

Martínez Wassaf, Maribel Graciela

Estudio de la circulación del virus de la hepatitis E (HEV) en Córdoba, Argentina: aspectos epidemiológicos, zoonóticos y ambientales

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Doctor en Bioquímica**

Director: Ré, Viviana Elizabeth

Documento disponible para su consulta y descarga en **Biblioteca Digital - Producción Académica**, repositorio institucional de la **Universidad Católica de Córdoba**, gestionado por el **Sistema de Bibliotecas de la UCC**.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.

Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

**"ESTUDIO DE LA CIRCULACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E
(HEV) EN CÓRDOBA, ARGENTINA:
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, ZONÓTICOS Y AMBIENTALES"**

**Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas
de la Universidad Católica de Córdoba conforme
a los requisitos para obtener el título de Doctor en Bioquímica**

Por

BIOQ. FARM. MARIBEL GRACIELA MARTÍNEZ WASSAF

Córdoba, Argentina

2016

DIRECTOR

Dra. Viviana Elizabeth Ré

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR DE TESIS DOCTORAL

Dra. Nora López

Dr. Dante Beltramo

Dr. Miguel Orsilles

MIEMBROS DEL COMITÉ DE TESIS DOCTORAL

Dra. Silvia Viviana Nates

Dr. Dante Beltramo

Dr. Miguel Orsilles

DEDICATORIA

A mis padres, Graciela y Daniel, sin su guía y apoyo constante hoy no sería nada. Gracias por acompañarme, festejar mis aciertos y llorar conmigo en mis derrotas; por levantarme cuando estaba caída e impulsarme a arrancar de nuevo; por enseñarme el amor al trabajo, la pasión por los ideales, la fuerza de la voluntad y la importancia del respeto, la responsabilidad y la perseverancia.

A mis hermanas, Ayelen y Daniela, porque fueron mis primeras amigas y cómplices, porque sólo basta una mirada para entendernos, porque mi vida sería muy distinta sin ustedes y porque han sido siempre mis compañeras incansables.

A mi esposo, Adrián, quien me conoció arrancando este viaje y me siguió en todos los vaivenes emocionales de este camino. Por ser mi estoico compañero y soporte inquebrantable. Porque supo entender mis ausencias, mis largas horas en el laboratorio y las interminables frente a la computadora. Porque aprendió un poco de virología por mí y me ayudó en lo que pudo para que alcanzara este gran objetivo en mi vida, que también lo hizo suyo.

A Adriana, mi segunda madre, quien es mi mentora y más aún, mi compañera en muchos aspectos en la vida. De vos aprendí la importancia de los detalles y lo lindo que es reírse de uno mismo. Me enseñaste que siempre hay que trabajar por más y nunca conformarse con lo pequeño si podemos lograr lo grande.

A mis cuñados, Agustín y Genaro, que siempre están al pie del cañón para lo que necesito y listos para festejar mis logros.

A mis amigas, Alicia, Cecilia y Marina, por ser mis compañeras, la causa de muchas carcajadas y por abrazarme en mis momentos de debilidad. Porque han sido siempre mi cable a tierra, las incondicionales, regalo que me dio la vida. Sin ustedes, a mi vida le faltaría una gran parte.

A Viviana, mi directora y mucho más, porque me acompañaste, enseñaste y guiaste. Porque me defendiste siempre y porque además de sentirme a gusto trabajando con vos, me divierte a montones!

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Dra. Viviana Ré y a los miembros de la Comisión de Tesis Dra. Silvia Nates, Dr. Dante Beltramo y Dr. Miguel Orsilles, quienes guiaron mi trabajo de tesis.

Al Dr. Osvaldo Elbarcha, quien fue el responsable de que me metiera en el universo de la virología y guió mis primeros pasos en el mundo de las hepatitis. Fue además el que cruzó mi camino con el de Viviana y el que me persigue a diario para que logre ser mejor de lo que creo que puedo ser.

A la Dra. Silvia Nates, quien apostó a la búsqueda de lo desconocido una vez más y me apoyó en todo el camino de mi tesis. Gracias Silvia porque además me abriste las puertas de tu laboratorio donde me encontré con dos excelentes personas, las Dras. Patricia Barril y Gisela Masachessi, quienes colaboraron conmigo en las concentraciones de las muestras de agua, me enseñaron sobre procedimientos de laboratorio como métodos de extracción, cedieron sus muestras para que investigue y me acompañaron en las presentaciones de mis hallazgos. En el Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” encontré compañeros y amigos de mesada, de congresos y publicaciones que sumaron mucho más a mi vida que la parte académica.

A la Dra. Belén Pisano, quien se subió al tren de la hepatitis E cuando estaba en marcha, pero sumó vagones de conocimiento, trabajo y buena onda necesarios para llegar hasta donde llegamos en el descubrimiento de este virus y con la cual seguimos trabajando por más.

A la Dra. Marize Pereira Miagostovich y a la Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira, de los Laboratorios de Virología Comparada e Ambiental y de Desenvolvimento Tecnológico del Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro-Brasil, quienes me acompañaron en mis primeros pasos de esta tesis y me brindaron los protocolos y controles positivos necesarios para arrancar con los análisis moleculares del HEV en Córdoba. Gracias Adriana, Tulio, Carmen y Anna Carolina por ayudarme en los inicios, tengo los mejores recuerdos de ustedes dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. José Debes, del Departamento de Medicina, División Enfermedades Infecciosas y Medicina Traslacional de la Universidad de Minnesota, Minneapolis- Estados Unidos de América, por confiar y apostar al conocimiento del HEV y a este grupo de trabajo. Gracias José porque sin tus múltiples ayudas nos hubiéramos quedado en muchos “quizás o tal vez”.

Al Dr. Domingo Balderramo, del Servicio de Gastroenterología del Hospital Privado de Córdoba, al Dr. Leonardo Marianelli, del Hospital Rawson, y a la Dra. María Beatriz Isa, de la Clínica Universitaria Reina Fabiola, por participar en el reclutamiento, seguimiento de pacientes, recolección de muestras necesarias para este estudio y análisis de los resultados.

A mis compañeros de trabajo en LACE Laboratorios, quienes me acompañaron durante los altibajos lógicos durante el desarrollo de esta tesis. Gracias al Dr. Cristian Galván, por siempre empujarme para que supere las dificultades y bromear conmigo ante buenos y malos resultados. Gracias a la Dra. Susana Vitozzi por dedicar horas para ayudarme a solucionar los problemas metodológicos y siempre alegrarse con mis aciertos.

A mis compañeras de trabajo y amigas en la UCC: Adriana, Ana, Elena, Yanina, Pamela y Maru. Sin sus bromas y alientos no hubiera superado los desaciertos de este viaje.

A LACE Laboratorios, el Instituto de "Virología Dr. J. M. Vanella" de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba y la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba quienes contribuyeron en la elaboración de esta tesis.

A la Secretaría de Posgrado de la Universidad Católica de Córdoba (Programa especial de becas de posgrado - Resolución Rectoral N° 941/06 y su modificatoria Resolución Rectoral N° 996/07), al Ministerio de Ciencia y Tecnología - Gobierno de la Provincia de Córdoba (MINCyT-Cba PIO 170/11 y 198/11-CICAL 175/10), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica-Foncyt (PICT 0998/12- PICT2537/14), a la Fundación Alberto J. Roemmers, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al American College of Gastroenterology, Clinical Research Award por contribuir al financiamiento de este estudio.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE GENERAL	viii
ABREVIATURAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xv
RESUMEN	xvi
SUMMARY	xvii
<u>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y RELEVANCIA DEL ESTUDIO</u>	1
1. DESCUBRIMIENTO E HISTORIA DEL VIRUS DE HEPATITIS E	1
2. ESTRUCTURA DEL VIRUS	2
3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	3
4. EPIDEMIOLOGÍA	5
5. VÍAS DE TRANSMISIÓN	7
5.1. TRANSMISIÓN ENTÉRICA	7
5.2. TRANSMISIÓN ZONÓTICA	7
5.3. OTRAS VÍAS DE TRANSMISIÓN	9
6. REPLICACIÓN VIRAL	10
7. PATOGÉNESIS	11
8. CINÉTICA DE ANTICUERPOS	12
9. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN	13
9.1. CLÍNICA EN INDIVIDUOS INMUNOCOMPETENTES	13
9.2. CLÍNICA EN MUJERES EMBARAZADAS	14
9.3. CLÍNICA EN INDIVIDUOS INMUNOCOMPROMETIDOS	15
9.4. HEPATITIS E CRÓNICA	15
10. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	16
11. TRATAMIENTO	18
12. PROFILAXIS	19
13. RELEVANCIA Y OBJETIVO GENERAL DEL ESTUDIO	20
<u>CAPÍTULO II: VIRUS DE HEPATITIS E EN EL MEDIOAMBIENTE</u>	22
1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	22
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. ÁREAS DE MUESTREO	23
3.1.1. Planta de tratamiento de líquidos residuales de la ciudad de Córdoba	23
3.1.2. Río Suquía	24
3.1.3. Río Xanaes	24
3.1.4. Embalse San Roque	24
3.2. MUESTRAS ANALIZADAS	25
3.2.1. Muestras de líquidos residuales	25
3.2.2. Muestras de agua de río	25

3.2.3. Muestras de agua de embalse	26
3.3. OBTENCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AGUA	26
3.4. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	28
3.4.1. Protocolo de Trizol	28
3.4.2. Protocolo de fenol-cloroformo	29
3.4.3. Columnas de extracción comerciales	30
3.5. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA)	31
3.6. AMPLIFICACIÓN DEL RNA DEL HEV POR NESTED-PCR	31
3.7. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	32
3.8. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS CIRCULANTES	33
3.9. ANÁLISIS BACTERIANO	33
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
4. RESULTADOS	34
4.1. IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	35
4.2. IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-NESTED-PCR	35
4.3. DETECCIÓN DE RNA-HEV EN MUESTRAS AMBIENTALES	36
4.3.1. Muestras de líquidos residuales	36
4.3.2. Muestras de agua de río	37
4.3.3. Muestras de agua de embalse	37
4.4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE HEV EN MUESTRAS AMBIENTALES	39
<u>CAPÍTULO III: VIRUS DE HEPATITIS E EN CERDOS</u>	43
1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	43
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. MUESTRAS ANALIZADAS	43
3.2. DETECCIÓN DE RNA-HEV	44
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
4. RESULTADOS	46
4.1. DETECCIÓN DE RNA-HEV EN MUESTRAS DE HECES PORCINAS	46
4.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE HEV EN MUESTRAS PORCINAS	48
<u>CAPÍTULO IV: VIRUS DE HEPATITIS E EN HUMANOS</u>	51
1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	51
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1. MUESTRAS ANALIZADAS	52
3.1.1. Población general	52
3.1.2. Pacientes con diagnóstico de hepatitis aguda	53
3.1.3. Pacientes HIV positivos	53
3.1.4. Pacientes dializados y trasplantados	53
3.2. METODOLOGÍAS UTILIZADAS	54
3.2.1. Detección de anticuerpos específicos anti-HEV	54
3.2.2. Detección de RNA-HEV	54
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
3.4. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS	56
4. RESULTADOS	56
4.1. POBLACIÓN GENERAL	56

4.2. PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS AGUDA	57
4.3. PACIENTES HIV POSITIVOS	58
4.4. PACIENTES DIALIZADOS Y TRASPLANTADOS	60
<u>CAPÍTULO V: NUEVA CLASIFICACIÓN DE SUBTIPOS DEL VIRUS DE HEPATITIS E</u>	63
1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	63
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
3. MATERIALES Y MÉTODOS	64
3.1. SECUENCIAS ANALIZADAS	64
3.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	65
4. RESULTADOS	65
<u>CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN</u>	68
1. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE HEV	68
2. HEV EN EL MEDIOAMBIENTE	70
3. HEV EN CERDOS	73
4. HEV EN POBLACIÓN GENERAL	76
5. HEV EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS AGUDA	77
6. HEV EN INDIVIDUOS INMUNOSUPRIMIDOS	78
6.1. HEV EN PACIENTES INFECTADOS CON HIV	78
6.2. HEV EN PACIENTES DIALIZADOS Y TRASPLANTADOS	80
<u>CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES</u>	84
BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXOS	1077

- First detection of hepatitis E virus in Central Argentina : Environmental and serological survey. (*Journal of Clinical Virology*. 2014)
- Increased Hepatitis E Virus Seroprevalence Correlates with Lower CD4 + Cell Counts in HIV-Infected Persons in Argentina. (*PLoS One*. 2016)
- Hepatitis E virus infection among patients on dialysis and solid organ transplant recipients in Argentina: exploring associated risk factors. (*Archives of Virology*. 2016)

ABREVIATURAS

AgHBs	Antígeno de superficie del virus de hepatitis B
ALT	Alaninoaminotransferasa
ANA	Anticuerpos antinucleares
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de la Argentina
AST	Aspartatoaminotransferasa
BD	Bilirrubina directa
BEG	Bahía El Gitano
BI	Bilirrubina indirecta
BT	Bilirrubina total
cDNA	DNA complementario (por sus siglas en inglés)
CENTRO	Centro del embalse
CID	Coagulación intravascular diseminada
CMV	Citomegalovirus
CN	Control negativo
CO	Cut-off o valor de corte
CP	Club de Pescadores
DCH	Desembocadura río Los Chorrillos
DCQ	Desembocadura río Cosquín
DEPC	Dietilpirocarbonato
DLM	Desembocadura Arroyo Las Mojarras
DNA	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato (por sus siglas en inglés)
DSA	Desembocadura río San Antonio
EBV	Virus de Epstein-Barr (por sus siglas en inglés)
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético (por sus siglas en inglés)
EPA	Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos de América
FAL	Fosfatasa alcalina
FHF	Fallo hepático fulminante
GGT	Gamaglutamiltranspeptidasa
HAV	Virus de la Hepatitis A (por sus siglas en inglés)
HBV	Virus de la Hepatitis B (por sus siglas en inglés)
HEA	Hepatitis E Aguda
HEC	Hepatitis E Crónica
HEV	Virus de la Hepatitis E (por sus siglas en inglés)
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana (por sus siglas en inglés)
HRP	Enzima peroxidasa de rabanita
IC95%	Intervalo de confianza del 95%
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (por sus siglas en inglés)
IgG-HCV	Inmunoglobulina G anti-virus de hepatitis C

IgG-HEV	Inmunoglobulina G anti-virus de hepatitis E
IgM-HEV	Inmunoglobulina M anti-virus de hepatitis E
IgM-CMV	Inmunoglobulina M anti-citomegalovirus
IgM-EBV	Inmunoglobulina M anti-virus de Epstein-Barr
IgM-HAV	Inmunoglobulina M anti-virus de hepatitis A
IR	Índice de reactividad
LT-CD4[+]	Linfocitos T CD4 positivos
NAT	Técnicas de ácidos nucleicos (por sus siglas en inglés)
Nested-PCR	Técnicas de PCR anidada (por sus siglas en inglés)
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control (por sus siglas en inglés)
ODs	Odds ratios (por sus siglas en inglés)
OMS / WHO	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marcos de lectura abiertos (por sus siglas en inglés)
PBS	Solución de buffer fosfato (por sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PCR-I	PCR inicial
PCR-II	Ver Nested-PCR
PP	Playa Perelli
QMRA	Evaluación cuantitativa del riesgo microbiano (por sus siglas en inglés)
RIQ	Rangos intercuartílicos
RNA	Ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés)
RT-PCR	Técnicas de retrotranscripción seguidas de una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
SD	Desvíos estándares (por sus siglas en inglés)
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TARV	Terapia antiretroviral
TOMA	Toma de agua de la empresa Aguas Cordobesas
UFC/100 mL	Unidades formadoras de colonias por 100 mililitros
X ²	Test de Chi Cuadrado de Pearson

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del genoma del virus de hepatitis E (HEV)	3
Figura 2: Relación filogenética de los HEV identificados en varios huéspedes	5
Figura 3: Distribución geográfica de los genotipos del HEV	6
Figura 4: Ciclo de replicación de HEV	10
Figura 5: Resumen de la historia natural de la infección aguda por el HEV	12
Figura 6: Ubicación geográfica del río Suquía, río Xanaes, Embalse San Roque, las Ciudades de Córdoba y Villa del Rosario y la planta de tratamiento Bajo Grande	23
Figura 7: Mapa que muestra la localización de la ciudad de Córdoba y el Río Suquía con cada uno de los puntos de muestreo a lo largo de su recorrido	25
Figura 8: Ubicación geográfica de los puntos de muestreo en el Embalse San Roque	26
Figura 9: Pasos generales de extracción utilizando kits comerciales	30
Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa para los distintos métodos de extracción para HEV ORF-1	35
Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa para los distintos métodos de extracción para HEV ORF-1	35
Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa para el protocolo de Huang y col. (2002) y Huang y col. modificado que muestra los fragmentos parciales del ORF 2	36
Figura 13: Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de muestras de líquidos residuales	36
Figura 14: Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de muestras de agua del río Suquía	37
Figura 15: Mapa que muestra la localización del Río Suquía con los puntos de muestreo	37
Figura 16: Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de muestras de agua del embalse	38
Figura 17: Ubicación geográfica de los puntos de muestreo en el Embalse San Roque	38
Figura 18: Captura de pantalla del programa MEGA 5.05 que muestra parte de la base de datos de fragmentos parciales de ORF-2 creada con secuencias de los cuatro genotipos descriptos del HEV disponibles en el GenBank y donde se incluyeron las secuencias identificadas en muestras ambientales en el presente estudio.	39
Figura 19: Árbol filogenético construido por el método de Neighbor-Joining basado en alineamientos de fragmentos de 146 nt del ORF-1 provenientes de la secuencia aislada en este trabajo y otras 21 secuencias de referencia	40
Figura 20: Árbol filogenético construido por el método de Neighbor-Joining basado en alineamientos de fragmentos de 280 nt del ORF-2 provenientes de la secuencias aisladas en este trabajo en líquidos residuales y río junto a otras 25 secuencias de referencia	40
Figura 21: Árbol filogenético construido por el método de Neighbor-Joining basado en alineamientos de fragmentos de 280 nt del ORF-2 provenientes de la secuencias aisladas en este trabajo en líquidos residuales, río Suquía y embalse San Roque junto a otras 45 secuencias de referencia	42
Figura 22: Mapa de la provincia de Córdoba donde se marca la zona de criaderos de cerdos muestreada	44

- Figura 23:** Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de algunas de las muestras de heces porcinas analizadas **47**
- Figura 24:** Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-1 de algunas de las muestras de heces porcinas analizadas **47**
- Figura 25:** Resultado del secuenciamiento directo en sentido 5'-3' (sense) de la muestra rotulada como "SW CbaArg-2-113" en un fragmento parcial del ORF-2 **49**
- Figura 26:** Resultado del secuenciamiento directo en sentido 3'-5' (antisense) de la muestra rotulada como "SW CbaArg-2-113" en un fragmento parcial del ORF-2 **49**
- Figura 27:** Árbol filogenético construido por el método de Maximum Likelihood basado en alineamientos de fragmentos de 235 nt del ORF-2 provenientes de las secuencias halladas en muestras de heces porcinas conjuntamente con las encontradas en líquidos residuales, río Suquia y embalse San Roque junto a otras 32 secuencias de referencia **50**
- Figura 28:** Mapa de la ciudad de Córdoba (31°23'51" S 64°10'57" O) donde se marcan con puntos negros la localización aproximada de la toma de muestras de suero de población general. **52**
- Figura 29:** Fotografía de una placa de Elisa luego de terminado el proceso de determinación de IgG anti-HEV **56**
- Figura 30:** Probabilidad estimada de seropositividad de HEV de acuerdo al recuento de CD4[+] (línea continua) con su intervalo de confianza del 95% (líneas punteadas). **58**
- Figura 31:** Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de muestras de pacientes HIV[+] **60**
- Figura 30:** Árbol filogenético realizado con el programa MEGA 5.05 utilizando el test de Neighbour-Joining y el método de distancias de Maximum Likelihood basado en alineamientos de fragmentos de 235 nt del ORF-2 **67**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Oligonucleótidos usados para la detección del HEV según Wang y col., 1999 y Huang y col. , 2002	33
Tabla 2: Valores límites bacterianos para aguas recreacionales (EPA 2012)	34
Tabla 3: Detalle de las fuentes, fechas de muestreo y números de accesos de las secuencias de nucleótidos de HEV ingresadas al GenBank en este estudio	39
Tabla 4: Resultados del análisis de RNA-HEV en muestras de cerdos estudiadas	46
Tabla 5: Resultados del análisis prospectivo de RNA-HEV (ORF-2) en las muestras de heces de la cerda hembra entre Agosto de 2005 y Junio de 2007	48
Tabla 6: Porcentajes de individuos con anticuerpos IgG anti-HEV positivos en suero clasificados por rango etario y nivel socioeconómico	56
Tabla 7: Marcadores de daño hepático en las muestras con diagnóstico de hepatitis aguda	57
Tabla 8: Seroprevalencia de IgG anti-HEV de acuerdo a los valores de LT-CD4[+] informados en cada paciente	59
Tabla 9: Comparación de seroprevalencia de IgG anti-HEV en pacientes dializados y trasplantados vs grupo control (población general)	61
Tabla 10: Análisis univariado de los factores asociados con la seroprevalencia de IgG anti-HEV	62
Tabla 11: Análisis multivariado de los factores independientes asociados con la seroprevalencia de IgG anti-HEV	62
Tabla 12: Secuencias de referencia de subtipos de HEV según Smith y col.	66

RESUMEN

El HEV es un virus ampliamente distribuido pero su circulación está subestimada. En Argentina, escasos estudios en humanos y cerdos muestran que dicho virus circula pero hasta el presente, no existían reportes de su circulación en matrices hídricas ambientales y los datos clínico-epidemiológicos locales eran escasos, por lo que conocer las implicancias de la infección en individuos inmunocompetentes e inmunosuprimidos, inferir posibles fuentes de infección y profundizar en la epidemiología molecular de HEV fueron los motivos de este proyecto.

