

Rev Biomed 2003; 14:165-189.

Virus de la hepatitis E.

Revisión

Ariel Quintana-González.

Physiology Institute, Saarlandes University, Germany.

RESUMEN.

El virus de la hepatitis E (VHE), posible nuevo integrante de la familia *Caliciviridae*, es un virus no envuelto, con un ARN de simple cadena y de sentido positivo, el cual posee tres marcos de lectura abiertos y superpuestos que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales necesarias para su ciclo replicativo. Se transmite predominantemente por vía fecal oral, a través de aguas contaminadas y es uno de los seis principales virus capaces de causar un cuadro clínico de hepatitis viral en el hombre. Además, provoca cuadros de hepatitis fulminante en mujeres embarazadas, alcanzando hasta un 20% de letalidad. Presenta una distribución geográfica mundial, aunque sólo es altamente endémico en el subcontinente Indio, en el centro y el sudeste de Asia, Medio Oriente y parte de África, donde se han reportado las más grandes e importantes epidemias causadas por este agente viral. Luego de varios años de estudio sobre la epidemiología molecular del VHE, se ha planteado la existencia de cepas epidémicas y no epidémicas, siendo estas últimas las causantes de los casos esporádicos encontrados en países desarrollados. Las cepas del VHE aisladas en humanos tienen una estrecha relación genética con cepas halladas en

cerdos, ratas y pollos, sugiriendo que la hepatitis E es una enfermedad de posible transmisión zoonótica. La variedad antigénica entre las cepas no parece ser tan amplia como la encontrada genéticamente. Sin embargo, los candidatos vacunales en desarrollo no muestran claramente una seroprotección contra todos los genotipos del VHE hasta hoy descritos. Mientras tanto, el buen tratamiento de las aguas albañales y potables, son los métodos más efectivos para el control de las epidemias desatadas por el VHE. Este artículo trata de resumir los conocimientos actuales acerca de la estructura molecular y biológica del virus, así como la epidemiología, el diagnóstico de la infección, y muestra cómo se comporta la incidencia de la hepatitis E en diferentes regiones del mundo. (*Rev Biomed 2003; 14:165-189*)

Palabras clave: Virus de la hepatitis E, epidemiología.

SUMMARY.

Hepatitis E virus.

The hepatitis E virus (HEV), a possible new *Caliciviridae* family integrant, is a non-enveloped virus, with a single-strand positive-sense RNA molecule which has three overlapping open reading

Solicitud de sobretiros: Ariel Quintana-González, MSc. 749 Marlee Ave. apt. 1, North York-Toronto, M6B 3J8. Ontario, Canada..

E-mail: aquintana60274@hotmail.com

Recibido el 10/Enero/2003. Aceptado para publicación el 23/Mayo/2003.

Este artículo está disponible en <http://www.uady.mx/sitios/biomedic/revbiomed/pdf/rb031436.pdf>

A Quintana-González.

frames that encode all structural and non-structural viral proteins needed for its intracellular replication cycle. It is predominantly transmitted by the faecal-oral route, usually through contaminated water. This viral agent is one of six viruses able to cause clinical viral hepatitis in humans. It is also able to provoke severe viral hepatitis in pregnant women causing up to 20% mortality. This virus shows a worldwide distribution, although it is highly endemic in the Indian sub-continent, Southeast and Central Asia, the Middle East, and parts of Africa reporting the biggest and most important HEV outbreaks. After many years of studying the HEV molecular epidemiology, both epidemic and non-epidemic HEV strains have been reported, the latter causing many sporadic cases in developed countries. Human HEV strains have shown a close genetic relation with swine, rats, and chicken HEV isolates, suggesting that hepatitis E is a possible zoonotic disease. Antigenic variety does not seem to be as wide as the genetic variability found among all HEV strains. However, different vaccine candidates have not clearly shown an immunological protection against all HEV genotypes. Thus, the most effective mode of preventing HEV outbreaks is the use of clean water and proper sanitation. This review tries to summarize the current knowledge about the molecular and biological structure of the virus, as well as the epidemiology and diagnosis of the infection, and shows the incidence of hepatitis E in different regions of the world. (*Rev Biomed* 2003; 14:165-189)

Key words: Hepatitis E virus, epidemiology.

Antecedentes.

La hepatitis no-A, no-B (HNANB) transmitida entéricamente, rebautizada como hepatitis E (1-3), es probablemente una vieja enfermedad que fue descubierta recientemente. El origen de la hepatitis E, sin embargo, no se conoce. Se ha sugerido que la enfermedad es relativamente nueva y es de importancia creciente (4). No obstante, hay evidencias de registros históricos de que esta forma de hepatitis puede ser antigua (5).

Dos rasgos de la epidemiología de la hepatitis E

parecen ser únicos: la alta incidencia en adultos y la alta incidencia de hepatitis fulminante con muerte subsecuente en las mujeres gestantes afectadas. Esto último fue un instrumento para el reconocimiento de la hepatitis E como una enfermedad nueva; en primera instancia, porque la población en la que ocurría era virtualmente inmune en 100% al virus de la hepatitis A desde alrededor de los diez años de edad.

En la última mitad del siglo XIX, a través de Europa y otras regiones (como Australia), ocurrían regularmente hepatitis epidémicas y endémicas en adultos (6), con las características epidemiológicas de una enfermedad transmitida entéricamente y diseminada por el agua. A partir de varios estudios de prevalencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis A (VHA) en poblaciones europeas y australianas, se pudo inferir que esta forma de hepatitis no era debida a la infección por ese virus. Esto reveló que el VHA había disminuido en importancia en estas poblaciones en los últimos cincuenta años, ya que, probablemente, 100% de la población estaba infectada antes del cierre del siglo (6,7). De modo que muchas de las enfermedades parecidas a la hepatitis A que ocurrían en Europa y otros lugares antes de 1990 eran probablemente hepatitis E (8).

Evidencias adicionales fueron proporcionadas por los estudios de la mortalidad asociada a hepatitis en mujeres gestantes. Los reportes de la alta mortalidad asociada con la hepatitis viral en gestantes eran comunes en el norte de Europa y otros lugares antes de finales del siglo diecinueve. 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 (5). De este modo, parece que una enfermedad, que epidemiológicamente se parecía a la hepatitis E, ocurría en Europa antes del cierre de ese siglo, pero se restringía a los países de menos desarrollo, patrón que se viene 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 (4).

Virus de la hepatitis E.

Varias epidemias se han documentado en países subdesarrollados (3, 4, 9-11). Al principio, se pensaba que esta hepatitis prevalecía en el subcontinente indio o alrededor del Himalaya, pero luego se demostró que estaba presente en casi todos los países en desarrollo. Todas las grandes epidemias fueron provocadas por la contaminación fecal de las fuentes de aprovisionamiento de agua potable, debido a las pobres condiciones socioeconómicas e higiénicas existentes. Las epidemias de las hepatitis en el subcontinente indio que eran diseminadas por el agua, se creían causadas por el VHA.

Khuroo, en 1980, demostró por primera vez que una epidemia de hepatitis viral ocurrida en el valle de Cachemira no era causada por el VHA sino por un agente de HNANB (12). Ése fue un hito en la historia de la hepatitis E y comenzó una búsqueda activa para la caracterización del agente etiológico. Casi simultáneamente, se demostró que ninguna de las muestras de suero de los pacientes de las epidemias de Delhi, de los años 1955-1956, y Ahmedabad, de 1975-1976, que se probaron, fueron positivas para infección reciente por el VHA o el virus de la hepatitis B (VHB). De hecho, todos los sueros mostraban evidencias de infección antigua por VHA (13-15).

Subsecuentes experimentos de transmisión, tanto en voluntarios humanos como en animales de experimentación, proporcionaron las evidencias concluyentes acerca de la existencia de la hepatitis E, al demostrar, por inmunomicroscopía electrónica (IME), la presencia de partículas en forma de virus de 27-34 nm en las heces de voluntarios y de animales (16). Reyes y colaboradores reportaron un ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) específico para el virus de la hepatitis E (VHE) y demostraron la presencia de secuencias de ácido ribonucleico (ARN) viral en muestras clínicas obtenidas de personas afectadas de Birmania, México, Tashkent, Somalia y Paquistán (1).

Clasificación.

La clasificación del VHE no ha sido aún completamente establecida. Se creyó al principio, sobre la base de la detección de partículas en forma

de virus de 27 nm en algunos brotes de hepatitis E y el hallazgo de un genoma de 7.6 kb, que pertenecía a la familia de los *Picornaviridae* (16). Sin embargo, los estudios de comparación de secuencia y de organización genómica del VHE con el tipo salvaje del virus de hepatitis A o el Poliovirus, indicaron que el VHE era muy diferente a los *Picornaviridae* (11). Los estudios subsecuentes de microscopía electrónica y de las propiedades físico-químicas del VHE, indicaron que el virus podría ser un *Calicivirus*. Esto también estaba respaldado por un análisis inicial del genoma viral, que reveló tres marcos abiertos de lectura (MAL), la localización de posibles proteínas no estructurales en el extremo 5', así como de las estructurales en el extremo 3' del genoma, y la detección de ARN mensajeros subgenómicos en tejido hepático infectado, todo esto sugestivo de una relación con los *Calicivirus* (17).

Sin embargo, el orden de los genes del VHE no es idéntico al de los *Calicivirus*: el tercer MAL de los *Calicivirus* se localiza en el extremo 3' del genoma, mientras que solapa los extremos del primero y segundo MAL en el VHE. Más aún, la secuencia del VHE no tiene una relación cercana con ninguno de los virus conocidos. Se asemeja más a la secuencia del virus de la rubeola, clasificado actualmente como miembro de la familia *Togaviridae*, y el virus de la vena amarilla necrótica de la remolacha, un *Furovirus* vegetal (18). Bajo este esquema, estos dos últimos virus y el VHE estarían situados en familias separadas, pero relacionadas. Una clasificación concluyente del VHE está en espera de un mayor conocimiento de su estrategia de expresión y replicación, y de la naturaleza, procesamiento y propiedades de sus proteínas constituyentes.

Morfología.

Los estudios de IME describieron originalmente al VHE como una partícula esférica de 27 a 30 nm, no envuelta, similar en aspecto a los *Calicivirus* (16). Variadas dimensiones del tamaño del virión, que fluctúan de 27 a 30 nm, de 27 a 34 nm y de 32 a 34 nm, han sido reportadas en numerosos estudios (19, 20, 37). Se reportó un tamaño promedio de 30 nm

A Quintana-González.

en un estudio acerca del tamaño del virión, a partir de muestras de tres cepas geográficamente diferentes del VHE procedentes de México, Nepal y Paquistán (19). En un estudio similar de partículas del VHE procedentes de Birmania, México, Somalia y Asia Central, el diámetro promedio de las partículas se estableció en 32 nm, comparado con el diámetro de 28 nm del VHA (21, 22). La inconsistencia de diámetro de las partículas en forma de virus se ha explicado como debida a la digestión proteolítica o desnaturalización parcial del virus durante el paso por el intestino (23). Sobre la base de la morfología, el VHE no puede ser distinguido confiablemente de otros virus pequeños redondos que se encuentran en las heces (24). El análisis de la microfotografías electrónicas de las partículas del VHE por análisis rotacional de Markham (25), proporcionó imágenes que sugieren una simetría icosaédrica para los viriones del VHE (19).

Propiedades físico-químicas.

Se ha reportado una densidad de flotación de 1.35 g/cm³ en cloruro de cesio (CsCl) para el antígeno viral de hepatitis E y/o de las partículas virales (16), aunque cifras de 1.39 a 1.40 g/cm³ han sido obtenidas por otros autores (26). La densidad de flotación del VHE es 1.29 g/cm³ en tartrato de potasio y glicerol (27). El coeficiente de sedimentación del VHE es 183 S (22). Se dice que el VHE es inestable cuando se guarda a temperatura entre -70°C y 8°C, pero estable en nitrógeno líquido (22). Sin embargo, éste no ha sido un hallazgo consistente.

La supervivencia del VHE en el tracto intestinal sugiere que el virus es relativamente estable en

condiciones ácidas o alcalinas suaves. El VHE contiene un genoma de ARN, incluido en el interior de una cápsida compuesta por una o, posiblemente, dos proteínas, pero el virus disponible ha sido insuficiente para la purificación y el análisis químico directo para obtener información confiable (17).

Estructura y organización del genoma.

La secuencia nucleotídica del genoma completo del VHE ha sido identificada con cepas del VHE provenientes de Birmania (17), Paquistán (28), China (29-34) y México (35). Se ha identificado una secuencia genómica parcial del VHE en cepas de la India, Kirguistán, Uzbekistán, Taiwan, Italia, Grecia, Egipto y Argentina (36-40). El VHE (figura 1) contiene un genoma de ARN de cadena simple positiva, de aproximadamente 7.5 kb de largo, con una cola de poli-A en su extremo 3' (36, 17). Las secuencias de las regiones no codificantes (RNC) 5' y 3' son de 27 y 68 nucleótidos, respectivamente. Los genes considerados no estructurales se localizan en el extremo 5' y los estructurales en el 3' del genoma. El primer MAL (MAL1) comienza 28 nucleótidos a partir del extremo 5' y se extiende 5079 pares de bases (pb) antes de terminar en el nucleótido de la posición 5107. El MAL2 comienza en el nucleótido en la posición 5147 y se extiende 1980 pb antes de terminar 65 pb hacia arriba del poli-A. El MAL3 comprende 369 pb, solapa al MAL1 en su extremo 5' por un nucleótido y solapa significativamente el MAL2. Así, el genoma del VHE tiene tres MAL que se solapan y en su replicación utiliza los tres marcos codificantes.

