde la mayoría de los estudios se limitan a correlacionar la presencia de ARN-VHE con ALAT.

Finalmente, se demostró que los trabajadores de las granjas porcinas estudiadas constituyen un grupo de riesgo para la hepatitis E, los que comúnmente cursaron con infecciones asintomáticas sin movimiento patológico de la enzima hepática (ALAT) particularmente en las personas donde se detectó viremia y excreción viral.

IV.4 Evaluación de la sensibilidad de varias líneas celulares para la multiplicación del VHE.

Dentro del diagnóstico virológico, el cultivo celular es la prueba de oro y constituye una herramienta de extraordinaria importancia, ya que permite confirmar la presencia del virus y obtener material biológico para múltiples propósitos (Melnick, 1996).

Teniendo en cuenta los antecedentes de que el VHE fue aislado e identificado en diferentes líneas celulares y que además teníamos muestras de heces positivas por TR-RCP al ARN-VHE, adecuadamente conservadas de un paciente cubano con hepatitis E, en cuya historia epidemiológica no se recogió viajes al exterior del país, nos propusimos en esta parte de la investigación aislar y propagar el virus autóctono en diferentes líneas celulares.

Primeramente se utilizaron las células A549, las que fueron inoculadas con una suspensión de heces correspondiente al paciente antes referido e identificado por el LNRHV como la muestra ECV/2349-03. Después de realizada la siembra primaria donde se observó el efecto tóxico del espécimen, se procedió al 1er. pase y el ECP fue evidente a partir del 3er. día de post-inoculación. Se realizaron cinco pases seriados y las células fueron observadas diariamente en los dos primeros pases hasta los 9 y 11 días, respectivamente. El ECP estuvo dado por un aumento de la refringencia, redondeamiento y desprendimiento celular de la superficie de cultivo. El efecto progresó hasta llegar a la pérdida de la arquitectura normal de la monocapa y destrucción de la misma (Figura IV.3). El tiempo de aparición del ECP disminuyó al aumentar el número de pases, por lo que células tuvieron que ser congeladas entre los 7 y 8 días de post-inoculación a partir del 3er pase.



Figura IV.3. Efecto citopático producido por el VHE en las células A549 en el 3er. pase a los 7 días de post-inoculación. a) Células infectadas con la muestra ECV/2349-03 positiva al ARN-VHE b) Células no infectadas, como control negativo del ensayo.

El resto de las líneas celulares estudiadas (FRhK4; HeLa; HEp-2; LLC-MK2; MRC-5) se inocularon con el sobrenadante obtenido del 3er. pase de las células A549, donde el ECP comprometió a más del 90% de las células. Estos cultivos fueron observados durante tres pases seriados realizados a ciegas ya que no se observó ECP alguno, las células fueron congeladas entre los 9 y 11 días (Tabla IV.10).

La expresión celular de los Ag del VHE se evaluó por IFI (Tabla IV.10), con esta técnica se detectó la presencia de Ag virales desde el primer pase en las células A549, la que se mantuvo hasta la quinta generación. En el resto de los sistemas celulares se observó a partir del 2do. pase, excepto en la línea HeLa donde estos no fueron detectados. Similar a lo reportado por Kazachkov y cols. se observó un patrón de inmunofluorescencia granular propio de los virus que tienen replicación citoplasmática (Kazachkov y cols., 1992).

Tabla IV.10. Evaluación de la sensibilidad de varias líneas celulares a la replicación del VHE en pases seriados.

Línea celular	Efecto citopático ^a			Expresión de antígenos virales ^b			Detección del ARN del VHE ^c		
	1er.p	2do.p	3er.p	1er.p	2do.p	3er.p	1er.p	2do.p	3er.p
A549	2x	3x	4x	50%	70%	>90%	+	+	+
MRC-5	0	0	0	0	50%	50%	+	+	+
LLC-MK2	0	0	0	0	50%	15%	+	+	-
HEp-2	0	0	0	0	25%	50%	+	+	+
FRhK4	0	0	0	0	25%	50%	-	-	+

HeLa	0	0	0	0	0	0	-	-	-
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Leyenda: ^a Número de cruces corresponde a la intensidad del efecto citopático (0%=0 ECP, 50% ECP=2X, 75% ECP=3X, 100% ECP=4X); p, pases. ^b Expresión de antígenos virales dada en % de células infectadas detectadas por IFI. ^c Presencia (+) o ausencia (-) de ARN del VHE, detectada por TR-RCP.

La detección del material genético viral por la TR-RCP simple para el MAL2 (Figura IV.4), se demostró en las células A549 desde el 1ro hasta el 5to pase, e incluso desde la siembra primaria. En cambio, este marcador no tuvo un comportamiento uniforme en el resto de los sistemas estudiados. En las MRC-5 como en las HEp-2 el ARN del virus se detectó en todos los pases, en tanto para las LLC-MK2 solo se constató en los dos primeros pases. En las FRhK4 se obtuvo producto amplificado solo en el 3er pase, mientras que en la línea HeLa, no se observó genoma del virus en ninguno de los sobrenadantes de los pases realizados.

Al analizar de forma integral estos resultados observamos que para las células A549, el VHE se multiplicó y fue infeccioso en todos los pases realizados. La intensidad del ECP se incrementó con cada pase, lo que sugiere una rápida adaptación de la cepa a este sistema celular y probablemente una reducción de la fase exponencial de la replicación viral. Además, se confirmó la presencia del virus y su multiplicación, ya que fue detectado el genoma y los Ag virales en cada pase. El cultivo del VHE en esta línea celular procedente de heces, fue reportado por primera vez por Huang y cols., quienes utilizaron muestras de brotes y de casos esporádicos de hepatitis E en China (Huang y cols., 1992b; Huang y cols., 1999).

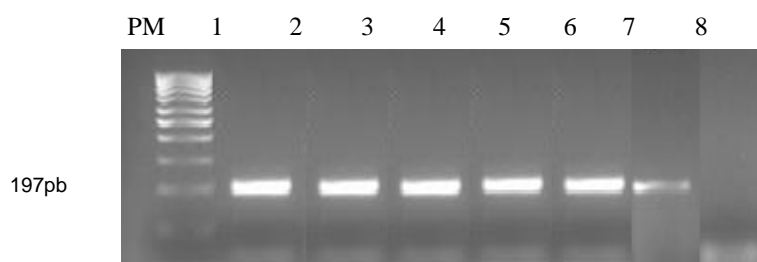


Figura IV.4. Productos amplificados del MAL2 de sobrenadante de cultivo de las células A549. PM: Peso molecular 100pb; 1: control positivo; 2: 5to. pase; 3: 4to. pase; 4: 3er. pase; 5: 2do. pase; 6: 1er. pase; 7: siembra primaria y 8: control negativo.

En este trabajo se reporta por primera vez el aislamiento en cultivos celulares de una cepa del continente americano, ya que los datos anteriores fueron obtenidos con cepas del continente asiático. Las características del ECP provocado por la cepa cubana, fue similar a lo observado

con los aislamientos asiáticos, donde además se refiere que aparece el ECP a las 48 hr. de post-inoculación, este progresó hasta la destrucción completa de la monocapa, siendo detectado el virus por IFI, microscopía electrónica y TR-RCP (Huang y cols., 1992b; Huang y cols., 1999). Con respecto a las células MRC-5 no hay antecedentes del uso de esta línea de fibroblastos humanos para propagar el VHE. Con este estudio se demostró que puede ser utilizada para sostener el crecimiento viral, aunque su replicación no afecta la morfología, ni la monocapa celular. Este hallazgo de la propagación del VHE en las células MRC-5 es importante, ya que es una línea celular diploide certificada para la producción de vacunas convencionales (ATCC, 1992). Igualmente, la línea 2BS (células diploides de fibroblastos de pulmón fetal humano), ha demostrado ser útil para aislar y propagar el VHE, el que produce un marcado ECP en esta línea celular (Huang y cols., 1995; Huang y cols., 1999).

Si bien, en la línea LLC-MK2 no se detectó ECP en los tres pases seriados, sí se pudo identificar los componentes del virus. En los dos primeros pases se obtuvo el genoma viral y la expresión de Ag fue máxima en el 2do. pase para luego caer en el 3ro. Huang y cols., obtuvieron resultados similares, pero en cuanto al ECP, no lo observaron después de realizar pases seriados. Al mismo tiempo, detectaron por el método de Reed y Muench (Melnick, 1996) que el título viral descendió en los pases sucesivos (Huang y cols., 1995). Esta disminución en la detección de Ag y de material genético viral pudiera estar determinada por la interacción entre la célula hospedera y el virus, donde se pueden producir alteraciones en el ciclo replicativo que provoca una reducción progresiva de la progenie viral y consecuentemente se aborta la multiplicación viral.

En la línea HEp-2, la expresión de los Ag del virus aumentó del 2do. al 3er. pase y el genoma viral fue detectado en todos los pases realizados. La sensibilidad de este sistema al VHE no había sido explorada con anterioridad, por lo que al igual que las líneas MRC-5 se demuestra que puede ser utilizada para mantener el crecimiento del virus en condiciones de laboratorio.

Las células FRhK4 demostraron su capacidad para propagar el VHE, aunque la adaptación de la cepa a este sistema no ocurrió de forma inmediata. Las células FRhK4 fueron las primeras células utilizadas para aislar este agente cuando se co-cultivaron con células de riñón de monos *cynomolgus* infectado con el virus. En este experimento los componentes del virus fueron observados (IFI y ARN) a partir del 5to. pase; este es el único antecedente que se recoge en la

literatura sobre el uso de esta línea celular que fue inoculada con el VHE usando un protocolo diferente al nuestro (Kazachkov y cols., 1992).

En tanto, se evidenció que la línea HeLa no fue permisiva para el VHE, pues en ninguno de los pases se detectaron componentes del virus. Esto concuerda con la literatura revisada, ya que Le y cols., siguieron estas células hasta el 4to pase y obtuvieron resultados similares a los nuestros (Le y cols., 2001).

En las líneas celulares empleadas para la propagación y que a su vez fueron permisivas para el VHE, el crecimiento viral fue detectado tempranamente desde el 1er pase por TR-RCP y no por IFI. Como se conoce, la sensibilidad de esta técnica es elevada con respecto a la IFI, que depende del reconocimiento de epítopes conformacionales del virus y de la concentración de los Ag en las células tomadas del frasco de cultivo para obtener un resultado positivo, mientras que la TR-RCP puede identificar genoma viral a bajas concentraciones (Huang y cols., 1995) y la empleada en esta investigación tenía una sensibilidad de 10^3 copias del genoma viral/ μL .

La posibilidad de cultivar el primer aislamiento cubano del VHE en diferentes líneas celulares quedó demostrada en la presente investigación, lo que permitirá profundizar en los estudios de biología molecular y de replicación viral. Además, esta fuente de Ag podría ser utilizada para diseñar estuches para el diagnóstico de la hepatitis E en nuestro medio, realizar investigaciones de caracterización biológica de cepas y evaluar futuros candidatos vacunales.

IV.5 Determinación de la relación filogenética de los aislamientos cubanos del VHE con otras cepas que circulan en el mundo.

Para concluir esta investigación era imprescindible conocer si los aislamientos cubanos estaban genéticamente relacionados con otros que circulan en el mundo, ya que las evidencias serológicas en cuanto a la reactividad con los estuches utilizados en los acápite IV.1.1 y IV.2 así lo sugerían. Se analizaron las secuencias nucleotídicas de los productos de la RCP obtenidos con la TR-RCP anidada del MAL1 y 2, descrita con anterioridad. Se incluyeron en este análisis secuencias de muestras positivas a la RdRp provenientes de población abierta y del grupo de riesgo que laboraba en las granjas porcinas. Dieciséis muestras fueron secuenciadas a partir del producto amplificado clonado (12 aislamientos) y directamente del producto de la RCP (4 aislamientos).

En cuanto a la porción del MAL1 que se empleó para genotipar, Zhai y cols. demostraron que esta región de la polimerasa del VHE poseía suficiente variabilidad y longitud entre las cepas

que circulaban en el mundo para ser utilizada con este fin, sustituyendo de esta forma la secuenciación completa del virus (Zhai y cols., 2006). Esta región funciona como unidad catalítica de la replicasa viral, imprescindible para la multiplicación del virus. Por tanto, determinar la evolución de esta región, pudiera reflejar los cambios genéticos de los virus con alta fidelidad.

El análisis filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas (211 nucleótidos), correspondiente a la región de la polimerasa viral MAL1 se muestra en la figura IV.5. Los aislamientos cubanos obtenidos de brotes y casos esporádicos, o sea en población abierta se agruparon dentro del genotipo 1, subtipo 1a (Anexo XIV) con un valor del bootstrap de 100%. Nuestros aislamientos compartieron un 97,8-99% de similitud nucleotídica con los aislamientos hindúes, específicamente con la cepa Yam-67 del norte de la India (Jameel y cols., 2002). La distancia nucleotídica entre los aislamientos cubanos osciló de 0-0,025, mostrando poca variabilidad por lo que están genéticamente relacionadas entre sí.

La caracterización molecular de los aislamientos autóctonos del VHE en población abierta de Cuba, evidenció por primera vez la presencia del genotipo 1 autóctono en la región de las Américas. Asimismo, la sospecha de que la elevada reactividad encontrada con el estuche de IgM anti-VHE del CIGB, cuya proteína recombinante se obtuvo de un aislamiento de India obedecía a una homología genética (genotipo 1, subtipo 1a) entre las cepas, quedó demostrada. El genotipo 1 había sido identificado en Asia y África. En la región del Caribe este mismo genotipo fue detectado en un brote de hepatitis E, presuntamente importado en un campamento de tropas pacifistas de Naciones Unidas, donde los soldados habían arribado recientemente de Bangladesh y se encontraban en Haití. Este brote fue controlado y se detectaron Ac anti-VHE en personal haitiano (3%), en ausencia de genoma viral (Gambel y cols., 1998).

Se ha planteado que los genotipos del VHE tienen una distribución geográfica determinada, sin embargo estos hallazgos sugieren que el virus circula ampliamente en el mundo y que pudiera no estar limitado genótipicamente a un área específica. Existen datos que avalan estos resultados donde se demuestra que el genotipo 2, identificado en México (Huang y cols., 1992a), también ha sido detectado en el continente africano en países como Namibia y Nigeria (Buisson y cols., 2000; Maila y cols., 2004).

El genotipo 1 es considerado epidémico y hasta la fecha se ha identificado solo en humanos (Lu y cols., 2006). La transmisión de cepas humanas epidémicas generalmente se produce a partir de una fuente de abasto de agua o alimentos contaminados, lo que contribuye a la baja variabilidad genética de las cepas pertenecientes a este genotipo. Esta estabilidad genética fue encontrada en el análisis filogenético realizado con los aislamientos cubanos es poca, lo que concuerda en este último aspecto con nuestros resultados. No obstante, se ha descrito una variabilidad mayor en los casos esporádicos producidos por este genotipo, la cual se incrementa entre las áreas geográficas (Zhai y cols., 2006).