Al inicio del estudio en Argentina no existían equipos diagnósticos aprobados para la detección de IgM/IgG-anti-HEV, por lo que el acceso al diagnóstico era limitado y los estudios sero-epidemiológicos escasos y desactualizados. La implementación de métodos moleculares era necesaria para concretar estudios que aportaron datos inéditos en la región acerca del HEV. Se realizó el primer estudio en Sudamérica que reportó HEV-3 (a, b, c) en aguas recreacionales que, junto a hallazgos en aguas residuales, corroboraron la utilidad de la vigilancia ambiental para el monitoreo y caracterización de las cepas circulantes de virus poco estudiados, demostrando la circulación constante del mismo subtipo desde hace al menos 7 años. La detección de HEV en cerdos y su estrecha relación filogenética con cepas humanas aumentaron la sospecha de un ciclo de transmisión local zoonótico.

La demostración serológica del HEV en 4,4% de la población general sumó evidencias locales de la circulación. La mayor prevalencia en pacientes inmunosuprimidos (7,37% HIV $p=0,12$; 10,22% dializados $p=0,031$; 5,8% trasplantados $p=0,66$) respecto a la población general, significativamente más elevada en individuos con bajos niveles de LT-CD4[+] (16%, $p=0,012$), resultó poco alentador considerando que son grupos en riesgo de adquirir infección crónica.

El hallazgo de IgM-anti-HEV en individuos dializados y en casos de hepatitis agudas NoA-NoC señalan al HEV como el responsable de casos de hepatitis E aguda subdiagnosticadas, resaltando la necesidad de su inclusión en el algoritmo diagnóstico.

La difusión de estos hallazgos y la implementación local de metodologías para la detección en diferentes etapas de la infección, podrán ser transferidas a los efectores de Salud, sanidad animal y ambiental para mejorar el diagnóstico, reforzar la vigilancia y profundizar el control de su diseminación.

PALABRAS CLAVE: Hepatitis E, seroprevalencia, pacientes inmunocomprometidos, monitoreo ambiental, cerdos, epidemiología molecular, Argentina.

SUMMARY

HEV is a widely distributed virus but its circulation is underestimated. In Argentina, few studies in humans and swines show that this virus circulates but so far, there were no reports of their circulation in water matrices and local clinical and epidemiological data were scarce, so to know the implications of infection in immunocompetent and immunosuppressed individuals, to infer possible sources of infection and to deepen the molecular epidemiology of HEV were the reasons for this project.

At the beginning of the study in Argentina, there were no approved diagnostic equipment for the detection of IgM / IgG-anti-HEV, so access to diagnosis was limited and sero-epidemiological studies were scarce and outdated. The implementation of molecular methods was necessary to materialize studies that contributed unpublished data in the region about HEV. The first study was conducted in South America that reported HEV-3 (a, b, c) in recreational waters that, together with findings in wastewater, corroborated the utility of environmental surveillance for the monitoring and characterization of poorly studied viral strains, demonstrating the constant circulation of the same subtype since at least 7 years ago. The detection of HEV in swines and their close phylogenetic relationship with human strains increased the suspicion of a zoonotic local transmission cycle.

The serological demonstration of HEV in 4.4% of the general population added local evidence of circulation. The highest prevalence in immunosuppressed patients (7,37% HIV $p=0,12$; 10,22% dialysed $p=0,031$; 5,8% transplanted $p=0,66$) compared to the general population, significantly higher in individuals with low levels of LT-CD4+ (16%, $p=0,012$), was less encouraging considering that they are groups at risk of acquiring chronic infection.

The finding of IgM-anti-HEV in dialyzed individuals and in cases of acute hepatitis NoA-NoC indicate HEV as responsible for cases of acute hepatitis E underdiagnosed, highlighting the need for its inclusion in the diagnostic algorithm.

The dissemination of these findings and the local implementation of methodologies for detection at different stages of infection can be transferred to the health effectors, animal and environmental health agents to improve the diagnosis, reinforce surveillance and deepen the control of their dissemination.

KEYWORDS: Hepatitis E, seroprevalence, immunocompromised patients, environmental monitoring, swines, molecular epidemiology, Argentina.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y RELEVANCIA DEL ESTUDIO

1. DESCUBRIMIENTO E HISTORIA DEL VIRUS DE HEPATITIS E

La Hepatitis E, conocida antiguamente como hepatitis no A, no B de transmisión entérica, es una patología hepática aguda causada por el virus de la Hepatitis E (HEV por sus siglas en inglés). El HEV pertenece a la Familia: *Hepeviridae*, Genero: *Orthohepevirus*, especie: *Orthohepevirus A*. Anteriormente, el HEV se clasificó dentro de la familia *Hepeviridae*, género *Hepevirus*^{1,2}. Desde finales de los años noventa, se identificaron agentes adicionales relacionados con el HEV en una gran variedad de animales como cerdos domésticos, jabalíes, ciervos, conejos, mangostas, hurones, ratas, pollos, murciélagos y truchas³. Tras la identificación de estas cepas y un nuevo análisis de las secuencias existentes, Smith y col. (2014)⁴ propusieron una nueva clasificación que divide a la familia *Hepeviridae* en dos géneros: *Orthohepevirus* (HEV que infectan mamíferos y aves) y *Piscihepevirus* (HEV que infectan peces). La propuesta fue aprobada por el ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de los Virus, por sus siglas en inglés) en mayo de este año⁵. A su vez, el género *Orthohepevirus* se subdividió en cuatro especies: *Orthohepevirus A, B, C y D*^{4,5}. La especie *Orthohepevirus A* incluye todos aquellos virus de este género que infectan a humanos, cerdos, ciervos, jabalíes, conejos, camellos y mangostas, así como una minoría de variantes que infectan ratas. La especie *Orthohepevirus B* incluye aquellos que infectan aves, la *Orthohepevirus C* aquellos que infectan ratas y hurones y, finalmente, la especie *Orthohepevirus D* aquellos virus del género que infectan murciélagos⁴.

En un principio se sospechó que la infección por HEV fuera endémica en países en desarrollo, especialmente del sur de Asia y del África subsahariana, encontrándose únicamente casos importados en países industrializados. Actualmente, un número creciente de evidencias demuestran que ocurren infecciones autóctonas frecuentes en países desarrollados⁶.

A menudo la infección por HEV es considerada como una enfermedad emergente debido a que el agente causante fue descrito por primera vez en 1990⁷ y un año después se publicó su genoma completo⁸. Sin embargo, hay evidencia histórica de brotes que son consistentes con las características de Hepatitis E Aguda (HEA) desde

principios del siglo pasado. Estos brotes se caracterizaron por la gran mortalidad en mujeres embarazadas en contraste con los hombres y las mujeres no embarazadas⁹.

Una de las epidemias más antiguas documentadas tuvo lugar en Nueva Delhi en 1955 pero no fue hasta 1980 que se encontró que el suero de los infectados no reaccionaba para el Virus de la Hepatitis A (HAV)⁶.

En 1983 un voluntario fue experimentalmente infectado por vía fecal-oral con extractos obtenidos de un individuo que había sufrido la enfermedad en un brote en Kyrgystzan. Esto permitió la identificación del virus por microscopía electrónica⁶. En 1988, las partículas de 32 nm fueron aisladas de heces de individuos pertenecientes a áreas geográficas afectadas por hepatitis no A - no B. Finalmente, en 1990 se recolectaron evidencias que demostraron la presencia de ácido ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés) de HEV en muestras de individuos infectados de Birmania, México, Somalia y Pakistán⁷.

En 1996, una cepa distinta a las previamente reportadas fue aislada de un individuo de Estados Unidos sin historial previo de viajes. Este caso, junto con la aparición de cuadros de HEA en países industrializados como Holanda, Japón y España, sirvió de puntapié inicial para sospechar la existencia de reservorios animales. Por esta razón, se han conducido una gran cantidad de estudios de seroprevalencia en distintas especies. En 1997, se aisló la primera cepa de HEV perteneciente a cerdos en EEUU con una similitud del 74% en la secuencia nucleotídica comparada con el prototipo aislado en Birmania y México, y con una similitud del 90% al compararse con las cepas humanas de la misma región. Debido a esto, se consideró la posibilidad que HEV fuera una zoonosis⁶.

2. ESTRUCTURA DEL VIRUS

El HEV es un virus pequeño no envuelto de simetría icosaédrica formado por una única molécula de RNA de polaridad positiva y con 7,5 kb de longitud que contiene en su extremo 3' una cola de poli-A y codifica para tres marcos de lectura abiertos superpuestos (*open reading frames* -ORF-) ^{7,10}. En el extremo 5' se encuentra un capuchón (*cap*)¹¹, seguido de una región no codificante y a continuación el ORF-1, de 5079 nt, que codifica las proteínas no estructurales con actividad enzimática, una metiltransferasa, una proteasa, una helicasa de RNA y una RNA polimerasa dependiente de RNA, que están involucradas en la replicación viral, la transcripción y el procesamiento proteico^{12,13}. El ORF-2, de 1980 nt, termina unos 65 nt antes de la cola de poli-A y da lugar a la proteína estructural de la cápside viral que contiene epitopes

que inducen anticuerpos neutralizantes¹⁴. El ORF-3 se superpone en 1 nt en su extremo 5' con el ORF-1 y en 328 nt con el ORF-2, y codifica para una proteína fosforilada reguladora, no glicosilada involucrada en la morfogénesis y la patogenicidad del virus¹⁵⁻¹⁷.

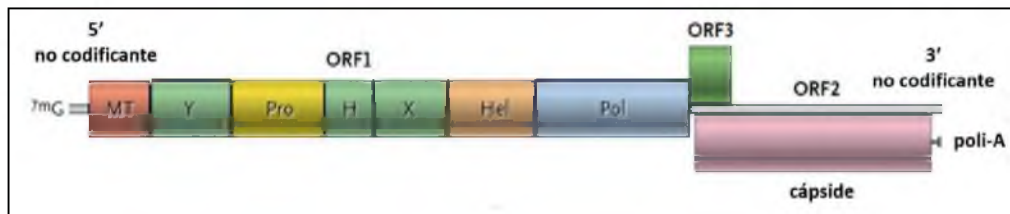


Figura 1: Estructura del genoma del virus de hepatitis E (HEV): MT: metiltransferasa; Pro: proteasa; Hel: helicasa; Pol: RNA polimerasa; Y, H y X: regiones de función desconocida (adaptado de Hoofnagle y col., 201210)

3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

Se ha determinado la existencia de un único serotipo pero existe una gran diversidad genética entre los distintos aislamientos de HEV¹⁸, que involucran hallazgos del HEV en de mamíferos, aves y peces^{3,19}. A su vez los HEV en mamíferos se clasifican en 4 genotipos (gt1-gt4) con características clínico-epidemiológicas distintas²⁰ (Figura 2). Los gt1 y gt2 han sido responsables de brotes epidémicos en humanos en países endémicos mientras que los gt3 y gt4 son responsables de casos aislados agudos en humanos y también han sido aislados de animales²¹⁻²³.

Lu y col. (2006)²⁴, realizaron el cálculo de la divergencia nucleotídica necesaria para la diferenciación de las secuencias de HEV en 3 niveles: genotipos, subtipos y cepas. En primer lugar, para los gt1 y gt2 se estimó a partir del genoma viral completo una divergencia del 24% a nivel de genotipos, entre 6,2%-11% a nivel de subtipos y entre 2%-3,6% a nivel de cepas²⁴.

Para los gt3 y gt4, las diferencias nucleotídicas en base al genoma completo se estimaron entre 23,9%-26,7% a nivel de genotipo, entre 12,1%-18% a nivel de subtipo y entre 5,8%-10,2% a nivel de cepas. Los mismos autores encontraron que utilizando el extremo 5' del ORF2 se logran reflejar resultados similares en la clasificación del HEV, a los hallados con genomas completos²⁴.

El HEV gt1 (HEV-1) presenta 5 subtipos denominados 1a-1e de acuerdo al orden de hallazgo. Estos subtipos difieren en el lugar donde fueron reconocidos y se trata de los principales causantes de brotes en distintas regiones de Asia. En América, el subtipo 1b

fue identificado en Haití, Cuba y Uruguay^{23,25}. En Argentina se identificó un caso de subtipo 1a proveniente de un caso importado de una persona que había viajado a India²⁶.

El HEV gt2 (HEV-2) presenta dos subtipos, el primero, 2a, encontrado en México y el segundo, 2b, en Nigeria y Chad²³.

El HEV gt3 (HEV-3) corresponde a cepas que infectan tanto humanos como otros animales (principalmente ciervos y cerdos) y es el más extendido mundialmente habiéndose detectado en Estados Unidos, España, Francia, Austria, Grecia, Canadá, Reino Unido, Holanda, Nueva Zelanda, Brasil, Bolivia, Argentina, Venezuela entre otros países^{19,22,23,27}. Sus variantes fueron denominadas como subtipos 3a hasta 3j y el 3a es el más abundante en EEUU, Corea, Holanda y España^{6,23}. Las cepas del HEV encontradas en Argentina corresponden al gt3 y subtipos 3a, 3b y 3i^{19,26,28-30}.

El HEV gt4 (HEV-4) se ha identificado en China, Taiwán, Japón, India, Vietnam, entre otros países, en humanos y animales²³. Un estudio realizado en China reveló la presencia de un potencial nuevo genotipo en conejos de granja, el cual se clasifica en nueve subtipos (4a-4i)^{31,32}.

Recientemente Smith y col. (2014)⁴ han clasificado, dentro de *Orthohepevirus A*, siete genotipos de HEV que comprenden los que infectan humanos (HEV-1, -2, -3, -4 y -7), cerdos (HEV-3 y -4), conejos (HEV-3), jabalíes (HEV-3, -4, -5 y -6), mangostas (HEV-3), ciervos (HEV-3), yaks (HEV-4) y camellos (HEV-7) (Figura 2). Una cepa HEV se ha caracterizado en aislamientos en alces suecos, pero todavía no está asignada a ningún genotipo del HEV^{3,33} (Figura 2).

Debido al patrón complejo que muestran las relaciones filogenéticas del HEV y la distribución de las distancias entre los nucleótidos, en 2016 se propuso una re-clasificación de los subtipos³¹, respetando lo propuesto por Lu y col. (2006)²⁴, que clasificó previamente genotipos y subtipos de acuerdo porcentaje de divergencia de las secuencias nucleotídicas incluidas en cinco árboles filogenéticos. La nueva propuesta incluye la formación de dos clados para el gt3: “3abchij” (que incluye los subtipos 3a, 3b, 3c, 3h, 3i y 3j) y “3efg” (que agrupa los subtipos 3e, 3f y 3g). A la vez, los mismos autores proponen las secuencias de referencias que podrían ser usadas por los investigadores para lograr un mejor consenso en la clasificación de subtipos del HEV³¹.

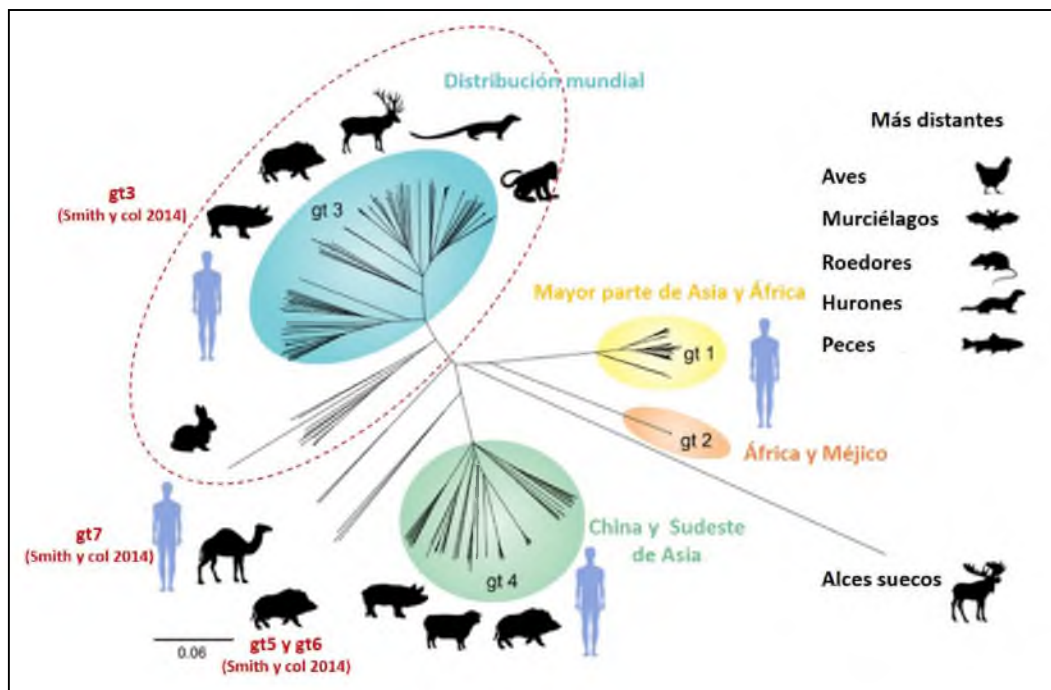


Figura 2: Relación filogenética de los HEV identificados en varios huéspedes: Debing y col. (2016) obtuvieron del GenBank secuencias de 305 nucleótidos del HEV, las alinearon con ClustalW y construyeron un árbol filogenético con el método de Neighbor-Joining. Mientras que los gt1 y gt2 se limitan a los seres humanos, los gt3 y gt4 se encuentran en humanos y una amplia gama de especies animales: gt3 en cerdos, jabalíes, ciervos, mangostas y monos japoneses; gt4 en cerdos, jabalíes y ovejas. Se agrega la clasificación propuesta por Smith y col. (2014) que adiciona al gt3 las secuencias halladas en conejos, e incorpora tres genotipos más: gt5 y gt6 en jabalíes y gt7 en humanos y camellos. En esta figura existen secuencias no clasificadas todavía en gt y que se encuentran más alejadas de los ya descritos (adaptado de Debing y col., 2016³³ y Smith y col., 2014⁴).