Las funciones de las proteínas codificadas por

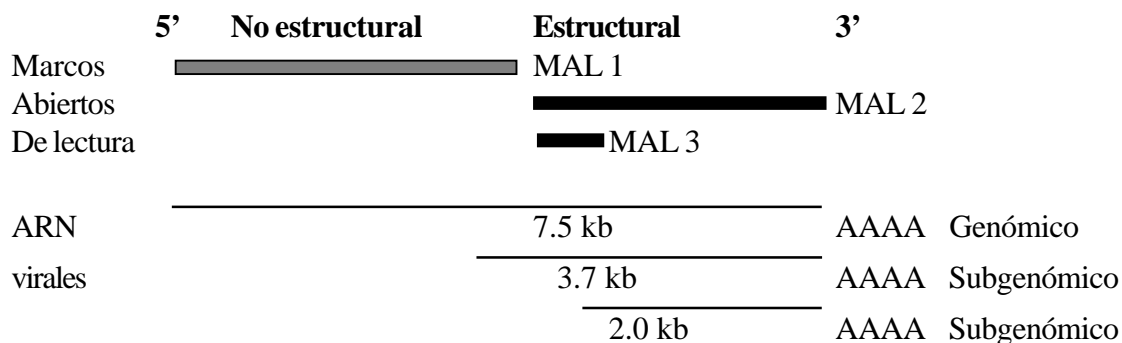


Figura 1.- Organización del genoma del VHE.

los MAL del VHE no han sido demostradas directamente, pero sobre la base de extensos análisis de secuencia del genoma del VHE e identificación de los “*motif*” conservados que se encuentran en proteínas de otros virus, se cree que el MAL1 codifica las proteínas no estructurales. Se piensa que el MAL2 codifica las principales (si no la única) proteína estructural y el péptido de la cápsida, y que el MAL3 codifica una pequeña proteína inmunogénica de función desconocida (17, 18, 28, 41-43).

El MAL2 contiene una típica secuencia señal cercana a su extremo 5', inmediatamente seguida por una región de 300 nucleótidos, rica en codones de arginina y de carga altamente básica. Esta región se cree que está involucrada en la encapsidación del transcrito genómico (17). El MAL2 contiene tres sitios potenciales de glicosilación, aunque no se ha establecido que sean funcionales (44). El MAL2 contiene en el extremo 3' un epítoto inmunogénico principal (17).

Recientemente, Jameel y colaboradores (45), han caracterizado las proteínas de los MAL2 y MAL3 del VHE, expresándolas en células COS-1, con el empleo de vectores de expresión basados en el SV-40, e *in vitro* mediante el uso de un sistema acoplado de transcripción-traducción. Se observó que la proteína principal de la cápsida, codificada por el MAL2, es una glicoproteína de 88 kDa expresada intracelularmente, así como sobre la superficie celular, y tiene la posibilidad de formar homodímeros no covalentes. Es sintetizada como un precursor (ppMAL2) procesado por corte de la secuencia señal en la proteína madura (pMAL2), la cual es entonces glicosilada (gpMAL2). En su secuencia primaria de aminoácido, la proteína pMAL2 contiene tres sitios potenciales de glicosilación, que son conservados en todas las cepas del VHE secuenciadas hasta ahora (17, 28, 29, 41, 46).

Sin embargo, Torresi y colaboradores (47) mediante el empleo de la técnica de pulsado y seguimiento (pulse-chase), han sugerido que la proteína no-glicosilada es estable en el citosol de células de mamíferos transfectadas con el virus Semliki Forest, usado como vector para expresar el MAL 2, mientras

que las proteínas glicosiladas son inestables en el citosol y sólo se encuentran insertadas en la membrana celular. De esta manera propusieron que dicho precursor no glicosilado de 78 kDa sea el principal componente de la cápsida viral del VHE, y que las otras dos proteínas glicosiladas de 82 y 86 kDa respectivamente, sean sólo productos de una expresión heteróloga viral. No obstante, todos estos hallazgos necesitan de un mayor número de trabajos que confirmen dichos criterios.

El MAL3 contiene una secuencia señal cerca de su extremo 5', pero carece de otro “*motif*” identificable y su función se desconoce (69). Este MAL3 también codifica un epítoto inmunogénico cerca de su extremo 3' (17). En experimentos con este MAL (45), se encontró que expresaba una proteína de 13.5 kDa (pMAL3) en células transfectadas con vectores de expresión de MAL3. Esta proteína se localiza en el citoplasma, no es glicosilada y no parece sufrir ninguna modificación que altere significativamente su tamaño. La proteína menor pMAL3 también interactúa con una proteína celular de cerca de 18 kDa.

Heterogeneidad genética.

Los genomas de varias cepas del VHE de Asia (Birmania, Paquistán y China) (17, 28, 31, 34, 47, 48) y de América del Norte (México), han sido secuenciados completamente, y hay secuencias parciales disponibles de cepas del VHE a partir de otras regiones (37, 38, 40, 46, 49-52). Además, se ha identificado en cerdo un virus genéticamente relacionado al VHE que infecta al humano, denominado virus de la hepatitis E del cerdo (VHE cerdo) (53). Recientemente, se reporta el hallazgo en pollos de un virus relacionado genéticamente con las cepas del VHE aisladas en humanos y en cerdos (54, 55). Se han propuesto 8 genotipos para el VHE en los cuales se agrupan todas las cepas actualmente identificadas, mediante el análisis filogenético de la secuencia nucleotídica de dos regiones ubicadas en el MAL1 (40).

La cepa mexicana fue la que mostró mayor diferencia entre todas las cepas estudiadas. La RNC

A Quintana-González.

del extremo 5' de la mayoría de las cepas fue de 26 a 27 nucleótidos de largo, pero la RNC 5' de la cepa mexicana fue solamente de 3 nucleótidos de largo (48). En la región del MAL1, la cepa mexicana fue 25% diferente a nivel nucleotídico, mientras que todas las demás cepas difirieron entre un 10 y un 25%.

El grado de heterogeneidad genética en el MAL2 fue similar al de MAL1 entre las diferentes cepas. El MAL3 fue el más conservado excepto en su extremo 3', con una variación cercana al 20% entre las cepas asiáticas, y de aproximadamente 10% en la cepa mexicana (24).

Estrategia de replicación.

En ausencia de sistemas de cultivo *in vitro* estables, no se comprenden bien las estrategias de replicación del VHE, y la naturaleza de sus polipéptidos codificados. El mecanismo de unión, entrada y desnudamiento del VHE no es conocido, pero se asume que el virus se une a sitios receptores sobre los hepatocitos y, posiblemente, células del intestino. Jammel y colaboradores (45) han expresado, muy recientemente, proteínas estructurales del VHE en células animales en cultivo para estudiar las propiedades e interacciones de estas proteínas virales. Este estudio ha arrojado alguna luz sobre el mecanismo de replicación del VHE.

Reyes y colaboradores (56) propusieron una estrategia de replicación que toma en consideración todos los elementos mencionados anteriormente. Los productos de los genes que codifican proteínas no estructurales son expresados presumiblemente por el genoma de sentido positivo en toda su longitud después de entrar en la célula. Estos productos génicos individuales se involucran entonces en los estadios más tempranos de la replicación viral. El primer paso es la generación de ambas cadenas negativas de ARN (cadenas antígenómicas). La polimerasa de ARN dependiente de ARN puede estar involucrada en la generación de ambas cadenas positiva y negativa del ARN. El ARN antígenómico de longitud completa disponible, puede conducir a la producción de ARN genómico adicional de longitud completa y a más expresión y acumulación de proteína

no estructural.

En el modelo propuesto, el ARN antígenómico serviría no sólo como molde para la producción de la cadena genómica de ARN de sentido positivo, sino también para la producción de mensajeros subgenómicos más pequeños. Esto inicia la segunda fase de la replicación viral, la producción de proteínas virales estructurales. No se conoce el mecanismo exacto por el cual se generan los mensajeros subgenómicos de 3.7 y 2.0 kb. Tampoco se sabe cuál mensajero es utilizado como fuente para la proteína de la cápsida ni tampoco está claro si se incorpora más de una proteína en el virión. El hallazgo de una proteína altamente inmunogénica codificada por el MAL3 sugiere que esta proteína tiene algún papel estructural en el virión. Sin embargo, no se conocen ni el papel exacto que desempeña esta proteína ni sus medios de expresión.

Se presume que la producción del ARN genómico de longitud completa ocurre a partir del ARN antígenómico. La encapsidación del ARN genómico ocurre entonces por asociación con la proteína de la cápsida. El alto contenido (10%) del aminoácido básico arginina del extremo amino de la proteína de la cápsida es, presumiblemente, crítico para su papel en la encapsidación del ARN genómico, como se postula para otros virus (17, 57).

Evidencias experimentales permiten pensar que la expresión de los productos génicos individuales puede ser regulada en varias etapas. Se ha observado que la abundancia relativa entre los transcritos individuales no es equimolar respecto al transcrito menor de 2.0 kb, el cual es más abundante que el de 3.7 kb (17). También se ha sugerido en este modelo que algún tipo de procesamiento regulatorio complejo es responsable del nivel desigual de los productos de transcripción. No se sabe todavía si estos niveles también varían de acuerdo con el estadio de la infección (56).

Como se ha dicho, la glicoproteína principal de la cápsida (gpMAL2), de 88 kDa, es expresada intracelularmente y sobre la superficie celular, y tiene la posibilidad de formar homodímeros no covalentes (45). La proteína menor, pMAL3, codificada por el

MAL3, es una proteína no glicosilada de 13.5 kDa expresada intracelularmente y no muestra ningún procesamiento importante.

El patrón de glicosilación de una glicoproteína refleja el comportamiento celular a través del cual ha pasado durante su síntesis y procesamiento. Los resultados con la gpMAL2 en este estudio muestran que es completamente sensible a la endoglicosilasa H y, en consecuencia, contiene solamente residuos con abundante manosa. Estas estructuras son sintetizadas en el retículo endoplásmico y el compartimiento *cis* Golgi (58). Así, parece que el procesamiento de la MAL2 ocurre en el retículo endoplásmico y que la proteína es subsecuentemente transportada a la superficie celular, bien directamente o a través del compartimiento *cis* Golgi. Consistente con esto, la localización por inmunofluorescencia mostró que la pMAL2 era expresada tanto en la superficie celular como en el citoplasma. Se ha descrito aquí que las subunidades de la pMAL2 pueden homodimerizarse mediante interacciones no covalentes. Muchos de los virus de ARN de cadena positiva se replican y se ensamblan sobre superficies membranosas y utilizan una proteína de la cápsida que se une al ARN (59). La pMAL2, bastante básica (pI~10.3) en su mitad hacia el extremo amino, puede servir bien para el propósito (56). Aunque la estrategia de replicación del VHE no ha sido trabajada, tal propuesta se ajustaría bien al modelo propuesto por Reyes y colaboradores (56). Aún no está claro qué peso tiene la glicosilación de la pMAL2 sobre la superficie celular, su localización y en el ensamblaje de la cápsida nuclear del VHE.

Hasta ahora no hay evidencias de que el VHE contenga una membrana lipídica. Está propuesto que la proteína pMAL2 es el constituyente principal de la cápsida nuclear del VHE, que se ensambla en la membrana citoplasmática (45). Alguna parte del ensamblaje de la cápsida puede ocurrir también en asociación con el retículo endoplásmico, como han propuesto Reyes y colaboradores (56), pero el ensamblaje y/o maduración final tienen que ser citoplasmáticos para participar en la encapsidación del ARN genómico. En la membrana citoplasmática, la cápsida nuclear se autoensambla con el ARN

genómico de cadena positiva del VHE. No está claro si el ARN viral es un requerimiento absoluto para el ensamblaje de la cápsida nuclear, ya que Tsarve y colaboradores (15) han mostrado que la pMAL2 expresada por células de insectos en un vector de *Baculovirus* también es capaz de producir partículas en forma de virus. Tampoco está claro qué papel desempeña la pMAL3 en el ensamblaje de la cápsida nuclear viral, si es que tiene alguno. En ausencia de cultivo de tejidos o de un sistema de transfección de ARN genómico para el VHE, se trata de responder algunas de estas interrogantes utilizando el sistema de expresión en células COS-1.

Antígenos virales.