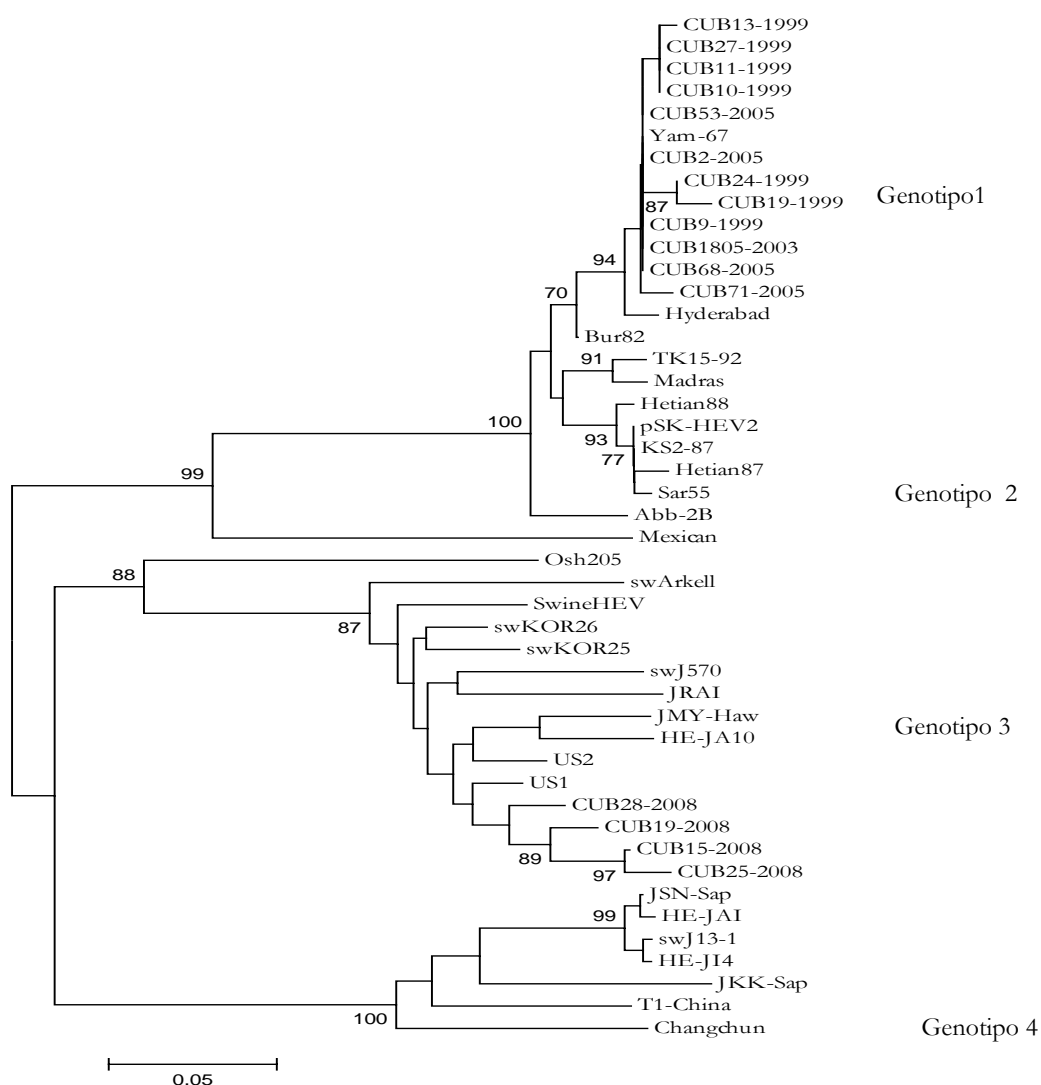


Figura IV.5. Árbol filogenético construido con 211 nucleótidos de la ARN polimerasa ARN dependiente (MAL1), se usó el método de Neighbor Joining para crear el árbol y los valores de bootstrap para 1 000 replicas mayor de 70% fueron mostrados en los nodos internos. Las ramas principales del árbol representan los genotipos del VHE.

El análisis genético de las secuencias del MAL1 de los aislamientos obtenidos de personas que laboraban en granjas de cerdos (Figura IV.5), mostró que estas secuencias se agruparon dentro del genotipo 3 subtipo 3a (Anexo XV), estrechamente relacionadas con la cepa US1 aislada de un paciente de EE.UU. que trabajaba en granjas de cerdos (Erker y cols., 1999), compartiendo un 97% de similitud nucleotídica. La similitud de nucleótidos entre las cepas cubanas con otras de este mismo genotipo osciló de 88% a 97%. La distancia de nt los aislamientos cubanos fue 2% a 4%. Los aislamientos cubanos pertenecientes a este genotipo mostraron una alta variabilidad, la cual pudiera ser atribuida a la transmisión zoonótica de este genotipo, provocando una divergencia nucleotídica elevada (Lu y cols., 2006; Song y cols., 2010).

La detección del genotipo 3 del VHE en los trabajadores de las granjas de cerdos estudiadas, fue un hallazgo que apoyó las especulaciones realizadas en cuanto a la subestimación de los resultados de seroprevalencia de los virus encontrados en estos sujetos con el EIE empleado, que contenía proteína recombinante del MAL 2 del genotipo 1b.

Al analizar las secuencias de la RdRp del genotipo 1 obtenidas de población abierta, se encontraron 5,2% (11/211) cambios nucleotídicos, dados en su totalidad por transiciones 91% (10/11). No se observaron inserciones ni deleciones. El análisis de la cadena de aa reveló 11,4% (8/70) de cambios aminoacídicos. Por el contrario, en las secuencias obtenidas de la RdRp del genotipo 3, se identificaron 27,1% (57/211) sustituciones de nucleótidos, dadas en su mayoría por transversiones. En particular, se detectaron 5 inserciones en la cepa CUB25-2008, que fue la más variable de todas. Con respecto a la secuencia de aa, la proteína obtenida de estos aislamientos estaba truncada con respecto a la proteína prototipo, ya que la secuencia de nt poseía un codón de parada, similar a la cepa swKOR25 y swKOR26 aislada de cerdos (Kim y cols., 2008). Se produjeron 32 cambios en la secuencia de aa, lo que se correspondió con un 45,7% de variación en la secuencia proteica, al parecer sin afectar la función biológica de esta enzima.

La razón de la baja variabilidad de las cepas del genotipo 1, con respecto a las cepas del genotipo 3, aun es objeto de controversia en la comunidad científica internacional. Los

aislamientos del genotipo 1 causan brotes o epidemias por su eficiente transmisión por la ruta fecal-oral (Purcell y Emerson, 2001). Los genotipos 3 y 4 son mantenidos entre las especies de animales tales como los cerdos, roedores y ocasionalmente infectan a humanos debido a una transmisión cruzada de especies, producida por estas variantes genéticas. Estos animales soportan una circulación prolongada del VHE con una evolución independiente (Okamoto, 2007), por lo que las diferencias en el grado de divergencia viral entre los genotipos pudiera reflejar patrones de transmisión diferentes.

Dos aislamientos obtenidos de población abierta previamente secuenciados para el MAL 1 (RdRp) fueron secuenciados a partir del producto clonado para la región que codifica la proteína estructural del virus (cápside), región ampliamente utilizada para genotipaje (Figura IV.6). Los aislamientos identificados como CUB10D-1999 y CUB2D-2005, fueron obtenidos de un brote y un caso esporádico, respectivamente..

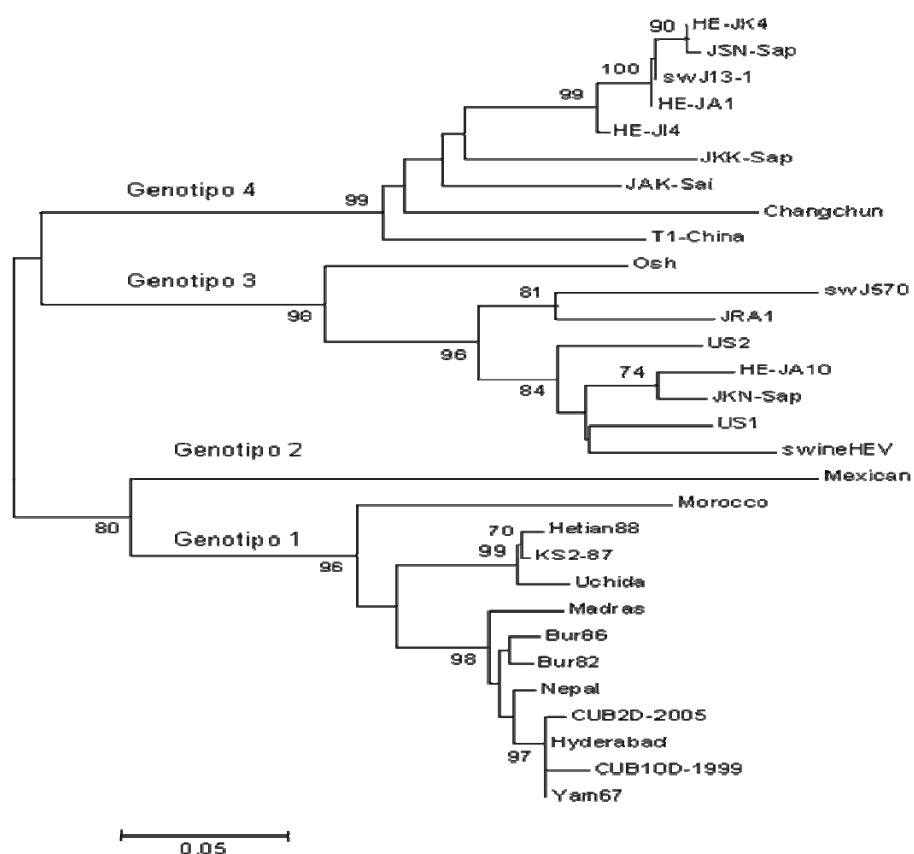


Figura IV.6. Árbol filogenético construido con 311 nucleótidos de la cápside de VHE, se usó el método de Neighbor Joining para crear el árbol y los valores de bootstrap para 1000 réplicas mayor de 70% fueron mostrados en los nodos internos. Las ramas principales del árbol representan los genotipos del VHE.

Con este análisis se confirmó la presencia del genotipo 1 en la población estudiada. Los aislamientos cubanos se agruparon con una alta homología con las cepas del genotipo 1, la diferencia nucleotídica entre estas dos secuencias osciló de 0,8 a 1,9%, mientras que la diferencia de nt entre los aislamientos que pertenecen a un mismo genotipo alcanzó hasta 6,7%, lo que fue compatible con los estudios moleculares realizados por Lu y cols. (2006). Estos mismos aislamientos cubanos mostraron una diferencia de 0,05-0,08% para la secuencia obtenida del MAL1.

Para el MAL2 las variaciones nucleotídicas estuvieron dadas principalmente por transiciones, aunque se observaron transversiones. Se produjeron 18,6% cambios de nucleotídicos (58/311) y la mayoría de estas sustituciones fueron sinónimas. En cuanto a la secuencia de aa la cepa CUB2D-2005 tuvo 6,7% (7/103) cambios de aa y la CUB10D-1999, 8 cambios con respecto a la secuencia patrón.

La epidemiología molecular del VHE es bastante compleja, aunque se plantea que la diseminación del virus es clonal, siguiendo el esquema de “un brote una cepa”, la presencia de cuasiespecies del VHE epidémico fue demostrada en un análisis retrospectivo tomando muestras seriadas de un mismo paciente y de varios pacientes de un mismo brote de transmisión hídrica en Argelia provocado por el genotipo 1 (Okamoto, 2007). Las mutaciones constituyen una fuente primaria de variación, pero no la única, la recombinación génica es una de las formas de incrementar la variabilidad del VHE, la que fue reportada dentro de un mismo genotipo entre dos cepas divergentes que mostraron una relación discordante. Este hallazgo confirma que los humanos pueden ser dualmente infectados con cepas del virus molecularmente divergentes, lo cual tiene serias implicaciones en la emergencia y evolución de nuevos VHE epidémicos (van Cuyck y cols., 2005); de ahí la importancia de continuar los estudios de epidemiología molecular del virus.

V. CAPÍTULO DE DISCUSIÓN INTEGRADA

La hepatitis E es una enfermedad infecciosa autolimitada, que frecuentemente tiene un curso clínico benigno en individuos inmunocompetentes, por lo que las infecciones en múltiples ocasiones se evidencian a través de los estudios de prevalencia (Pischke y cols., 2010).

El diagnóstico y la caracterización molecular del VHE, que permiten reconocer patrones de circulación, determinar las rutas de transmisión y ampliar los conocimientos de este virus emergente en la región, todavía son insuficientes en América Latina (Munne, 2010).

Los estudios relacionados con los mecanismos de transmisión del VHE, demuestran que su clasificación como agente transmitido por agua y alimentos contaminados está justificada, independientemente del genotipo viral (Vasickova y cols., 2009). Los virus liberados en heces de humanos o de animales vivos en el ambiente pueden contaminar fuente de abastos de agua y alimentos (Matsubayashi y cols., 2008). La transmisión zoonótica puede presentarse paralelamente no solo por el contacto con animales (cerdos y roedores) sino por preferencias culinarias, dietéticas y gastronómicas que impiden que el VHE pueda ser inactivado antes de ser ingerido por el hospedero (Teo, 2010).

El virus puede cruzar las barreras de las especies, dato que fue confirmado experimentalmente por un grupo de investigadores (Meng y cols., 1998). La hipótesis de la transmisión zoonótica del virus es sustentada por los reportes que existen sobre la transmisión inter-especie, pero esto es atribuible a los genotipos 3 y 4 que infectan a los humanos, cerdos y otras especies de animales y son los responsables de casos esporádicos de hepatitis E tanto en países subdesarrollados como en industrializados, mientras que los genotipos 1 y 2, son restringidos a humanos y asociados a epidemias en países en desarrollo (Meng, 2009).

Con los resultados serológicos obtenidos en la presente investigación se demuestra que el VHE es endémico en Cuba, produciendo brotes, casos esporádicos, cuadros clínicos graves e incluso fatales por FHF. Los brotes de HVA fueron en su mayoría producidos por el VHA, seguidos por la coinfección del VHA y el VHE, lo que evidencia que ambos microorganismos comparten las

mismas vías de transmisión. Por tanto, las políticas de saneamiento encaminadas a la prevención del VHA, redundarían satisfactoriamente en la reducción de la morbilidad por hepatitis E, ya que no existe vacuna disponible para prevenir esta infección.

Otros de los hallazgos que apoyaron el patrón endémico del VHE en Cuba fue la detección de anti-VHE (IgM e IgG) en población menor de 15 años, lo que quedó demostrado en los estudios de vigilancia de los brotes y de la prevalencia del anti-VHE en la población de Marianao. Datos similares fueron reportados en países endémicos al virus como India y Egipto (Zaki Mel y cols., 2008; Vivek y cols., 2009).

La elevada prevalencia de anti-VHE encontrada en trabajadores de granjas porcinas demostró que estos constituyen un grupo de riesgo en la epidemiología de esta enfermedad, por lo que este sector debe ser considerado en las futuras estrategias de profilaxis y prevención de la hepatitis E.