4. EPIDEMIOLOGÍA

Para el HEV se registran dos patrones epidemiológicos, el de la vía entérica y el de la vía zoonótica. El patrón epidemiológico relacionado con la vía entérica ha sido registrado en los países en desarrollo, donde se reportaron brotes epidémicos vinculados al agua potable contaminada^{19,23}. Sin embargo, la epidemiología de la hepatitis E en los países industrializados es diferente y ha cambiado con el tiempo^{21,34}. Inicialmente, en los países desarrollados la infección por HEV estaba vinculada a los viajes a zonas endémicas, pero actualmente, se reporta como una infección vinculada a un reservorio animal^{6,19}. Además, la seroprevalencia en los países industrializados es mayor de lo que se pensaba anteriormente, en comparación con el número de casos autóctonos reportados³⁵. De hecho, varios estudios ya definen una clara separación entre los dos tipos diferentes de la infección por HEV. Los gt1 y gt2, que prevalecen en los países en vías de desarrollo, son responsables de enfermedades transmitidas por agua; mientras

que los gt3 y gt4, frecuentes en países industrializados, producen principalmente infecciones zoonóticas transmitidas por los alimentos^{10,36} (Figura 3).

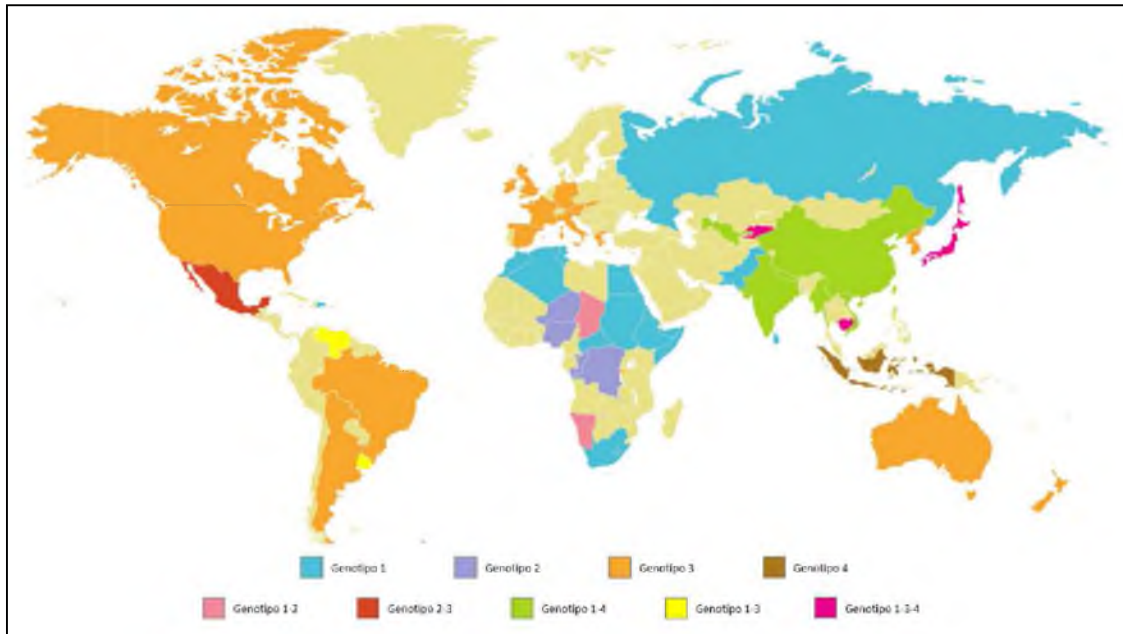


Figura 3: Distribución geográfica de los genotipos del HEV (adaptado de Mirazo y col., 2014³⁷ y Pérez-Gracia y col., 2015⁶)

La infección por HEV es endémica en el centro y el sudeste de Asia. Se reportaron varios brotes en el Medio Oriente, el norte y el oeste de África y América Central (México). Los brotes por el HEV son de larga duración pudiendo afectar a cientos de miles de personas y al extenderse aún más pueden convertirse en epidemias con duraciones de más de un año. Durante los brotes, el porcentaje de la población afectada puede variar entre el 1% y el 15%.

En áreas endémicas, la prevalencia total de anticuerpos frente al HEV es bastante variable, del 3 al 27%^{10,19,38} y, a diferencia de otros virus entéricos, la presencia de IgG en niños y jóvenes es menor que en adultos (0,25-10% vs 3-30%)^{19,39-42}. Estos números sugerirían que las infecciones anictéricas y/o subclínicas podrían ser más frecuentes en niños. Además, los hombres se infectan con más frecuencia que las mujeres^{6,21,34}. La transmisión de persona a persona es rara y es más frecuente en los miembros de una misma familia que están infectados por una fuente de agua común⁴³.

En países no endémicos, se han observado casos esporádicos de hepatitis E donde constituyen entre 1-11% de los casos agudos de hepatitis y se debe principalmente a personas que viajaron a zonas endémicas⁴⁴. Sin embargo, recientemente se ha informado un número cada vez mayor de casos de hepatitis E autóctonos, como se mencionó anteriormente^{45,46}.

En los países industrializados, las tasas de seroprevalencia de HEV varían entre 1-5% en población sana^{6,19,35}. Además, llamativamente, en algunas áreas no endémicas con buenas condiciones sanitarias y de control de abastecimiento del agua, la prevalencia de anticuerpos anti-HEV en la población general es bastante elevada, de hasta un 7-10%, incluso mayor que la descrita en algunas áreas endémicas^{13,30,47-49}. Esta prevalencia no se correlaciona con la baja incidencia de casos agudos de la hepatitis E, por lo que refuerza la idea de la posibilidad de gran cantidad de infecciones subclínicas, pero se requieren más estudios para poder afianzar esta idea.

La primera evidencia serológica de infección por HEV en Sudamérica fue encontrada en Venezuela en 1994¹⁹. Desde entonces ha habido un creciente número de estudios de prevalencia en la región, las cuales oscilan entre 1% y 35%. Desafortunadamente la diversidad de metodologías utilizadas dificulta la comparación de estos estudios, ya que los inmunoensayos disponibles comercialmente tienen diferente configuración antigénica¹⁹. Teniendo en cuenta estas limitaciones, esta porción del continente presenta una endemidad moderada para HEV¹⁹. En Argentina se han descrito prevalencias de entre 0,15% y 35%, dependiendo la población estudiada y el kit comercial utilizado^{30,41,50}.

5. VÍAS DE TRANSMISIÓN

5.1. Transmisión entérica

La transmisión del HEV se produce por vía fecal-oral a través de la ingestión de agua y/o alimentos contaminados por lo que se la relaciona directamente con las condiciones sanitarias deficientes de los países en vías de desarrollo con clima templado⁵¹. Este es el caso de muchas regiones de Asia, Oriente Medio, norte de África y América Central, donde el HEV es endémico^{22,51}. Los casos encontrados en áreas no endémicas, al principio, se relacionaron con gente que había viajado a zonas endémicas, pero actualmente se describen cada vez más casos de hepatitis E esporádicos autóctonos en países desarrollados, en pacientes que no presentan este factor de riesgo epidemiológico^{19,22,51-53}. En contraste con el virus de la hepatitis A y otros virus entéricos, la transmisión de humano a humano del HEV es rara⁵⁴.

5.2. Transmisión zoonótica

La hepatitis E es considerada una enfermedad zoonótica y los cerdos junto a los jabalíes constituyen el reservorio del HEV, ya que estudios filogenéticos de cepas humanas y porcinas han demostrado una gran similitud y se han documentado infecciones cruzadas

entre humanos y cerdos^{10,23,51,55}. La primera descripción de la presencia de anticuerpos específicos frente al HEV en cerdos se realizó en los años noventa^{56,57} y la infección experimental de cerdos con el HEV mostró que los animales infectados presentaban viremia y liberaban virus en las heces pero no se observaba en ellos evidencias clínicas o bioquímicas de la enfermedad¹³. Se han realizado estudios de seroprevalencia en cerdos mostrando valores entre el 20% y el 100% en América, Europa, Asia y Oceanía, y la detección de RNA viral en heces y sueros porcinos indicó que el HEV está diseminado no sólo en los países endémicos, sino en la población porcina mundial^{13,21,40,58-60}. Así, la observación de la elevada incidencia de la infección por HEV en ganado porcino dio origen a los estudios de vigilancia epidemiológica en países endémicos en personas que estaban en contacto directo con los cerdos, arrojando una seroprevalencia entre el 50 y el 100%^{19,40,48,60-62}. Diversas investigaciones realizadas en Japón demostraron además que la prevalencia de anticuerpos en cerdos aumenta con la edad de los animales siendo de un 7% en cerdos de dos meses, de un 40% en cerdos de cuatro meses y de entre un 80 y un 100% en cerdos entre cinco y seis meses de edad, por lo que se infiere que la infección con el HEV se produce en las primeras etapas de crecimiento^{29,48,59,63}. En consecuencia el hallazgo de RNA viral es mayor en cerdos de dos a cuatro meses de edad^{29,48,59}. Estos estudios se complementan con otros realizados en Estados Unidos, Corea, Tailandia y México, donde el RNA viral no se detectó en suero en cerdos en etapa de succión ni en cerdos con una edad superior a los seis meses⁶⁴⁻⁶⁶.

En estudios realizados en nuestro país, área no endémica, en criaderos de cerdos de las provincias de Santa Fe, San Luis, Mendoza, Buenos Aires, Neuquén y Río Negro, se encontró una gran homología genética con las secuencias del HEV encontradas en pacientes clasificados como casos esporádicos de hepatitis aguda no A no C. Al mismo tiempo, estudios en criaderos de cerdos de 2 a 4 meses de edad en estas mismas provincias arrojaron una seroprevalencia de un 22,7%, con un rango variable en las distintas regiones, entre un 4% en Santa Fe y un 58% en Buenos Aires^{29,30}.

Asimismo, la existencia de otros datos refuerzan la idea de que la Hepatitis E es una enfermedad zoonótica: la prevalencia elevada de anticuerpos específicos en piaras de regiones endémicas y no endémicas; la detección del HEV en aguas contaminadas con heces porcinas; el mayor riesgo de infección documentado en aquellas personas que consumen agua superficial cercana a criaderos de cerdos y de los trabajadores del sector y las variantes porcinas del HEV que resultan genéticamente más relacionadas a las variantes humanas de una misma región que a las variantes porcinas de otras partes del mundo; entre otras evidencias⁶⁷. Pero la prueba definitiva del carácter

zoonótico de la enfermedad fue la descripción de casos de hepatitis aguda tras la ingesta de carne cruda de ciervo infectado por el HEV en una familia de ocho personas dónde tres de ellos que no consumieron la carne contaminada no se infectaron, cuatro de ellos que sí consumieron presentaron hepatitis y el restante miembro de la familia que consumió sólo un trozo pequeño no resultó enfermo, lo que apoya la teoría de que la enfermedad también es dependiente de la carga viral del inóculo. El análisis de la secuencia del HEV encontrado en los pacientes y en la carne de ciervo sobrante presentó un 100% de homología nucleotídica⁶⁸.

Además de esta información que plantea como reservorios de HEV a cerdos y ciervos, también se han detectado anticuerpos específicos y RNA-HEV en otras especies, tales como aves de corral, perros, gatos, ganado vacuno, roedores, mangostas, caballos y ovejas⁶. Consistente con esto, se ha informado por medio de infecciones experimentales que el HEV es capaz de cruzar la barrera de especies. Por ejemplo, primates han sido infectados con HEV porcino⁶⁹, mientras que cerdos, corderos⁷⁰ y roedores⁷¹ han sido infectados con HEV humano. Una posible explicación de la gran variabilidad genómica del HEV es un origen animal. Esta idea se sustenta con la ayuda de la secuenciación genómica y el análisis filogenético de muchas cepas de HEV, que muestran una estrecha relación entre las cepas animales y humanas de la misma área geográfica⁶.

5.3. Otras vías de transmisión

Las vías de transmisión alternativas, tales como transfusiones y transmisión vertical, están siendo cada vez más relevantes a medida que se reportan cada año nuevos casos. La transfusión de sangre se ha convertido en una importante ruta de transmisión en los países desarrollados. Un grupo de investigación en el sudeste de Inglaterra analizó de forma retrospectiva un total de 225.000 donantes de sangre, de los cuales 79 resultaron tener viremia detectando el HEV-3⁷². El seguimiento de 43 receptores mostró que 18 (42%) tenían evidencia de infección, y sólo aquellos pacientes inmunodeprimidos presentaron morbilidad aguda.

Asimismo, se está reportando con más frecuencia la transmisión vertical de mujeres embarazadas a sus hijos⁵¹. Un estudio reciente sugiere que en los países en desarrollo el HEV-1 puede ser responsable de más de 3.000 niños nacidos muertos cada año, incluyendo muertes fetales vinculadas a la mortalidad materna prenatal⁷³.

6. REPLICACIÓN VIRAL

El ciclo de replicación del HEV no se conoce en profundidad debido a la dificultad de la propagación del virus en cultivos celulares. No obstante, se han producido infecciones exitosas y replications en las líneas de células hepáticas Huh7, PLC/PRF/5 y HepG2, en células de carcinoma de pulmón A549 y en la línea de carcinoma de colon Caco-2. En la Figura 4 se describe el ciclo de la replicación del HEV propuesto por varios autores^{14,15,74}:

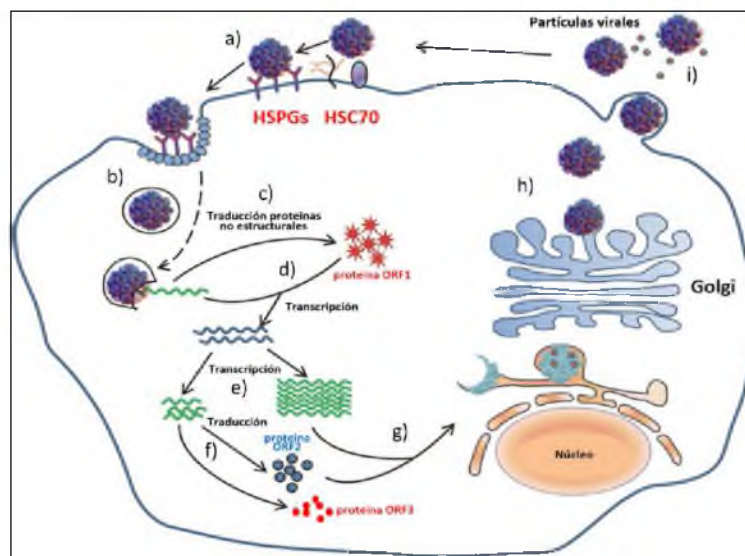


Figura 4: Ciclo de replicación de HEV (adaptado de Pérez-Gracia y col., 2014²³)

- a) Las partículas virales se concentran en la superficie de las células diana utilizando las moléculas de heparán sulfato (HSPG, HSC70 y otros) como factores de anclaje.
- b) Se ancla a una proteína receptora aún no determinada a pesar de que las proteínas HSP90 y GRP78 podrían estar involucrados en este proceso. Esto desencadena la endocitosis y liberación del RNA al citoplasma.
- c) La región correspondiente al ORF-1 es la primera en traducirse en el citoplasma con la consecuente formación de las poliproteínas no estructurales que incluyen la RNA polimerasa RNA dependiente.
- d) La RNA polimerasa RNA dependiente sintetiza la cadena negativa intermedia a partir de la cadena positiva correspondiente.
- e) Se sintetizan las copias del RNA viral subgenómico a partir del molde intermedio.
- f) Se traducen las regiones subgenómicas correspondientes al ORF-2 y al ORF-3 en el citoplasma.

- g) La proteína estructural del ORF-2 ingresa al retículo endoplásmico donde empaqueta el RNA para la generación de los nuevos viriones mientras la proteína ORF3 optimiza el entorno de la célula huésped para la replicación viral.
- h) Los nuevos viriones son transportados a la membrana celular. La proteína ORF3 también estaría asociada con endomembranas y membranas plasmáticas para ayudar en la salida viral.
- i) Se liberan las nuevas partículas virales, las que abandonan la célula. Estudios recientes sugieren que los viriones maduros se asocian con la proteína ORF3 y los lípidos, los cuales se eliminan posteriormente a través de un proceso no muy conocido en la actualidad, para reanudar un nuevo ciclo de infección.

7. PATOGÉNESIS

El HEV ingresa, en su forma clásica, por vía oral y alcanza el hígado donde se replica^{10,33}. Posteriormente se acumula en la bilis y la utiliza como medio para llegar al intestino a través del conducto biliar y de ahí se excreta en las heces^{10,75}.

En la hepatitis E aguda autóctona, la patología en el hígado no cirrótico es similar a la observada en cualquier hepatitis viral aguda, presentando desorden lobular con un marco distorsionado de la reticulina. Los tractos portales se muestran ampliados por un severo infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares y linfocitos. También se encuentra presente una moderada a severa hepatitis de interfase y colangitis^{76,77}.

La investigación del daño hepático mediante biopsias en un brote en Nueva Delhi en los años cincuenta⁷⁸ mostró una alteración colestásica, caracterizada por presencia de estasis biliar en los canalículos y en las células parenquimatosas que se disponían de forma pseudoangular. Además en aquellos pacientes que no presentaron alteraciones colestásicas, se observó abombamiento y degeneración acidófila de los hepatocitos y la formación de cuerpos acidófilos⁷⁵.

Los factores virales y del huésped que determinan la gravedad de la enfermedad causada por la infección por HEV no se conocen completamente. Sin embargo, se cree que los factores virales, tales como el genotipo del HEV, la carga viral y otras coinfecciones podrían desempeñar un papel fundamental en la patogénesis⁷⁹. Al parecer, el gt3 y gt4 son menos patógenos en humanos en relación con los gt1 y gt2⁸⁰.

Otros factores que se cree que están involucrados en la gravedad de la enfermedad son los relacionados con el huésped. Podrían jugar un papel importante el embarazo, el uso de anticonceptivos⁸¹, la edad, la enfermedad hepática preexistente y la respuesta

inmune del huésped⁶. Más recientemente se han observado otras formas clínicas de enfermedades por el HEV en pacientes en condiciones inmunosupresoras, tales como los receptores de trasplantes⁸² o pacientes que sufren de leucemia⁸³. Algunos de estos pacientes desarrollaron infección crónica por HEV y progresaron a cirrosis⁸⁴. Esto sugiere claramente que el resultado clínico y virológico atípico de la infección por HEV en estos casos podría estar relacionada con los tratamientos inmunosupresores, que podrían haber dado lugar a respuestas inmunes anti-HEV-específicas subóptimas y la persistencia viral subsiguiente. Tal hipótesis ha sido defendida por Kamar y col (2008)⁸² quienes encontraron una reducción significativa en los recuentos de linfocitos T CD2+, CD3+, CD4+ en pacientes con enfermedad crónica por HEV y en las poblaciones en riesgo de desarrollar insuficiencia hepática fulminante. Otra población que podría estar en riesgo de infección crónica por HEV son aquellos pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés) que tengan un cuadro de inmunodeficiencia avanzada^{85,86}.