El VHE codifica antígenos reactivos en IME, EIA, Western blot e inmunofluorescencia. La IME fue la primera técnica con la cual fue identificado el agente y la primera prueba utilizada para detectar anticuerpos anti-VHE (16). Parecen existir epítopes principales cercanos a los extremos carboxilos de la pMAL2 y de la pMAL3 (36). Los epítopes del extremo carboxilo de la proteína pMAL2 son bastante conservados entre las cepas más distantes genéticamente del VHE (Birmania y México) (36). En contraste, los epítopes del extremo carboxilo de la pMAL3 comparten sólo un 73.5% de similitud entre dos cepas (36). De tal modo que no es sorprendente que las pruebas serológicas basadas en secuencias del extremo 3' del MAL2 sean ampliamente reactivas, mientras que las pruebas que contienen secuencias del extremo 3' del MAL3 pueden ser más específicas de cada cepa (60-62), aunque se han reportado excepciones (12, 63).

El mapeo de los epítopes B lineales de las proteínas codificadas por los tres MAL del VHE por el método de Geysen (64), reveló 12 de tales epítopes en la pMAL1, tres en la pMAL2 y uno en la pMAL3 (61). Similarmente, el mapeo de las proteínas pMAL2 y pMAL3 con péptidos sintéticos más largos en pruebas estándares de EIA, confirmaron algunos de esos epítopes pero no todos, lo que sugiere que los epítopes conformacionales pueden ser importantes en las respuestas inmunes al VHE (65). Otro estudio que

A Quintana-González.

avala esta afirmación, fue el trabajo realizado por Li y colaboradores en 1997 (66), en el cual demuestran la existencia de epítopes conformacionales en el extremo carboxilo del MAL2, los cuales fueron reconocidos por sueros de fase aguda y convaleciente a partir de pacientes infectados con hepatitis E.

Se han desarrollado pruebas diagnósticas basadas en péptidos sintéticos (12, 60, 67-69), pero también se han utilizado los antígenos derivados del MAL2 expresados en *Escherichia coli*, células de insectos o *Baculovirus* para la detección de anticuerpos anti-VHE (15, 46, 61, 69, 70-75). Las pruebas de Western blot, aunque aparentemente específicas, fueron algo menos sensibles que el EIA para detectar anti-VHE en algunos pero no en todos los estudios (46, 65, 69). El MAL2 completo ha sido expresado en células de insectos (61) y, al menos una parte del antígeno, expresado como partículas en forma de virus (15). Este antígeno expresado es más sensible que los sistemas análogos basados en antígenos expresados en *E. coli*, cuando se incorpora en un EIA (15, 76). Sin embargo la especificidad de los mismos es todavía discutida, ya que usando dichos sistemas se han obtenido altos niveles de reactividad en regiones no endémicas de la enfermedad (77).

Panda y colaboradores (46) expresaron los MAL2 y 3 de una cepa india en *E. coli*, como fusiones en el extremo amino de epítopes hexahistidina. Las proteínas purificadas se utilizaron entonces en una prueba de inmunoblot para evaluar la presencia o no de anticuerpos en sueros de individuos de un área de alto nivel de endemidad del VHE. Se encontró que los anticuerpos anti-pMAL2 eran inespecíficos y no pudieron ser correlacionados con la enfermedad clínica. Sin embargo, hallaron que la IgM anti-pMAL3 era específica para la presencia de la enfermedad aguda. Estos hallazgos tienen ramificaciones prácticas para el desarrollo de pruebas diagnósticas contra el VHE.

Recientemente, Anderson y colaboradores (14) desarrollaron un EIA basado en una proteína recombinante expresada en *E. Coli* fusionada a la proteína de fusión "Glutathione S-transferase (GST)", denominada GST-ORF2.1, la cual presenta un

epítipo conformacional altamente conservado e inmunogénico. La proteína truncada representa los últimos 267 aminoácidos del extremo carboxil terminal del MAL 2 y permite una óptima y adecuada detección de anticuerpos de clase IgG humanos anti-VHE presentes en la fase convaleciente. Ha mostrado altos niveles de sensibilidad y especificidad, cuando se ha evaluado el ensayo en regiones endémicas y no endémicas de hepatitis E, con sueros de pacientes que padecían hepatitis A, B y C, y sueros de paciente con enfermedades no relacionadas y enfermedades autoinmunes.

Serotipos.

Aunque se ha identificado una heterogeneidad genética entre cepas del VHE, las evidencias de heterogeneidad serológica son limitadas y han sido detectadas, inicialmente, con antígenos expresados por el MAL3 (36, 62, 65). Los experimentos de reto cruzado en primates con las más diversas cepas del VHE demostraron protección cruzada tras la infección (15, 19, 21, 22, 27, 78-83). Así, con una sola posible excepción, todas las cepas del VHE estudiadas hasta la fecha parecen constituir un serotipo único. La excepción es un agente similar al VHE asociado a la HNANB diseminada por el agua en una epidemia en Siberia (84). Partículas parecidas a virus, indistinguibles morfológicamente del VHE, reaccionaron por IME sólo con sueros agudos y convalecientes de casos de la epidemia, y no con sueros comparables de casos de hepatitis E de otros lugares. Las partículas en forma de virus encontrados en Siberia podrían corresponder a un virus diferente. Por lo menos otra epidemia de hepatitis difundida por el agua que no fue causada por el VHA ni el VHE ha sido documentada, pero el virus no fue visualizado y no se conoce nada sobre su naturaleza (85).

Una cepa atípica del VHE ha sido reportada en el norte de la India (86). La naturaleza atípica de esta cepa se basa principalmente en su comportamiento termoestable. Sin embargo, el ARN del VHE amplificado por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) mediante el empleo de sondas basadas en secuencias prototipo del VHE, fue

detectado en la bilis de monos infectados, así como también en heces del voluntario de ese estudio.

Presumiblemente, la respuesta inmune detectada por IME está dirigida contra epítopes de la proteína de la cápsida, que se cree son expresadas por el MAL2 y posiblemente contra el producto génico del MAL3, cuya función se desconoce (24). En otros estudios la unión de anticuerpos humanos anti-VHE al antígeno del VHE en hígado fue bloqueada por el antígeno expresado por el MAL2, lo que indica que el anticuerpo estaba dirigido contra la proteína atribuida a la cápsida (11). Se sospecha muy seriamente la importancia de epítopes conformacionales en la inmunología de las infecciones por el VHE (87). Similarmente, se identificaron anticuerpos neutralizantes al VHE, conjuntamente con el reporte de una propagación de este virus en cultivo celular. Pero se espera confirmación antes de que pueda evaluarse la significación de este hallazgo (26, 88-89).

Rango de hospederos.

Cierto número de especies de primates han sido utilizados para estudios de transmisión del VHE. Los primates son susceptibles a la infección con VHE, los cuales incluyen especies del viejo mundo, como chimpancés, macacos (*cynomolgus rhesus* y monos de cola de cerdo) y monos verdes africanos, y especies del Nuevo Mundo, tales como tamarines, monos lechuza y monos ardilla (15, 11, 19, 21, 90). De estas, las más útiles han sido los monos *cynomolgus* y *rhesus*. El VHE ha sido transmitido a primates, tanto por vía intravenosa (91) como por vía oral (92), pero esta última es menos sensible (76). Se ha encontrado que la infección oral de primates con el VHA es también menos sensible que la inoculación intravenosa (24).

El curso de la infección experimental en primates es similar al del hombre. El período de incubación es generalmente de 3 a 8 semanas, aunque también se han observado períodos distintos de incubación (15, 21, 91, 93). La elevación de las enzimas es usualmente unimodal, pero se han reportado también curvas bimodales (15, 9, 21, 91, 93, 94). La viremia pico y el pico de liberación del VHE en las heces ocurre

durante el período de incubación y de enfermedad aguda temprana (16, 22, 94, 95). La detección de antígenos del VHE en el hígado es generalmente paralela con la viremia y la liberación fecal (95). La replicación del VHE en el hígado ha sido demostrada mediante la detección de la cadena negativa del ARN del VHE en los hígados de los monos *rhesus* infectados experimentalmente (96). Los cambios histopatológicos en el hígado corren paralelos con las evidencias bioquímicas de hepatitis, con resolución en todos los casos. Como en la hepatitis A, la respuesta inmune de primates a la hepatitis E aparece tarde en el período de incubación o durante la fase aguda de la enfermedad y se caracteriza por una respuesta vigorosa de la IgM y la IgG anti-VHE. La viremia puede persistir por algún tiempo después de la aparición de los anticuerpos séricos, lo que sugiere la presencia de inmunocomplejos (82). Se ha detectado anti-VHE adquirido naturalmente en monos *cynomolgus* capturados (9), cautivos (24) y, recientemente, en ganado (vacas, ovejas y chivos) (97), lo cual sugiere que puede ocurrir la diseminación zoonótica del VHE.

También se han reportado como susceptibles a la infección por VHE los cerdos (98) y los ratones (99). Resulta interesante observar que los cerdos infectados experimentalmente, al contrario de los primates, se ponen ictericos, lo que sugiere que la enfermedad fue relativamente severa. El VHE se detectó también por IME en la sangre de 5 de 23 ratas y ratones salvajes atrapados en la cercanía de un brote de hepatitis E en Kirguizia (99). La infección experimental de ratas de laboratorio con el VHE también se ha reportado (100). Se observaron cambios histopatológicos y/o antígenos virales en el duodeno, el bazo y en los ganglios linfáticos mesentéricos y en células mononucleares periféricas de la sangre de estas ratas. Ello sugiere que la replicación del VHE en ratas ocurre en estos tejidos al mismo tiempo que ocurre en el hígado (100).

Estas cepas del VHE en animales fueron diferentes de las previamente conocidas, pero genéticamente estuvieron muy relacionadas con las nuevas cepas del VHE identificadas en humanos en

A Quintana-González.

las mismas regiones donde fueron aisladas.

Propagación en cultivo celular.

La replicación del VHE en cultivos celulares ha sido reportada para cepas del VHE procedentes de Pakistán, Marruecos (89, 101, 102), China (37, 38) y Rusia (39). Las cepas pakistání y marroquí fueron aisladas eficientemente en la línea celular PLC/PRF/5, donde el ARN viral pudo ser detectado en las células y en el sobrenadante celular durante tres semanas o más. La cepa china fue recuperada en células diploides humanas de pulmón embrionario y produce efecto citopático. El virus fue neutralizado con sueros de fase aguda, pero no con sueros de casos convalecientes de hepatitis E (39). Sin embargo, no se han reportado intentos independientes para confirmar estos resultados.

El aislamiento ruso fue recuperado en cultivo celular por cocultivo de células FRhK4 con células primarias de riñón de mono *cynomolgus*, obtenidas durante la fase aguda de la infección por VHE en un mono infectado experimentalmente. El virus no produjo efecto citopático, pero la infección crónica de las células se detectó por hibridación, mediante Dot blot, con un clon del VHE y por inmunofluorescencia directa e indirecta con sueros de casos convalecientes de hepatitis E (39). El aislamiento en cultivo de tejidos de la cepa rusa del VHE tampoco ha sido confirmado independientemente.

También se ha reportado la replicación del VHE en cultivos primarios de hepatocitos de monos *cynomolgus* (103). El ARN genómico y antígenómico del VHE se detectó por inmunofluorescencia en cultivos inoculados con suspensión de heces que contenían VHE. La infección por VHE de cultivos fue prevenida por neutralización con sueros que contenían anticuerpos anti-VHE, pero no con suero normal. La propagación de la cepa del VHE 87A, aislada en células 2BS a partir de un paciente con hepatitis E, ha sido reportada en células A549 (37), en la que se observó un marcado efecto citopático. Se encontró que el tamaño de este virus era de 30 nm de diámetro. Más aún, se detectó, por amplificación mediante RCP, el ARN del VHE de sobrenadantes

de diferentes países del virus.

Recientemente, se ha desarrollado un sistema de cultivo celular que utiliza una formulación de medio libre de suero para propagar el virus *in vitro* (104, 105). Se aislaron hepatocitos a partir de hígados de macacos *cynomolgus* infectados experimentalmente con un inóculo de VHE (cepa de Birmania) y se mantuvieron en cultivo a largo plazo. Durante el curso de los experimentos se detectaron en estos hepatocitos bandas de ARN del VHE, tanto de sentido positivo como replicativas de sentido negativo, mediante un ensayo de transcripción inversa (TI) seguida de una RCP con alta especificidad de banda. Se detectó también la banda positiva de ARN genómico en el medio de cultivo, lo que sugiere la producción y secreción de partículas virales del VHE. Las partículas del virus fueron concentradas exitosamente 200 veces, a partir del medio, a través del empleo de ultrafiltración y pudieron observarse por IME utilizando suero inmune positivo anti-VHE (104).

Patogénesis.

En circunstancias ordinarias no se conoce que alguno de los virus de las hepatitis sea directamente citopático a los hepatocitos. Las evidencias sugieren que las manifestaciones clínicas y la evolución después del daño hepático agudo asociado con la hepatitis viral, quedan determinados por la respuesta inmunológica del hospedero (106).