Es importante señalar que en el período evaluado no se recibieron muestras de casos graves procedentes de mujeres embarazadas, contrario a lo que ha sido ampliamente reportado en la literatura y diferencia epidemiológicamente la hepatitis E de la hepatitis A (Bradley, 1995). En cuanto al ritmo de letalidad en gestantes se ha reportado que existen diferencias geográficas, cuyas razones se desconocen. Se plantea que el estatus socioeconómico de los pacientes, los cambios hormonales que se producen durante el embarazo, el estado inmunológico, la eficiencia de los sistemas de salud y la existencia de otros agentes co-infectantes pueden jugar un papel importante en la mortalidad asociada a la hepatitis E durante la gestación (Meng, 2009). Los hallazgos encontrados en Cuba relacionados con este tópico coincidieron con lo reportado por Bhatia y cols., quienes no observaron relación entre el diagnóstico de FHF y la condición de estar embarazada (Bhatia y cols., 2008).

Dentro de los factores asociados con la exposición al VHE se constató que la prevalencia de anti-VHE se incrementó con la edad, lo que tuvo un comportamiento similar tanto en población abierta como en el grupo de riesgo estudiado. Esto concuerda con lo reportado en la literatura internacional, Takahashi y cols. encontraron que los Ac anti-VHE estaban directamente relacionados con la edad y detectaron que las personas de 30-59 años fueron más susceptibles a la infección (Takahashi y cols., 2010). En los trabajadores de granjas porcinas el tiempo laboral constituyó un factor de riesgo asociado con la exposición al VHE, similar a lo reportado por otros autores (Drobeniuc y cols., 2001). El género y los riesgos de exposición parenteral no se correlacionaron con la exposición al virus.

La circulación de dos genotipos del VHE, genotipo 1 en muestras de población abierta y genotipo 3 en las personas que laboraban en las granjas de cerdos, mostró la presencia de dos genotipos en Cuba. El genotipo 1 tradicionalmente está asociado con la transmisión fecal-oral, dado por la ingestión de agua y alimentos contaminados (Schlauder y cols., 1998). En tanto, la carencia de asociación entre la prevalencia de anti-VHE y el trabajo directo con cerdos detectado en los trabajadores de las granjas estudiadas, sugiere que probablemente la fuente de exposición al VHE perteneciente al genotipo 3 se deba a la contaminación de los alimentos o fuentes de abastos con residuales provenientes de estos animales. En un estudio realizado en comunidades de China cercanas a granjas de cerdos se detectó que la prevalencia de anti-VHE fue mayor en estas comunidades con respecto a los pobladores que habitaban en zonas urbanas, lo que podría sustentar nuestra sospecha en cuanto a esta vía de transmisión (Zheng y cols., 2006). No se debe descartar que la ingestión de los productos procedentes de estos animales (carnes y vísceras) mal cocinados pueda ser una fuente de contagio, aunque nuestra población no está habituada a la poca cocción de los alimentos. De todas formas la literatura reporta que el contacto directo con residuales provenientes de estos animales, constituye un riesgo para contraer la enfermedad (Drobeniuc y cols., 2001; Meng y cols., 2002).

Otro resultado importante que se obtuvo en este trabajo fue la detección de formas asintomáticas de la enfermedad en población abierta y en el grupo de riesgo, esto ha sido reportado en hepatitis E (Meng, 2009). Los factores relacionados con las infecciones subclínicas no se conocen, algunos autores plantean que la edad, el estado inmunológico del hospedero, las hepatopatías pre-existentes y el genotipo viral pudieran influir en estas presentaciones (Mizuo y cols., 2005; Amon y cols., 2006). Si tenemos en cuenta la implicación clínica de la variabilidad genética del VHE, se ha planteado que el genotipo 1 es más virulento que el genotipo 3 (Purcell y Emerson, 2010). En el grupo de trabajadores de granjas porcinas se constató no solo la poca expresión clínica, sino también el poco movimiento de las aminotransferasas, a pesar de detectarse excreción del virus en heces; nuestros resultados son consistentes con los reportes de la literatura relacionados con la escasa patogenicidad del genotipo 3 del VHE (Pérez-Gracia y cols., 2007; Galiana y cols., 2008).

Se observó una elevada reactividad de los sueros con el EIE del CIGB de tipo indirecto que tenía en su fase sólida proteínas recombinantes que procedían de un aislamiento que pertenecía al genotipo 1 y subtipo 1a, similar al que circula en nuestro medio. Probablemente los epítopes conformacionales que forman parte de estos Ag recombinantes fueron reconocidos con alta

afinidad por los Ac generados por el VHE autóctono, lo que garantizó una elevada sensibilidad de este ensayo en nuestro medio.

Con el estuche de Igs totales anti-VHE de Genelabs Diagnostic se obtuvo una elevada reactividad a pesar de que la proteína recombinante procedía del genotipo 1, pero del subtipo 1b. El principio de este EIE fue tipo sándwich de doble antígeno y se ha reportado que estos ELISA se caracterizan por una elevada sensibilidad y especificidad cuando se comparan con los ensayos indirectos, donde se utilizan Ac conjugados con enzima para revelar la reacción, lo cual ha sido referido por varios autores (Chen y cols., 2005; Yuan y cols., 2010). Además, teniendo en cuenta el carácter zoonótico de esta enfermedad y la diversidad de reservorios, este puede ser utilizado para detectar Ac contra el VHE provenientes de diferentes especies, como reportó Yang y cols., en un EIE para detectar el virus de la rabia (Yang y cols., 2006).

En Cuba se reporta por primera vez el genotipo 1 en aislamientos autóctonos, el cual no ha sido asociado a grandes epidemias como ocurre en otras regiones del mundo, lo que pudiera estar justificado no solo por la baja tasa de ataque secundario del VHE, sino también con un mejoramiento relativo de las condiciones higiénico-sanitarias, de los servicios de agua potable y de los sistemas de eliminación de residuales del país, en comparación con otras zonas endémicas (Balayan, 1997; Aguiar, 2004). Como se observó, el genotipo 1 no está circunscrito a África y Asia, por lo que probablemente los viajes internacionales constituyen una fuente de diseminación, siendo detectado en Haití en tropas pacificadoras recién llegadas de Bangladesh en 1995 (Gambel y cols., 1998).

El genotipo 3 está ampliamente distribuido y está más asociado a zoonosis, que limitado a una zona geográfica determinada. Este genotipo es altamente variable justificado por la amplia gama de hospederos que tiene con sistemas replicativos diferentes, por lo que la vigilancia molecular de estas cepas es importante para predecir el advenimiento de virus re-emergentes pertenecientes a este genotipo.

En esta investigación se identificó la co-circulación de cepas de genotipos diferentes, lo que no solo ha sido detectado en Cuba. En Namibia se reportó la presencia del genotipo 1 y 2, así como el genotipo 1 y 4 en India (Maila y cols., 2004; Arankalle y cols., 2007). La co-existencia de dos genotipos circulando dentro de una misma región alerta a nuestro sistema de salud que incrementos en la morbilidad y severidad de la infección por el VHE en un futuro pudieran presentarse debido a los fenómenos de recombinación génica entre cepas genéticamente

divergentes (van Cuyck y cols., 2005), fenómeno que ya fue reportado para el VHE por Wang y cols. (2010).

Varios autores describieron la asociación clínica-epidemiológica con los genotipos del VHE. Los genotipos 1 y 2 desde la década del 50 del siglo XX provocaron grandes epidemias en países tropicales y subtropicales, mientras el genotipo 3 y 4 se presentan comúnmente como infecciones asintomáticas o casos esporádicos de HVA (Velázquez y cols., 1990; Okamoto, 2007). Sin embargo, en Asia se observaron cuadros severos de hepatitis en pacientes infectados con el genotipo 4, donde se detectó una elevada carga viral (Mizuo y cols., 2005). El genotipo 3 provocó fallo hepático, en 8 pacientes japoneses, en los que se demostró la transmisión zoonótica del virus. En este mismo estudio se obtuvo la secuencia completa del VHE y se identificaron cambios de aa en la helicasa, valina por alanina en la posición 239, lo que trajo como consecuencia un incremento en la virulencia, debido a una alta replicación y recombinación entre cepas divergentes (Takahashi y cols., 2009).

Finalmente el diagnóstico virológico, incluyendo las técnicas serológicas, moleculares y de cultivo, permitieron identificar las cepas autóctonas del VHE en Cuba en personas sin antecedentes de viajes al exterior. Se demuestra que además de los aislamientos asiáticos, los aislamientos cubanos del VHE pudieron ser cultivados en varias líneas celulares, lo que permitirá realizar estudios de caracterización biológica de las cepas circulantes en nuestro medio.

Según el Comité Internacional de Prevención de Hepatitis Virales, los estudios sobre el VHE demuestran claramente que este virus ocasiona una enfermedad emergente, pero aún se necesitan muchos esfuerzos para esclarecer totalmente las rutas de transmisión del mismo, así como identificar los reservorios del virus capaces de mantener este microorganismo en la comunidad (FitzSimons y cols., 2009).

VI. CONCLUSIONES

1. El VHE es endémico en Cuba y es causa de brotes, casos esporádicos, graves y fallecidos por fallo hepático fulminante asociados a HVA.
2. Los EIE que presenten en su fase sólida proteínas recombinantes del genotipo 1, poseen una elevada positividad en la población estudiada por lo que son útiles para realizar estudios serológicos en nuestro medio.
3. La presencia de Ig totales anti-VHE en personas sin antecedentes de HVA y de ARN del VHE en trabajadores de granjas porcinas sin manifestaciones clínicas, indica que las infecciones asintomáticas son comunes, constituyendo una fuente importante de contaminación para el resto de la comunidad.
4. Los individuos que trabajan en las granjas porcinas estudiadas constituyen un grupo de riesgo para la infección por el VHE, siendo la edad y el tiempo de trabajo los factores asociados con la exposición al virus.
5. La línea celular A549 es útil para aislar y propagar el VHE autóctono y las células LLC-MK2, HEp-2, MRC-5 y las FRhK4 pueden mantener la multiplicación viral, lo que permite la producción de antígenos virales y la evacuación de candidatos vacunales.
6. Los aislamientos del VHE en población abierta se agrupan filogenéticamente en el genotipo 1, identificándose por primera vez su circulación autóctona en América y los aislamientos de trabajadores de granjas porcinas se agrupan dentro del genotipo 3, por lo que más de un genotipo viral circula en nuestro medio.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios sero-epidemiológicos del VHE en población abierta y grupos de riesgo en otras provincias del país.
2. Profundizar en los estudios de sensibilidad de los EIE anti-VHE en población cubana, identificando los Ag dianas de los Ac.
3. Diseñar estudios que permitan identificar la transmisión zoonótica de la enfermedad en Cuba.
4. Buscar los nichos ecológicos del VHE con vistas a identificar los hospederos intermediarios que mantienen el virus en la comunidad.
5. Obtener la secuencia completa de los genotipos del VHE identificados en Cuba, con vistas a realizar estudios moleculares asociados con la virulencia de las cepas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe K, Li TC, Ding X, Win KM, Shrestha PK, Quang VX, et al. International collaborative survey on epidemiology of hepatitis E virus in 11 countries. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37:90-5.
2. Aboulata AA, Ahmad MS, Shaban MM, Zayd KM, Abd El-Moktader AM. Prevalence of hepatitis E virus in Egyptian children presented with minor hepatic disorders. *Egypt J Immunol* 2005;12:71-6.
3. Aggarwal R, Kini D, Sofat S, Naik SR, Krawczynski K. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet* 2000;356:1081-2.
4. Aggarwal R, Kumar R, Pal R, Naik S, Semwal SN, Naik SR. Role of travel as a risk factor for hepatitis E virus infection in a disease-endemic area. *Indian J Gastroenterol* 2002;21:14-8.
5. Aggarwal R, McCaustland KA, Dilawari JB, Sinha SD, Robertson BH. Genetic variability of hepatitis E virus within and between three epidemics in India. *Virus Res* 1999;59:35-48.
6. Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:1484-93.
7. Aggarwal R, Naik SR. Hepatitis E: does person-to-person spread occur? *Indian J Gastroenterol* 1992;11:109-12.
8. Aggarwal R, Naik SR. Epidemiology of hepatitis E: past, present and future. *Trop Gastroenterol* 1997;18:49-56.
9. Aggarwal R, Shukla R, Jameel S, Agrawal S, Puri P, Gupta VK, et al. T-cell epitope mapping of ORF2 and ORF3 proteins of human hepatitis E virus. *J Viral Hepat* 2007;14:283-92.
10. Agrawal S, Gupta D, Panda SK. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Virology* 2001;282:87-101.
11. Aguiar P. Comportamiento Epidemiológico de la Hepatitis A en Cuba. *Reporte Técnico Vigilancia* 2004;9:1-7.

12. Ahn JM, Kang SG, Lee DY, Shin SJ, Yoo HS. Identification of novel human hepatitis E virus (HEV) isolates and determination of the seroprevalence of HEV in Korea. *J Clin Microbiol* 2005;43:3042-8.
13. Aksu K, Kabasakal Y, Sayiner A, Keser G, Oksel F, Bilgic A, et al. Prevalences of hepatitis A, B, C and E viruses in Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:1279-81.
14. Alvarez-Muñoz MT, Torres J, Damasio L, Gomez A, Tapia-Conyer R, Munoz O. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in Mexican subjects 1 to 29 years of age. *Arch Med Res* 1999;30:251-4.
15. Amon JJ, Drobeniuc J, Bower WA, Magana JC, Escobedo MA, Williams IT, et al. Locally acquired hepatitis E virus infection, El Paso, Texas. *J Med Virol* 2006;78:741-6.
16. Anderson DA, Li F, Riddell M, Howard T, Seow HF, Torresi J, et al. ELISA for IgG-class antibody to hepatitis E virus based on a highly conserved, conformational epitope expressed in *Escherichia coli*. *J Virol Methods* 1999;81:131-42.
17. Arankalle VA, Chadha MS, Chitambar SD, Walimbe AM, Chobe LP, Gandhe SS. Changing epidemiology of hepatitis A and hepatitis E in urban and rural India (1982-98). *J Viral Hepat* 2001a;8:293-303.
18. Arankalle VA, Chobe LP, Chadha MS. Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. *J Viral Hepat* 2006;13:742-5.
19. Arankalle VA, Goverdhan MK, Banerjee K. Antibodies against hepatitis E virus in Old World monkeys. *J Viral Hepat* 1994;1:125-9.
20. Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM, Gandhe SS, Chobe LP, Rautmare SS, et al. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat* 2001b;8:223-7.
21. Arankalle VA, Lole KS, Deshmukh TM, Chobe LP, Gandhe SS. Evaluation of human (genotype 1) and swine (genotype 4)-ORF2-based ELISAs for anti-HEV IgM and IgG detection in an endemic country and search for type 4 human HEV infections. *J Viral Hepat* 2007;14:435-45.
22. Arankalle VA, Tsarev SA, Chadha MS, Alling DW, Emerson SU, Banerjee K, et al. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J Infect Dis* 1995;171:447-50.