8. CINÉTICA DE ANTICUERPOS

Respecto a la presencia de anticuerpos (Figura 5), el hallazgo de IgM anti-HEV coincide con la aparición de los síntomas, 2-3 semanas luego de la exposición al HEV, y se mantiene en circulación hasta 6 meses^{87,88}. Las IgG anti-HEV aparecen poco después de las IgM, aproximadamente 4-5 semanas post infección, y son detectadas en suero hasta 12-14 años después de la infección inicial^{37,87,88}. Las IgA anti-HEV aparecen junto con las IgG y desaparecen en general junto con las IgM⁶.

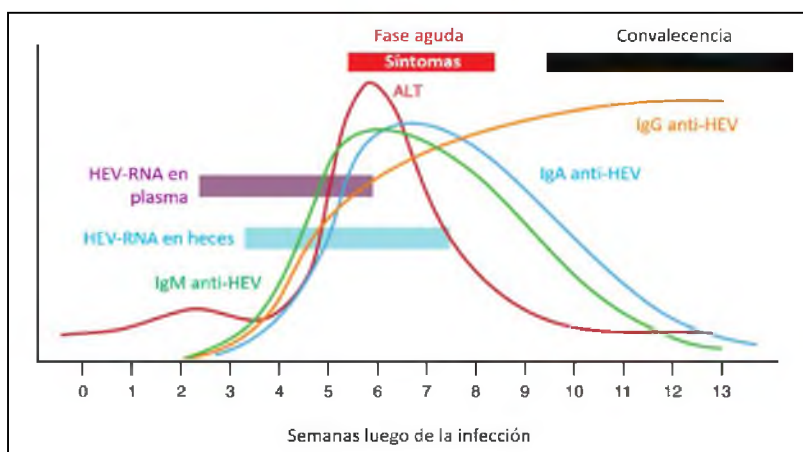


Figura 5: Resumen de la historia natural de la infección aguda por el HEV (adaptado de Pérez-Gracia y col. 2015⁶).

9. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN

Las características clínicas de la hepatitis E se asemejan a las de la hepatitis A aguda, manifestándose de manera aguda autolimitada cuya presentación varía desde subclínica a hepatitis fulminante. La enfermedad se presenta tanto como casos esporádicos o como brotes epidémicos^{10,22}. El periodo de incubación es de 40 días con un rango de 15 a 60 días⁶ (Figura 5). En la mayoría de los casos las infecciones son asintomáticas pero en el caso de existir signos y síntomas, la elevación de las enzimas hepáticas se produce entre 30 y 120 días después de la infección^{23,75,89} (Figura 5). La viremia es transitoria (excepto en los casos crónicos), desde la fase preictérica y desapareciendo al comienzo de los síntomas²³ (Figura 5). La excreción fecal comienza unos días antes de la fase icterica (al quinto día en promedio) y dura alrededor de 2-3 semanas²³. También el HEV se ha detectado en suero, heces y orina en periodos más largos, de hasta 16 semanas, lo que implica la posibilidad que los individuos infectados asintomáticos pueden servir como reservorio del virus entre epidemias, y de esta forma, originar infecciones esporádicas entre personas o por contaminación del agua y los alimentos^{51,67,90}.

9.1. Clínica en individuos inmunocompetentes

En el caso de infecciones sintomáticas en pacientes inmunocompetentes, durante la fase icterica se observa un cuadro similar a una gripe con malestar general, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos; también se ha descrito astenia, anorexia, artralgias, hepatoesplenomegalia, diarrea, heces amarronadas, orina oscura, prurito y exantemas cutáneos^{23,51,89}.

Las manifestaciones extrahepáticas incluyen pancreatitis, manifestaciones hematológicas (trombocitopenia, hemólisis) o síndromes neurológicos (síndrome de Guillain-Barre, meningoencefalitis, pseudotumor cerebral, parálisis de los nervios)^{87,91}. De todos modos, en países endémicos esta enfermedad tiene una tasa de mortalidad baja (0,2 a 4%)^{40,67}, y el alto porcentaje de mortalidad reportado en áreas no endémicas (8-11%) está posiblemente relacionado con una infección con HEV en pacientes con enfermedades hepáticas previas⁴⁰.

En pacientes con enfermedades hepáticas crónicas que se infectan con el HEV se puede desencadenar una hepatitis aguda^{10,23,33}. Las manifestaciones clínicas son similares a la mono infección, pero se produce un rápido progreso hacia una descompensación hepática con ascitis y encefalopatía hepática^{10,23}. Además, puede originarse fallo renal que pueden conducir a la muerte^{10,23}. El consumo de alcohol es

considerado un factor de riesgo importante dado que favorece la rápida aparición de los síntomas clínicos y está relacionado a la severidad de la enfermedad. En estos pacientes, la presencia de esteatosis hepática o fibrosis se relaciona con una respuesta inmunológica más fuerte⁹².

9.2. Clínica en mujeres embarazadas

Una de las características más preocupantes de la infección por el HEV es la gravedad que presenta la enfermedad causada por el HEV-1 en mujeres embarazadas. En esta población en particular se observa una incidencia de fallo hepático fulminante (FHF) mucho mayor a la de la población general, el cual se complica con encefalopatía y coagulación intravascular diseminada (CID) con tasas de mortalidad superiores al 20%^{6,10,22,40,93,94} que aumentan con el progreso del embarazo y llegan a duplicarse en el último trimestre^{51,75,91,95,96}. Además diversos estudios han demostrado que los episodios de FHF son causantes de un 100% de mortalidad en embarazadas infectadas por el HEV y sólo el 50% en embarazadas no infectadas⁹⁷. También hay mayor número de complicaciones obstétricas, por ejemplo, ruptura prematura de membranas, hemorragia post-parto, abortos espontáneos, y la muerte fetal intrauterina⁹⁸. La tasa de mortalidad durante el embarazo se ha reportado entre un 15-25%^{23,99,100} y según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el tercer trimestre de gestación se encuentra alrededor del 20%¹⁰¹. Las complicaciones fetales incluyen el nacimiento prematuro y bajo peso al nacer⁹⁸. La tasa de muerte fetal y neonatal alcanza hasta el 25%^{33,94}.

La alta tasa de mortalidad de la hepatitis E aguda en el embarazo se postula como resultado de cambios hormonales (estrógeno y progesterona) e inmunológicos, incluyendo una regulación negativa del factor-kappa-B y un cambio del equilibrio de células T helper-1/T helper-2 hacia T helper-2, además de los factores de susceptibilidad del huésped que aparecen en el embarazo^{79,102}. Devhare y col.¹⁰³ estudiaron la respuesta inmune a la infección por HEV y observaron una respuesta celular temprana y sus mecanismos moleculares asociados, sugiriendo un papel potencial de la infección por HEV en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria del huésped y la patogénesis. Demostraron la regulación positiva de genes de citoquinas y quimioquinas y la secreción de IL-6, IL-8 y TNF (factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés) en las células epiteliales humanas infectadas con HEV. Tripathy y col.¹⁰⁴ encontraron que los niveles elevados de interleuquina-1a y de los receptores de interleuquina-2 en sangre son clave en la patogénesis de HEV. También demostraron participación de la respuesta inmune innata en el sitio de la infección. Todos estos estudios sugieren que la

destrucción inmune de los hepatocitos es importante en la patogénesis de la hepatitis E⁶.

9.3. Clínica en individuos inmunocomprometidos

El HEV es capaz de provocar hepatitis crónica, especialmente, en personas receptoras de trasplante de órganos sólidos (riñón, hígado y páncreas) y en sujetos con infección por HIV (HIV[+]) aunque en menor proporción^{40,51,82,84,105-107}. Las manifestaciones clínicas de la infección crónica no son específicas: la mayoría de los pacientes son asintomáticos y unos pocos presentan ictericia, fatiga, dolor abdominal, fiebre y astenia¹⁰⁸.

9.4. Hepatitis E Crónica

La Hepatitis E Crónica (HEC), definida como la presencia de RNA viral en suero, plasma o materia fecal, por 6 meses o más⁸², puede resultar en fibrosis hepática progresiva con la consiguiente falla hepática y posible necesidad de trasplante. Según los estudios realizados hasta el momento, HEV-3 ha sido el único asociado a la cronicidad y ocurre en la mayoría de los casos en individuos con el sistema inmunológico comprometido^{21,91}, tales como receptores de trasplantes de órganos con terapia inmunosupresora, individuos HIV[+]¹⁰⁸ y en pacientes con tratamiento de diálisis crónica¹⁰⁹, aunque se han reportado algunos casos de HEV crónico en pacientes inmunocompetentes¹¹⁰⁻¹¹².

Estudios clínicos sugieren que la ocurrencia y persistencia de la infección por HEV estaría favorecida por el estado inmunológico de los pacientes¹¹³. Si bien el mecanismo continua siendo incierto, se resalta el rol de la activación de las células T por reconocimiento de los péptidos codificados por ORF-2 y ORF-3 en pacientes con HEA^{91,113,114}. Se sugirió que la respuesta ineficiente de la inmunidad adaptativa podría estar relacionada con la HEC y que la estimulación de este tipo de inmunidad contra HEV podría ser un mecanismo efectivo para prevenir la infección persistente¹¹⁴.

En individuos trasplantados, la cronicidad ha sido reportada en trasplantes de riñón, hígado, pulmón o corazón^{82,109,115}, así como también en trasplantes de células madres¹¹⁶. En un estudio retrospectivo, aproximadamente el 60% de los trasplantados expuestos al virus desarrollaron infecciones crónicas¹¹⁵ y se ha registrado que estos individuos tienen un riesgo incrementado de progresar hacia la cirrosis y la falla hepática en menor tiempo¹⁰⁸. Al momento de analizar qué factores estarían influyendo en este fenómeno, se reconoció que el cuadro de trombocitopenia propio de la infección y el uso de Tacrolimus (droga inmunosupresora) estarían fuertemente asociados¹¹⁵.

En individuos HIV[+], hasta 2012, la incidencia de infección crónica era baja, variando de 0% a 0,9%. Sólo unos pocos casos (todos por HEV-3) se pudieron confirmar por PCR en todo el mundo y todos presentaron un conteo bajo de células T CD4+^{6,85,86,115}.

Los pacientes que se encuentran en tratamiento de diálisis crónica normalmente presentan defectos en la generación de la inmunidad celular y humoral, asociados a la falla renal terminal. Aún no se ha confirmado que HEV pueda generar cuadros de infección crónica en estos pacientes¹⁰⁹.

La prevalencia de HEV en pacientes con distintas condiciones de inmunosupresión varía entre países, y si bien la frecuencia de publicaciones que analizan la prevalencia y la existencia de posibles factores de riesgo han aumentado en los últimos años, es necesario seguir estudiando estas condiciones en la infección por HEV. En Argentina, sólo existen dos publicaciones, que reportan la circulación de HEV en poblaciones locales de inmunosuprimidos, en particular en pacientes HIV[+], no habiéndose detectado ningún caso de hepatitis crónica^{30,50}.

10. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Las metodologías existentes para el diagnóstico del HEV son de tipo directo e indirecto. Dentro de los primeros se incluye la detección del material genético del virus mediante técnicas de retrotranscripción seguidas de una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y metodologías de PCR en tiempo real (qPCR) para cuantificar el RNA-HEV, con la ventaja de reducir el tiempo de diagnóstico (~3 horas)^{6,37,87}. Estas técnicas de ácidos nucleicos (NAT) se utilizan para detectar el RNA-HEV en muestras de suero, plasma, heces y biopsias de tejidos³⁷.

Es importante considerar que la sensibilidad de las NAT para la detección de RNA-HEV es dependiente del momento de la toma de la muestra, de que el paciente concurra al laboratorio cuando comienzan los síntomas, de la rápida y adecuada toma de muestras de suero y/o heces y finalmente del transporte y el procesamiento apropiado de las mismas³⁷. Por lo tanto, el RNA viral indetectable, bajo ciertas circunstancias en las que no se contemplan la pautas básicas de diagnóstico, no descarta la infección por HEV¹⁰⁵. A pesar de que el RNA-HEV se puede detectar en el inicio de la enfermedad y hasta 6 y 4 semanas en heces y suero, respectivamente, los niveles de RNA viral pueden ser bajos y por lo tanto reducir la ventana de captura de HEV³⁷. Además, los métodos de NAT para HEV no han sido estandarizados, y se observa una gran variabilidad en los ensayos *in-house*¹¹⁷. Varios grupos europeos están trabajando junto con la OMS para poder desarrollar un estándar internacional para técnicas de NAT para HEV¹¹⁷.

Los métodos indirectos se basan en la detección de anticuerpos específicos (IgM e IgG) contra el HEV en muestras de suero, siendo las técnicas más comunes los enzimoimmunoensayos (ELISA)^{10,22,87}. Se busca IgM-HEV para el diagnóstico agudo de la infección e IgG-HEV para establecer un contacto previo con el virus^{6,10,19}. Si bien existe una gran diversidad de kits comerciales disponibles en el mercado, éstos varían en su efectividad, sensibilidad y especificidad^{19,37,108}. Varios estudios comparativos realizados recientemente entre diversos ELISA disponibles en el mercado para la identificación de anticuerpos anti-HEV demostraron diferencias en la sensibilidad entre las distintas marcas comerciales^{118,119}. Según analizaron los autores, esto podría deberse a diferencias en los parámetros utilizados para la ejecución de las técnicas o por la presencia de reacciones heterólogas de los anticuerpos¹¹⁸.

Los inmunoensayos tradicionales para IgM-HEV tienen una sensibilidad que oscila entre el 90% y el 97%, con resultados positivos falsos de hasta el 2,5%^{120,121}, y varios de ellos han demostrado producir resultados falsos negativos en pacientes infectados con el gt1¹²². De hecho, muchas metodologías de diagnóstico se basan en antígenos específicos de genotipo, limitando de este modo la detección de todos los genotipos del HEV. Adicionalmente, se han detectado resultados falsos positivos para IgM-HEV con otros virus hepatotropos como el virus de Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus (CMV)³⁷. Esto es clínicamente relevante y problemático, ya que estos virus conforman el panel de diagnóstico diferencial de hepatitis aguda una vez que se excluye una infección por el virus de hepatitis A¹²³.

Por otro lado, es de particular preocupación el diagnóstico de la infección por HEV en pacientes inmunocomprometidos y receptores de trasplantes de órganos sólidos en los que la seroconversión a anticuerpos anti-HEV se retrasa o no se produce³⁷.

Abravanel y col. (2013)¹²⁴ realizaron estudios con receptores de trasplantes de órganos y en dializados para evaluar la sensibilidad y especificidad de los ELISAS IgM/IgG. Al analizar los resultados de IgM-HEV encontraron valores de sensibilidad y especificidad de 85%-87,5% y 85% respectivamente, y aunque estos valores resultaron mayores a los esperados, se encuentran lejos de los observados en sujetos inmunocompetentes^{37,125}. En contraste, al analizar los resultados de las IgG-HEV, sólo el 50% de los pacientes presentó valores de IgG-HEV en la etapa aguda. A partir de esta información, se infiere que los ensayos IgM-HEV podrían utilizarse como herramientas de primera línea para el diagnóstico de rutina de la infección aguda por HEV, incluso en pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, de acuerdo con este y otros estudios^{87,126}, la detección molecular de HEV RNA es esencial para el diagnóstico de la hepatitis E aguda en pacientes inmunocomprometidos IgM-HEV negativos.

A pesar de los recientes avances en la comprensión de la epidemiología y la patogénesis viral del HEV y que varios diagramas de flujo de diagnóstico se han propuesto¹¹⁹, la estandarización de los criterios de diagnóstico sigue siendo crítica³⁷.

En este estudio, los criterios de diagnóstico que se siguen son los siguientes:

◆ Infección aguda por HEV:

- IgM-HEV e IgG-HEV negativas, RNA-HEV positivo (periodo ventana);
- IgM-HEV positiva, RNA-HEV positivo (seroconversión temprana);
- IgM-HEV positiva, RNA-HEV negativo (post-seroconversión); y
- Seroconversión a IgG-HEV[+] luego del seguimiento.

◆ Infección pasada por HEV:

Cualquier reactividad de IgG-HEV en ausencia de IgM-HEV y RNA-HEV se interpreta como infección pasada, en ausencia de enfermedad aguda. Indica sólo la memoria inmunológica del contacto con el virus.

◆ Infección crónica por HEV:

Se define por la persistencia de RNA en suero, plasma o materia fecal por más de 6 meses en asociación con incremento de los niveles de transaminasas. En individuos inmunosuprimidos la detección de IgM/IgG anti-HEV en sangre puede tener resultados negativos y sólo la detección de RNA viral confirma el diagnóstico de hepatitis E crónica²².

11. TRATAMIENTO

La hepatitis E aguda es generalmente autolimitada y no necesita tratamiento⁹¹. La determinación reciente de la infección crónica por HEV y el riesgo asociado de lesión hepática progresiva ha conducido a intentos de tratamiento antiviral utilizando interferón pegilado, ribavirina o ambos, con buenos resultados^{34,91}. Un estudio reciente indica que en pacientes que han recibido un trasplante de órganos sólidos, el tratamiento con ribavirina como monoterapia y por lo menos por tres meses, podría ser apropiado para pacientes con infección crónica¹²⁷. Sin embargo, los informes publicados son en su mayoría en forma de reportes de casos o investigaciones con poca cantidad de sujetos^{34,128-130}. En la actualidad, existe un amplio consenso de que la terapia antiviral se debe considerar para los pacientes con hepatitis E crónica diagnosticada que no consiguen eliminar el virus de su sistema después de la reducción de los fármacos inmunosupresores^{128,129}. El objetivo que se persigue es lograr un tratamiento eficaz de

la infección crónica sin aumentar el riesgo de rechazo del injerto en los receptores de trasplante^{127,128}.

El tratamiento con estos medicamentos tiene sus limitaciones, por ejemplo, la teratogenicidad de la ribavirina hace que no sea recomendado durante el embarazo⁹¹ y el interferón no se puede utilizar después de un trasplante de riñón, corazón, pulmón ya que aumenta el riesgo de rechazo agudo^{34,37}.

Sigue siendo poco claro si estos medicamentos serán útiles en pacientes con FHF debido a la hepatitis E, o aquellos con enfermedad hepática crónica y la superinfección por HEV^{34,91}. Actualmente, el trasplante hepático es el único tratamiento validado y la única opción para los pacientes con FHF³⁷.

12. PROFILAXIS

Con respecto a la profilaxis, actualmente no se dispone globalmente de vacunas comerciales contra el HEV pero sí se encuentran en desarrollo varias que utilizan una proteína de la cápsida (que contiene epítopes antigénicos que se relacionan con la producción de anticuerpos neutralizantes) expresada por *Escherichia coli*, Baculovirus, o un plásmido de DNA¹³¹⁻¹³³.

La viabilidad de las vacunas frente al HEV está basada en numerosas evidencias: 1) después de la infección se produce un aumento de anticuerpos específicos; 2) las personas que alguna vez se infectaron con el HEV están protegidas frente a nuevos contactos con el virus; 3) gracias a la investigación en animales, se ha demostrado que la inmunización activa induce una inmunidad humoral específica y 4) la existencia de un único serotipo respalda la idea de crear una vacuna que presente una reactividad cruzada para los distintos genotipos⁶⁷.