Como los ensayos serológicos para el VHE son de reciente disponibilidad, la patogénesis de la hepatitis E no se comprende bien. Sin embargo, se cree que el virus entra al hospedero por vía oral, mediante el agua de beber contaminada y el contacto de persona a persona. El sitio primario de replicación no ha sido identificado, pero se presume que sea en el tracto digestivo. No está claro cómo el virus alcanza el hígado, pero ocurre presumiblemente por la vena porta. Se replica en el citoplasma de los hepatocitos (107) y es liberado en la bilis y la sangre por mecanismos que aún no se comprenden totalmente. Basado en un estudio limitado de infección oral de un voluntario, la viremia se detectó por primera vez el

Virus de la hepatitis E.

día 22 después de la exposición y una semana antes de la aparición de los síntomas, el día 30 (108). Se encontraron partículas en forma de virus por IME en las heces 34 días después de la exposición. Los valores de las enzimas hepáticas hicieron pico el día 46. Los anticuerpos anti-VHE se detectaron primero el día 41 y eran todavía detectables dos años después. Similarmente, en otro estudio más reciente en un voluntario, el VHE se detectó por IME el día 28, y los niveles de enzimas hepáticas hicieron pico aproximadamente el día 42 (16). Los voluntarios de ambos estudios se recuperaron desde los puntos de vista clínico y bioquímico.

La respuesta inmune y el patrón de viremia en pacientes en un entorno humano natural han sido estudiados recientemente (109, 110). Sobre la base de estos hallazgos y de los datos obtenidos del estudio de un voluntario humano (108), se ha propuesto un perfil generalizado de la infección natural de hepatitis E. La viremia y liberación del virus en las heces ocurre en la fase preictérica y dura hasta 10 días en la enfermedad clínica. Ambos tipos de anticuerpos contra el VHE, IgM e IgG, se detectan temprano en el curso de la enfermedad. La IgM anti-VHE permanece hasta 6 meses y desaparece a partir de entonces, mientras que la IgG anti-VHE es de larga duración y quizás de naturaleza protectora (111). En algunos pacientes, en ausencia de seroconversión, se ha notado una viremia retardada (109, 110). Parece que esta seroconversión puede ser crítica para el temprano aclaramiento del virus del torrente sanguíneo y es un rasgo que requiere un análisis más extenso. Recientemente, también se observó una viremia retardada similar en cerca del 10% de los pacientes esporádicos de hepatitis E (112). De este modo, parece que la infección por VHE no resulta de una persistencia limitada en una parte de los pacientes, lo que indica que el VHE puede ser, además, transmitido parenteralmente en áreas endémicas (110, 113-118).

La severidad de las infecciones por VHE es algo mayor que la de las infecciones por VHA. La mortalidad de la hepatitis E varía ampliamente, pero ha sido tan alta como 1%, comparada con 0.2% con la hepatitis A (24). Sin embargo, uno de los rasgos

clínicos distintivos de la hepatitis E es la incrementada incidencia y severidad en mujeres gestantes (119). En contraste, ninguno de los otros 4 virus reconocidos causa hepatitis severa durante el período de gestación (24).

Curso clínico.

Los rasgos clínicos de la hepatitis E se muestran en el cuadro 1. La enfermedad clínica en los humanos es típica de las hepatitis virales. Sin embargo, la colestasis es un rango predominante en 20% de los pacientes y debe ser diferenciada de la obstrucción de los grandes conductos biliares (12). El hígado parece ser el órgano diana para la infección, y las manifestaciones extrahepáticas han sido raras.

Cuadro 1
Características clínicas.

Período de incubación: 2-9 semanas (6 semanas como promedio).

Enfermedad autolimitada; no se han observado casos de hepatitis crónica.

Alta mortalidad entre mujeres gestantes.

Alta tasa de infección entre adultos jóvenes y de edad media.

El período de incubación fluctúa entre 15-50 días y, en el caso de un voluntario humano, los síntomas clínicos se desarrollaron a los 36 días después de la ingestión de muestras con infección fecal (36). La fase preictérica dura entre 1 y 10 días (promedio: 3-4 días) y los síntomas gastrointestinales, tales como el dolor epigástrico, náuseas y vómitos, se reportan con frecuencia.

La fase ictérica comienza abruptamente con la aparición de íctero, orina oscura y heces de color de arcilla. En los casos no complicados esto dura de 12 a 15 días, y la recuperación es total, usualmente tiene lugar en un mes. Cerca de la mitad de los pacientes desarrollan fiebre y 2/3 se quejan de artralgias. Las pruebas de función hepática son indicativas de necrosis hepática. Los estudios clínicos han demostrado que la elevación de los niveles de alanina aminotransferasa

A Quintana-González.

(ALAT) sérica ocurre como un pico único, que precede o coincide con el comienzo de la ictericia (9, 10, 12, 110, 120), la cual es similar a las otras formas de hepatitis, aunque ha sido también observado en algunos pacientes un patrón bifásico de elevación de las enzimas (109). Hasta ahora no se ha reportado que la infección por VHE conduzca a la cronicidad (121). Sin embargo, la persistencia de la IgM anti-VHE, por lo menos por 21 meses en un caso (63), y la viremia prolongada (42-112 días) en por lo menos 4 pacientes, ha sido reportada con la liberación fecal hacia la séptima semana de la enfermedad, bastante después de la recuperación clínica y bioquímica (112). Tan prolongada liberación puede ser responsable de la contaminación de las fuentes de agua y de la enfermedad epidémica o esporádica.

Hepatitis E y embarazo.

La hepatitis E icterica ocurre más comúnmente y con más severidad en mujeres gestantes (119). De hecho, la principal causa de mortalidad en la enfermedad epidémica es la alta tasa de hepatitis fulminante en las gestantes. Una severidad incrementada de la hepatitis viral en mujeres gestantes ha sido reportada en el subcontinente Indio, Irán, y muchos otros países en desarrollo (122, 123). Los datos recolectados en un brote de hepatitis E en Cachemira (119), mostraron que la frecuencia de la hepatitis era mayor en mujeres gestantes que en no gestantes o que en hombres. La enfermedad grave, en forma de insuficiencia hepática fulminante también se desarrolla más a menudo en las mujeres en gestación que en las que no lo están o que en hombres. La hepatitis fulminante se desarrolló exclusivamente en el tercer trimestre. El estado nutricional de las mujeres en el área afectada por el brote, o el de las mujeres que desarrollaron insuficiencia hepática fulminante, fue también evaluada como bueno. Se encontró que la mortalidad general en las mujeres en gestación era de 20% (119).

Similares altas tasas de mortalidad en gestantes infectadas, han sido observadas en casi todas las epidemias de hepatitis E (3, 110). La muerte se produce, usualmente, como consecuencia de

encefalopatía, diátesis hemorrágica o insuficiencia renal. Además, se ha observado que, a diferencia de otros virus de hepatitis, es común que el VHE cause infección intrauterina, así como también una sustancial morbilidad y mortalidad perinatal (124).

Aunque el mecanismo asociado con la patogenia de la hepatitis fulminante en la infección por VHE no es conocido, se ha notado una alta incidencia de coagulación intravascular diseminada, asociada con la enfermedad en mujeres gestantes. Se ha propuesto una hipótesis para la patogenia de la hepatitis E fulminante en gestantes (4). Brevemente, la hipótesis es como sigue: daño por el virus a las células sinusoidales, particularmente a las de Kupffer, lo que disminuye su habilidad para proteger los hepatocitos contra las endotoxinas originadas por las bacterias Gram negativas del tracto intestinal; daño directo de los hepatocitos por las endotoxinas; y daño secundario mediado por la liberación de eicoconosoides, que conduce a una atracción quimiotáctica de neutrófilos mediada por prostaglandinas, y edema y colestasis mediados por leucotrienos. La mayor sensibilidad de las mujeres gestantes ante tal efecto mediado por las endotoxinas, está bien reconocida y podría explicar la mortalidad de la hepatitis E durante el embarazo (4).

Diagnóstico.

Hasta hace poco, los métodos usados para el diagnóstico de hepatitis E eran la IME y la prueba de bloqueo de anticuerpo fluorescente. Estos dos métodos son problemáticos y están disponibles sólo en unos pocos centros especializados, además de ser poco sensibles. La RCP, por su parte, es un método muy sensible y específico, y puede detectar el genoma viral en la bilis, la sangre, el hígado y las heces. Sin embargo, el método, que surgió como una herramienta de investigación, es caro y no puede utilizarse para el diagnóstico de rutina. El inmunoensayo enzimático es el método más conveniente y fácilmente disponible para la detección de la IgM y la IgG anti-VHE. La IgM anti-VHE se mantiene como marcador de elección para diagnosticar infección aguda, mientras que la IgG anti-VHE se utiliza para estudios

seroepidemiológicos.

Inmunomicroscopía electrónica.

La IME permite detectar partículas en forma de virus de 27-34 nm directamente de las heces de un paciente infectado. El suero de la fase aguda ha sido más reactivo que el de convalecientes, con esta técnica. La IME, aunque muy específica, tiene un número de desventajas como medio de diagnóstico (131), ya que requiere un observador altamente entrenado, suficiente tiempo, y grandes cantidades de antígeno y anticuerpo. Además, el virus, con frecuencia, se libera en heces en forma degradada y se encuentran muy pocas partículas en forma de virus (19, 22). De hecho, en un estudio de 2 200 muestras de heces obtenidas de casos de hepatitis E en distintas regiones geográficas del mundo, sólo dos muestras contenían un número adecuado de partículas en forma de virus de 27-34 nm (16, 22).

Reacción en cadena de la polimerasa.

La clonación del VHE, la secuenciación del genoma viral y la expresión de proteínas recombinantes del VHE facilitaron un progreso significativo en el desarrollo de métodos para la identificación de la infección por VHE en pacientes y animales de experimentación. La detección de secuencias genómicas amplificadas del VHE por TI-RCP, ha sido la principal contribución para el avance en el progreso de la comprensión del patrón de la enfermedad y de las características moleculares del VHE (1, 110, 112, 113, 134-136). Se identificaron las regiones variables y conservadas de la secuencia del VHE (137, 138), pero no se ha discernido aún una región para la amplificación preferencial.

Se han podido identificar secuencias de ARN del VHE en heces y muestras de suero de pacientes y primates infectados experimentalmente (1, 108-110, 112, 113, 135, 136, 139). Las secuencias amplificadas del VHE fueron las localizadas en una región atribuida a la polimerasa del MAL1 o del extremo 3' del MAL2. Recientemente, se han usado los cebadores "random" para la transcripción inversa de los ARN virales que son extraídos de las muestras clínicas estudiadas, y

seguidamente se realiza una RCP con cebadores degenerados, diseñados para amplificar una región de indentidad del MAL1 y MAL 2 de las cepas de Birmania, Pakistán, México y de los aislamientos de Estados Unidos (38, 40). El empleo de estos nuevos cebadores en la amplificación de ARN viral ha permitido detectar nuevas cepas del VHE en nuevas regiones geográficas del mundo.

Todo este desarrollo en las técnicas y tecnologías aplicadas a la biología molecular ha permitido esclarecer muchos aspectos alrededor de la epidemiología del VHE, sobre la cual todavía quedan muchas incógnitas.

Ensayos inmunoenzimáticos.

Las proteínas recombinantes del VHE derivadas de aislamientos de Birmania, de México o de China, han sido utilizadas en inmunoensayos anti-VHE tales como Western Blot o inmunoensayos enzimáticos (EIA) (14, 61, 70, 75, 130, 139, 140). Se ha usado la proteína de fusión C2, expresada a partir de un fragmento de 1700 bases de ADNc del MAL2, en un ensayo de Western blot para medir los isotipos de IgG e IgM anti-VHE en pacientes y animales infectados experimentalmente (72). Se encontró que la proteína C2 contiene epítopes con reacción cruzada con la IgG o la IgM anti-VHE (o ambas) en sueros de fase aguda de pacientes de hepatitis E de los brotes de Birmania, México y Somalia, y en un paciente de Grecia (72). Se utilizó también el Western blot anti-VHE para el estudio de brotes y de casos esporádicos de hepatitis E en las repúblicas centroasiáticas de Tadjikistán, Turkmenistán, Kirguistán y Uzbequistán (72), hallándose aproximadamente un 90% de casos positivos. En el mismo estudio se identificaron casos esporádicos de hepatitis E (76%) entre un pequeño número de casos de las repúblicas centroasiáticas, donde la infección es endémica. Se utilizó también el ensayo de Western blot para la identificación de la hepatitis E entre casos agudos esporádicos de hepatitis en niños que vivían en una región urbana de Sudán (70). Se observó IgM anti-VHE en 59% de los casos estudiados, mientras que se encontró IgG anti-VHE en 67% de los casos de hepatitis E diagnosticados

A Quintana-González.

sobre la base de la presencia de anticuerpos de IgM. Sin embargo, cerca de 8% de los pacientes sin evidencias de enfermedad hepática incluidos en el grupo control, fueron también positivos para IgM anti-VHE.