23. Arora NK, Nanda SK, Gulati S, Ansari IH, Chawla MK, Gupta SD, et al. Acute viral hepatitis types E, A, and B singly and in combination in acute liver failure in children in north India. *J Med Virol* 1996;48:215-21.
24. Arús E. Clínica y terapia de las hepatitis virales. In: Padrón G. Bases moleculares para el diagnóstico de las hepatitis virales. 1er ed. La Habana, Elfos Scientiae Publisher; 1998.p. 43-77.
25. Asher LV, Innis BL, Shrestha MP, Ticehurst J, Baze WB. Virus-like particles in the liver of a patient with fulminant hepatitis and antibody to hepatitis E virus. *J Med Virol* 1990;31:229-33.
26. Assarehzadegan MA, Shakerinejad G, Amini A, Rezaee SA. Seroprevalence of hepatitis E virus in blood donors in Khuzestan Province, southwest Iran. *Int J Infect Dis* 2008;12:387-90.
27. American Type Culture Collection. Catalogue of cell line and hybridomas. 7^{ma} ed. Rockville. American Type Culture Collection; 1992.p. 48.
28. Aye TT, Uchida T, Ma X, Iida F, Shikata T, Ichikawa M, et al. Sequence and gene structure of the hepatitis E virus isolated from Myanmar. *Virus Genes* 1993;7:95-109.
29. Balayan MS. HEV infection: historical perspectives, global epidemiology, and clinical features. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis H. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins Publisher; 1991.p. 498-501.
30. Balayan MS. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 1997;4:155-65.
31. Balayan MS, Andzhaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for virus for non-A/non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirol* 1983;20:23-31.
32. Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol* 1990;32:58-9.
33. Balmaseda A, Más P, Ribas M, Rodríguez L, Delgado G. Estudio de brotes de hepatitis A ocurridos en Ciudad de La Habana en el año 1991. *Rev Cubana Med Trop* 1994;46:42-5.
34. Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol* 2010;82:799-805.

35. Beniwal M, Kumar A, Kar P, Jilani N, Sharma JB. Prevalence and severity of acute viral hepatitis and fulminant hepatitis during pregnancy: A prospective study from north india. *Indian J Med Microbiol* 2003;21:184-5.
36. Benjelloun S, Bahbouhi B, Bouchrit N, Cherkaoui L, Hda N, Mahjour J, et al. Seroepidemiological study of an acute hepatitis E outbreak in Morocco. *Res Virol* 1997;148:279-87.
37. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC Method for aspartate aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986a;24:497-508.
38. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC Method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986b;24:481-489.
39. Bhatia V, Singhal A, Panda SK, Acharya SK. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? *Hepatology* 2008;48:1577-85.
40. Bilic I, Jaskulska B, Basic A, Morrow CJ, Hess M. Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes. *J Gen Virol* 2009;90:863-73.
41. Billam P, Huang FF, Sun ZF, Pierson FW, Duncan RB, Elvinger F, et al. Systematic pathogenesis and replication of avian hepatitis E virus in specific-pathogen-free adult chickens. *J Virol* 2005;79:3429-37.
42. Bortoliero AL, Bonametti AM, Morimoto HK, Matsuo T, Reiche EM. 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;48:87-92.
43. Bouwknegt M, Engel B, Herremans MM, Widdowson MA, Worm HC, Koopmans MP, et al. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 2008;136:567-76.
44. Bradley DW. Hepatitis E virus: a brief review of the biology, molecular virology, and immunology of a novel virus. *J Hepatol* 1995;22:140-5.
45. Bradley DW, Andjaparidze AG, Cook EHJ, McCaustland KA, Balayan M, Steler H. Etiologic agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J Gen Virol* 1988;69:731-738.

46. Bryan JP, Tsarev SA, Iqbal M, Ticehurst J, Emerson S, Ahmed A, et al. Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. *J Infect Dis* 1994;170:517-21.
47. Buisson Y, Grandadam M, Nicand E, Cheval P, van Cuyck-Gandre H, Innis B, et al. Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria. *J Gen Virol* 2000;81:903-9.
48. Buisson Y, Van Cuyck-Gandre H, Deloince R. Water and viral hepatitis. *Bull Soc Pathol Exot* 1993;86:479-83.
49. Burton DR, Williamson A. Antibody and Virus: Binding and Neutralization. *Virology* 2000;270:1-3.
50. Buti M, Dominguez A, Plans P, Jardi R, Schaper M, Espunes J, et al. Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1328-32.
51. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis Surveillance. Report Number 57, September 2000;1-31.
52. Clayson ET, Innis BL, Myint KS, Narupiti S, Vaughn DW, Giri S, et al. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 1995a;53:228-32.
53. Clayson ET, Myint KS, Snitbhan R, Vaughn DW, Innis BL, Chan L, et al. Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis* 1995b;172:927-33.
54. Clayson ET, Vaughn DW, Innis BL, Shrestha MP, Pandey R, Malla DB. Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis at a military training camp in Nepal. *J Med Virol* 1998;54:178-82.
55. Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Quart J Med* 1912;6:1-28.
56. Cooper K, Huang FF, Batista L, Rayo CD, Bezanilla JC, Toth TE, et al. 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;43:1684-8.
57. Coursaget P, Buisson Y, Enogat N, Bercion R, Baudet JM, Delmaire P, et al. Outbreak of enterically-transmitted hepatitis due to hepatitis A and hepatitis E viruses. *J Hepatol* 1998;28:745-50.
58. Cowie BC, Adamopoulos J, Carter K, Kelly H. Hepatitis E infections, Victoria, Australia. *Emerg Infect Dis* 2005a;11:482-4.

59. Cowie BC, Breschkin A, Kelly H. Hepatitis E virus: overseas epidemics and Victorian travellers. *Med J Aust* 2005b;183:491.
60. Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* 2008;33:451-64.
61. Chatterjee R, Tsarev S, Pillot J, Coursaget P, Emerson SU, Purcell RH. African strains of hepatitis E virus that are distinct from Asian strains. *J Med Virol* 1997;53:139-44.
62. Chau KH, Dawson GJ, Bile KM, Magnius LO, Sjogren MH, Mushahwar IK. Detection of IgA class antibody to hepatitis E virus in serum samples from patients with hepatitis E virus infection. *J Med Virol* 1993;40:334-8.
63. Chauhan A, Dilawari JB, Jameel S, Kaur U, Chawla YK, Sharma ML, et al. Common aetiological agent for epidemic and sporadic non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1992;339:1509-10.
64. Chauhan A, Jameel S, Dilawari JB, Chawla YK, Kaur U, Ganguly NK. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 1993;341:149-50.
65. Chen HY, Lu Y, Howard T, Anderson D, Fong PY, Hu WP, et al. 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* 2005a;12:593-8.
66. Chen S, Lu D, Zhang M, Che Z, Yin Z, Zhang S, et al. Doble-antigen sandwich ELISA for detection of antibodies to SARS-associated coronavirus in human serum. *Eur J Clin Microb Infect Dis*. 2005b;24:549-553.
67. Chen Y, Tian DY, Xia NS. Epidemiology and genotypes of HEV in Wuhan. *Chin J Dig Dis* 2005c;6:182-8.
68. Chobe LP, Chadha MS, Banerjee K, Arankalle VA. Detection of HEV RNA in faeces, by RT-PCR during the epidemics of hepatitis E in India (1976-1995). *J Viral Hepat* 1997;4:129-33.
69. Choi IS, Kwon HJ, Shin NR, Yoo HS. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea. *J Clin Microbiol* 2003;41:3602-8.
70. Chow WC, Lee AS, Lim GK, Cheong WK, Chong R, Tan CK, et al. Acute viral hepatitis E: clinical and serologic studies in Singapore. *J Clin Gastroenterol* 1997;24:235-8.
71. Chow WC, Ng HS, Lim GK, Oon CJ. Hepatitis E in Singapore--a seroprevalence study. *Singapore Med J* 1996;37:579-81.

72. Dawson GJ, Chau KH, Cabal CM, Yarbough PO, Reyes GR, Mushahwar IK. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J Virol Methods* 1992;38:175-86.
73. de Deus N, Peralta B, Pina S, Allepuz A, Mateu E, Vidal D, et al. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol* 2007;
74. De León R, Matsui SM, Baric RS, Herrmann JE, Blacklow NR, Greenberg HB, et al. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* 1992;30:3151-7.
75. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A, et al. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 2001;184:1594-7.
76. Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Hirashima N, Sugiyama M, Khan A, et al. Evaluation of anti-hepatitis E virus (HEV) immunoglobulin A in a serological screening for HEV infection. *J Gastroenterol* 2007;42:911-7.
77. Emerson S, Purcell R. Hepatitis E Virus. In: Knipe D, Howley D, et al, eds. *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins Publisher; 2007.p.3048-60.
78. Emerson S, Purcell RH. Running like water--the omnipresence of hepatitis E. *N Engl J Med* 2004a;351:2367-8.
79. Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 2005;192:930-3.
80. Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 2003;13:145-54.
81. Emerson SU, Purcell RH. Running like water--the omnipresence of hepatitis E. *N Engl J Med* 2004b;351:2367-8.
82. Enouf V, Dos Reis G, Guthmann JP, Guerin PJ, Caron M, Marechal V, et al. 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;78:1076-82.
83. Erker JC, Desai SM, Schlauder GG, Dawson GJ, Mushahwar IK. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol* 1999;80 (Pt 3):681-90.

84. Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, Yashina TL, Aleksandrov AG, Alter MJ, et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol* 1992;36:246-50.
85. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783-791.
86. FitzSimons D, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 2009;28:583-8.
87. Fix AD, Abdel-Hamid M, Purcell RH, Shehata MH, Abdel-Aziz F, Mikhail N, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E in two rural Egyptian communities. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:519-23.
88. Fukuda S, Ishikawa M, Ochiai N, Suzuki Y, Sunaga J, Shinohara N, et al. 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;152:1623-35.
89. Fukuda S, Sunaga J, Saito N, Fujimura K, Itoh Y, Sasaki M, et al. 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;73:554-61.
90. Galiana C, Fernandez-Barredo S, Garcia A, Gomez MT, Perez-Gracia MT. Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:1012-5.
91. Gambel JM, Drabick JJ, Seriwatana J, Innis BL. Seroprevalence of hepatitis E virus among United Nations Mission in Haiti (UNMIH) peacekeepers, 1995. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:731-6.
92. Gandolfo GM, Ferri GM, Conti L, Antenucci A, Marrone R, Frasca AM, et al. Prevalence of infections by hepatitis A, B, C and E viruses in two different socioeconomic groups of children from Santa Cruz, Bolivia. *Med Clin (Barc)* 2003;120:725-7.
93. Gao DY, Peng G, Zhu JM, Sun L, Zheng YJ, Zhang J. Investigation of sub-clinical infection of hepatitis E virus in blood donors. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:11-2.
94. Garkavenko O, Obriadina A, Meng J, Anderson DA, Benard HJ, Schroeder BA, et al. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* 2001;65:525-9.

95. Ghabrah TM, Tsarev S, Yarbough PO, Emerson SU, Strickland GT, Purcell RH. Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *J Med Virol* 1998;55:134-7.
96. Goldsmith R, Yarbough PO, Reyes GR, Fry KE, Gabor KA, Kamel M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children. *Lancet* 1992;339:328-31.
97. Goto K, Ito K, Sugiura T, Ando T, Mizutani F, Miyake Y, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in Japanese children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:89-92.
98. Grandadam M, Tebbal S, Caron M, Siriwardana M, Larouze B, Koeck JL, et al. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol* 2004;85:3189-94.
99. Guthmann JP, Klovstad H, Boccia D, Hamid N, Pinoges L, Nizou JY, et al. A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin Infect Dis* 2006;42:1685-91.
100. Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, Benne CA, Vennema H, Reimerink JH, et al. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2008;14:547-53.
101. Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ. 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;82:2449-62.
102. Harrison TJ. Hepatitis E virus -- an update. *Liver* 1999;19:171-6.
103. He J, Hayes CG, Binn LN, Seriwatana J, Vaughn DW, Kuschner RA, et al. Hepatitis E virus DNA vaccine elicits immunologic memory in mice. *J Biomed Sci* 2001;8:223-6.
104. He J, Hoffman SL, Hayes CG. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structural protein gene induces immune response in mice. *Vaccine* 1997;15:357-62.
105. He J, Tam AW, Yarbough PO, Reyes GR, Carl M. Expression and diagnostic utility of hepatitis E virus putative structural proteins expressed in insect cells. *J Clin Microbiol* 1993;31:2167-73.
106. Heins M, Heil H, Withold W. Storage of Serum or Whole Blood Samples? Effect of Time and Temperature on 22 Serum Analytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995;33:231-238.

107. Herremans M, Bakker J, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:562-8.
108. Herrera JL. Hepatitis E as a cause of acute non-A, non-B hepatitis. *Arch Intern Med* 1993;153:773-5.
109. Hu WP, Lu Y, Precioso NA, Chen HY, Howard T, Anderson D, et al. Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis E virus-specific antibodies in human or swine sera. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1151-7.
110. Huang CC, Nguyen D, Fernandez J, Yun KY, Fry KE, Bradley DW, et al. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 1992a;191:550-8.
111. Huang FF, Sun ZF, Emerson SU, Purcell RH, Shivaprasad HL, Pierson FW, et al. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol* 2004;85:1609-18.
112. Huang R, Li D, Li Q. Gene analysis of acute sporadic HEV in the southern areas of China. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 1999a;7:151-2.
113. Huang R, Li D, Wei S, Li Q, Yuan X, Geng L, et al. Cell culture of sporadic hepatitis E virus in China. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999b;6:729-33.
114. Huang R, Nakazono N, Ishii K, Kawamata O, Kawaguchi R, Tsukada Y. Existing variations on the gene structure of hepatitis E virus strains from some regions of China. *J Med Virol* 1995a;47:303-8.
115. Huang R, Nakazono N, Ishii K, Li D, Kawamata O, Kawaguchi R, et al. Hepatitis E virus (87A strain) propagated in A549 cells. *J Med Virol* 1995b;47:299-302.
116. Huang RT, Li DR, Wei J, Huang XR, Yuan XT, Tian X. Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China. *J Gen Virol* 1992b;73 (Pt 5):1143-8.
117. Hussaini SH, Skidmore SJ, Richardson P, Sherratt LM, Cooper BT, O'Grady JG. Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J Viral Hepat* 1997;4:51-4.
118. Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev Mol Med* 1999;1999:1-16.

119. Jameel S, Zafrullah M, Chawla YK, Dilawari JB. Reevaluation of a North India isolate of hepatitis E virus based on the full-length genomic sequence obtained following long RT-PCR. *Virus Res* 2002;86:53-8.
120. Jayanthi V, Udayakumar N. Acute liver failure in pregnancy: an overview. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2008;54:75-84.
121. Jiménez L, Montes N, Albizu-Campó J. Social demographic indicators and territorial identity in Havana City. *Rev Novedades Población* 2002;1:1817-1820.
122. Johne R, Plenge-Bonig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* 2010;91:750-8.
123. Jothikumar N, Aparna K, Kamatchiammal S, Paulmurugan R, Saravanadevi S, Khanna P. Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:2558-62.
124. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 2006;131:65-71.
125. Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol* 1999;73:8848-50.
126. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008;358:811-7.
127. Kaur M, Hyams KC, Purdy MA, Krawczynski K, Ching WM, Fry KE, et al. Human linear B-cell epitopes encoded by the hepatitis E virus include determinants in the RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3855-8.
128. Kazachkov YA, Balayan MS, Ivannikova TA, Panina LI, Orlova TM, Zamyatina NA, et al. Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol* 1992;127:399-402.
129. Kazachkov YA, Balayan MS, Ivannikova TA, Panina LI, Orlova TM, Zamyatina NA, et al. Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol* 1992;127:399-402.
130. Khudyakov YE, Khudyakova NS, Fields HA, Jue D, Starling C, Favorov MO, et al. Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology* 1993;194:89-96.