Una de las vacunas en desarrollo fue aprobada en 2012 por el gobierno chino después de la fase III de ensayos clínicos y ya está disponible para su uso únicamente en ese país¹³⁴⁻¹³⁶. Esta vacuna es comercializada desde noviembre de ese año por Innovax (Xiamen Innovax Biotech) bajo el nombre de Hecolin®^{137,138}. Un estudio reciente demuestra una efectividad a largo plazo de esta vacuna. Durante 4,5 años, un grupo de investigadores chinos estudió la eficacia, la inmunogenicidad y la seguridad de la vacuna en comparación con un grupo control que recibió la vacuna del virus de la hepatitis B (HBV)¹³⁹. Como resultado de este estudio, se identificaron 60 casos de hepatitis E, de los cuales sólo siete pertenecían al grupo de 239 individuos que recibieron la vacuna en estudio, lo que demostró la eficacia de la vacuna de un 87%¹³⁹.

La distribución mundial de dicha vacuna sería de gran utilidad en la salud pública para proteger a las personas de la infección por este virus, sobre todo a las mujeres embarazadas, a los habitantes de zonas endémicas y a los que viajen a esas áreas, a personas con enfermedades hepáticas preexistentes, con trasplantes de órganos o inmunosuprimidos en riesgo de contraer hepatitis E crónica. Pero hasta ahora no existe información acerca de la seguridad e inmunogenicidad de esta vacuna en estos grupos de riesgo²³. Por otro lado, a pesar de estar diseñada para prevenir infecciones por HEV-1, la vacuna china ha demostrado ser protectora contra HEV-4 aunque se desconoce su accionar sobre HEV-3 por lo que no es aplicable en países endémicos de esta variante¹³⁷.

La otra manera clásica de profilaxis de cualquiera de estas infecciones transmitidas por agua y alimentos contaminados son las medidas de higiene. La provisión de agua potable, la red de alcantarillado sanitario y el tratamiento adecuado de líquidos residuales son claves para el control de estas infecciones lo que involucra, además de la higiene en cada hogar, políticas sanitarias públicas. 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 potable^{6,140}. Otra medida es la de evitar el consumo de carne mal cocida, sobretodo de origen porcino³⁴.

13. RELEVANCIA Y OBJETIVO GENERAL DEL ESTUDIO

El HEV es un virus ampliamente distribuido pero su circulación está mundialmente subestimada. En Argentina, algunos estudios serológicos realizados en muestras humanas y de cerdos en diferentes regiones del país y el hallazgo de HEV en casos humanos de hepatitis aguda, muestran que dicho virus circula en el país. Sin embargo, hasta el presente estudio, no existían reportes que demostraran la presencia de este virus en Córdoba, ni estudios que reporten circulación del mismo en matrices acuosas, incluso en Sudamérica.

Es necesario conocer el estado de situación de la circulación del HEV en Córdoba, considerando aspectos epidemiológicos de la infección en poblaciones inmunocompetentes e inmunosuprimidas, aspectos medioambientales con el estudio de ácidos nucleicos del virus en matrices hídricas e inferir posibles fuentes de infección y aspectos zoonóticos al estudiar la presencia del RNA del HEV en pjaras locales.

Por último, tanto para la detección de HEV en las diferentes fuentes de origen como para profundizar en la epidemiología molecular del HEV en nuestra región, surge la necesidad de implementar y validar a nivel local técnicas de amplificación de ácidos

nucleicos, lo que permitirá luego obtener secuencias de HEV de diferentes fuentes de origen, genotipificarlas y establecer relaciones filogenéticas entre las mismas.

Este estudio aportará datos inéditos sobre la circulación del virus HEV en la región central de Argentina, los cuales serán de gran utilidad en el conocimiento local de este virus, en tres aspectos importantes: humano, zoonótico y ambiental. Dichos datos podrán ser considerados a fin de reforzar el sistema de vigilancia y mejorar el diagnóstico (incluyéndolo en los algoritmos diagnósticos), además de formular normas de prevención y control, haciendo énfasis en fortalecer las buenas prácticas higiénicas y de saneamiento ambiental que puedan atenuar la diseminación de este virus en nuestro medio.

Descripto el problema es que se plantea el **objetivo general** del estudio: Conocer el estado de situación de la circulación del HEV en la región central de Argentina e identificar sus aspectos epidemiológicos, zoonóticos y ambientales.

CAPÍTULO II

VIRUS DE HEPATITIS E EN EL MEDIOAMBIENTE

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Una de las principales vías de transmisión descritas para HEV es la fecal-oral, por esto, resulta indispensable estudiar la presencia del virus en matrices hídricas (aguas residuales y recreacionales) que pueden demostrar por un lado la excreción viral poblacional y por otro su posible participación en el ciclo de transmisión. Este es el punto por el cual se destaca la importancia de la vigilancia ambiental de los virus entéricos, sumado a que para muchos de ellos no se tienen datos de su circulación debido a que su diagnóstico no es frecuente en el laboratorio.

El estudio de líquidos residuales es de gran relevancia a nivel poblacional, ya que brinda información global de la circulación de este virus de transmisión entérica, y corresponde a una muestra representativa de la población (61% de la población de la ciudad de Córdoba según el último censo nacional [1.329.604 habitantes: 811.058 personas muestreadas])¹⁴¹. Además, de esta manera se puede incluir el genoma viral proveniente de heces de individuos infectados sintomáticos (sin necesidad de recurrir a la toma de muestras de pacientes en un centro de salud) y asintomáticos, que no concurren a ninguna consulta médica y que no serían incluidos si se hicieran exclusivamente estudios clínicos.

Por otra parte, detectar virus entéricos en determinadas fuentes de agua recreacionales señala una posible contaminación con líquidos residuales y marca a dichos recursos hídricos como potenciales fuentes de infección para la población expuesta. Asimismo, el estudio en aguas de ríos y embalses permite brindar información sobre la contaminación viral de fuentes de aguas usadas para consumo, las cuales podrían también ejercer un rol como reservorio del virus y fuente de infección a huéspedes susceptibles.

En el mundo la detección de virus en el medio ambiente y en muestras de agua potable está comenzando a ser una opción estratégica importante para prevenir brotes de infecciones con virus de transmisión hídrica. En este sentido, el agua, las condiciones sanitarias y la salud están íntimamente relacionadas, por lo que el monitoreo constante de cursos de agua es una herramienta muy útil para el control y prevención de estas infecciones.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Implementar y aplicar métodos de concentración viral, extracción y detección de RNA de HEV en muestras ambientales (líquidos residuales y agua proveniente de ríos y embalses) de la zona central de Argentina.
- ◆ Caracterizar genéticamente las cepas de HEV detectadas mediante secuenciación directa.
- ◆ Realizar el análisis filogenético para establecer relaciones parentales entre secuencias amplificadas de diferentes fuentes de origen.
- ◆ Correlacionar los resultados de las detecciones del HEV obtenidos con los indicadores bacterianos utilizados para la determinación de la calidad microbiológica del agua.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Áreas de muestreo

3.1.1. Planta de tratamiento de líquidos residuales de la ciudad de Córdoba

La ciudad de Córdoba capital ($31^{\circ}24'18''\text{S}$ - $64^{\circ}11'24''\text{O}$) tiene una población de 1.329.604 habitantes según el último censo, pero sólo el 61% se encuentra conectado a la red cloacal, el resto utiliza sistemas de tratamiento *in-situ*, como zanjas de filtración y pozos absorbentes¹⁴¹. La planta de tratamiento de líquidos residuales “Bajo Grande” recibe las descargas cloacales de dicho porcentaje de la población (aproximadamente 811.058 personas)¹⁴¹. Esta planta de tratamiento se encuentra localizada en las cercanías del río Suquía, en las afueras de la ciudad ($31^{\circ}24'15''\text{S}$ - $64^{\circ}6'12''\text{O}$) (Figura 6).



Figura 6: Ubicación geográfica del río Suquía, río Xanaes, Embalse San Roque, las Ciudades de Córdoba y Villa del Rosario y la planta de tratamiento Bajo Grande (adaptado de Google Earth).

3.1.2. Río Suquía

El río Primero o Suquía, nace en el embalse San Roque¹⁴² (Figura 6). Este curso de agua atraviesa la ciudad de Córdoba, integrándose al paisaje urbano y a actividades recreativas, particularmente de la población de menores recursos socio-económicos^{142,143}. Su caudal es de 10 m³/segundo (rango 1,5-24,0 m³/segundo), y tiene un importante recorrido ciudadano¹⁴². A la salida de la Capital, el río Suquía continúa en dirección este hasta la localidad de Río Primero donde comienza a torcer su curso hacia el oeste para desembocar en la laguna El Plata y después en la laguna Mar Chiquita (30°40'16"S - 62°33'36"O)^{142,143}. Entre el embalse San Roque y la laguna Mar Chiquita, tiene el río Suquía una extensión aproximada de 200 km.

3.1.3. Río Xanaes

El río Segundo o Xanaes es un río del centro-norte de la provincia de Córdoba (Fig.6). Nace en los faldeos orientales de las Cumbres de Achala (a unos 2.000 msnm), estas cumbres se encuentran en el centro de la llamada Sierra Grande, uno de los principales cordones de las llamadas Sierras de Córdoba¹⁴². Tiene un caudal medio de 14,5 m³/s y recorre 340 km donde atraviesa varios conglomerados urbanos, incluyendo la ciudad de Villa del Rosario (31°35'00"S-63°32'00"O), y desemboca en la laguna Mar Chiquita¹⁴².

3.1.4. Embalse San Roque

En la provincia de Córdoba, Argentina, y más específicamente en el departamento Punilla, se encuentra el embalse San Roque (31°22'32" S, 64°27'56" O) (Fig.6). El dique que le dio origen fue construido con el fin de mitigar las crecientes y proveer de agua a la ciudad de Córdoba¹⁴⁴. Se encuentra a 651 msnm y recibe el aporte de cuatro tributarios, los ríos Cosquín (caudal medio anual de 16,5 m³/segundo) y San Antonio (caudal medio anual de 4,0 m³/segundo) y en menor proporción por los arroyos Las Mojarras y Los Chorrillos¹⁴⁵. A sus orillas se encuentra la ciudad de Villa Carlos Paz (62.423 habitantes), a 40 Km aguas arriba de la ciudad capital Córdoba, y otras poblaciones de menor envergadura¹⁴¹. Posee una superficie de 2.478 hectáreas, un volumen máximo de 350 hm³, con un tiempo de permanencia mínimo y máximo de 28 y 247 días respectivamente^{142,144,145}. El embalse San Roque posee múltiples usos como suministro de agua potable, riego, generación de energía y actividades recreativas, como pesca y natación, que atraen a una gran cantidad de turistas a la zona sobretodo en épocas estivales¹⁴⁴. Es el responsable de la provisión de agua potable a las poblaciones aledañas y provee agua a la planta potabilizadora Suquía que abastece al

70% de la ciudad de Córdoba, lo que equivale a un total aproximado de 2.300.000 personas según el último censo^{141,142}.

3.2. Muestras analizadas

3.2.1. Muestras de líquidos residuales

Se analizaron 72 muestras de líquidos residuales obtenidas mensualmente en los años 2007, 2009-2011, colectadas desde el caño principal que llega a la planta de tratamiento “Bajo Grande” de la ciudad de Córdoba (Figura 7).

3.2.2. Muestras de agua de río

Se analizaron 31 muestras tomadas de zonas diferentes del curso de río Suquía (Figura 7). Las colectas se realizaron estacionalmente durante el año 2010 en ocho puntos de muestreo: Embalse San Roque, Villa Warcalde, Vado San Antonio, Puente Zípoli, Isla de los Patos, Puente Centenario, Vado Sargento Cabral y Puente San José. Durante la primavera el Vado Sargento Cabral no pudo ser colectado.

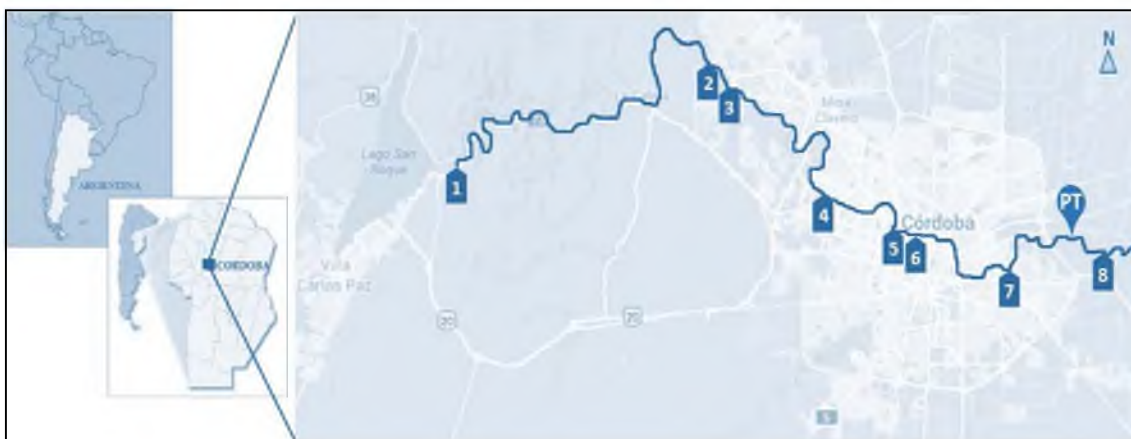


Figura 7: Mapa que muestra la localización de la ciudad de Córdoba y el Río Suquía con cada uno de los puntos de muestreo a lo largo de su recorrido: (1) Embalse San Roque, (2) Villa Warcalde, (3) Vado San Antonio, (4) Puente Zípoli, (5) Isla de los Patos, (6) Puente Centenario, (7) Vado Sargento Cabral y (8) Puente San José. También se localiza la planta de tratamiento de líquidos residuales de la ciudad de Córdoba (PT) (adaptado de Google Maps).

Adicionalmente, se estudiaron 28 muestras del río Xanaes (Figura 6). Se realizó un muestreo mensual durante el período mayo-noviembre de 2012 (n=28) en cuatro puntos del río, correspondientes al área balnearia de Villa del Rosario.

En todos los casos, las muestras fueron cedidas por el laboratorio de Gastroenteritis Virales del Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

3.2.3. Muestras de agua de embalse

El embalse San Roque (31°22'32"S 64°27'56"O), a 30 km de la ciudad de Córdoba, constituye una fuente de agua de consumo para la ciudad capital, además de su uso recreacional y para pesca deportiva. Se analizaron 66 muestras tomadas en seis puntos diferentes del cuerpo de agua del embalse (Figura 8): Desembocadura río San Antonio (DSA), Desembocadura río Los Chorrillos (DCH), Desembocadura Arroyo Las Mojarras (DLM), Desembocadura río Cosquín (DCQ), Centro del embalse (CENTRO) y Toma de agua (TOMA) de la empresa potabilizadora de agua de la ciudad de Córdoba. Los muestreos se realizaron mensualmente entre septiembre de 2011 y diciembre de 2012. Adicionalmente, se tomaron 30 muestras en tres playas recreacionales del mismo embalse: Playa Perelli (PP), Bahía El Gitano (BEG) y Club de Pescadores (CP), de manera mensual entre junio de 2013 y diciembre de 2014.

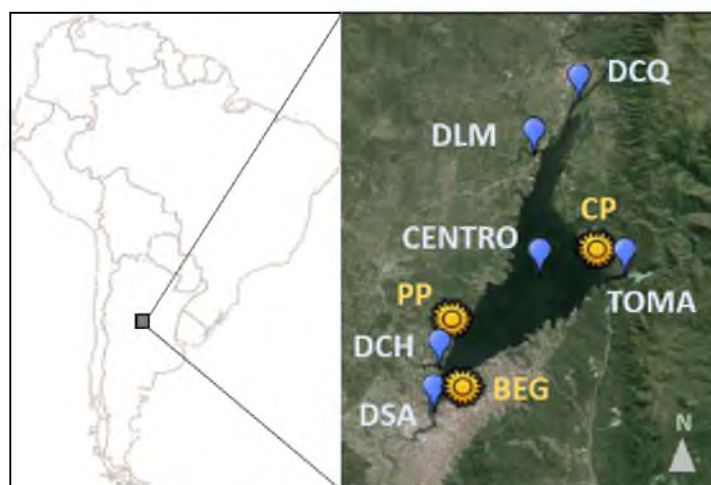


Figura 8: Ubicación geográfica de los puntos de muestreo en el Embalse San Roque: (DSA) Desembocadura río San Antonio, (DCH) Desembocadura río Los Chorrillos, (DLM) Desembocadura Arroyo Las Mojarras, (DCQ) Desembocadura río Cosquín, (CENTRO) Centro del embalse, (TOMA) Toma de agua de la empresa potabilizadora de agua, (PP) Playa Perelli, (BEG) Bahía El Gitano y (CP) Club de Pescadores (adaptado de Google Earth).

3.3. Obtención y concentración de las muestras de agua

Las muestras se colectaron contracorriente en frascos de vidrio o polietileno estériles e inmediatamente fueron transportadas y almacenadas refrigeradas hasta su procesamiento. En cada caso se colectó aproximadamente 1,5 L de muestra.

Posteriormente se realizó la concentración de las muestras provenientes de matrices hídricas del río Suquía, río Xanaes y del embalse San Roque aplicando la metodología definida por Mueller y col. (2009), la cual se basa en una metodología previamente descrita [Lewis y Metcalf (1988) y Greening y col. (2002), con modificaciones descritas previamente por Huang y col. (2005)]¹⁴⁶. Utilizando esta metodología cada muestra es

concentrada 100 veces utilizando ultracentrifugación, resuspensión, sonicación, y tratamiento con cloroformo.

El procedimiento constó de los siguientes pasos:

- 1) Para cada muestra, se rotularon 6 botellas de centrífuga de 250 mL correlativas del n°1 al n°6 y se registraron los pesos de cada botella. Se distribuyeron 1,5 L de la muestra (por peso total para balancear en la centrífuga) en las 6 botellas en campana de bioseguridad. Se balanceó cuando fue necesario.
- 2) Se centrifugó a 4000 rpm (revoluciones por minuto) durante 20 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante (S1) en un recipiente limpio de 3 L y se mantuvo a 4°C para usar más tarde.
- 3) Se pesaron las botellas con el pellet remanente y se calculó el peso de cada pellet (n° 1-6) (Peso de la botella con pellet – peso inicial de la botella).
- 4) Se agregó 3 veces, respecto al peso del pellet, solución de extracto de carne 3% en nitrato de sodio 2M (pH 5,5) para dar una proporción 1:3 (ej agregar 3 mL a 1 g de pellet). Se homogeneizaron y juntaron los 6 volúmenes finales en una única botella de 250 mL. Se midió el pH y se registró en la hoja de cálculo. Se ajustó el pH a 5,5 (con HCl 1N).
- 5) Se incubó por 1 hora a 4°C con mezclado continuo en agitador a 180 rpm.
- 6) Se centrifugó a 8.300 rpm por 20 minutos y se agregó el sobrenadante (S2) resultante al S1.
- 7) Se ajustó el pH del sobrenadante S1+S2 a 6,5-7,2 (con HCl concentrado) y se midió el volumen total.
- 8) Se agregó al sobrenadante final (S1+S2) PEG 6000 10% m/v y NaCl 2% m/v (en este paso ocurre la precipitación de virus) (ej, se agregó 100 g PEG 6000 y 20 g NaCl por litro de volumen final). Se homogeneizó durante unos pocos minutos a temperatura ambiente y se dejó en agitación (aproximadamente 120 rpm) un mínimo de 2 horas (idealmente se debe dejar durante toda la noche a 4°C).
- 9) Se centrifugó a 8.300 rpm por 25 minutos a 4°C.
- 10) Se descartó el sobrenadante en una botella de 3 L rotulada, teniendo la precaución que en la botella no queden rastros de sobrenadante. Se tomó la precaución de tratar el sobrenadante con lavandina al 10% durante toda la noche antes de descartarlo.