Recientemente, se han desarrollado diversos EIA de fase sólida para la detección de anticuerpos de los tipos IgM e IgG contra el VHE, utilizando antígenos recombinantes del VHE expresados en *E. Coli* o *Baculovirus* a partir del MAL2 y del MAL3 de aislamientos de China, Birmania, México y Paquistán (14, 15, 36, 61, 72). Se ha demostrado la especificidad de los EIA que utilizan antígenos recombinantes, ya que 98% de las muestras (378 de 386), obtenidas de una región considerada como no endémica para la infección por VHE, resultaron negativas para anticuerpos contra el VHE, mientras que de 151 muestras obtenidas de los brotes del VHE en Somalia, se encontraron 125 reactivas (122 también fueron encontradas positivas con péptidos sintéticos), lo que indica una concordancia de aproximadamente 98% (12). También haciendo uso de antígenos recombinantes se identificó IgG e IgM anti-VHE en pacientes de una epidemia en Cachemira (141), y entre casos de HNANB aguda esporádica infantil en Egipto (130).

La proteína recombinante ORF 2.1, representando los últimos 267 aminoácidos de la cápsida viral del VHE de una cepa china es fusionada a la proteína transportadora GST, lo que permite que se exprese un epítipo conformacional altamente inmunogénico y conservado. La especificidad y sensibilidad de este ensayo han sido evaluadas, usando muestras provenientes de diferentes regiones geográficas y de zonas endémicas y no endémicas de la enfermedad. Además, se analizaron sueros provenientes de pacientes con enfermedades clínicamente similares y enfermedades autoinmunes, mostrando valores de especificidad y sensibilidad mayores de un 96%. Los resultados obtenidos en estudios de prevalencia de anticuerpos IgG anti-VHE usando este sistema, han demostrado su concordancia con otros sistemas ya reportados y con la elevada reactividad de las muestras en zonas endémicas (14, 17).

Además de los antígenos recombinantes, en los sistemas de EIA se usan también péptidos sintéticos basados en las secuencias de distintas regiones del genoma viral (13, 60, 62, 142).

La clonación del VHE y la disponibilidad de EIA para la detección de IgM e IgG anti-VHE han abierto una brecha importante en la comprensión de la epidemiología y curso clínico de la hepatitis E. Sin embargo, se ha observado que las actuales pruebas diagnósticas para hepatitis E no son las óptimas (143). Pueden ocurrir falsos positivos y negativos, como era el caso con las pruebas de anticuerpos de primera generación para la hepatitis C. Aunque hay un alto grado de homología (nucleótidos 93%, aminoácidos 99%) entre secuencias del VHE de aislamientos de Paquistán y Birmania (143), la homología entre los aislamientos de México y Birmania es menor. La homología nucleotídica de las proteínas codificadas por el MAL2 y el MAL3 es de 79.8 y 78.5%, y la aminoacídica, 90.5 y 73.5%, respectivamente (17). Además, se ha reportado una importante delección de una cepa india de 246 pb en el MAL3 sin que afecte el frente de lectura (50). Así, el uso de antígenos del VHE de un MAL o de un aislamiento puede conducir a resultados falsos negativos. En consecuencia, parece imperativo que se incorporen múltiples antígenos del VHE de más de un aislamiento en los EIA de anti-VHE para el diagnóstico de hepatitis E en diversas áreas geográficas.

No hay patrón ideal para el chequeo de los actuales EIA anti-VHE. La liberación de virus y la viremia son transitorias y solamente pueden ser detectadas mediante la RCP. La comparación directa entre la reactividad con antígenos del VHE recombinantes y los péptidos sintéticos correspondientes, mostró que una proporción menor de sujetos sanos reaccionó contra los péptidos sintéticos en las pruebas de IgG anti-VHE, lo cual sugiere que los EIA que utilizan antígenos recombinantes del VHE pueden dar resultados falsos positivos (12). Comparaciones similares no se han realizado en los EIA de IgM anti-VHE.

Los EIA son las pruebas para el diagnóstico de rutina más convenientes, baratas y útiles para la

infección por VHE, así como para los estudios seroepidemiológicos. Se espera mejorar la sensibilidad y especificidad de estas pruebas con la disponibilidad de pruebas de segunda y tercera generación.

Epidemiología.

El virus de la hepatitis E causa grandes brotes de hepatitis viral en países en desarrollo, que involucran decenas de miles de casos. La enfermedad es causa de considerable mortalidad y morbilidad, y plantea un problema principal de salud a escala nacional en regiones endémicas. Las epidemias diseminadas por el agua ocurren en brotes unimodales, con una curva de incidencia altamente comprimida o epidemias más prolongadas con múltiples picos de incidencia (12, 133).

La primera epidemia reportada de hepatitis E ocurrió en Nueva Delhi, India, en 1955, cuando 29000 casos de hepatitis icterica se identificaron después de la contaminación fecal ampliamente diseminada del agua de beber de la ciudad (126). Otra epidemia de hepatitis difundida por el agua ocurrió en Cachemira, en 1978, e involucró a 16 000 personas (12). Se han documentado otras epidemias en numerosas regiones de la India (113, 135, 139, 144-146).

También se han observado presuntas epidemias de hepatitis E en la República de Kirguizia, en la antigua Unión Soviética, entre 1955 y 1956 (147). Epidemias epidemiológicamente similares a la hepatitis E también se han reportado en el sudeste asiático, incluyendo a Birmania (148) y Nepal (127, 149, 150). El mayor brote que involucró a 120 000 casos, se documentó en el sur de la región Xianjiang Uighur entre septiembre de 1986 y abril de 1988 (151, 152). La misma involucró 23 condados y ciudades, y persistió durante 20 meses, con dos picos epidémicos.

También se han reportados brotes de hepatitis E en varios países de África (88, 107, 128, 153), pero estas epidemias no están confinadas solamente a los continentes de Eurasia y África, sino que también se han registrado en el continente Americano. Se han reportado brotes asociados con agua de beber contaminada fecalmente en Borneo y Ciudad de México (154, 155).

Distribución global.

La hepatitis E es una enfermedad determinada ecológicamente, prevalente en las regiones del mundo con bajo nivel socioeconómico, suministros de agua inseguros y pobres sistemas de alcantarillado. Es endémica en una región amplia, que comprende mucho del sudeste asiático (3), Asia central (156), África del norte, este y occidental (128), y el norte de América (154, 155). Las epidemias de mucha de estas regiones han sido confirmadas serológicamente como hepatitis E, así como ha ocurrido hepatitis E esporádica en muchas de estas mismas regiones (3, 21, 70, 85, 90, 107, 135, 141-144, 152, 157-159). De hecho, se cree que el VHE es la causa más común de hepatitis esporádica en regiones donde el virus es endémico. El virus de la hepatitis E también ha sido implicado en la etiología de la insuficiencia hepática fulminante esporádica en áreas endémicas (109, 160-162), así como en algunos países no endémicos (163-165).

No se ha reportado ningún brote de hepatitis E en los Estados Unidos, Canadá o en los países desarrollados de Europa y Asia. Sin embargo, la enfermedad en estos países ha sido descrita principalmente como importada (167-174). Aunque, han aparecido casos muy recientes en Europa y Estados Unidos, donde no se ha documentado la visita de dichos pacientes a regiones endémicas de la enfermedad en toda su vida o que hayan estado en contacto con personas provenientes de esas zonas (37, 38).

Seroprevalencia de hepatitis E.

El advenimiento de pruebas serológicas sensibles para el diagnóstico de la infección por el VHE, ha permitido, por primera vez, un análisis más completo de la distribución y la seroprevalencia de una infección por este virus a escala mundial. Sorprendentemente, la prevalencia de anticuerpos contra el VHE en algunas regiones endémicas sospechadas o documentadas ha sido menor que lo esperado (3 a 26%) (12, 17, 63, 109, 129, 153, 175), y la prevalencia de estos anticuerpos en regiones no endémicas ha sido mucho mayor que lo que se anticipaba (1 a 3%) (12, 13, 176). La prevalencia de anti-VHE en países donde el

A Quintana-González.

diagnóstico de hepatitis E es raro, si lo hay, se considera que es diez veces mayor que la prevalencia de anticuerpos contra el VHC en estos mismos países, donde el VHC produce 20% o más de las hepatitis clínicas. Este hallazgo de anti-VHE en poblaciones donde la hepatitis clínica del tipo E no parece existir, sugiere que la infección subclínica, ocurre en estas regiones o que las pruebas actualmente disponibles producen resultados no específicos en algunos casos.

Modo de transmisión.

Hay evidencias epidemiológicas convincentes de que la hepatitis E es una enfermedad diseminable por el agua. Las epidemias de hepatitis E ocurren cuando se espera que la contaminación sea máxima; por ejemplo, durante los meses de invierno (los niveles de agua que caen reducen la dilución de los contaminantes), y durante las fuertes lluvias de la estación monzónica (aumentan la posibilidad de contaminación fecal de las fuentes de aprovisionamiento de agua) (3, 126, 127).

Las epidemias en que se han aportado evidencias conclusivas de la contaminación fecal del agua fueron las de Delhi (127), Ahmedabad (3), Cachemira (12), Argelia (139) y Kampur (129). De hecho, con excepción de varias epidemias ocasionadas por alimentos en China (178-180), todas las epidemias de hepatitis E confirmadas serológicamente hasta la fecha han sido asociadas con agua contaminada fecalmente.

Se han detectado secuencias genómicas del VHE en las heces de pacientes afectados durante epidemias de hepatitis E (8, 113, 135, 159) y en un reporte, ARN del VHE en fuentes de agua de desecho tratadas y no tratadas probando la circulación y persistencia de este agente viral en la fuente de contaminación (181).

Se han relacionado epidemiológicamente casos probables de hepatitis E esporádica con el consumo de mariscos de concha y medicinas herbales no cocinados (178-180). Los factores de riesgo epidemiológico asociados con la mayoría de los casos esporádicos de hepatitis E, han sido difíciles de identificar.

A continuación de las epidemias usualmente no ocurren olas secundarias de hepatitis, lo que sugiere que la transmisión por contacto persona a persona no es un factor principal en la evolución de los brotes. Aunque, significativamente en algunas epidemias, se ha reportado una tasa superior de diseminación por contacto, estas epidemias han sido del tipo prolongada y durante meses después del término de la epidemia principal aparecieron nuevos casos de ictericia (146, 155). Sin embargo, las tasas de ataque secundario en todas las principales epidemias reportadas han sido significativamente menores, lo que indica que el modo de transmisión por contacto no es una vía importante de transmisión.

En un estudio se sugiere también la transmisión del VHE por las prácticas sexuales, que también facilitan la difusión de la infección por VIH en hombres homosexuales (182).

La infección relacionada con la transmisión parenteral de la hepatitis E es escasa y contradictoria y pocos reportes están disponibles para ser comentados.

En un experimento en voluntario humano, se detectó ARN de VHE en la fase preictérica y en los primeros días de la enfermedad icterica, lo que sugiere la posibilidad de transmisión esporádica del VHE en áreas endémicas por vía parenteral (108). La transmisión de la hepatitis E a monos *rhesus* por sueros mezclados de la fase aguda (90) y un brote hospitalario (183) -en el cual la enfermedad fue transmitida al personal médico que atendía el paciente de hepatitis E aguda- también apuntan hacia la posible transmisión parenteral de la enfermedad. La posibilidad es respaldada adicionalmente por la observación de que los anticuerpos del tipo IgG al VHE, marcadores de infección pasada, son más frecuentes en los receptores de transfusiones que en el mismo número de controles no transfundidos (184). También se encontró en pacientes franceses hemodializados una mayor prevalencia de anticuerpo comparado con donantes de sangre (185). La prevalencia de anticuerpos anti-VHE en drogadictos suizos fue también más alta, comparada con donantes de sangre (186). Sin embargo, un estudio sobre la presencia de

Virus de la hepatitis E.

anti-VHE en una cohorte de hemofílicos italianos, transfundidos de por vida con grandes cantidades de concentrados comerciales de factores de coagulación, reveló que ninguno de los hemofílicos estudiados tenía anti-VHE (187).

Aunque se han proporcionado evidencias, en algunos otros estudios (114-118), de que la hepatitis E puede ser difundida parenteralmente, los datos son preliminares para establecer una ruta de infección. Más aún, no se han reportado, hasta el momento, estudios de seroprevalencia desde áreas endémicas de la enfermedad dirigidos en este sentido.

La infección por VHE tiene una incrementada incidencia en mujeres gestantes, y durante las epidemias, la enfermedad icterica ocurre nueve veces más a menudo en las gestantes que en las no gestantes o que en los hombres. Hasta la fecha, hay sólo un estudio que ha establecido que el VHE se transmite de la madre infectada a su prole (124). Seis de los ocho niños nacidos de madres con manifiesta infección por VHE, tenían evidencias clínicas, serológicas o virológicas de infección por VHE. Dos de estos niños murieron.

Control y profilaxis.

Como la hepatitis E es una enfermedad determinada ecológicamente, su control depende de mejoras sanitarias, la apropiada disposición del albañal y el suministro de agua potable segura. También puede ayudar la educación masiva durante y entre los brotes, con la recomendación al público de seguir precauciones higiénicas apropiadas y el consumo de agua hervida. Como la morbilidad y la mortalidad se observa, principalmente en mujeres gestantes, durante las epidemias se debe dedicar especial atención a esta población.