131. Khudyakov YE, Lopareva EN, Jue DL, Crews TK, Thyagarajan SP, Fields HA. Antigenic domains of the open reading frame 2-encoded protein of hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 1999;37:2863-71.
132. Khudyakov YE, Favorov MO, Jue DL, Hine TK, Fields HA. Immunodominant antigenic regions in a structural protein of the hepatitis E virus. *Virology* 1994a;198:390-3.
133. Khudyakov YE, Khudyakova NS, Jue DL, Wells TW, Padhya N, Fields HA. Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in Burmese and Mexican strains of hepatitis E virus. *J Gen Virol* 1994b;75:641-6.
134. Khuroo MS. Hepatitis E: the enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Indian J Gastroenterol* 1991;10:96-100.
135. Khuroo MS. Hepatitis E virus. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:539-43.
136. Khuroo MS, Kamili S, Dar MY, Moeckli R, Jameel S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet* 1993;341:1355.
137. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 1995;345:1025-6.
138. Khuroo MS, Rustgi VK, Dawson GJ, Mushahwar IK, Yattoo GN, Kamili S, et al. Spectrum of hepatitis E virus infection in India. *J Med Virol* 1994;43:281-6.
139. Khuroo SM. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 1980;68:818-824..
140. Kim SE, Kim MY, Kim DG, Song YJ, Jeong HJ, Lee SW, et al. Determination of fecal shedding rates and genotypes of swine hepatitis E virus (HEV) in Korea. *J Vet Med Sci* 2008;70 1367-1371.
141. Klauke R, Schmidt E, Lorentz K. Recommendations for carrying out standard ECCLS procedures (1988) for the the catalytic concentrations of creatine kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and Y-glutamyltransferase at 37 °C. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993;31:901-909.
142. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. 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;89:8259-63.
143. Krawczynski K. Hepatitis E. *Hepatology* 1993;17:932-41.

144. Krawczynski K. Hepatitis E vaccine--ready for prime time? *N Engl J Med* 2007;356:949-51.
145. Krawczynski K, Bradley DW. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J Infect Dis* 1989;159:1042-1049.
146. Kumagai M, Nishii Y, Koizumi Y, Akahane Y. Domestic infection of hepatitis E in Japan. *Intern Med* 2004;43:807-10.
147. Kumar A, Yachha SK, Poddar U, Singh U, Aggarwal R. Does co-infection with multiple viruses adversely influence the course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in children? *J Gastroenterol Hepatol* 2006a;21:1533-7.
148. Kumar RM, Uduman S, Rana S, Kochiyil JK, Usmani A, 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;100:9-15.
149. Kumar S, Ratho RK, Chawla YK, Chakraborti A. Virological investigation of a hepatitis E epidemic in North India. *Singapore Med J* 2006b;47:769-73.
150. Kumar S, Ratho RK, Chawla YK, Chakraborti A. The incidence of sporadic viral hepatitis in North India: a preliminary study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007;6:596-9.
151. Kwok S, Higuchi R. Avoid false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-238.
152. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chena R, McGettigan PA, MacWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X versions 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947-2948.
153. Le GY, Wu J, Ma YB, Du RJ, Zhuang JY, Xie TH, et al. Propagation of hepatitis E virus in several cell lines including human embryo lung diploid cell KMB17. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2001;23:590-3.
154. Lemos G, Jameel S, Panda S, Rivera L, Rodriguez L, Gavilondo JV. Hepatitis E virus in Cuba. *J Clin Virol* 2000;16:71-5.
155. Li F, Riddell MA, Seow HF, Takeda N, Miyamura T, Anderson DA. Recombinant subunit ORF2.1 antigen and induction of antibody against immunodominant epitopes in the hepatitis E virus capsid protein. *J Med Virol* 2000;60:379-86.
156. Li F, Torresi J, Locarnini SA, Zhuang H, Zhu W, Guo X, et al. Amino-terminal epitopes are exposed when full-length open reading frame 2 of hepatitis E

virus is expressed in *Escherichia coli*, but carboxy-terminal epitopes are masked. *J Med Virol* 1997a;52:289-300.

157. Li L, Zhou Y, Wang Z. A study on familial aggregation of hepatitis virus infection in Fujian province. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1997b;31:362-4.

158. Li RC, Ge SX, Li YP, Zheng YJ, Nong Y, Guo QS, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus infection, rural southern People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 2006a;12:1682-8.

159. Li T, Takeda N, Miyamura T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 2001;19:3476-84.

160. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1958-60.

161. Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N. Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am J Trop Med Hyg* 2006b;74:932-6.

162. Lin DB, Lin JB, Chen SC, Yang CC, Chen WK, Chen CJ. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection among preschool children in Taiwan. *J Med Virol* 2004;74:414-8.

163. Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol* 2010;47:276-9.

164. Lu J, Zhao H, Mong Q. [Detection of anti-HAV IgM and anti-HEV IgM in patients with sporadic acute hepatitis in Beijing between 1995-2000]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2001;15:157-9.

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

166. Ma H, Song X, Li Z, Harrison TJ, Zhang H, Huang W, et al. Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J Med Virol* 2009;81:1052-61.

167. Magden J, Takeda N, Li T, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, et al. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J Virol* 2001;75:6249-55.

168. Mahtab MA, Rahman S, Khan M, Mamun AA, Afroz S. Etiology of fulminant hepatic failure: experience from a tertiary hospital in Bangladesh. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7:161-4.
169. Maila HT, Bowyer SM, Swanepoel R. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *J Gen Virol* 2004;85:89-95.
170. Maneerat Y, Clayson ET, Myint KS, Young GD, Innis BL. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol* 1996;48:121-8.
171. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 1998;27:857-61.
172. Mateos Lindemann ML, Morales JG, Fernandez-Barredo S, Dominguez MR, Garcia de la Hoz F, Halfon P, et al. Fulminant hepatitis E in a woman taking oral contraceptive medication. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:12-5.
173. Mathur P, Arora NK, Panda SK, Kapoor SK, Jaikhanani BL, Irshad M. Sero-epidemiology of hepatitis E virus (HEV) in urban and rural children of North India. *Indian Pediatr* 2001;38:461-75.
174. Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, et al. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 2008;48:1368-75.
175. Mayo MA. Changes to virus taxonomy 2004. . *Arch Virol* 2005; 150 189-198.
176. Melenhorst WB, Gu YL, Jaspers WJ, Verhage AH. Locally acquired hepatitis E in the Netherlands: associated with the consumption of raw pig meat? *Scand J Infect Dis* 2007;39:454-6.
177. Melnick J. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enterovirus. In: Fields B, Knipe D, Howley P, et al, eds.. *Fields Virology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Raven Publisher; 1996.p. 655-712.
178. Meng J, Dai X, Chang JC, Lopareva E, Pillot J, Fields HA, et al. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 2001;288:203-11.
179. Meng J, Dubreuil P, Pillot J. A new PCR-based seroneutralization assay in cell culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol* 1997a;35:1373-7.
180. Meng J, Pillot J, Dai X, Fields HA, Khudyakov YE. Neutralization of different geographic strains of the hepatitis E virus with anti-hepatitis E virus-

- positive serum samples obtained from different sources. *Virology* 1998a;249:316-24.
181. Meng XJ. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol* 2000;33:842-5.
182. Meng XJ. Recent advances in Hepatitis E virus. *J Viral Hepat* 2009b;17:153-61.
183. Meng XJ. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 2010;140:4:256-65.
184. Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, et al. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol* 1998b;143:1405-15.
185. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, et al. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 1998c;72:9714-21.
186. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997b;94:9860-5.
187. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, et al. 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;40:117-22.
188. Minuk GY, Sun A, Sun DF, Uhanova J, Nicolle LE, Larke B, et al. Serological evidence of hepatitis E virus infection in an indigenous North American population. *Can J Gastroenterol* 2007;21:439-42.
189. Mitsui T, Tsukamoto Y, Suzuki S, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, et al. Serological and molecular studies on subclinical hepatitis E virus infection using periodic serum samples obtained from healthy individuals. *J Med Virol* 2005;76:526-33.
190. Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, Takahashi M, et al. 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;74:563-72.
191. Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, et al. 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;76:341-9.

192. Morán MC, Aceves D, Peña PM, Gallegos MP, Flores SE, Montoya H, et al. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2000;7:389-394.
193. Munne M. Epidemiología molecular del virus de hepatitis E. *Actualizaciones en Hepatol* 2010;2:1-6.
194. Munne MS, Vladimirsky S, Otegui L, Brajterman L, Castro R, Soto S, et al. Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2006;36:125-30.
195. Mushahwar IK, Dawson GJ, Bile KM, Magnus LO. Serological studies of an enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Somalia. *J Med Virol* 1993;40:218-21.
196. Myint KS, Endy TP, Shrestha MP, Shrestha SK, Vaughn DW, Innis BL, et al. Hepatitis E antibody kinetics in Nepalese patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100:938-41.
197. Naik SR, Aggarwal R, Salunke PN, Mehrotra NN. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull World Health Organ* 1992;70:597-604.
198. Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, et al. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* 2006;34:137-40.
199. Nanda SK, Ansari IH, Acharya SK, Jameel S, Panda SK. Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 1995;108:225-30.
200. Nanda SK, Panda SK, Durgapal H, 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;42:237-40.
201. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int* 2008;28:1190-9.
202. Nicand E, Armstrong GL, Enouf V, Guthmann JP, Guerin JP, Caron M, et al. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus in Darfur, Sudan, and neighboring Chad. *J Med Virol* 2005;77:519-21.
203. Nishizawa T, Takahashi M, Mizuo H, Miyajima H, Gotanda Y, 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;84:1245-51.
204. Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 2007;127:216-28.
205. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Usui R, Kobayashi E. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection* 2004;32:57-8.
206. Olsen B, Axelsson-Olsson D, Thelin A, Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis* 2006;38:55-8.
207. Pal R, Aggarwal R, Naik SR, Das V, Das S, Naik S. Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1094-101.
208. Panda SK. Hepatitis E virus: recent advances. *Trop Gastroenterol* 2000;21:47.
209. Panda SK, Nanda SK, Zafrullah M, Ansari IH, Ozdener MH, Jameel S. An Indian strain of hepatitis E virus (HEV): cloning, sequence, and expression of structural region and antibody responses in sera from individuals from an area of high-level HEV endemicity. *J Clin Microbiol* 1995;33:2653-9.
210. Panda SK, Thakral D, Rehman S. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 2007;17:151-80.
211. Pérez-Gracia MT, Garcia-Valdivia MS, Galan F, Rodríguez-Iglesias MA. Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol* 2004;48:197-200.
212. Pérez-Gracia MT, Mateos ML, Galiana C, Fernandez-Barredo S, Garcia A, Gomez MT, et al. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:893-6.
213. Pérez-Gracia MT, Rodríguez-Iglesias M. Hepatitis E virus: current status. *Med Clin (Barc)* 2003;121:787-92.
214. Perez OM, Morales W, Paniagua M, Strannegard O. Prevalence of antibodies to hepatitis A, B, C, and E viruses in a healthy population in Leon, Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:17-21.
215. Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 2000;33:826-33.

216. Pischke S, Potthoff A, Hauröder B, Schlue J, Manns MP, Cornberg M, et al. Hepatitis E virus infection: a paradigm shift?. *Dtsch Med Wochenschr* 2010;135:1129-33.
217. Poddar U, Thapa BR, Prasad A, Singh K. Changing spectrum of sporadic acute viral hepatitis in Indian children. *J Trop Pediatr* 2002;48:210-3.
218. Pujol FH, Favorov MO, Marcano T, Este JA, Magris M, Liprandi F, et al. Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. *J Med Virol* 1994;42:234-6.
219. Purcell R, Emerson S. Hidden Danger: The Raw Facts about Hepatitis E Virus. *J Infect Dis* 2010;202:819-821.
220. Purcell RH, Emerson SU. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J* 2001;42:161-77.
221. Purcell RH, Ticehurst JR. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Epidemiology and clinical characteristics. In: Zuckerman A. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. 1st ed. New York: Alan R Liss Publisher; 1988.p. 131-137.
222. Purdy MA, McCaustland KA, Krawczynski K, Spelbring J, Reyes GR, Bradley DW. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol* 1993;41:90-4.
223. Radha Krishna Y, Saraswat VA, Das K, Himanshu G, Yachha SK, Aggarwal R, et al. Clinical features and predictors of outcome in acute hepatitis A and hepatitis E virus hepatitis on cirrhosis. *Liver Int* 2009;29:392-8.
224. Ramalingaswami V, Purcell RH. Waterborne non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988;i:571-573.
225. Rapicetta M, Kondili LA, Pretolani S, Stroffolini T, Chionne P, Villano U, et al. Seroprevalence and anti-HEV persistence in the general population of the Republic of San Marino. *J Med Virol* 1999;58:49-53.
226. Ray R, Aggarwal R, Salunke PN, Mehrotra NN, Talwar GP, Naik SR. Hepatitis E virus genome in stools of hepatitis patients during large epidemic in north India. *Lancet* 1991;338:783-4.
227. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990;247:1335-9.

228. Reyes GR, Yarbough PO, Tam AW, Purdy MA, Huang CC, Kim JS, et al. Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 1991;26 Suppl 3:142-7.
229. Robinson RA, Burgess WH, Emerson SU, Leibowitz RS, Sosnovtseva SA, Tsarev S, et al. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* 1998;12:75-84.
230. Rodríguez-Iglesias M, Pérez-Gracia MT. Nuevos conceptos sobre el virus de la hepatitis E y su importancia creciente en los países desarrollados. *Enf Emerg* 2003;5:105-112.
231. Rodríguez L, Mas P, Balmaseda A, Comellas M, Delgado G, Palomera R. Desarrollo y evaluación de un ELISA de detección de anticuerpos de la clase IgM contra el virus de la hepatitis A. *Rev Cubana Med Trop* 1994;46:86-89.
232. Ruan B, Zhuang H, Ma Y. Dynamics of anti-HEV ORF2, ORF3, IgM and IgG in serial sera of patients with hepatitis E and their clinical significance. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1998;78:498-500.
233. Saeed AA, al-Rasheed A, Olewicz G, Yarbough PO. ELISA for diagnosis of acute sporadic hepatitis E. *Lancet* 1992;339:882.
234. Samanta T, Ganguly S. Aetiology, clinical profile and prognostic indicators for children with acute liver failure admitted in a teaching hospital in Kolkata. *Trop Gastroenterol* 2007;28:135-9.
235. Sambrook J, Fritschand EFT, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
236. Santos DC, Souto FJ, Santos DR, Vitral CL, Gaspar AM. Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living in a community located in the North Area of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:637-40.
237. Sarguna P, Rao A, Sudha Ramana KN. Outbreak of acute viral hepatitis due to hepatitis E virus in Hyderabad. *Indian J Med Microbiol* 2007;25:378-82.
238. Scott RM, Pandey P, Shlim DR, Khin Saw Aye M. Etiology of enterically-transmitted hepatitis among foreigners in Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009;40:731-7.
239. Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, Kwo PY, Knigge MF, Smalley DL, et al. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 1998;79:447-56.

240. Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* 1999;57:243-51.
241. Schlauder GG, Frider B, Sookoian S, Castano GC, Mushahwar IK. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J Infect Dis* 2000;182:294-7.
242. Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, Purcell RH. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol* 2000;74:5548-55.
243. Schofield DJ, Purcell RH, Nguyen HT, Emerson SU. Monoclonal antibodies that neutralize HEV recognize an antigenic site at the carboxyterminus of an ORF2 protein vaccine. *Vaccine* 2003;22:257-67.
244. Seow HF, Mahomed NM, Mak JW, Riddell MA, Li F, Anderson DA. Seroprevalence of antibodies to hepatitis E virus in the normal blood donor population and two aboriginal communities in Malaysia. *J Med Virol* 1999;59:164-8.
245. Sergeev NW, Paktor EA, Ananov VA, Antinova A, Semenov EP. General characteristics of disease occurring in Kirgiz Republic of USSR in 1955-56. *Soviet Healthcare Kirgizii* 1957;15:16-23.
246. Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP, Jr., Thapa GB, Thapa N, et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 2007;356:895-903.
247. Shrestha S, Misra RP. An epidemic of hepatitis E in Nepal: Clinical and epidemiological study. *J Inst Med* 1990;12:195-204.
248. Smith JL. A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* 2001;64:572-86.
249. Song YJ, Jeong HJ, Kim YJ, Lee SW, Lee JB, Park SY, et al. Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J Med Virol* 2010;82:583-91.
250. Srivastava R, Aggarwal R, Jameel S, Puri P, Gupta VK, Ramesh VS, et al. Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral Immunol* 2007;20:56-65.
251. Stoszek SK, Abdel-Hamid M, Saleh DA, El Kafrawy S, Narooz S, Hawash Y, et al. High prevalence of hepatitis E antibodies in pregnant Egyptian women. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006a;100:95-101.

252. Stoszek SK, Engle RE, Abdel-Hamid M, Mikhail N, Abdel-Aziz F, Medhat A, et al. Hepatitis E antibody seroconversion without disease in highly endemic rural Egyptian communities. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006b;100:89-94.
253. Strugnell RA, Wijburg LC. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:656-667.
254. Takahashi K, Okamoto H, Abe N, Kawakami M, Matsuda H, Mochida S, et al. Virulent strain of hepatitis E virus genotype 3, Japan. *Emerg Infect Dis* 2009;15:704-9.
255. Takahashi M, Nishizawa T, Tanaka T, Tsatsralt-Od B, Inoue J, Okamoto H. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J Gen Virol* 2005;86:1807-13.
256. Takahashi M, Tamura K, Hoshino Y, Nagashima S, Yazaki Y, Mizuo H, et al. A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan. *J Med Virol* 2010;82:271-81.
257. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185:120-31.
258. Tam AW, White R, Reed E, Short M, Zhang Y, Fuerst TR, et al. In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 1996;215:1-9.
259. Tam AW, White R, Yarbough PO, Murphy BJ, McAtee CP, Lanford RE, et al. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 1997;238:94-102.
260. Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, et al. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res* 2007a;37:113-20.
261. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007b; 24:1596-1599.
262. Taremi M, Gachkar L, MahmoudArabi S, Kheradpezhoh M, Khoshbaten M. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among male blood donors in Tabriz, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2007;13:98-102.
263. Teo CG. The two clinico-epidemiological forms of hepatitis E. *J Viral Hepat* 2007;14:295-7.

264. Teo CG. Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:24-32.
265. Tian DY, Chen Y, Xia NS. Significance of serum IgA in patients with acute hepatitis E virus infection. *World J Gastroenterol* 2006;12:3919-23.
266. Ticehurst J, Popkin TJ, Bryan JP, Innis BL, Duncan JF, Ahmed A, et al. Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis in Pakistan: serologic responses and pattern of virus excretion. *J Med Virol* 1992a;36:84-92.
267. Ticehurst J, Rhodes LL, Jr., Krawczynski K, Asher LV, Engler WF, Mensing TL, et al. Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *J Infect Dis* 1992b;165:835-45.
268. Ticehurst JR. Identification and Characterization of Hepatitis E Virus. In: Hollinger BF, Lemon SM, Margolis AS. *Viral Hepatitis and Liver Diseases*. 1st ed. Baltimore, Williams and Wilkins Publisher; 1991.p. 501-513.
269. Toole MJ, Claridge F, Anderson DA, Zhuang H, Morgan C, Otto B, et al. Hepatitis E virus infection as a marker for contaminated community drinking water sources in Tibetan villages. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:250-4.
270. Toyoda H, Honda T, Hayashi K, Katano Y, Goto H, Kumada T, et al. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibody in Japanese patients with hemophilia. *Intervirology* 2008a;51:21-5.
271. Toyoda H, Honda T, Hayashi K, Katano Y, Goto H, Kumada T, et al. Prevalence of Hepatitis E Virus IgG Antibody in Japanese Patients with Hemophilia. *Intervirology* 2008b;51:21-25.
272. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Govindarajan S, Shapiro M, Gerin JL, et al. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10198-202.
273. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Govindarajan S, Shapiro M, Gerin JL, et al. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine* 1997;15:1834-8.
274. Tsega E, Hansson BG, Krawczynski K, Nordenfelt E. Acute sporadic viral hepatitis in Ethiopia: causes, risk factors, and effects on pregnancy. *Clin Infect Dis* 1992;14:961-5.
275. van Cuyck H, Fan J, Robertson DL, Roques P. Evidence of recombination between divergent hepatitis E viruses. *J Virol* 2005;79:9306-14.

276. van Cuyck H, Juge F, Roques P. Phylogenetic analysis of the first complete hepatitis E virus (HEV) genome from Africa. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;39:133-9.
277. van der Poel WH, Verschoor F, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M, et al. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2001;7:970-6.
278. Vasickova P, Psikal I, Widen F, Smitalova R, Bendova J, Pavlik I, et al. Detection and genetic characterisation of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. *Res Vet Sci* 2009;87:143-8.
279. Velázquez O, Stetler HC, Avila C, Ornelas G, Alvarez C, Hadler SC, et al. Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA* 1990;263:3281-85.
280. Vildosola H, Colichon A, Barreda M, Piscoya J, Palacios O. Hepatitis E IgG antibodies seroprevalence in a Peruvian risk group. *Rev Gastroenterol Peru* 2000;20:111-116.
281. Vivek R, Chandy GM, Brown DW, Kang G. Seroprevalence of IgG antibodies to hepatitis E in urban and rural southern India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;
282. Wang H, Zhang W, Ni B, Shen H, Song Y, Wang X, et al. Recombination analysis reveals a double recombination event in hepatitis E virus. *Virology* 2010;7:129.
283. Wang Y, Levine DF, Bendall RP, Teo CG, Harrison TJ. Partial sequence analysis of indigenous hepatitis E virus isolated in the United Kingdom. *J Med Virol* 2001a;65:706-9.
284. Wang Y, Zhang H, Li Z, Gu W, Lan H, Hao W, et al. Detection of sporadic cases of hepatitis E virus (HEV) infection in China using immunoassays based on recombinant open reading frame 2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4. *J Clin Microbiol* 2001b;39:4370-9.
285. Wang Y, Zhang H, Ling R, Li H, Harrison TJ. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *J Gen Virol* 2000;81:1675-86.
286. Wang YC, Zhang HY, Xia NS, Peng G, Lan HY, Zhuang H, et al. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol* 2002;67:516-21.

287. Ward P, Muller P, Letellier A, Quessy S, Simard C, Trottier YL, et al. Molecular characterization of hepatitis E virus detected in swine farms in the province of Quebec. *Can J Vet Res* 2008;72:27-31.
288. Wibawa ID, Muljono DH, Mulyanto, Suryadarma IG, Tsuda F, Takahashi M, et al. 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;73:38-44.
289. Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 2001;39:3040-6.
290. Withers MR, Correa MT, Morrow M, Stebbins ME, Seriwatana J, Webster WD, et al. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:384-8.
291. Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: Evidence for non-A/non-B hepatitis virus etiology. *Lancet* 1980;2:876-878.
292. Worm HC, Schlauder GG, Wurzer H, Mushahwar IK. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. *J Gen Virol* 2000;81:2885-90.
293. Worm HC, van der Poel WH, Brandstatter G. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect* 2002;4:657-66.
294. Wu KT, Chung KM, Feng IC, Sheu MJ, Kuo HT, Koay LB, et al. Acute hepatitis E virus infection in Taiwan 2002-2006 revisited: PCR shows frequent co-infection with multiple hepatitis viruses. *J Med Virol* 2009;81:1734-42.
295. Wu T, Lang J. Study progress on hepatitis E. *Zhongguo Ji Hua Mian Yi* 2009;15:375-8.
296. Yan YS, Wang HR, Wang LL, Chen L, Xiao JX, He S, et al. A sero-epidemiology study on hepatitis E virus infection in Fujian province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2007;28:105-8.
297. Yang LM, Zhao L-Z, Hu RH, Shi SZ, Liu WJ. A Novel Double-Antigen Sandwich Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for Measurement of Antibodies against Rabies Virus. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:966-968.
298. Yarbough PO, Tam AW, Fry KE, Krawczynski K, McCaustland KA, Bradley DW, et al. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *J Virol* 1991;65:5790-7.

299. Yin S, Purcell RH, Emerson SU. A new Chinese isolate of hepatitis E virus: comparison with strains recovered from different geographical regions. *Virus Genes* 1994;9:23-32.
300. Yoo D, Giulivi A. Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can J Vet Res* 2000;64:193-203.
301. Yu C, Engle RE, Bryan JP, Emerson SU, Purcell RH. Detection of immunoglobulin M antibodies to hepatitis E virus by class capture enzyme immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:579-86.
302. Yuan LA, Huan Z, Fan J, Guo R, Luo B, Zheng Q, et al. Novel double-antigen sandwich immunoassay for human hepatitis B core antibody. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:464-469.
303. Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, Panda SK, Jameel S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol* 1999;73:4074-82.
304. Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol* 1997;71:9045-53.
305. Zaki Mel S, Salama OS, Mansour FA, Hossein S. Hepatitis E virus coinfection with hepatotropic viruses in Egyptian children. *J Microbiol Immunol Infect* 2008;41:254-8.
306. Zhai L, Dai X, Meng J. Hepatitis E virus genotyping based on full-length genome and partial genomic regions. *Virus Res* 2006;120:57-69.
307. Zhang L, Han F, Wu D, Zhang D, Feng GH. [Analysis of the clinical features of and responsive factors on the prognosis in patients with fulminant hepatic failure]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2010;18:614-7.
308. Zhao ZY, Ruan B, Shao H, Chen ZJ, Liu SL. Detection of hepatitis E virus RNA in sera of patients with hepatitis E by polymerase chain reaction. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007;6:38-42.
309. Zheng Y, Ge S, Zhang J, Guo Q, Ng MH, Wang F, et al. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *J Infect Dis* 2006;193:1643-9.
310. Zhou YH, Purcell RH, Emerson SU. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine* 2004;22:2578-85.

311. Zhu G, Qu Y, Jin N, Sun Z, Liu T, Lee H, et al. Seroepidemiology and Molecular Characterization of Hepatitis E Virus in Jilin, China. *Infection* 2008;36:140-6.
312. Zhuang H. Advances in the research on non-A, non-B hepatitis in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 1991;12:377-9.
313. Zhuang H, Cao XY, Liu CB, Wang GM. Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol Jpn* 1991;26:135-8.

Anexo I.

✓ **Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis**

- *Acute hepatitis E virus infection in a Cuban patient. Int J Infect Dis 2005;9(5):286-287. Montalvo MC, Trujillo A, Rodríguez L, Goyenechea A, Bello M, Gutiérrez A, Sario S.*
- *Vigilancia de las hepatitis virales: Resultados de laboratorio 1992-2004. Rev Cubana Med Trop 2006;58(2):97-102. Rodríguez L, Delgado G, Bello M, Montalvo MC, Sario S, Gutiérrez A.*
- *Dual Infection with Hepatitis A and E Viruses in Outbreaks and in Sporadic Clinical Cases. Cuba 1998 – 2003. J Med Virol 2008;80(5):798-802. Rodriguez L, Quintana A, Montalvo MC, Lemos G, Bello M, Gutiérrez A, Aguiar P, Guzmán MG, Anderson A.*
- *Aislamiento y propagación del virus de la hepatitis E en diferentes líneas celulares. Rev Cubana Med Trop 2008;60(3). Montalvo MC, Goyenechea A, Morier L, González Z, Rodríguez M, Bello M, Gutiérrez A, Sario S, Mendoza D, Caballero Y, Rodríguez L.*
- *Hepatitis E virus genotype 1, Cuba. Emerg Infect Dis 2008;14(8):1320-1322. Montalvo MC, Rodríguez L, Chandra V, Bello M, Sario S, Gutierrez A, Jameel S.*
- *Seroprevalence of antibodies to hepatitis E in two large communities in Havana City, Cuba. Trans R Soc Trop Med Hyg. Montalvo MC, Guan M, Pérez A, Bello M, Hu WP, Howard T, Sario S, Gutiérrez A, Rodríguez L, Anderson D. Trans R Soc Trop Med Hyg 2010;104(12):772-6.*

✓ **Eventos científicos donde fueron expuestos los resultados de la tesis.**

- *Hepatología, CIMEQ 2002, Internacional, Cuba. Prevalencia del VHE y factores de riesgo asociados en el municipio la Lisa. Quintana A, Rodríguez L, Gutiérrez A, Bello M, Sánchez L, Montalvo MC.*
- *Forum de Ciencia y Técnica, La Lisa, 2002, Cuba. Ponencia Relevante. Aportes a la vigilancia de las hepatitis virales en Cuba. Rodríguez L, Bello M, Montalvo MC, Gutiérrez A, Sánchez A, Delgado G, Díaz M, Ribas MA, Rodríguez C, García D.*
- *IV Simposio Nacional, III Encuentro Internacional, Vigilancia en Salud, IPK 2005, Cuba. Primer reporte clínico, virológico y epidemiológico del virus de la hepatitis E en*

Cuba. Montalvo MC, Rodríguez L, Trujillo A, Goyenechea A, Bello M, Sario S, Gutiérrez A.