- 11) Se resuspendió el pellet en PBS (solución de buffer fosfato) 1/100 del volumen total de muestra original (pH 7.4) (ej., 15 mL por 1,5 L). Se cambió el pH a 8,0 mediante el agregado de NaOH 0,1N y se chequeó el pH.
- 12) Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con vórtex ocasional.
- 13) Se centrifugó a 8.300 rpm por 20 minutos. El sobrenadante resultante es el concentrado, es decir, la muestra concentrada 100X. Se obtuvieron, de los 1,5 L iniciales, un concentrado de 15 mL.

3.4. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de RNA presente en las muestras de aguas concentradas se realizó utilizando diversos protocolos *in-house* y kits de columnas comerciales para comparar la eficiencia y practicidad de uso con las muestras de esta investigación.

Todas las técnicas fueron realizadas bajo campana de seguridad biológica, con limpieza previa y esterilización de la superficie de trabajo con luz ultravioleta. Las muestras de RNA fueron sometidas, inmediatamente, a transcripción inversa para la síntesis de cDNA (DNA complementario, por sus siglas en inglés) o almacenadas a -70°C hasta su procesamiento

3.4.1. Protocolo de Trizol

Se utilizó el reactivo comercial Trizol® (Invitrogen BRL, CA, USA) según indicaciones del fabricante. A partir de 150 μL de una muestra concentrada se pueden obtener 20 μL de RNA. Se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se adicionó, a cada tubo de reacción de 1,5 mL, 10 μg (1 μL de tRNA de concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 750 μL de la solución de Trizol® (a temperatura ambiente) y 200 μL de cloroformo. Posteriormente se agregaron 150 μL de la muestra concentrada.
- 2) Se homogeneizaron las muestras, una a una, mediante el uso de un vórtex durante 1-2 minutos.
- 3) Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente las muestras y luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C .
- 4) Se transfirió la fase acuosa, obtenida en la parte superior después de la centrifugación, a nuevos tubos que contenían igual volumen de isopropanol a 10°C . Después de una rápida y suave homogeneización (por inversión de los tubos), se incubó la solución - 20°C toda la noche.

- 5) Se centrifugó el RNA precipitado a 12.000 rpm por 20 minutos, a 4°C, se descartó el sobrenadante y se conservó el sedimento de RNA.
- 6) Se lavó el sedimento con 600 µL de etanol al 75% (a 10°C) y se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm por 15 minutos, a 4°C.
- 7) Se mantuvieron los tubos con el RNA extraído abiertos a temperatura ambiente durante 30-60 minutos para permitir que se sequen.
- 8) Se resuspendió el sedimento de RNA en 20 µL de agua libre de RNAasas estéril (mili Q, tratada con DEPC -dietilpirocarbonato, usado para inactivar RNAasas presentes en el agua-).

3.4.2. Protocolo de fenol-cloroformo

Este protocolo involucra una clarificación por centrifugación y una extracción del ácido nucleico utilizando una solución de fenol-cloroformo 1:1. A partir de 15 mL de una muestra concentrada se pueden obtener 40 µL de RNA.

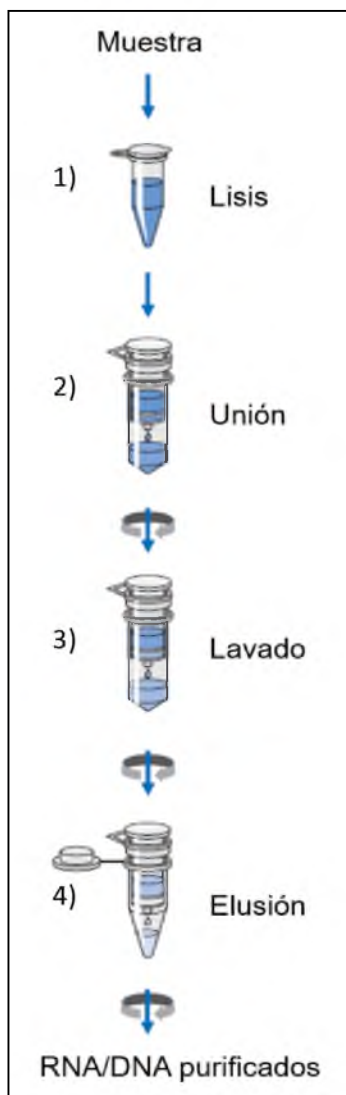
El procedimiento consta constó de los siguientes pasos:

- 1) A 15 mL de líquido residual o de agua concentrada se le agregaron 15 mL de solución de fenol-cloroformo (igual volumen) en un tubo de centrifuga de 50 mL y se agitó para mezclar.
- 2) Se dejó por 15 minutos a temperatura ambiente, con mezclado por inversión ocasional.
- 3) Se centrifugó a 2.500 rpm por 5 minutos. Se obtuvieron tres fases: la superior acuosa, una interfase y una inferior de solución de fenol-cloroformo. El virus se encontraba en la fase acuosa y parte quedó retenido en la interfase.
- 4) Se tomó la fase superior acuosa, se la llevó a un nuevo tubo de 50 mL y se volvió a agregar 15 mL de cloroformo.
- 5) Se dejó por 15 minutos a temperatura ambiente, con mezclado por inversión ocasional.
- 6) Se centrifugó a 8.300 rpm por 20 minutos.
- 7) Se tomó la fase superior acuosa y se transfirió a un nuevo tubo. Se agregaron 300 µL de solución de penicilina/estreptomicina (Penicilina 100.000 UI/mL; Estreptomicina 2,5%) y 150 µL fungizona (Anfotericina B: 250 µg/mL) para inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico respectivamente.

- 8) Se alicuotó el volumen final obtenido en crioviales estériles y se almacenaron a -70°C .

3.4.3. Columnas de extracción comerciales

Se utilizaron kits comerciales de “extracción de o RNA/DNA” de tres marcas comerciales (Qiagen®, Invitrogen®, Axygen®) siguiendo estrictamente las instrucciones de cada fabricante. Todas las metodologías utilizadas se basaron en una serie de pasos principales (Figura 9):



1) Lisis de la muestra: La muestra se lisó por incubación con la solución de lisis y proteinasa K bajo condiciones de desnaturalización a temperaturas elevadas (56°C). La solución de lisis y proteinasa K inactivaron ambas RNasas y DNasas, para garantizar la protección de los ácidos nucleicos virales contra la degradación.

2) Unión de ácidos nucleicos virales a la membrana de la columna de centrifugación: La muestra lisada se transfirió a una columna de centrifugación donde los ácidos nucleicos virales liberados se unieron inmediatamente al filtro a base de sílice en presencia de sales caotrópicas. El lisado restante se eliminó por centrifugación.

3) Lavado de contaminantes: Los contaminantes restantes se eliminaron durante tres etapas de lavado utilizando soluciones buffer de lavado, mientras que los ácidos nucleicos permanecieron unidos a la membrana.

4) Elución de los ácidos nucleicos virales: Los ácidos nucleicos virales puros fueron liberados desde el filtro de columna de centrifugación usando una solución eluyente. Los ácidos nucleicos purificados quedan listos para su uso en cualquier técnica de NAT y deben conservarse a -70°C .

Figura 9: Pasos generales de extracción utilizando kits comerciales (adaptado de www.qiagen.com)

3.5. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Por un proceso de retrotranscripción, se sintetizó DNA copia o complementario (cDNA) a partir del RNA viral extraído de las muestras de líquidos residuales y agua de río o del embalse para luego continuar el proceso de amplificación por técnicas de PCR. Se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se colocaron 10 μL de RNA extraído de cada muestra analizada en un tubo tipo eppendorf, correctamente identificado.
- 2) Se introdujeron los tubos en el termociclador a 65°C por 10 minutos (proceso de desnaturalización).
- 3) Se retiraron los tubos del termociclador y se pusieron en un baño de hielo durante 5 minutos.
- 4) Se agregaron a cada tubo 10 μL de mix que contenía 1,0 μL de dNTP (10 mM), 4,0 μL de buffer 10X, 1,0 μL de *random hexámeros primers*[®] -oligonucleótidos hexaméricos que hibridan al azar- (2,5 mM) (Promega), 0,5 μL de RNaseOUT[®] (20 U/ μL) (Invitrogen), 0,1 μL de agua mili-Q autoclavada, 1,0 μL de enzima ImProm-II[™] (200 U/ μL) (Promega) y 2,4 μL de MgCl_2 (25 mM) (Promega).
- 5) Se colocaron los tubos nuevamente en el termociclador a 45°C durante 60 minutos
- 6) Se elevó la temperatura del termociclador a 65°C y se mantuvo 10 minutos para inactivar la enzima.
- 7) Se almacenó el cDNA sintetizado a -20°C.

3.6. Amplificación del RNA del HEV por Nested-PCR

Luego de obtener el cDNA a partir del RNA viral de las muestras analizadas se procedió a identificar el RNA específico del HEV por técnicas de amplificación por PCR. Se utilizaron técnicas de PCR anidada o Nested-PCR, es decir una PCR inicial (PCR-I) que utiliza como molde el cDNA seguida por una segunda PCR (PCR-II o Nested-PCR propiamente dicha) que utiliza como molde el DNA obtenido de la PCR-I. Para este proceso se siguieron dos protocolos modificados a partir de otros dos previamente descritos por Wang y col. 1999¹⁴⁷ y Huang y col. 2002⁶⁴ que amplifican fragmentos parciales del ORF-1 (418 bp –pares de bases por sus siglas en inglés-) y del ORF-2 (348 bp), respectivamente (Tabla 1). Según lo describió Huang y col. (2002) el límite de

detección de esta técnica es de 31,6 PID50 (50% pig infectious dose)⁶⁴. Ambos protocolos son capaces de detectar los cuatro genotipos conocidos del HEV.

Como se trata de una Nested-PCR, el proceso se realiza en dos etapas (dos ciclos de amplificación), cada una con distintos pasos descritos a continuación:

◆ Primer ciclo de amplificación (PCR-I):

- 1) Se colocaron en tubos tipo eppendorf de 0,5mL 25 μ L de la mix-1 conformada por: 15,8 μ L de agua ultrapura (Millipore); 6,0 μ L de buffer incoloro de GoTaq® 5X (Promega); 0,6 μ L de dNTP (10 mM); 1,0 μ L de oligonucleótido externo sense (10 pmol/ μ L); 1,0 μ L de oligonucleótido externo anti-sense (10 pmol/ μ L) y 0,6 μ L de GoTaq Polimerasa® (5U/ μ L) (Promega). Se agregaron 5,0 μ L de cDNA.
- 2) Se colocaron los tubos en un termociclador siguiendo el siguiente esquema de tiempos y temperaturas de ciclado: 5 minutos a 94°C (activación de la enzima inicial), 1 minuto a 94°C (desnaturalización); 1 minutos a 45°C (hibridación de los oligonucleótidos); 1 minuto a 72°C (polimerización de la cadena); estos pasos se repitieron 39 veces (39 ciclos) y finalmente se realizó un último paso: 7 minutos a 72° (polimerización final).

◆ Segundo ciclo de amplificación (PCR-II o Nested-PCR propiamente dicha)

- 3) Se colocaron en tubos tipo eppendorf de 0,5mL 27 μ L de la mix-2 conformada por: 18,8 μ L de agua ultrapura (Millipore); 5,0 μ L de buffer incoloro de GoTaq® 5X (Promega); 0,6 μ L de dNTP (10 mM); 1 μ L de oligonucleótido interno sense (10 pmol/ μ L); 1,0 μ L de oligonucleótido interno anti-sense (10 pmol/ μ L) y 0,6 μ L de GoTaq® Polimerasa (5U/ μ L) (Promega). Se agregaron 3,0 μ L de producto de amplificación de la PCR-I.
- 4) Se colocaron los tubos en el termociclador siguiendo el siguiente esquema de tiempos y temperaturas de ciclado: 5 minutos a 94°C (activación de la enzima inicial), 1 minuto a 94°C (desnaturalización); 1 minuto a 50°C (hibridación de los oligonucleótidos); 1 minuto a 72°C (polimerización de la cadena); estos pasos se repitieron 29 veces (29 ciclos) y finalmente se realizó un último paso: 7 minutos a 72° (polimerización final).

3.7. Visualización de los productos de PCR

Los productos amplificados por Nested-PCR fueron procesados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,4% con 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio o de SYBR® de Invitrogen Corporation. Los fragmentos esperados, de 418 bp (ORF-1) y de

348 bp (ORF-2), se visualizaron mediante el uso de un transiluminador UV LABNET TM-26.

Tabla 1: Oligonucleótidos usados para la detección del HEV según Wang y col., 1999 y Huang y col., 2002. (ES: external sense, EA: external antisense, IS: internal sense, IA: internal antisense)

Región	Sentido	Posición*	Secuencia (5'-3')
ORF-1 (Wang y col. 1999) 418 bp	ES	56-79	CTG GCA TYA CTA CTG CYR TWG AGC
	EA	473-451	CCA TCR ARR CGA TAW GTG CGG TC
	IS	104-124	CTG CCY TKG CGA ATG CTG TGG
	IA	390-367	GGC AGW RTA CCA RCG CTG RAC RTC
ORF-2 (Huang y col. 2002) 348 bp	ES	5687-5708	AAY TAT GCM CAG TAC CGG GTT G
	EA	6395-6417	CCC TTA TCC TGC TGA GCA TTC TC
	IS	5972-5993	GTY ATG YTY TGC ATA CAT GGC T
	IA	6298-6319	AGC CGA CGA AAT YAA TTC TGT C

* posición de los nucleótidos comparada con la secuencia de referencia de Burma (GenBank M73218)

3.8. Caracterización molecular de las cepas circulantes

Los fragmentos nucleotídicos obtenidos se secuenciaron usando el servicio de MacroGenCorea (10F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu, Seoul, Rep. of Korea) y los análisis filogenéticos se efectuaron utilizando el programa MEGA 5.05¹⁴⁸.

Para realizar el alineamiento y análisis filogenético de las secuencias obtenidas en este estudio se utilizaron secuencias patrón de cada genotipo y subtipo, disponibles en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para construir los árboles filogenéticos se emplearon métodos de distancia utilizando el test de Neighbor-Joining y Maximum Likelihood teniendo en cuenta los modelos de sustitución de nucleótidos y los parámetros sugeridos por el mismo programa MEGA 5.05. Para evaluar el soporte de rama (bootstrap) se utilizaron 2000 pseudoréplicas de remuestreo. Cada secuencia analizada fue publicada en el GenBank para su libre accesibilidad.

3.9. Análisis bacteriano

Además de los análisis virales, en las muestras ambientales se determinaron bacterias consideradas indicadores de contaminación fecal que incluyen bacterias Coliformes fecales o termotolerantes, *Escherichia coli* y *Enterococos*. Como Argentina no dispone de estudios epidemiológicos locales que estimen valores de estos indicadores bacterianos en relación al riesgo de enfermedad por exposición en aguas

recreacionales, la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina ha adoptado el criterio de considerar de manera interina, los niveles guía recomendados por la Agencia de Protección del Ambiente (EPA)¹⁴⁹ de los Estados Unidos de América¹⁴⁴ (Tabla 2).

Tabla 2: Valores límites bacterianos para aguas recreacionales (EPA 2012)

Indicador bacteriológico	Valor límite (unidades formadoras de colonias/100mL -UFC/100 mL-)	
	Contacto primario (natación)	Contacto secundario (actividades acuáticas sin inmersión)
Coliformes fecales o termotolerantes	200	200
Escherichia coli	235	298
Enterococos	61	89

Las determinaciones bacterianas se realizaron por el método de filtración por membrana siguiendo las indicaciones del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater¹⁵⁰.

3.10. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando los programas Infostat v2015¹⁵¹ y Microsoft Office Excel v2013¹⁵². Se emplearon test de normalidad (Shapiro-Wilks modificado), prueba T, cálculos de intervalos de confianza, χ^2 de Pearson y Test de Fisher. La significación estadística se definió en 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

En la primera etapa de este estudio se utilizó Nested PCR para comparar las técnicas de extracción de RNA para decidir cuál o cuáles eran las más adecuadas. En una segunda etapa se modificaron los protocolos de Nested PCR descritos por Wang y col., 1999¹⁴⁷ y Huang y col., 2002⁶⁴ para la amplificación de los fragmentos parciales del ORF-1 y ORF-2 del genoma del HEV. Ambas etapas fueron desarrolladas utilizando un control positivo de HEV proveniente de un pool de heces porcinas (cedido por el Laboratorio de Desarrollo Tecnológico en Virología, IOC/Fiocruz, Río de Janeiro, Brasil).

Luego de determinar cuáles fueron las metodologías de extracción y de amplificación con mejores rendimientos cualitativos, se procedió al procesamiento de las muestras del estudio.

4.1. Implementación de las técnicas de extracción

Para llevar a cabo la extracción del control positivo del HEV se ensayaron tres kits comerciales de extracción con columnas de sílica (Invitrogen®, Qiagen® y Axygen®) y dos técnicas de extracción *in-house* (fenol-cloroformo y Trizol) para comparar las eficiencias de las mismas y decidir cuáles serían las más adecuadas para utilizar con las muestras del estudio.

A posteriori se realizaron las RT-Nested-PCR para la amplificación de los fragmentos parciales del ORF-1¹⁴⁷ y ORF-2⁶⁴ y se corrió el producto de las PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa. A modo de ejemplo de visualización de las corridas ensayadas, en las Figuras 10 y 11 se muestran fotos de los geles de agarosa con distintas combinaciones de técnicas de extracción. En ambas se muestran corridas de amplificación de fragmentos parciales del ORF-1 pero las corridas de los fragmentos del ORF-2 muestran el mismo patrón.



Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa para los distintos métodos de extracción para HEV ORF-1. Se observan las calles: (2) el marcador de peso molecular (100 bp), (3) control negativo, (4-7) productos de la PCR I, (8) blanco PCR I y (9-12) productos de la PCR II y (13) blanco PCR. Los fragmentos obtenidos utilizando Invitrogen® se observan en las calles 4 y 9, Axygen® en las calles 5 y 10, Qiagen® en las calles 6 y 11, extracción con Trizol® en las calles 7 y 12.

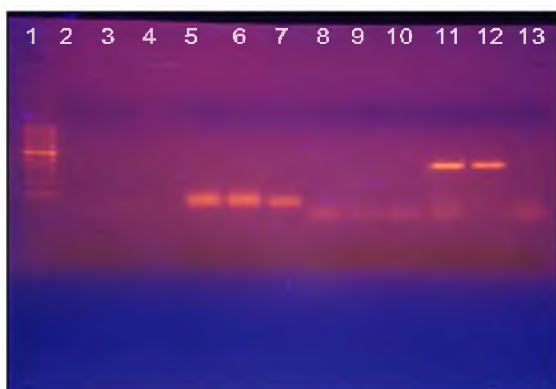


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa para los distintos métodos de extracción para HEV ORF-1. Se observan las calles: (1) el marcador de peso molecular (100 bp), (2) blanco de reactivos, (3-7) productos de la PCR I, (8) blanco de reactivos y (9-13) productos de la PCR II. Los fragmentos de las calles 5 y 11 se obtuvieron con la técnica de Invitrogen®, de las calles 6 y 12 con la técnica fenol-cloroformo y de las calles 7 y 13 utilizando la técnica de Trizol®.