Se ha demostrado que la gammaglobulina producida en países occidentales no es efectiva para la prevención de la hepatitis E en regiones donde la enfermedad es endémica. Los lotes de globulina empleados no fueron probados para detectar la presencia de títulos de anticuerpos anti-VHE. Aunque en las poblaciones de regiones donde el VHE es endémico, hay una prevalencia relativamente baja de

títulos de anti-VHE, quizás no es sorprendente que los lotes no seleccionados de inmunoglobulina normal puedan no contener cantidades protectoras de anti-VHE. Sin embargo, en un brote en Cachemira, el uso de globulina de suero inmune redujo considerablemente la mortalidad, cuando se utilizó en el tercer trimestre en las gestantes (3).

Debido a la disponibilidad de ensayos inmunoenzimáticos para anti-VHE, debe ser posible seleccionar unidades de plasma de donantes que contengan niveles de moderados a altos de anticuerpos anti-VHE. La gammaglobulina preparada a partir de estas mezclas puede ser efectiva para prevenir la diseminación adicional de la enfermedad en brotes potencialmente grandes de hepatitis E y puede ser usada como una medida preventiva (profiláctica) para individuos que viajan de áreas no endémicas a áreas endémicas, y en mujeres gestantes durante las epidemias en áreas endémicas.

La obtención de anticuerpos recombinantes ha abierto una muy nueva alternativa, en la producción de anticuerpos monoclonales humanos altamente específicos que pudieran proteger contra el VHE, a través de la inmunización pasiva de los pacientes. Aunque todavía se requiere de muchos más estudios para esclarecer su posible aplicación (188).

Vacunas.

La vacunación es importante para los países en desarrollo donde la hepatitis E es endémica y para los turistas. En el pasado reciente, varios casos individuales de insuficiencia hepática aguda relacionados con el VHE han sido descritos en Europa y los Estados Unidos en viajeros que retornaron de América del Sur y el sudeste asiático. Si consideramos que aproximadamente 250 000 000 de personas viajan de los países desarrollados a las áreas endémicas, la vacuna puede resultar necesaria. La infección por VHE también ha sido descrita en las tropas de la ONU en Somalia. La vacuna puede ser también útil en estas circunstancias. Sin embargo, en el presente no hay vacunas comercialmente disponibles para la prevención de la hepatitis E.

Hay pocos estudios sobre la duración de la

A Quintana-González.

respuesta inmune en la hepatitis E y la inmunidad de protección cruzada en humanos y animales de experimentación. Se ha demostrado que los anticuerpos contra el VHE son persistentes hasta dos años en un voluntario humano (108) y hasta catorce años en pacientes con infección epidémica por el VHE. Se presume que tales anticuerpos son de naturaleza protectora, ya que la población de pacientes estudiada no sufrió un segundo ataque de infección por VHE durante un período de estudio de unos catorce años (154).

En un estudio se mostró que la proteína de fusión trpE-VHE birmano protegió al macaco *cynomolgus* contra la evidencia bioquímica de hepatitis después del reto con aislamientos del VHE, tanto de Birmania como de México. Uno de los monos tenía evidencias de la multiplicación del virus, pero las lesiones hepatocelulares fueron prevenidas por la inmunización previa. Este hallazgo sugiere que un epítipo neutralizante común está presente en dos virus ampliamente divergentes y que una vacuna producida con una cepa del VHE debe proporcionar protección contra la infección con otras cepas (81). Observaciones similares han sido realizadas en otro estudio, en el que monos *rhesus* inoculados con un aislamiento viral indio fueron protegidos contra otras cepas distintas (79), lo que sugiere el efecto protector de los anticuerpos anti-VHE generados por y contra aislamientos del VHE genéticamente similares. También se ha demostrado la protección posterior a la infección en varios otros estudios (78-83, 189). Se demostró la protección cruzada después de la infección, entre las cepas esporádicas y epidémicas del VHE, por más de 17 meses en el modelo *rhesus* (189). Sin embargo, en un estudio en el que se utilizaron antígenos recombinantes estructurales del VHE, no se observó protección en los animales inmunizados (189). La durabilidad de los anticuerpos neutralizantes en humanos y animales infectados experimentalmente es aún cuestionada y sólo estudios adicionales a largo plazo, conducidos en primates o poblaciones humanas fácilmente accesibles, proporcionarán una importante respuesta a esta cuestión.

La composición antigénica relativamente sencilla

del VHE sugiere que debe considerarse el enfoque molecular para el desarrollo de una vacuna efectiva. La identificación de antígenos capaces de estimular la respuesta inmune protectora, puede realizarse más fácilmente a través de la clonación de los genes relevantes y su expresión en vectores apropiados. La inmunización con ADN plasmídico no replicativo, que codifique proteínas virales, puede ser ventajosa, ya que no involucra agentes infecciosos, no se requiere el ensamblaje de partículas virales y permite la selección del determinante. También se ha probado introducir dentro de los vectores secuencias de genes de citoquinas que potencian la respuesta inmune. Los estudios al respecto son muy prometedores, mostrando protección cruzada de monos *cynomolgus* contra cepas de diferentes regiones geográficas y títulos de anticuerpos protectores elevados, además de una muy buena respuesta celular (83, 190, 191).

Tratamiento.

No hay tratamiento específico de la hepatitis viral aguda típica; aunque puede requerirse la hospitalización para la enfermedad clínicamente severa; la mayoría de los pacientes no requiere cuidados hospitalarios. No es esencial el descanso forzado y prolongado en cama para la completa recuperación. Sin embargo, el tratamiento se da para el alivio de los síntomas que, a veces, son altamente estresantes (106). En consecuencia, a los pacientes se les recomienda, un reposo absoluto, comer solamente alimentos bajos de grasa y evitar sustancias que dañan el hígado (alcohol, drogas).

Esta terapéutica ha probado ser beneficiosa para el tratamiento de las hepatitis no complicadas y conduce rápidamente a la recuperación. En cambio, el propósito del tratamiento en las formas fulminantes de hepatitis es mantener las funciones vitales del paciente con la ayuda de la medicina intensivista. Aparte del trasplante, con todas sus complicaciones, no existen métodos curativos verdaderos en la actualidad médica para tratar a los pacientes con insuficiencia hepática fulminante.

AGRADECIMIENTOS.

A los profesores Ángel Goyenechea y Clara Savón

Virus de la hepatitis E.

por su exhaustiva revisión. A las doctoras Sonia Resik y Licel de los Angeles Rodríguez por sus señalamientos y opiniones. A Osmany Larralde por su apoyo moral e incondicional. A Tania Elena Pumariaga quien motivó la culminación exitosa de este documento.

REFERENCIAS.

1. Reyes GR, Purdy MA, Kim J, Luk K-T, Young LM, Fry KM, *et al.* Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247:1335-9.
2. Zuckerman AJ, Hepatitis E Virus: The main cause of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br Med J* 1990; 300:1475-6.
3. Khuroo MS. Hepatitis E: The enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Indian J Gastroenterol* 1991; 10:96-100.
4. Purcell RH, Ticehurst JR. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Epidemiology and clinical characteristics. En: Zuckerman AJ ed. *Viral hepatitis and liver disease*, Allan R Liss, Press, 1986:131-7.
5. Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Quart J Med* 1912; 6:1.
6. Gust ID, Lehmann NI, Lucas CR, Ferris AA, Locarini SA. Studies on the epidemiology of hepatitis A in Melbourne. En: Vyas GN, Cohen SN, Schmid R ed. *Viral Hepatitis: Contemporary assessment of etiology, Epidemiology, Pathogenesis and Prevention*. Philadelphia: Franklin Institute Press, 1978:105-12.
7. Frosner G, Willers H, Muller R, Schenzle D, Deinhardt F, Hopken W. Decrease in incidence of hepatitis A infections in Germany. *J Clin Study and Treat Infec* 1978; 6:259-60.
8. Zanetti AR, Ferroni P, Bastia A. Decline in incidence of hepatitis A infection in Milan. *Serology Study. Bullettino dell Istituto Sieroterapico Milanese* 1979; 57:816-20.
9. Balayan MS. Hev Infection: Historical perspectives, global epidemiology, and clinical features. En: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis M eds. *Viral hepatitis and liver disease*. New York: Williams and Wilkins, 1990:498-501.
10. Dienstag JL. Non-A, non-b, Hepatitis. 1. Recognition, epidemiology and clinical features. *Gastroenterology* 1983; 85:439-62.
11. Krawczynski K. Hepatitis E. *Hepatology* 1993; 17:932-41.
12. Khuroo MS. 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; 68:818-23.
13. Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavari KM. Epidemic and endemic hepatitis in India; Evidence for non-A, non-B type. *Lancet* 1980; ii: 876-9.
14. Ramalingaswami V, Purcell RH. Waterborne non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988; i: 571-3.
15. Arankalle VA, Ticehurst J, Sreenivasan MA, Kapikian AZ, Popper H, Pavri KM, *et al.* Association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988; i: 550-4.
16. Balayan MS, Andzjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginiski DM, Savinov AP, *et al.* Evidence of a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal oral route. *Intervirology* 1983; 20:23-31.
17. 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.
18. Fry KE, Tam AW, Smith MM, Kim JP, Luk KC, Young LM, *et al.* Hepatitis E virus (HEV): Strain variation in the nonstructural gene region encoding consensus motifs for a RNA-dependent ARN polymerase and an ATP/GTP binding site. *Virus Genes* 1992; 6:173-85.
19. Ticehurst J. Identification and characterization of hepatitis E virus. En: Hollinger BF, Lemon SM, Margolis HS eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore: Williams & Wilkins 1991:501-13.
20. Li D, Huang R, Tian X, Yin S, Wei J, Huang X, *et al.* Morphology and morphogenesis of hepatitis E virus (strain 87 A). *Chin Med J* 1995; 108: 126-31.
21. Bradely DW, Krawczynski K, Cook EH Jr, McCaustland KA, Humphrey CD, Spelberg JE, *et al.* Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Serial passage of disease in *Cynomolgus* macaques and Tamarins and recovery of disease associated 27 to 31 nm virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:6277-81.
22. Bradley DW, Andjaparidze A, Cook EH, McCaustland KA, Balayan M, Steler H, *et al.* Etiological agent of enterically transmitted non-A non-B hepatitis. *J Gen Virol* 1988; 69:731-8.
23. Bradley DW, Balayan MS. Virus of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988; 1:819.
24. Purcell RH, Hepatitis E virus. En: Fields BN, Knipe DM, *et al.* eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1996; 89:2831-43.
25. Markham R, Frey S, Hills GH. Methods for the enhancement of image detail and accentuation of structure in electron microscopy. *Virology* 1963; 20:88-102.
26. Favorov MO, Goldberg EZ, Gurov AV, Zairov GK, Lashina TL. Various physico-chemical properties of non-A, non-B hepatitis virus with the fecal-oral mechanism of transmission and specific diagnosis of the disease. *Vopr Virusol* 1989; 34:47-50.
27. Bradley DW. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990; 46:442-61.
28. Tsarev SA, Emerson SU, Reyes GR, Legters LJ, Malik IA, Iqbal M, *et al.* Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:559-63.

A Quintana-González.

29. Aye TT, Uchida T, Ma XZ, Iida F, Shikata T, Zhuang H, *et al.* Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nuc Acid Res* 1992; 20:3512.
30. Aye TT, Uchida T, Ma Xuezhung, Iida F, Shikata T, Ichikawa M, *et al.* Sequence and gene structure of the hepatitis E virus isolated from Myanmar. *Virus Genes* 1993; 7:95-110.
31. Bi SL, Purdy MA, McCaustland KA, Margolis HS, Bradley DW. The sequence of hepatitis E virus isolated directly from a single source during an outbreak in China. *Virus Res* 1993; 28:233-47.
32. Ichikawa M, Araki M, Rikihisa T, Uchida T, Shikata T, Mizuno K. Cloning and expression of cDNAs from enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis virus. *Microbiol Immunol* 1991; 35:635-643.
33. Yin S, Tsarev SA, Purcell RH, Emerson SU. Partial sequence comparison of eight new Chinese strains of hepatitis E virus suggests the genome sequence is relatively stable. *J Med Virol* 1993; 41:230-41.
34. Wang Y, Zhang H, Roger L, Hemin L, Harrison T. 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.
35. Reyes GR, Huang CC, Yarbough PO, Tam AW. Hepatitis E virus. *J Hepatol* 1991; 13:S155-S61.
36. Hsieh SY, Yang PY, Ho YP, Chu CM, Liaw YF. Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J Med Virol* 1998; 55: 3000-4.
37. Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, Tanzi E, Fabris P, Dawson GJ, *et al.* Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 1999; 57: 356-60.
38. 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.
39. Tsarev SA, Binn LN, Gomatos PJ, Arthur RR, Monier MK, van Cuyck-Gandre H *et al.* Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J Med Virol* 1999; 57: 68-79.
40. Schlauder GG, Frider B, Sookoian S, Castaño GC, Mushahwar IK. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J Infect Dis* 2000; 182: 294-7.
41. Huang C, 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* 1992; 191:550-8.
42. Koonin EV, Gorbalenya AF, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. Computer assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: Delineation of new group of animal and plant positive-strand ARN viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:8259-63.
43. Jameel S, Siddiqui A, Hu K. The molecular biology of hepatitis viruses. En: Gitnik G ed. *Principles and practice of gastroenterology and hepatology, USA: Appleton and Lang, 1994; 54:57.*
44. Bradley DW, Purdy MA. Molecular and serological characteristics of hepatitis E virus. En: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T eds. *Viral hepatitis and liver disease, Tokyo, 1994:42-5.*
45. Jameel S, Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol* 1996; 70:207-16.
46. Panda SK, Nanda SK, Zafrullah M, Ansari I, Ozdener H, 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.
47. Torresi J Li F, Locarnini SA, Anderson DA. Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells. *J Gen Virol* 1999; 80:1185-8.
48. Yin SR, 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.
49. Huang R, Nakazone N, Ishii K, Li D, Kawamata O, Kawaguchi R, *et al.* II. Existing variations on the gene structure of hepatitis E virus strains from some regions of China. *J Med Virol* 1995; 47:303-8.
50. Ray R, Jameel S, Manivel V, Ray R. Indian hepatitis E virus shows a major deletion in the small open reading frame. *Virology* 1992; 189:359-62.
51. Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, Tanzi E, Fabris P, Dawson GJ *et al.* Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 1999; 57:356-60.
52. Tsarev SA, Binn LN, Gomatos PJ, Arthur RR, Monier MK, van Cuyck-Gandre H *et al.* Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J Med Virol* 1999; 57: 68-79.
53. 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 USA* 1997; 94: 9860-5.
54. 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.
55. Haqshenas G, Huang FF, Fenaux M, Guenette DK, Pierson FW, Larsen CT, *et al.* The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J Gen Virol* 2002; 83: 2201-9.