- *Hepatología, CIMEQ 2006, Internacional, Cuba. Infección aguda por virus de la hepatitis E en un paciente cubano. Montalvo MC, Sario S, Rodríguez L, Trujillo A, Goyenechea A, Bello M, Gutiérrez A.*
- *Ecojoven 2007, Cuba. Premio Municipal. Prevalencia de hepatitis E y factores de riesgo asociados en los municipios Playa y Marianao. Montalvo MC, StCroix S, Bello M, Gutiérrez A Sario S, Rodríguez L.*
- *Hepatología, CIMEQ 2008, Internacional, Cuba. Vigilancia Nacional de las hepatitis virales de transmisión entérica, A y E. Rodríguez L, Montalvo MC, Bello M, Gutiérrez A, Sario S.*
- *18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2008, Internacional, España. Hepatitis E: reporte de un caso de una embarazada cubana. Montalvo MC, Rodriguez L, Chandra V, Bello M, Sario S, Gutierrez A, Jameel S.*
- *VI Congreso Nacional de Inmunología Camaguey, 2008. Circulación silente de hepatitis E en dos municipios de la capital. Montalvo MC, Rodríguez L, Pérez A, Bello M, Gutiérrez A, Sario.*
- *Hematología, 2009, Palacio de Convenciones, Internacional, Cuba. Prevalencia y factores de riesgo de la hepatitis E en trabajadores de cuatro granjas porcinas de Provincia Habana. Montalvo MC, Correia B, Bello M, Sanchez M, Gutiérrez A, Sario S, Rodríguez L.*
- *Congreso 70 Aniversario de la fundación del IPK, VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, VII Congreso Nacional de Medicina Tropical, 2009, Internacional, Cuba. Presencia del genotipo 1 del VHE en Cuba. Montalvo MC, Rodríguez L, Chandra V, Bello M, Sario S, Gutiérrez A, Jameel S.*
- *Congreso 70 Aniversario de la fundación del IPK, VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, VII Congreso Nacional de Medicina Tropical, 2009, Internacional, Cuba. Aislamiento y propagación del VHE en varias líneas celulares.*

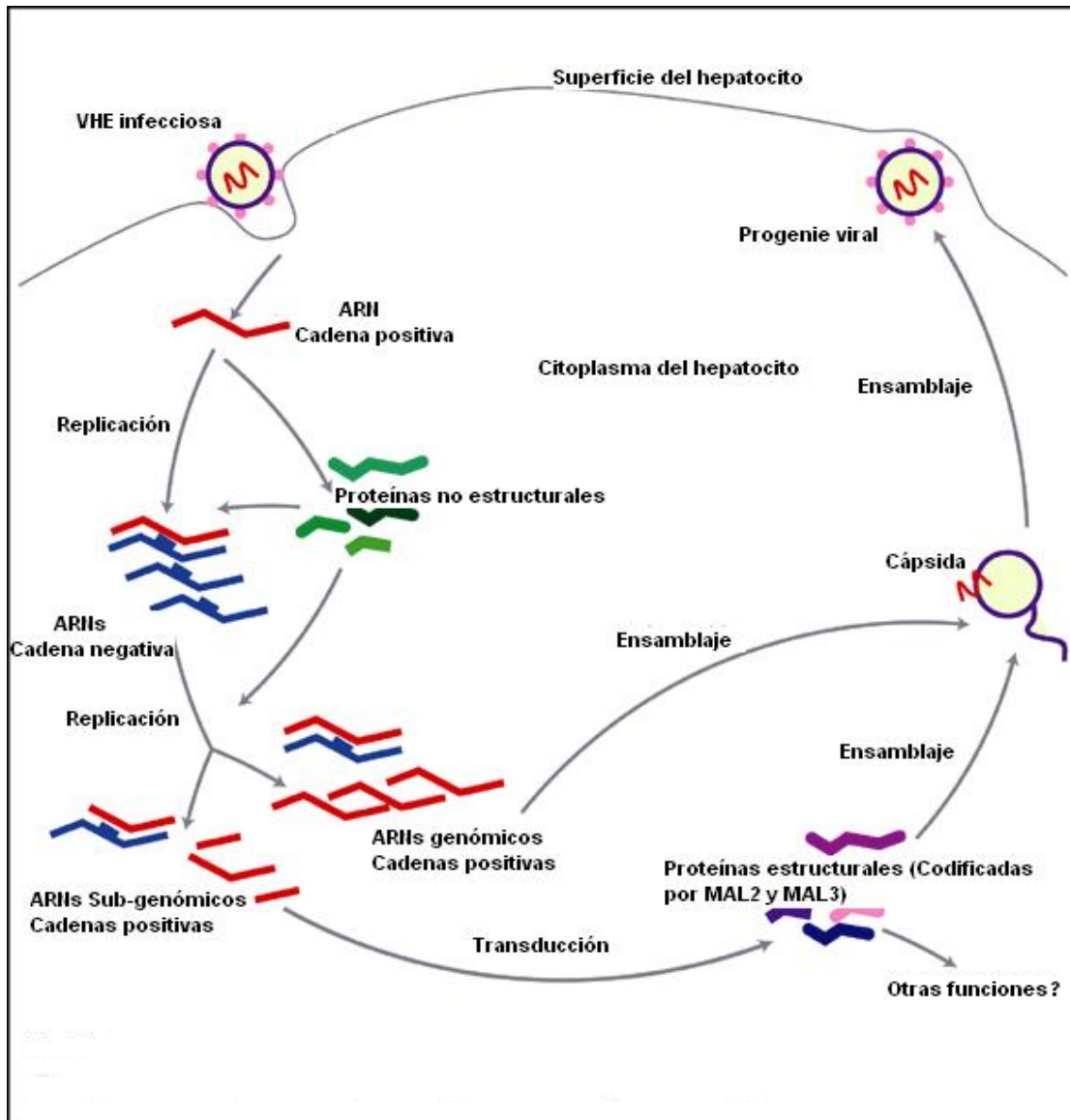
Montalvo MC, Goyenechea A, Morier L, González Z, Rodríguez M, Bello M, Gutiérrez A, Sariego S, Mendoza D, Caballero Y, Rodríguez L.

- *Congreso Nacional de Virología, Minas Gerais, 2009, Brasil. Hepatitis E in Cuba: some new data. Rodríguez L, Montalvo MC, Bello M, Sariego S, Gutiérrez A, Sánchez M.*
- *Hepatología, 2010, CIMEQ, Internacional, Cuba. Seroprevalencia de anticuerpos al virus de la hepatitis E en personas sin antecedentes clínicos de hepatitis viral aguda. Montalvo MC, Bello M, Sariego S, Gutiérrez A, Sánchez M, Pérez A, Rodríguez L.*

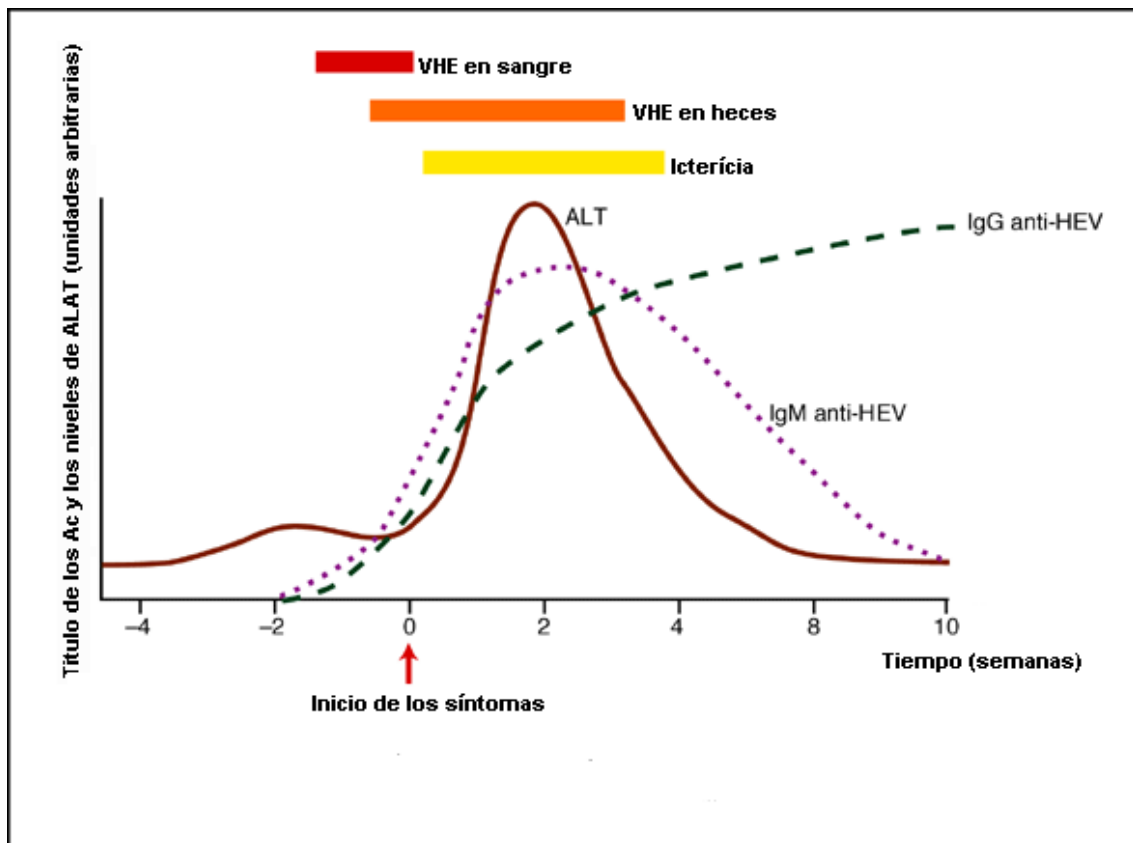
✓ **Reconocimientos otorgados a los resultados de la tesis.**

- *Fórum de Ciencia y Técnica Provincial, 2002, Cuba. Ponencia Destacada. Aportes a la vigilancia de las hepatitis virales en Cuba. Rodríguez L, Bello M, Montalvo MC, Gutiérrez A, Sánchez A, Delgado G, Díaz M, Ribas MA, Rodríguez C, García D.*
- *Logro Nacional de la Academia de Ciencias, 2007. Aportes al conocimiento de la hepatitis E en Cuba. Montalvo MC, Rodríguez L, Goyenechea A, Bello M, Gutiérrez A, Sariego S.*
- *Concurso Central del Premio Anual de Salud, 2008. Mención. Aportes al conocimiento de la hepatitis E en Cuba. Montalvo MC, Rodríguez L, Goyenechea A, Bello M, Gutiérrez A, Sariego S.*
- *Fórum de Ciencia y Técnica de Base, IPK, 2008. Aportes al conocimiento de la hepatitis E en Cuba. Montalvo MC, Rodríguez L, Goyenechea A, Bello M, Gutiérrez A, Sariego S.*
- *XVI Fórum de Ciencia y Técnica Provincial, 2008. Aportes al conocimiento de la hepatitis E en Cuba. Montalvo MC, Rodríguez L, Goyenechea A, Bello M, Gutiérrez A, Sariego S.*

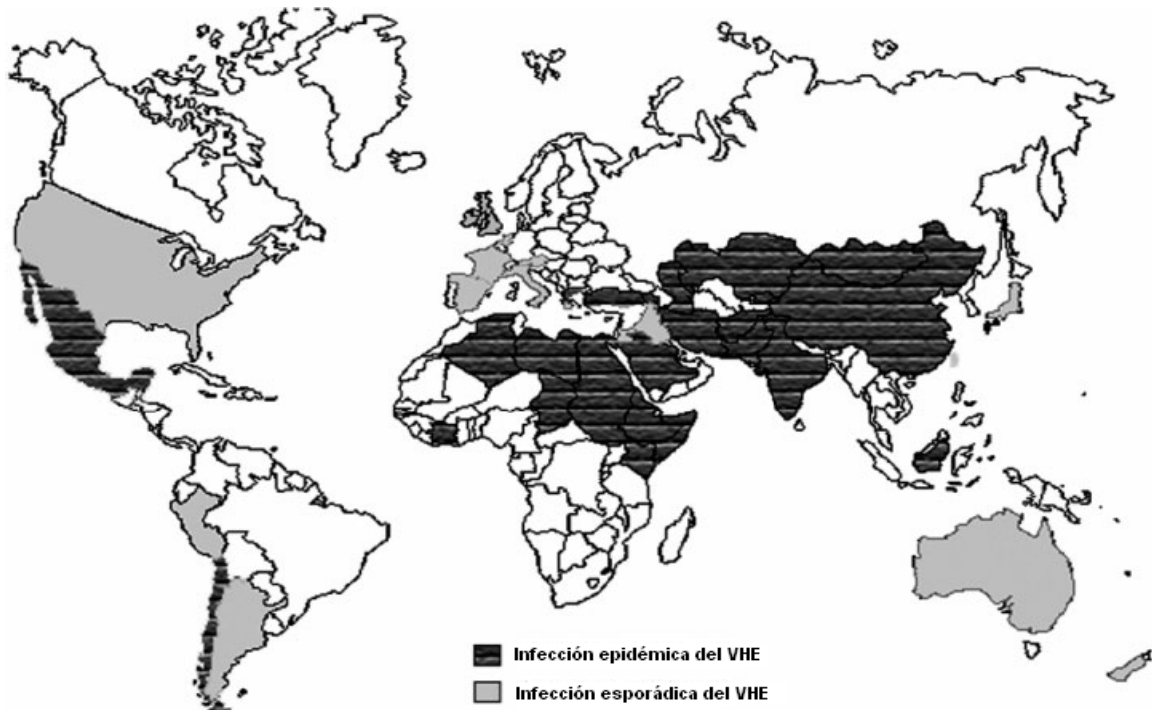
Anexo II. Modelo de replicación del VHE.



Anexo III. Eventos virológicos y serológicos subsecuentes a la exposición al VHE.



Anexo IV. Distribución geográfica a nivel internacional del VHE (Panda y cols., 2007).



Anexo V. Distribución geográfica de los brotes recibidos en el LNRHV de 1998 al 2005.



Anexo VI. Distribución de las muestras de sueros estudiadas según los estuches de IgM anti-VHE empleados.

Estuches de IgM anti-VHE empleados	Brotos	Suero de Brotos	Sueros de casos clínicos esporádicos	Sueros de casos graves y fallecidos (FHF)
IgM anti-VHE , CIGB, Cuba	13	82	N.R	N.R
IgM anti-VHE , Macfarlane, Australia	20	176	100	37
IgM anti-VHE , Genelabs Diagnostics, Singapur	16	124	53	40
Total	49	382	153	77

Fuente de datos: Libro de entrada, LNRHV.

Leyenda: N.R, no realizadas

Anexo VII. Consentimiento Informado de la Encuesta sero-epidemiológica del virus de la hepatitis E del municipio La Lisa.

El que suscribe: _____

He sido informado:

La hepatitis E es causada por un virus que se transmite por la ingestión de agua y alimentos contaminados. Este virus circula en nuestro país causando brotes y casos aislados de hepatitis viral. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son: fiebre; dolor de cabeza; manifestaciones digestivas como náuseas, vómitos, dolores abdominales; en ocasiones coloración amarilla de la piel y las mucosas, acompañado de malestar general. Generalmente tiene un curso benigno y no tiene formas crónicas o prolongadas, pero pueden presentarse cuadros graves en un 20% de las mujeres embarazadas. Las edades más afectadas son entre 15 y 45 años de edad.