4.2. Implementación de la técnica de RT-Nested-PCR

Se modificaron los protocolos descritos por Wang y col. (1999)¹⁴⁷ y Huang y col. (2002)⁶⁴ para poder optimizar el uso de los reactivos en el laboratorio respetando las

proporcionalidades de los protocolos originales y sin modificar la sensibilidad. Se disminuyeron proporcionalmente las cantidades de dNTP, oligonucleótidos externos e internos, sense y anti-sense, y de GoTaq Polimerasa® completando el volumen final con agua libre de ARN/ADNasas. Para poder realizar esto se procesó en paralelo el control positivo de HEV, extraído con el kit comercial de Invitrogen®, utilizando los protocolos originales y los modificados para luego visualizar la intensidad de las bandas en el gel de agarosa. A modo de ejemplo se muestra el gel de agarosa luego de la corrida de los fragmentos parciales de ORF-2 (Figura 12).



Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa para el protocolo de Huang y col. (2002) y Huang y col. modificado que muestra los fragmentos parciales del ORF 2. Se observan las calles: (1) el marcador de peso molecular (100 bp), (2-5) productos de PCR I, (6 y 11) blancos de reactivos, (7-10) productos de la PCR II. Los productos resultado del protocolo de Huang y col. (2002) original se muestran en la calle 7 -control positivo- y en la 8 -control negativo-. Los productos de PCR II del protocolo de Huang modificado se observan en la calle 9 -control positivo- y 10 -control negativo-.

4.3. Detección de RNA-HEV en muestras ambientales

4.3.1. Muestras de líquidos residuales

De las 72 muestras analizadas de los líquidos residuales que ingresan a la planta de Bajo Grande, tres resultaron positivas (4,2% [3/72]) para el fragmento parcial del ORF-2, las correspondientes a las muestras de Abril-2007, Septiembre-2010 y Marzo-2011 (Figura 13). Sólo la muestra correspondiente a Septiembre-2010 resultó positiva para el fragmento parcial del ORF-1 (1,4%).

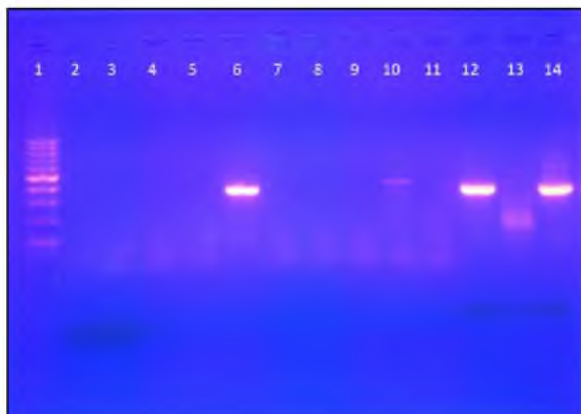


Figura 13: Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de muestras de líquidos residuales. Las calles 6 y 12 corresponden a las muestras de Sep2010 y Mar2011. En la calle 1 se observa el marcador de peso molecular (100 bp), en la 2 el blanco de reactivos y en la 14 el control positivo.

4.3.2. Muestras de agua de río

De las 31 muestras analizadas del río Suquía, una resultó positiva (3,2% [1/31]) para el ORF-2, correspondiente al sitio 6 (Puente Centenario), primavera de 2010 (Fig. 14 y 15). Por otro lado, en el río Xanaes ninguna de las 28 muestras procesadas resultó positiva para los fragmentos parciales analizados.

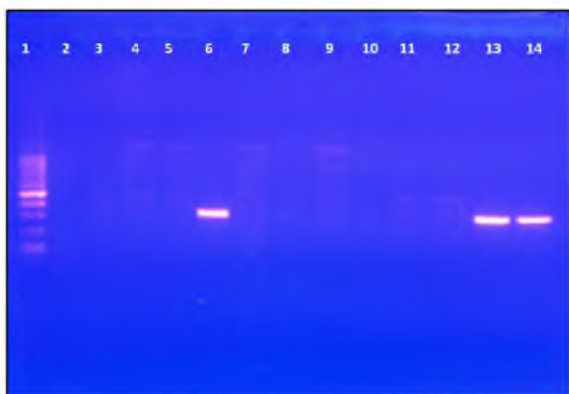


Figura 14: Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de muestras de agua del río Suquía. La calle 6 corresponde a la muestra de Primavera2010 en el Puente Centenario. En la calle 1 se observa el marcador de peso molecular (100 bp), en la 2 el blanco de reactivos y en las 13 y 14 controles positivos.



Figura 15: Mapa que muestra la localización del Río Suquía con los puntos de muestreo: (1) Embalse San Roque, (2) Villa Warcalde, (3) Vado San Antonio, (4) Puente Zípoli, (5) Isla de los Patos, (6) Puente Centenario, (7) Vado Sargento Cabral y (8) Puente San José. Se colorean en verde aquellos puntos cuyas muestras resultaron negativas para HEV y en rojo aquellos positivos (adaptado de Google Maps y <http://elpizarrondelagua.blogspot.com.ar/>¹⁴³)

Asimismo, en las muestras analizadas del río Suquía los recuentos de bacterias coliformes totales y termotolerantes resultaron superiores a los niveles máximos aceptados para aguas recreacionales (200 UFC/100 mL)¹⁴⁹ en todos los puntos muestreados salvo en el punto (1) que corresponde al nacimiento del río, en el embalse San Roque.

4.3.3. Muestras de agua de embalse

En el embalse San Roque, de las 66 muestras procesadas provenientes del cuerpo de agua del embalse, una resultó positiva (1,6% [1/66]) para el ORF-2, correspondiente a

la desembocadura del río Los Chorrillos (DCH) en Septiembre-2012. Además, de las 30 muestras de las playas recreacionales se obtuvo una muestra positiva (3,3% [1/30]) para la misma región genómica, correspondiente al Club de Pescadores (CP) en Agosto-2013 (Figura 16 y 17).

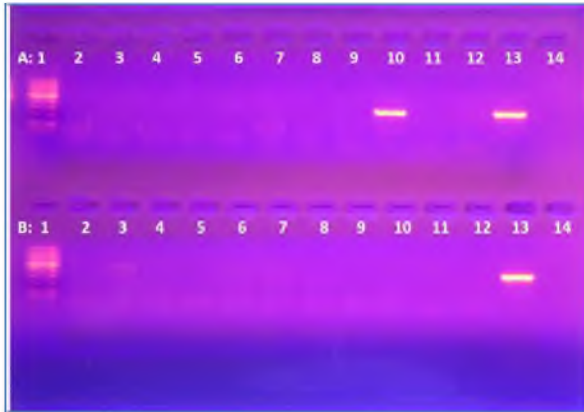


Figura 16: Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de muestras de agua del embalse. La calle A-10 corresponde a la muestra del Club de pescadores. En las calles A-1 y B-1 se observan los marcadores de peso molecular (100 bp), en las A-2 y B-2 blancos de reacción y en las A-13 y B-13 controles positivos.

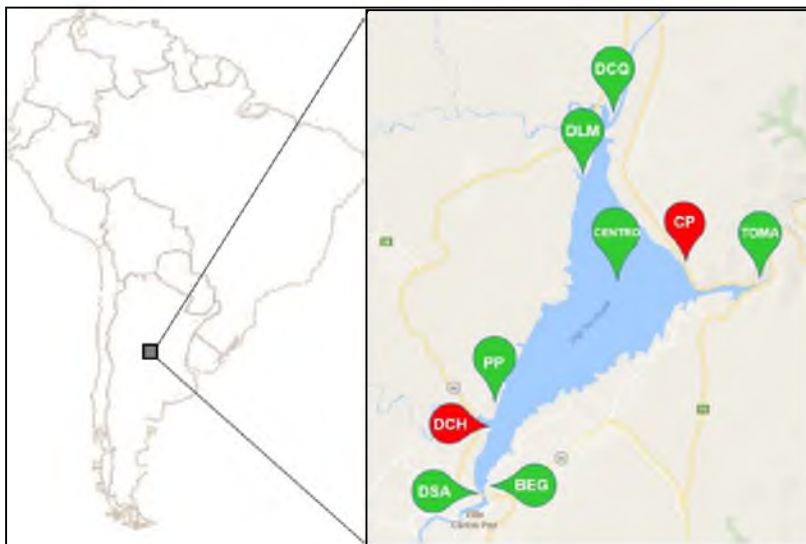


Figura 17: Ubicación geográfica de los puntos de muestreo en el Embalse San Roque (31°22'32"S 64°27'56"O): (DSA) Desembocadura río San Antonio, (DCH) Desembocadura río Los Chorrillos, (DLM) Desembocadura Arroyo Las Mojarras, (DCQ) Desembocadura río Cosquín, (CENTRO) Centro del embalse, (TOMA) Toma de agua de la empresa potabilizadora de agua, (PP) Playa Perelli, (BEG) Bahía El Gitano y (CP) Club de Pescadores. Se colorean en verde aquellos puntos cuyas muestras resultaron negativas para HEV y en rojo aquellos positivos. (Adaptado de Google Maps y <http://elpizarrondelagua.blogspot.com.ar/>¹⁴³).

Respecto al análisis bacteriano, un porcentaje de las muestras resultaron con recuentos superiores al valor límite aceptado para aguas recreacionales¹⁴⁹: el 20,8% para coliformes fecales (mayor a 200 UFC/100mL), el 16,7% de las muestras para E.coli (mayor a 298 UFC/100mL) y el 6,3% para Enterococos (mayor a 89 UFC/100mL) que correspondieron a muestras de la desembocadura de los ríos Cosquín y San Antonio durante los meses de diciembre de 2011, enero y febrero de 2012. Además, en la

muestra del mes de enero de 2012, en el sitio Toma, se excedió el límite para coliformes fecales. El resto de las muestras presentó valores aceptables en términos de calidad bacteriológica.

4.4. Caracterización genética de HEV en muestras ambientales

A partir de todas las muestras amplificadas, se pudo obtener las secuencias indicadas en la tabla 3. A partir de las mismas, se realizó un alineamiento utilizando el programa MEGA 5.05, incluyendo además secuencias patrón de cada genotipo (Fig. 18).

Tabla 3: Detalle de las fuentes, fechas de muestreo y números de accesos de las secuencias de nucleótidos de HEV ingresadas al GenBank en este estudio.

Identificación de la muestra	Fuente	Fecha	ORF-2: amplificación-número de acceso	ORF 1: amplificación-número de acceso
AmbSCbaArg01	Líquido residual	Septiembre 2010	Si - KF751218	Si - KF765479
AmbRCbaArg02	Río (Puente Centenario)	Primavera 2010	Si - KF751219	No
AmbSCbaArg03	Líquido residual	Marzo 2011	Si - KF751220	No
AmbSCbaArg04	Líquido residual	Abril 2007	Si - KF751221	No
AmbLCbaArgAgoP3	Embalse (Club de Pescadores)	Agosto 2013	Si - KX812464	No

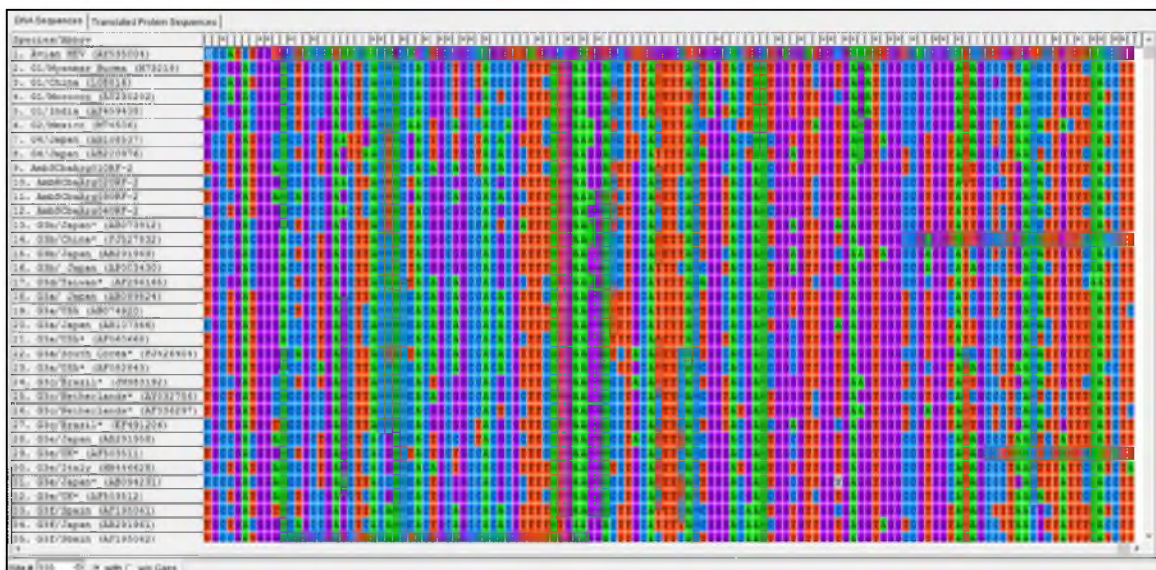


Figura 18: Captura de pantalla del programa MEGA 5.05 que muestra parte de la base de datos de fragmentos parciales de ORF-2 creada con secuencias de los cuatro genotipos descriptos del HEV disponibles en el GenBank y donde se incluyeron las secuencias identificadas en muestras ambientales en el presente estudio.

La caracterización genética y análisis filogenético de los fragmentos parciales de ORF-2 identificados mostró que todas las muestras agruparon con HEV-3 (Figura 19 y Figura 20).

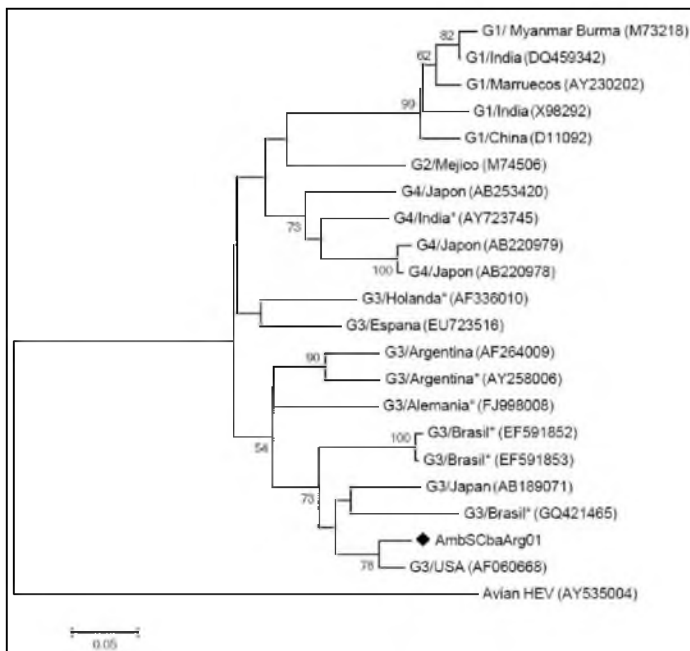


Figura 19: Árbol filogenético construido por el método de Neighbor-Joining basado en alineamientos de fragmentos de 146 nt del ORF-1 provenientes de la secuencia aislada en este trabajo y otras 21 secuencias de referencia. La secuencia caracterizada en este estudio se muestra con un ◆. Los asteriscos indican muestras porcinas. Cada secuencia viral se identifica con el número de acceso al GenBank, el país de origen y su respectivo genotipo. Una secuencia de HEV aviar se incluyó como outgroup. Los valores de bootstrap se indican en los nodos mayores como porcentajes de los datos obtenidos de 2000 réplicas (barra: 0.05 sustituciones por sitio)

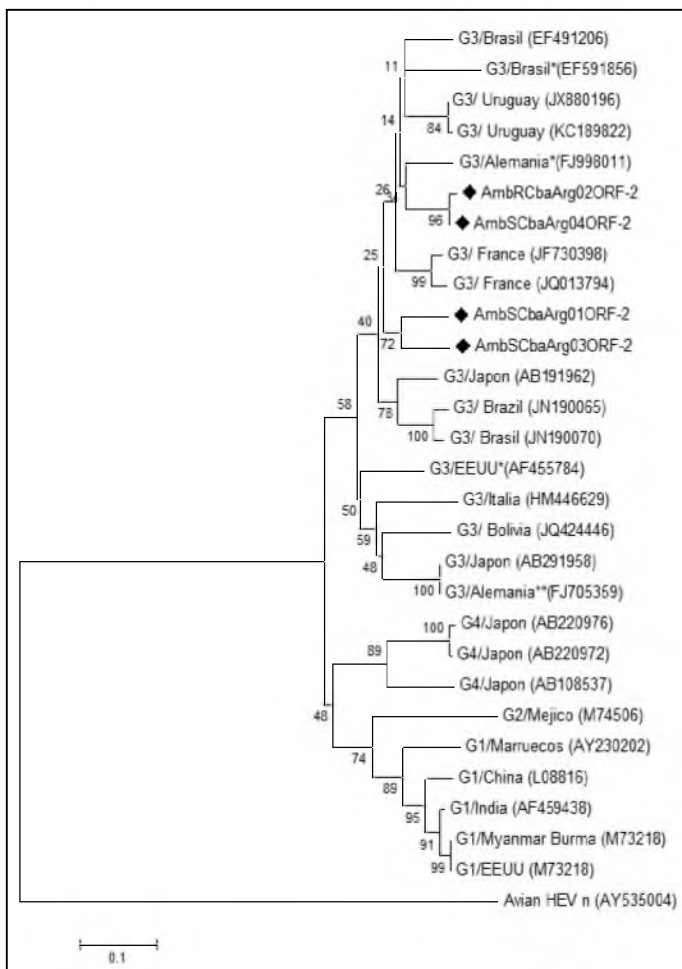


Figura 20: Árbol filogenético construido por el método de Neighbor-Joining basado en alineamientos de fragmentos de 280 nt del ORF-2 provenientes de las secuencias aisladas en este trabajo en líquidos residuales y río junto a otras 25 secuencias de referencia. Las secuencias caracterizadas en este estudio se muestran con un ◆. Los asteriscos simples indican muestras de cerdos y los dobles de jabalí. Cada secuencia viral se identifica con el número de acceso al GenBank, el país de origen y su respectivo genotipo. Una secuencia de HEV aviar se incluyó como outgroup. Los valores de bootstrap se indican en los nodos mayores como porcentajes de los datos obtenidos de 2000 réplicas (barra: 0.1 sustituciones por sitio).

En una segunda instancia, los fragmentos parciales de ORF-2 fueron utilizados para identificar el subtipo. Los hallazgos de RNA-HEV en las muestras de líquidos residuales se clasificaron como subtipos 3c (AmbSCbaArg04), 3a (AmbSCbaArg01) y 3b (AmbSCbaArg03). El RNA-HEV encontrado en la muestra del río Suquía (AmbRCbaArg02) se clasificó como subtipo 3c y el hallado en la muestra del CP (AmbLCbaArgAgoP3) se clasificó como subtipo 3c. El RNA-HEV identificado en la muestra del embalse San Roque de la DCH (Septiembre-2012) no pudo ser secuenciado. La Figura 21 muestra el árbol filogenético con las secuencias de RNA halladas en las muestras ambientales descriptas anteriormente.