56. Reyes GR, Huang CC, Tam AW, Purdy MA. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch Virol* 1993; 7:15-25.
57. Dalgarno L, Rice CM, Strauss JH. Ross River Virus 26S RNA: Complete nucleotide sequence and deduced sequence of the encoded structural proteins. *Virology* 1983; 129:170-87.
58. Tarentino AL, Trimble RB, Plummer TH. Enzymatic approaches for studying the structure, synthesis and processing of glycoproteins. *Methods Cell Biol* 1989; 32:111-39.
59. Brinton MA, Heinz FX (ed.) New aspects of positive-strand RNA viruses. American Society for Microbiology, Washington DC, 1990.
60. Coursaget P, Buisson Y, Depril N, le Cann P, Chabaud M, Molinie C, *et al.* Mapping of linear B cell epitopes on open reading frames 2- and 3-encoded proteins of hepatitis E virus using synthetic peptides. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 109:251-6.
61. 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.
62. Khudyakov YE, Khudyakova NS, Jue DL, Wells TW, Pandhya 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* 1994; 75:641-6.
63. Lee SD, Wang YJ, Lu RH, Chan CY, Lo KJ, Moeckli R. Seroprevalence of antibody to hepatitis E virus among Chinese subjects in Taiwan. *Hepatology* 1994; 19:866-70.
64. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G, Schoofs PG. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods* 1987; 102:259-74.
65. 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.
66. 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* 1997; 52: 289-300.
67. Coursaget P, Krawczynski K, Buisson Y, Nizou C, Molinie C. Hepatitis E and hepatitis C virus infections among French soldiers with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1993; 39:163-6.
68. Mast E, Purcell RH, Hollan P, Alter M. Evaluation of assays for diagnosis of HEV infection. En: IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease; Tokyo, 1996:A34.
69. Purdy MA, McCaustland K, Lixia L, Morris T, Krawczynski K, Spelbring J, *et al.* HEV antigen: detection and presentation in the stools of experimentally infected primates. En: IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease; Tokyo, 1996:A106.
70. Hyams KC, Purdy MA, Kaur M, McCarthy MC, Hussain MAM, El-Tigani A, *et al.* Acute sporadic hepatitis E in Sudanese children: Analysis based on a New *Western Blot Assay*. *J Infect Dis* 1992; 165:1001-5.
71. 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 Setting. *J Med Virol* 1992; 36:246-50.
72. Purdy MA, McCaustland KA, Krawczynski K, Tam A, Beach MJ, Tassopoulos NC, *et al.* Expression of a hepatitis E virus (HEV)-trpE fusion protein containing epitopes recognized by antibodies in sera from human cases and experimentally infected primates. *Arch Virol* 1992; 123:335-49.
73. Carl M, Issaacs S, Kaur M, He J, Tam AW, Yarbough PO, *et al.* Expression of hepatitis E virus putative structural proteins in recombinant vaccinia viruses. *Clin Diag Lab Immunol* 1994; 1:253-6.
74. He J, Ching WM, Yarbough PO, Wang H, Carl M. Purification of a baculovirus-expressed hepatitis E virus structural protein and utility in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3308-11.
75. Li F, Zhuang H, Kolivas S, Locarnini SA, Anderson DA. Persistent and transient antibody responses to hepatitis E virus detected by Western Immunoblot using open reading frame 2 and 3 and glutathione S-transferase fusion proteins. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2060-6.
76. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Yarbough PO, Legters LJ, Moskal T, *et al.* Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in *Cynomolgus* monkeys. *J Med Virol* 1994; 43:135-42.
77. Ghabrah TM, Tsarev S, Yarbough PO, Emerson SU, Strickland, Purcell RH. Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *J Med Virol* 1998; 55: 134-7.
78. Yin S, Bao Z, Tian X, Jiang Y, Zhang X. Protection of rhesus monkeys from challenge with hepatitis E virus. *Bull Acad Mil Med Sci* 1992; 16:115-8.
79. Arankalle VA, Chadha MS, Chobe LP, Nair R, Banerjee K. Cross-challenge studies in rhesus monkeys employing different Indian isolates of hepatitis E virus. *J Med Virol* 1995; 46:358-63.
80. Arankalle VA, Favorov MO, Chadha MS, Phule DM, Banerjee K. Monkeys infected with hepatitis E virus (HEV) from the former USSR are immune to subsequent challenge with an Indian strain of HEV. *Acta Virol* 1993; 37:515-8.
81. Purdy MA, McCaustland KA, Krawczynski S, Spelbring J, Reyes GR, Bradley DW. Preliminary evidence that trpE-HEV fusion protein protects *Cynomolgus* macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol* 1993; 41:90-4.

A Quintana-González.

82. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Govindara S, Shapiro M, Gerin JL, *et al.* Successful passive and active immunization of Cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:198-202.
83. 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.
84. Doroshenko NV, Smolina TG, Zairov GK, Stakhanova VM. Serological proof of the occurrence of non-A, non-B hepatitis with fecal-oral mode of transmission. *Vopr Virusol* 1989; 34:164-7.
85. Arankalle VA, Chadha MS, Tsarev SA, Emerson SU, Risbud AR, Banerjee K, *et al.* Seroepidemiology of water-borne hepatitis in India and evidence for a third enterically-transmitted hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3428-32.
86. Chauhan A, Dilawari JB, Kaur U, Ganguly NK, Bushnurmah S, Chawla YK. Atypical strain of hepatitis E virus (HEV) from North India. *J Med Virol* 1994; 44:22-9.
87. 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 Apr;60(4):379-86.
88. Sarthou JL, Budkowska A, Sharma MD, Bhuillier M, Pillot J. Characterization of an antigen antibody system associated with epidemic non-A, non-B hepatitis in West Africa and experimental transmission of an infectious agent to primates. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1986; 137E:225-32.
89. Gupta H, Joshi YK, Tandon BN. An Enzyme linked immunoassay for the possible detection of non-A, non-B viral antigen in patients with epidemic viral hepatitis. *Liver* 1988; 8:111-5.
90. Pillot J, Sharma MD, Lazizi Y. Immunological characterization of a viral antigen involved in epidemic and sporadic non-A, non-B hepatitis. *Ann Inst Pasteur Virol* 1987; 138:145-58.
91. Panda SK, Datta R, Kaur K, Zuckerman AJ, Nayak NC. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Recovery of virus-like particles from an epidemic in South Delhi and transmission studies in rhesus monkeys. *Hepatology* 1989; 10:466-72.
92. Uchida T, Suzuki K, Komatsu K, Lida I, Shikata T, Rikihisa T, *et al.* Serial Occurrence of a putative causative virus of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Bile. En: Shikata T, Purcell RH, Uchida T eds. *Viral Hepatitis C, D, E.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers: 1991. p. 221-8.
93. Gupta H, Tandon BN, Sriramachari S, Joshi YK, Iyenger B. Animal transmission of enteric non-A, non-B hepatitis infection to *Macaca mulata* by fecal oral route. *Indian J Med Res* 1990; 91:87-90.
94. Ticehurst J, Rhodes IL, Krwczynski K, Ashor VS, Englar 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* 1992; 165:835-45.
95. Tsarev SA, Emerson SU, Tsareva TS, Yarbough PO, Lewis M, Govindara S, *et al.* Variation in course of hepatitis E in experimentally infected Cynomolgus monkeys. *J Infect Dis* 1993; 167:1302-6.
96. Longer CF, Denny SL, Caudill JD, Miele TA, Asher LV, Myint KS, *et al.* Experimental hepatitis E: Pathogenesis in Cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J Infect Dis* 1993; 168:602-9.
97. 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.
98. Favorov MO, Nazarova O, Yashina T, McCaustland K, Fields HA, Margolis H. Castles as a possible reservoir of hepatitis E virus infection. En: IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Tokyo, 1996:A140.
99. Balayan MS, Usmanov RK, Zamyantina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief Report: Experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol* 1990; 32:58-9.
100. Karetnyi YV, Dzhumalieva DI, Usmanov RK, Titova IP, Litvak YI, Balayan MS. Probable involvement of rodents in the spread of viral hepatitis E. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1993; 4:52-6.
101. Maneerat Y, Clayson ET, Myint SA, Young GD, Innis BL. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol* 1996; 48:121-8.
102. Meng J, Guinet R, Pillot J. Infection of PLC/PRF/5 cells with the hepatitis E virus. In Buisson Y, Coursaget P, Kane M, eds. *Enterically-Transmitted Hepatitis Viruses.* L Simarre: Joué-lés-Tours, 1996. p. 336-345.
103. Meng J, Dubreuil P, Pillot J. A new PCR-based seroneutralization assay in cell culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1373-7.
104. Reyes GR, Bradley DW, Twu JS, Purdy MA, Tam AW, Krawczynski K. Hepatitis E virus vaccine and method. *Europe Patent Appl.* 1993, PCT/US 93/00475 and WO Publication 1993, 93/14208.
105. 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.
106. Albert WT, White R, Yarbough PO, Murphy BJ, McAtee P, Landford RE *et al.* In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 1997; 238: 94-102.
107. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Acute hepatitis. En: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci

Virus de la hepatitis E.