Hago constar por este medio mi disposición y consentimiento informado para participar en este estudio piloto de la prevalencia de Ig G contra el virus de la hepatitis E en el municipio de La Lisa, año 2002.

Declaro que he sido informado de los objetivos del estudio, que consiste en conocer la circulación de este virus en la población de La Lisa.

Asimismo, se me explicaron la importancia que reviste para nuestra salud pública conocer como se está comportando esta enfermedad en nuestro medio y de esta manera, poner en práctica las medidas de control y prevención eficientes contra esta enfermedad.

Dejo constancia asimismo que conozco que se realizara una toma de muestra de sangre venosa superficial (5 mL), utilizando equipos desechables para minimizar posibles riesgo de contaminación. Además me queda claro que puedo abandonar el estudio cuando lo estime conveniente.

Para la constancia de lo expuesto anteriormente firmo este documento en _____ provincia _____ el día ____ del mes de ____ del 2002.

Firma: _____

Anexo VIII. Encuesta sero-epidemiológica del virus de la hepatitis E del municipio La Lisa.

Fecha: _____

1. Datos generales

Nombre y Apellidos: _____

Dirección particular: _____

Edad _____ Sexo _____

Consultorio: _____ Área de Salud: _____

2. Datos específicos

Antecedentes de hepatitis viral aguda Si _____ No _____ Tipo _____

Antecedentes de transfusión sanguínea Si _____ No _____ Tipo _____

Tiene o ha tenido animales en su vivienda Si _____ No _____

Marque con una cruz cuales:

Cerdo _____ Ratas _____ Pollos _____

Carnero _____ Perros _____ Vacas _____

Otros: _____

Enfermedades crónicas Si _____ No _____ Cuales? _____

Antecedentes de intervenciones quirúrgicas Si _____ No _____

Tatuajes Si _____ No _____

Acupuntura Si _____ No _____

Nombre: _____

Firma: _____

Anexo IX. Consentimiento informado de la Encuesta sero-epidemiológica del virus de la hepatitis E de los municipios Playa y Marianao.

El que suscribe: _____ he sido informado de que:

La hepatitis E es una infección del hígado causada por el virus de la hepatitis E (VHE), que se transmite por vía oral, asociada al consumo de aguas o alimentos contaminados. Esta enfermedad es similar a la hepatitis A y pueden haber individuos que hayan estado en contacto con el virus sin referir síntomas (nauseas, vómitos, con coloración amarilla de piel y mucosas) relacionados con la enfermedad. La hepatitis E a diferencia de la hepatitis A tiene un elevado porcentaje de letalidad en las mujeres embarazadas, especialmente en el tercer trimestre de la gestación.

Hasta la fecha, no hay vacunas para prevenir la enfermedad, por lo que es importante conocer los factores de riesgos relacionados con la exposición al virus; con vistas e recomendar medidas adecuadas de control y hacer profilaxis de la enfermedad

Hago constar por la presente mi disposición y consentimiento informado para participar en la encuesta sero-epidemiológica del virus de la hepatitis E de los municipios Playa y Marianao en individuos supuestamente sanos y sin antecedentes de hepatitis viral aguda (diagnóstico de hepatitis, coloración amarilla de piel y mucosas).

Declaro que he sido informado de los objetivos del estudio en el cual se me llenará una encuesta de factores de riesgos y se me extraerá 5 mL de sangre periférica para la detección de anticuerpos contra el VHE.

Asimismo, me explicaron las ventajas que para la Salud Pública representa conocer esta información en la elaboración de las estrategias para disminuir o eliminar la transmisión del virus.

Dejo constancia de lo antes expuesto con mi firma personal en presencia de los dos testigos aquí presentes.

Firma del interesado: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____ Fecha: _____

Anexo X. Encuesta sero-epidemiológica del virus de la hepatitis E de los municipios Playa y Marianao.

Datos Generales:

Nombre y Apellidos: _____

Número del Carné de Identidad: _____

Edad: _____ Sexo: _____ Raza: _____

Dirección particular: _____

Ocupación: _____ Municipio: _____

Policlínico: _____ CMF: _____

Para niños de 5 a 11 años Niño

Anexo XI. Consentimiento de encuesta de Prevalencia de la hepatitis E en grupos de riesgo.

El que suscribe: _____ he sido informado de que:

La hepatitis E es una infección del hígado causada por el virus de la hepatitis E (VHE). Esta infección es similar a la hepatitis A y tiene un elevado porcentaje de letalidad en las mujeres embarazadas, especialmente en el tercer trimestre de la gestación. Aunque, la hepatitis E se transmite principalmente por vía oral, asociada al consumo de aguas y alimentos contaminados. No obstante, existen trabajadores que tienen un alto riesgo ocupacional de estar en contacto con el virus. En particular se ha demostrado a nivel mundial que los cerdos constituyen el principal reservorio del virus y los especialistas del tema consideran que la hepatitis E es una zoonosis.

Las personas que están en contacto directo con el ganado porcino tienen una exposición elevada al VHE. Sin embargo, hasta la fecha no se han obtenido datos sobre el tema en la población cubana expuesta a este riesgo. Por lo que es importante conocer el comportamiento de la exposición al virus; así como los factores relacionados con la misma en trabajadores de las granjas porcinas; con vistas a recomendar medidas de profilaxis y prevención de la enfermedad en este grupo poblacional.

Por tanto, hago constar por la presente mi disposición y consentimiento para participar en el estudio de prevalencia de la hepatitis E en grupos de riesgo.

Declaro que he sido informado de los objetivos de la investigación, en la cual se llenará una encuesta de factores de riesgo y se me extraerá 5 mL de sangre tomada del antebrazo con material desechable, para la detección de anticuerpos contra el VHE, niveles de transaminasas y marcadores moleculares de exposición al VHE. De ser positivo a los anticuerpos debo recoger heces para completar los datos de laboratorio de la investigación.

Dejo constancia de lo antes expuesto con mi firma personal.

Firma del interesado: _____ Fecha: _____

Fecha: _____

Datos Generales:

Nombre y Apellidos: _____

Número del Carné de Identidad: _____

Edad: _____ Sexo: _____

Dirección particular: _____

Ocupación: _____ Municipio: _____

Policlínico: _____ CMF: _____

a) Antecedente de hepatitis o Ictericia? Si ___ No ___

a.1) ¿Tipo?: _____

a.2) ¿Cuándo? _____

b) Tiempo que labora en la empresa: _____

b.1) Tipo de actividad que realiza: _____

c) Tiene animales en la casa Si ___ No ___

C.1) Cuales? _____

d) Consume agua almacenada? Si ___ No ___

d.1) Hierve el agua? Si ___ No ___

e) Usted tiene algún tatuaje en su cuerpo. Si ___ No ___

h) Le gusta usar adornos metálicos (aretes) en la orejas Si ___ No ___

omblogo, tetillas, nariz, lengua, etc.

i) Usted debe recibir tratamientos inyectables de forma regular. Si ___ No ___

i.1) ¿Por qué motivo? _____

a) Ha recibido transfusiones de sangre y/o hemoderivados Si ___ No ___

a.1) ¿Cuántas unidades? Número: _____

b) Ha recibo algún tratamiento quirúrgico Si ___ No ___

b.1) ¿Qué tipo de operación? _____

Marcadores virales: Anti-VHE: _____

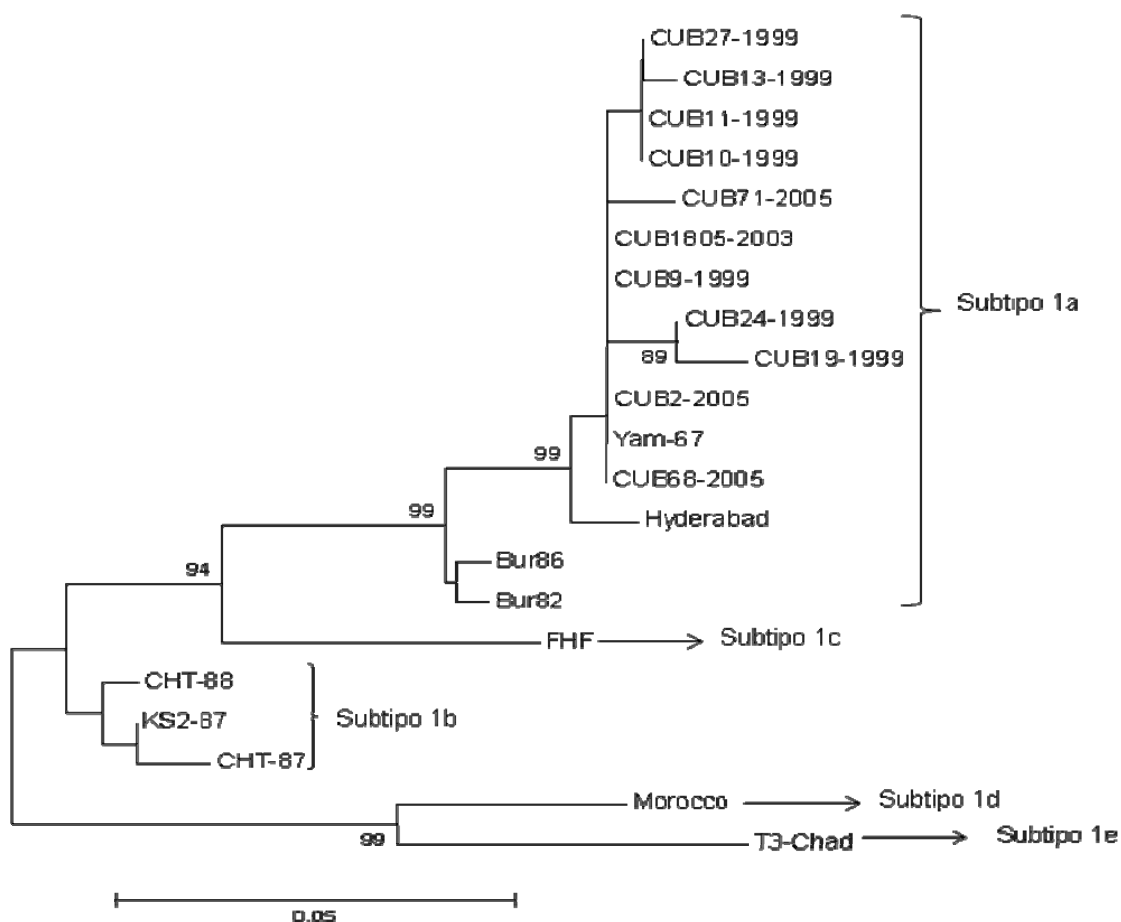
PCR-VHE: Suero : _____ Heces: _____

ASAT: _____ ALAT: _____

Anexo XIII. Secuencias del VHE utilizadas en el análisis filogenético secuencias disponibles en el Banco Internacional de genes (GenBank, sitio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

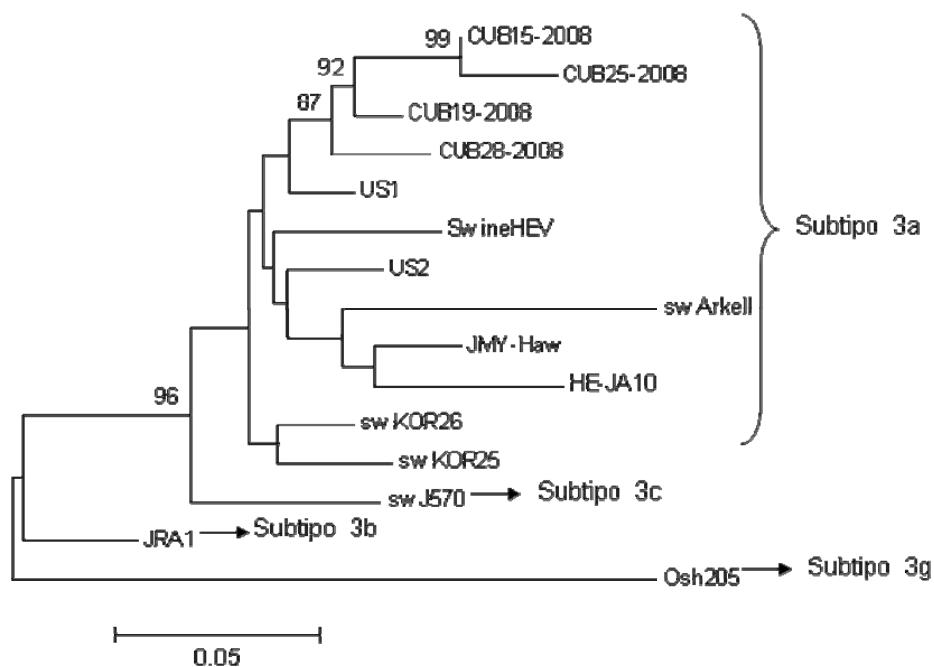
Aislamientos	Números de Acceso	País
Abb-2B	AF185822	Paquistán
Bur82	M73218	Birmania
Bur86	D10330	Birmania
Changchun	AB108537	China
HE-JA1	AB097812	Japón
HE-JI4	AB080595	Japón
HE-JK4	AB099347	Japón
Hetian87	L08816	China
Hetian88	D11092	China
Hyderabad	AF076239	India
JAK-Sai	AB074915	Japón
JKK-Sap	AB074917	Japón
JKN-Sap	AB074918	Japón
JMY-Haw	AB074920	Japón
JRA1	AP003430	Japón
JSN-Sap	AB091395	Japón
KS2-87	L25595	China
Madras	X99441	India
Mexican	M74506	México
Morocco	AY230202	Marruecos
Nepal	AB085969	Nepal
Osh205	AF455784	Kirguizistán
pKS-HEV2	AF444002	Paquistán
Sar55	M80581	Paquistán
swArkell	AY115488	Canadá
swJ13-1	AB097811	Japón
swJ570	AB073912	Japón
swKor25	EU407818	Corea
swKor26	EU407819	Corea
T1-China	AJ272108	China
TK15-92	AF051830	Nepal
Uchida	D11093	China
US1	AF060668	EE.UU.
US2	AF060669	EE.UU.
Yam67	AF459438	India
CHT-88	D11092	China
CHT-87	L08816	China
KS2-87	L25595	China
FHF	X98292	India
T3-Chad	AY204877	Chad
Morocco	AY230202	Marruecos

Anexo XIV. Árbol filogenético construido con 211 nucleótidos de la ARN polimerasa ARN dependiente (MAL1), que muestra el subtipo al que pertenecen los aislamientos cubanos del genotipo 1 del VHE^a. Los valores de bootstrap mayores del 70% se muestran en los nodos.



^a En el árbol filogenético no se muestran el resto de los subtipos ya que estos fueron subtipados utilizando otra región del virus.

Anexo XV. Árbol filogenético construido con 211 nucleótidos de la ARN polimerasa ARN dependiente (MAL1), que muestra el subtipo al que pertenecen los aislamientos cubanos del genotipo 3 del VHE^a. Los valores de bootstrap mayores del 70% se muestran en los nodos.



^a En el árbol filogenético no se muestran el resto de los subtipos ya que estos fueron subtipados utilizando otra región del virus.