- AS and Kasper DL (eds.) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill Inc. 1994; 266:1471-2.
108. Belabbes EH, Bougeurmouh A, Benatallah A, Illoul G. Epidemic non-A, non-B viral hepatitis in Algeria: Strong evidence for its spreading by water. *J Med Virol* 1985; 16:257-63.
109. Chahuan A, Jameel S, Dilawari JB, Chawla YK, Kaur U, Ganguly NK. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 1993; 341:149-50.
110. Kamili S. Hepatitis E: Studies on transmission, etiological agent and seroepidemiology. Universidad de Cachemira 1994.
111. Khuroo MS, Kamili S. Hepatitis E: From hypothesis to reality (editorial). *Indian J Gastroenterol* 1994; 13:39-43.
112. Khuroo MS, Kamili S, Dar MY, Moeckli R, Jameel S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet* 1993; 341:1355.
113. Nanda SK, Ansari IH, Acharya SK, Jameel S, Panda SK. Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 1995; 108:225-30.
114. Jameel S, Durgapal H, Habibullah CM, Khuroo MS, Panda SK. Enteric non-A, non-B hepatitis: Epidemics animal transmission and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 37:263-70.
115. Brazilai A, Schulman S, Karenyi YV, Favorov MO, Levin E, Mendelson PW, *et al.* Hepatitis E virus infection in hemophiliacs. *J Med Virol* 1995; 45:153-6.
116. Poovorawan Y, Tieamboonlers S, Chumdermpadelsuk S, Gluck R, Cry SJ. Hepatitis E virus and post-transfusion hepatitis. *J Infect Dis* 1994; 169:229.
117. Sylvan Sp, Hellstrom UB, Hampl H, Kapprell HP, Troonen H. Hepatitis E in patients with chronic autoimmune liver disease. *JAMA* 1995; 273:377-8.
118. Wang JT, Lin JT, Sheu JC, Wang TH, Chen DS. Hepatitis E virus and post-transfusion hepatitis. *J Infect Dis* 1994; 169:229-30.
119. Zaaijer HL, Mauser-Bunschoten EP, ten Veen JH, Kapprell HP, Kok M, van der Berg HM, *et al.* Hepatitis E virus antibodies among patients with hemophilia, blood donors, and hepatitis patients. *J Med Virol* 1995; 46:244-6.
120. Khuroo MS, Teli MR, Skidmore S, Sofi MA, Khuroo M. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med* 1981; 70:252-5.
121. Favorov MO, Khurkhlovich PA, Zairov GK, Listovskaya EK, Arakelov SA, Vzorov AN, *et al.* Clinical and epidemiological features and diagnosis of viral non-A, non-B hepatitis with fecal-oral transmission mechanism. *Vopr Virusol* 1989; 1:65-9.
122. Khuroo MS, Saleem M, Teli MR, Sofi MA. Failure to detect chronic liver disease after epidemic non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1980; 2:97-8.
123. Borhanmanesh F, Haghighi P, Hekmat K, Rezaizadeh K, Ghavami AG. Viral hepatitis during pregnancy. Severity and effect on gestation. *Gastroenterology* 1973; 64:304-12.
124. Nayak NC, Panda SK, Datta R, Zuckerman AJ, Guha DK, Madangopalan N, *et al.* Etiology and outcome of acute viral hepatitis in pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol* 1989; 4:345-52.
125. Asher LVS, Longer CF, Elliot J, Zhang HY, Daniels M, Johnson A, *et al.* Acute tubular necrosis in kidneys of monkeys infected with hepatitis E virus. En: IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease; Roma, 1996:A36.
126. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 1995; 345:1025-6.
127. Vishwanathan R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): A critical study: *Epidemiology*. *Indian J Med Res* 1957; 45(suppl):49-58.
128. Kane MA, Bradley DW, Shrestha SM, Maynard JE, Cook EH, Misra H, *et al.* Epidemic non-A, non-B Hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA* 1984; 252:314-5.
129. Centers for Disease Control. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: East Africa. *MMWR* 1987; 36:241-4.
130. Naik SR, Aggarwal R, Salunke PN, Mehrotra NN. A Large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kampur, India. *Bull WHO* 1992; 70:597-604.
131. 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.
132. Kapikian AZ, Dienstag JL, Purcell RH. Immune electron microscopy as a method for the detection, identification and characterization of agents not cultivable in an in vitro system. En: Rose NR and Friedman H eds. *Manual of Clinical Immunology*. Washington DC: American Society of Microbiology; 1976. p. 467-80.
133. Krawczynski K, Bradley D, Ajdukiewicz A, Alter M, Carreda F, Dilawari J, *et al.* Virus-associated antigen and antibody of epidemic non-A, non-B hepatitis: Serology of outbreak and sporadic cases. En: Shikata T, Purcell RH and Uchida T eds. *Viral Hepatitis C, D, E*. Amsterdam: Elsevier Sciences Publishers; 1991. p. 229-36.
134. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-91.
135. Chauhan A, Dilawari JB, Jameel S, Kaur U, Chawla YK, Sharma ML, *et al.* Common etiological agent for epidemic and sporadic non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1992; 339:1509-10.
136. 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* 1995; 72:927-33.
137. Schlauder GG, Mushahwar IK. Detection of hepatitis C

A Quintana-González.

- and E virus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1994; 47:243-53.
138. McCaustland KA, Bi S, Purdy MA, Bradly DW. Application of two RNA extraction methods prior to amplification of hepatitis E virus nucleic acid by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991; 35:331-42.
 139. Chau KH, Dawson GJ, Bile KM, Magnus 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; 40:334-48.
 140. Yarbough PO, Zhang Y, McAtee P, Tam E, Garza T. Improved assay development of diagnostic tests for IgM and IgG antibodies to hepatitis E virus. En: IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease; Tokyo, 1996:A105.
 141. Skidmore SJ, Yarbough PO, Gabor KA, Reyes GR. Hepatitis E virus: The cause of a waterborne hepatitis outbreak. *J Med Virol* 1992; 37:58-60.
 142. Favorov MO, Khudyakov Y, Fields HA. Enzyme immunoassay for the detection of anti hepatitis E virus activity based on synthetic peptides: Seroprevalence and world distribution of hepatitis E virus-infection. En: Mahy BWJ and Lvov DK eds. *Concepts in Virology*. Switzerland: Harwood Acad Publishers; 1993. p. 183-9.
 143. Ticehurst J, Popkin TJ, Bryan JP, Innis BL, Duncan JF, Ahmed A, *et al.* Association of hepatitis E with an outbreak of hepatitis in Pakistan: Serologic responses and pattern of virus excretion. *J Med Virol* 1992; 36:84-92.
 144. Dilawari JB, Singh K, Chawla YK, Ramesh GN, Chauhan A, Bhusnurmath SR, *et al.* Hepatitis E virus: Epidemiological, clinical and serological studies of North Indian Epidemic. *Indian J Gastroenterol* 1994; 13:44-8.
 145. Nayac NC, Panda SK. Enteric non-A, non-B hepatitis in India: Current experiences in various settings including transmission studies in the rhesus monkey. En: Shikata T, Purcell RH, Uchida T eds. *Viral hepatitis C, D, E*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1991. p. 247-57.
 146. Tandon BN, Gandhi BM, Joshi YK. Etiological spectrum of viral hepatitis and prevalence of markers of hepatitis A and B virus infection in North India. *Bull WHO* 1984; 62:67-73.
 147. Sergeev NW, Paktor EA, Ananov VA, Antinova Ail, Semenov EP. General characteristics of disease occurring in Kirgiz Republic of USSR in 1955-56. *Soviet Healthcare Kirgizii* 1957; 5:16-23.
 148. Myint H, Soe MM, Khin T, Myint TM, Tin KM. A clinical and epidemiological study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Rangoon. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34:1183-9.
 149. Hillis A, Shrestha SM, Saha NK. An epidemic of infectious hepatitis in the Kathmandu Valley. *J Nepal Med Assoc* 1973:11-51.
 150. Shrestha S, Shrestha S, Misra RP. An epidemic of hepatitis E in Nepal: Clinical and epidemiological study. *J Inst Med* 1990; 12:195-204.
 151. Coa X-Y, Ma X-Z, Liu Y-Z, Jin X-M, Gao Q, Dong H-J, *et al.* Epidemiological and etiological studies on enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in South part of Xiangiang. En: Shikata T, Purcell RH 1 y Uchida T eds. *Viral Hepatitis C, D and E*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1991. p. 297-312.
 152. Zhuang H, Cao XY, Liu CB, Wang GM. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in China. En: Shikata T, Purcell RH and Uchida T eds. *Viral hepatitis C, D, E*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1991. p. 277-85.
 153. Tsega E, Krawczynski K, Hansson BG, Nordenfelt E, Negusse Y, Alemu W, *et al.* Outbreak of acute hepatitis E virus infection among military personnel in Northern Ethiopia. *J Med Virol* 1991; 34:232-6.
 154. Centers for Disease Control. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Mexico. *MMWR* 1987; 36:597-602.
 155. 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.
 156. Uchida T. Hepatitis E: Review. *Gastr Jpn* 1992; 27:687-96.
 157. Arankalle VA, Chobe LP, Jha J, Chadha MS, Banerjee K, Favorov MO, *et al.* Etiology of acute sporadic non-A, non-B viral hepatitis in India. *J Med Virol* 1993; 40:121-5.
 158. Song DY, Zhuang H, Kang XC, Liu XM. Hepatitis E in Heitan City: A Report of 562 cases. En: Hollinger BF, Lemon SM and Margolis HS eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p. 528-9.
 159. 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; 338:183-4.
 160. Aggarwal R, Shahi H, Naik SR, Nityanand S, Deka N, Batra JK. Fulminant hepatic failure due to hepatitis E virus. *J Hepatol* 1994; 21:1156-7.
 161. Fagan EA, Menon T, Valliammai T, Paul DA, Donati MC, Burroughs AK, *et al.* Equivocal serological diagnosis of sporadic fulminant hepatitis E in pregnant Indians. *Lancet* 1994; 344:342-3.
 162. Nanda SK, Kezban Y, Panigrahi AK, Acharya SK, Jameel S, Panda SK. Etiological role of hepatitis E virus in sporadic fulminant hepatitis. *J Med Virol* 1994; 42:237-40.
 163. Lau JY, Sallie R, Fang JW, Yarbough PO, Reyes GR, Portmann BC, *et al.* Detection of hepatitis E virus genome and gene products in two patients with fulminant hepatitis E. *J Hepatol* 1995; 22:605-10.
 164. Liang TJ, Jeffers L, Reddy RK, Silva MO, Cheinquer H, Findor A, *et al.* Fulminant or subfulminant non-A, non-B hepatitis: Hepatitis C and E viruses. *Gastroenterology* 1993; 103:556-62.

Virus de la hepatitis E.

165. Sallie R, Silva AE, Purdy M, Smith H, McCaustland K, Tibbs C, *et al.* Hepatitis C and E in non-A, non-B fulminant hepatic failure: Polymerase chain reaction and serological study. *J Hepatol* 1994; 20:580-8.
166. Coppola RC. The Seroprevalence of anti-HEV in Italy. En: IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease; Tokyo 1996:A33.
167. Buisson Y, Coursaget P, Bercion R, Anne D, Debord T, Roue R. Hepatitis E virus infection in soldiers sent to endemic regions. *Lancet* 1994; 344:1165-6.
168. Centers for Diseases Control. Hepatitis E among US travellers, 1989-1992. *MMWR* 42:1-4.
169. Dawson GJ, Mushahwar IK, Chau KH, Gitnick GL. Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveler to Pakistan. *Lancet* 1992; 340:426-7.
170. Fortier D, Treadwell TL, Koff RS. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis importation from Mexico to Massachusetts. *N Engl J Med* 1989; 320:1281-2.
171. Roberts JK, Whitlock RF. Hepatitis E in a traveler to Bangladesh. *Lancet* 1992; 339:1424-5.
172. Shidrawi RG, Skidmore SJ, Coleman JC, Dayton R, Murray-Lyon IM. Hepatitis E- an Important cause of imported non-A, non-B hepatitis among migrant workers in Qatar. *J Med Virol* 1994; 43:412-4.
173. Skidmore SJ, Yarbough PO, Gabor KA, Tam AW, Reyes GR, Flower AJE. Imported hepatitis E in UK. *Lancet* 1991; 337:1541.
174. Trautwein C, Kiral G, Tillmann HL, Witteler H, Michel G, Manns MP. Risk factors and prevalence of hepatitis E in German immigrants from the former Soviet Union. *J Med Virol* 1995; 45:429-34.
175. Pujol FH, Favorov MO, Cano 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.
176. Paul DA, Knigge MF, Ritter A, Gutierrez R, Pilof-Matias, Chau KH, *et al.* Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion proteins and synthetic peptides. *J Infect Dis* 1994; 169:801-6.
177. Shi GR, Li SQ, Qian L. The epidemiological study on a food borne outbreak of non-A, non-B hepatitis. *J China Med Univ* 1987; 16:150-1.
178. Ishikawa K, Matsui K, Madarame T, Sato S, Oikawa K, Uchida T. Hepatitis E probably contracted via a Chinese herbal medicine, demonstrated by nucleotide sequencing. *J Gastroenterol* 1995; 30:534-538.
179. Meng H, Yiang XC, He Sc. A food-borne outbreak of non-A, non-B hepatitis. *Chinese J Prevent Med* 1987; 21:28-30.
180. Jothikumar N, Aparna K, Kamatchiammal S, Paulmurugan S, Saravanadevi S, Khanna P. Detection of hepatitis E virus in raw and treated waste water with the polimerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59:2558-62.
181. Montella R, Rezza G, Di Sora F, Pezzofti P, Recchia O. Association between hepatitis E virus and HIV infection in homosexual men. *Lancet* 1994; 344:1433.
182. Robson SC, Adams S, Brink N, Woodruff B, Bradley D. Hospital outbreak of hepatitis E. *Lancet* 1992; 339:14.
183. Wang CH, Flehming B, Moeckli R. Transmission of hepatitis E virus by transfusion? *Lancet* 1993; 34:825-6.
184. Halfon P, Ouzan D, Chanas M, Khiri H, Feryn JM, Mangin L, *et al.* High prevalence of hepatitis E virus antibody in hemodialysis patients. *Lancet* 1994; 344:746.
185. Lavanchy D, Morel B, Frei PC. Seroprevalence of hepatitis E virus in Switzerland. *Lancet* 1994; 344:747-8.
186. Mannucci PM, Gringeri A, Santagostino E, Romano L, Zanetti A. Low risk of transmission of hepatitis E virus by large-pool coagulation factor concentrates. *Lancet* 1994; 343:597-8.
187. 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.
188. Tsarev SA, Tsareva SU, Emerson S, Govindarajan M, Shapiro JL, Purcell RH. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:10198-202.
189. Uchida T, Shikata T, Rikihisa T, Ichikwa M, Mizuno K. Vaccination of hepatitis E virus. En: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, editors. *Viral hepatitis and liver disease*, Tokyo: Spring-Verlag; 1994. p. 175-86.
190. Stephen JH, Hoffman, 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.
191. Tuteja R, Li TC, Takeda N, Jammel S. Augmentation of Immune responses to hepatitis E virus ORF2 DNA vaccination by co-delivery of cytokine genes. *Viral Immunol* 2000; 13:169-78.