Los resultados de la presencia del HEV en muestras ambientales del río Suquía y de los líquidos residuales fueron publicados: First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. *Journal of Clinical Virology*. 2014; 61(3)¹⁵³ (Anexos).

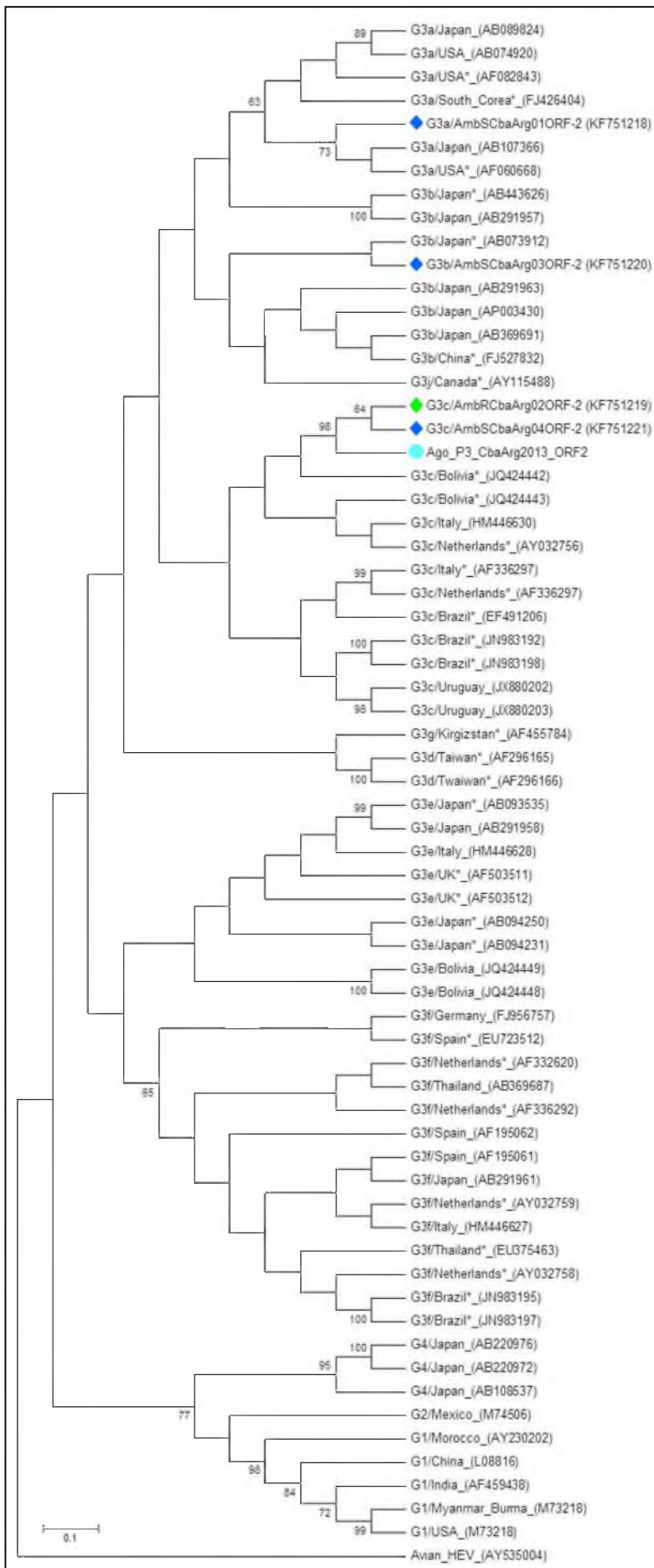


Figura 21: Árbol filogenético construido por el método de Neighbor-Joining basado en alineamientos de fragmentos de 280 nt del ORF-2 provenientes de la secuencias aisladas en este trabajo en líquidos residuales, río Suquía y embalse San Roque junto a otras 45 secuencias de referencia. Las secuencias caracterizadas en este estudio se muestran en río con un ◆, en aguas residuales con un ◆ y la muestra proveniente del embalse con un ◆. Los asteriscos indican muestras de cerdos. Cada secuencia viral se identifica con el número de acceso al GenBank, el país de origen y su respectivo genotipo. Las secuencias provenientes de cerdos se marcan con un *. Una secuencia de HEV aviar se incluyó como outgroup. Los valores de bootstrap superiores a 60 se indican en los nodos mayores como porcentajes de los datos obtenidos de 2000 réplicas (barra: 0.1 sustituciones por sitio).

CAPÍTULO III

VIRUS DE HEPATITIS E EN CERDOS

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El HEV también ha sido descrito en animales, principalmente en cerdos, demostrándose su transmisión zoonótica. En Argentina, si bien hay datos de prevalencia en piaras en algunas provincias reportados en 2006, no se conocen datos de su circulación en criaderos locales. A partir de este estudio, la identificación del HEV en cerdos nos acercaría a confirmar o descartar a estos animales como posibles fuentes de infección y/o reservorios del HEV en la provincia de Córdoba.

En el presente trabajo se estudiaron muestras de materia fecal de cerdo como una primera aproximación al reconocimiento de este animal como posible fuente de infección en nuestra región. La información recabada sentaría las bases para un estudio sobre las implicancias que puede tener la presencia de virus entéricos en alimentos, con los riesgos asociados a su transmisión por consumo de productos cárnicos derivados.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Implementar y aplicar métodos para concentración viral y extracción de ácidos nucleicos en muestras de materia fecal de cerdos de la zona central de Argentina.
- ◆ Caracterizar genéticamente las cepas de HEV detectadas mediante secuenciación directa de las muestras positivas para RNA-HEV.
- ◆ Realizar el análisis filogenético para establecer relaciones parentales entre secuencias amplificadas de cerdos y otras fuentes de origen en Argentina, Sudamérica y el resto del mundo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras analizadas

Se analizaron 108 muestras retrospectivas (2005-2007) de materia fecal de cerdos recolectadas en granjas locales dedicadas a la comercialización de carne y derivados porcinos. Estas granjas están localizadas en el departamento Santa María, provincia de

Córdoba, una zona rural ($31^{\circ}32'39''$ S – $64^{\circ}18'38''$ O) que se extiende al sur de la capital provincial a 20 km de la ciudad de Córdoba (Figura 22).

De las 108 muestras recolectadas, 84 provenían de chanchos sin crías y 24 de chanchos con crías. Además dentro del estudio se realizó un seguimiento a un cerdo hembra desde su destete (26 días después de nacido) y hasta el año y nueve meses de edad (694 días) que incluyen muestras mensuales entre los meses de Agosto-2005 a Junio-2007. En este periodo de seguimiento se incluyeron tres ciclos reproductivos de la cerda en estudio.

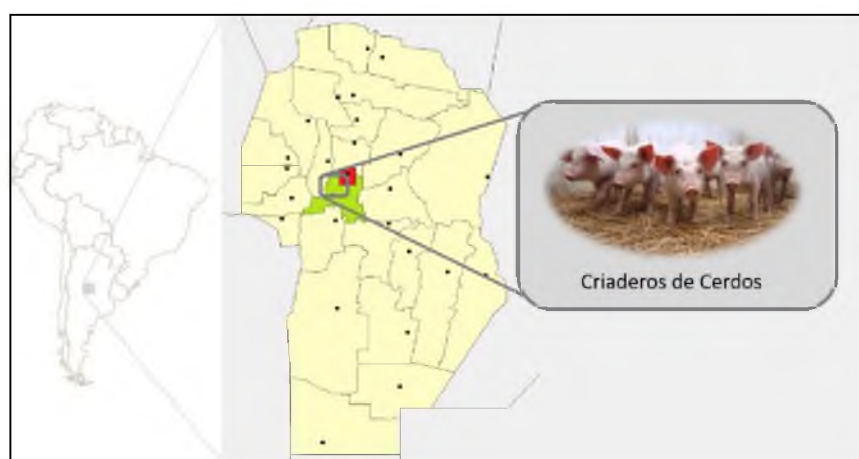


Figura 22: Mapa de la provincia de Córdoba -color amarillo-, donde se observa el departamento capital -color rojo-, allí se encuentra la ciudad de Córdoba, y el departamento Santa María - color verde-. En un recuadro gris se marca la zona de criaderos de cerdos muestreada.

Los ensayos se realizaron en pools de hasta tres pseudoréplicas provenientes de las mismas muestras que se habían fraccionado al momento de congelar. Cuando un pool dio positivo, se procesaron las pseudoréplicas por separado para confirmar las positivas.

Estas muestras fueron cedidas por el laboratorio de Gastroenteritis Virales del Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella" de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

3.2. Detección de RNA-HEV

El análisis de la presencia de RNA-HEV en muestras de materia fecal porcina incluyó, al igual que en las muestras ambientales, procesos de extracción de ácidos nucleicos, retrotranscripción, amplificación de los cDNA mediante técnicas de Nested-PCR y corridas en geles de agarosa para la visualización de los productos de las PCR. Todas las técnicas fueron realizadas bajo campana de seguridad biológica, con limpieza previa y esterilización de la superficie de trabajo con luz ultravioleta.

Posteriormente se realizó la caracterización molecular de las cepas halladas mediante secuenciación y análisis filogenético. Adicionalmente, los resultados se analizaron estadísticamente.

El tratamiento de las muestras de materia fecal porcina comienza con proceso de clarificación antes de la extracción, donde se diluyen dichas muestras con PBS pH=7,2 o solución de TrisHCl 0,02 M. La extracción posterior se realiza utilizando la técnica de fenol-cloroformo con algunas ligeras diferencias respecto de la utilizada para muestras ambientales. El resto del procesamiento sigue las mismas etapas y técnicas de la búsqueda de RNA-HEV en muestras hídricas. Estas metodologías se encuentran descritas detalladamente en el Capítulo II: Virus de Hepatitis E en el Medioambiente.

Los pasos que involucran la clarificación y extracción con fenol-cloroformo del RNA-HEV de las muestras porcinas se detallan a continuación:

- 1) Preparar el buffer de extracción que posee LiCl 50 mM, EDTA-Na₂ 10 mM y SDS (detergente no iónico) al 1%. Por ejemplo, para preparar 100 mL de solución se deben pesar 2,20 g de LiCl; 2,37 g de EDTA-Na₂ y 1,00 g de SDS.
- 2) Suspender al 20% cada muestra de heces porcinas utilizando PBS pH=7,2 o solución de TrisHCl 0,02 M pH=7,2.
- 3) Colocar la suspensión en tubos tipo eppendorf de 1,5 o 2,0 mL.
- 4) Centrifugar a 8.000 rpm durante 15 minutos.
- 5) Colocar 400 µL del sobrenadante resultante del punto anterior en tubos tipo eppendorf con tapa rosca con capacidad de 2 mL.
- 6) Agregar 400 µL de buffer de extracción preparado en el punto 1).
- 7) Agregar 800 µL de solución fenol-cloroformo 1:1 y agitar utilizando un vórtex.
- 8) Colocar los tubos en baño de agua a 60°C durante 10-15 minutos y agitar nuevamente utilizando un vórtex.
- 9) Centrifugar a 13.200 rpm durante 20 minutos.
- 10) Transferir cuidadosamente 800 µL del sobrenadante a tubos estériles tipo eppendorf de 2 mL que contengan previamente 850 µL (2,5 vol) de etanol absoluto y mezclar por inversión.
- 11) Dejar precipitar toda la noche a -20°C o 2 horas a -70°C.
- 12) Centrifugar a 13.200 rpm durante 20 minutos.

- 13) Descartar el sobrenadante con cuidado para no desprender el pellet y luego invertir el tubo sobre papel absorbente para lograr escurrir el restante de sobrenadante.
- 14) Dejar los tubos bajo campana de flujo laminar boca arriba hasta que se sequen completamente.
- 15) Resuspender los pellets en 40 μ L de agua destilada milli-Q libre de RNAsas y DNAsas.

Luego de la extracción, las muestras de RNA fueron sometidas, inmediatamente, a transcripción inversa para la síntesis de cDNA o almacenadas a -70°C hasta su procesamiento.

3.3. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando los programas Infostat v2015¹⁵¹ y Microsoft Office Excel v2013¹⁵². Se emplearon test de normalidad (Shapiro-Wilks modificado), prueba T, cálculos de intervalos de confianza, χ^2 de Pearson y Test de Fisher. La significación estadística se definió en 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Detección de RNA-HEV en muestras de heces porcinas

De las 108 muestras procesadas, 12 resultaron positivas (11,1% [12/108]) para el ORF-2 y ninguna para el ORF-1. De las muestras positivas, cuatro correspondieron a chanchos con crías y ocho a chanchos sin crías (Tabla 4). El análisis estadístico utilizando el test de Chi Cuadrado de Pearson (X^2) mostró que no existieron diferencias significativas entre las muestras positivas de cerdos con crías y sin crías ($p=0,3261$). Las Figuras 23 y 24 muestran la corrida en gel de agarosa para los fragmentos parciales de ORF-2 y ORF-1 respectivamente.

Tabla 4: Resultados del análisis de RNA-HEV en muestras de cerdos estudiadas

	RNA-HEV Positivos %(n)	RNA-HEV Negativos %(n)
Con crías (n=24)	16,7 (4/24)	83,3 (20/24)
Sin crías (n=84)	9,5 (8/84)	90,5 (76/84)
Totales (N=108)	11,1 (12/108)	88,9 (96/108)

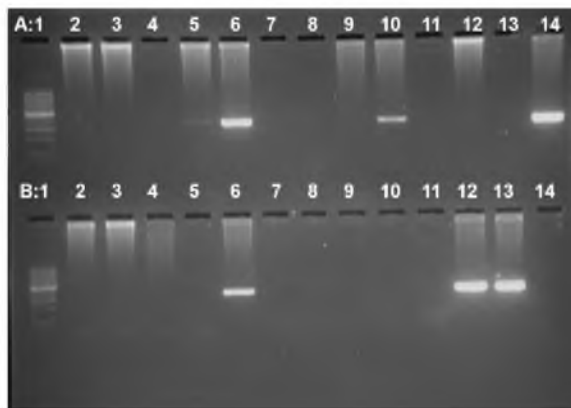


Figura 23: Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de algunas de las muestras de heces porcinas analizadas. Las calles A-5, A-6, A-10 y B-6 corresponden a muestras positivas. En las calles A-1 y B-1 se observan los marcadores de peso molecular (100 bp), en las A-2, A-3 y A-4 blancos de reacción y en las A-14, B-12 y B-13 controles positivos.

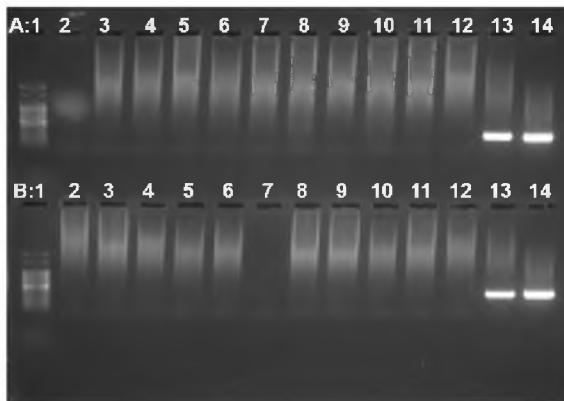


Figura 24: Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-1 de algunas de las muestras de heces porcinas analizadas. En las calles A-1 y B-1 se observan los marcadores de peso molecular (100 bp), en las A-2, A-3 y A-4 blancos de reacción y en las A-13, A-14, B-13 y B-14 controles positivos. Ninguna de las muestras resultó positiva.

Respecto al seguimiento de la cerda hembra, los resultados de los fragmentos parciales de ORF-2 se muestran en la Tabla 5, que incluye los resultados clasificados por días de vida. Los fragmentos de ORF-1 resultaron negativos.

Tabla 5: Resultados del análisis prospectivo de RNA-HEV (ORF-2) en las muestras de heces de la cerda hembra entre Agosto de 2005 y Junio de 2007.

Año	Mes	Edad (días)	RNA-HEV	Periodos reproductivos
2005	Agosto	26	-	
	Septiembre	58	+	
	Octubre	87	+	
	Noviembre	117	+	
2006	Enero	178	+	
	Febrero	208	-	
	Marzo	237	-	
	Abril	268	-	
	Mayo	297	-	
	Junio	327	-	
	Agosto	388	-	Primer parto y lactancia
2007	Junio	724	-	Tercer parto y lactancia

4.2. Caracterización genética de HEV en muestras porcinas

De las muestras positivas, tres lograron ser secuenciadas y luego del análisis filogenético se clasificaron como genotipo 3, subtipo 3c. Dichas muestras correspondieron a un cerdo macho recolectada en Noviembre de 2005 y dos muestras de la cerda a la que se le hizo el seguimiento: una recolectada en Noviembre de 2005 y otra de Enero de 2006. Las muestras fueron denominadas "SW CbaArg-2-113", "SW CbaArg-3-113" y "SW CbaArg-4-113" respectivamente. Las secuencias nucleotídicas fueron ingresadas al GenBank bajo los números de acceso KX812460, KX812461 y KX812462 respectivamente.

Las Figuras 25 y 26 muestran un ejemplo de los resultados del secuenciamiento directo *sense* (5'-3') y *antisense* (3'-5') de la muestra "SW CbaArg-2-113" utilizados para generar la secuencia consenso con la que se trabaja en el análisis filogenético.

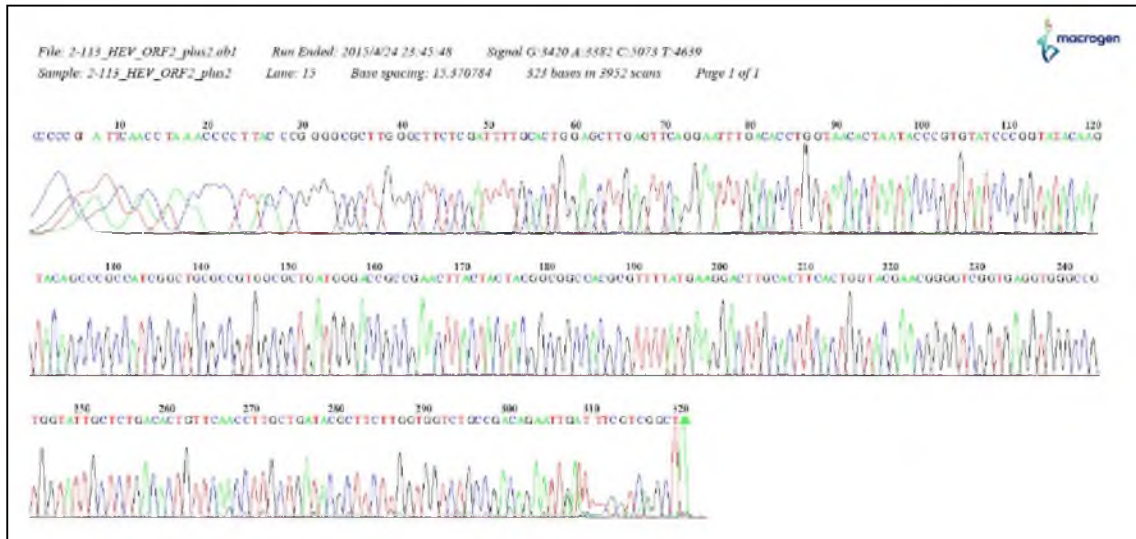


Figura 25: Resultado del secuenciamiento directo en sentido 5'-3' (*sense*) de la muestra rotulada como "SW CbaArg-2-113" en un fragmento parcial del ORF-2

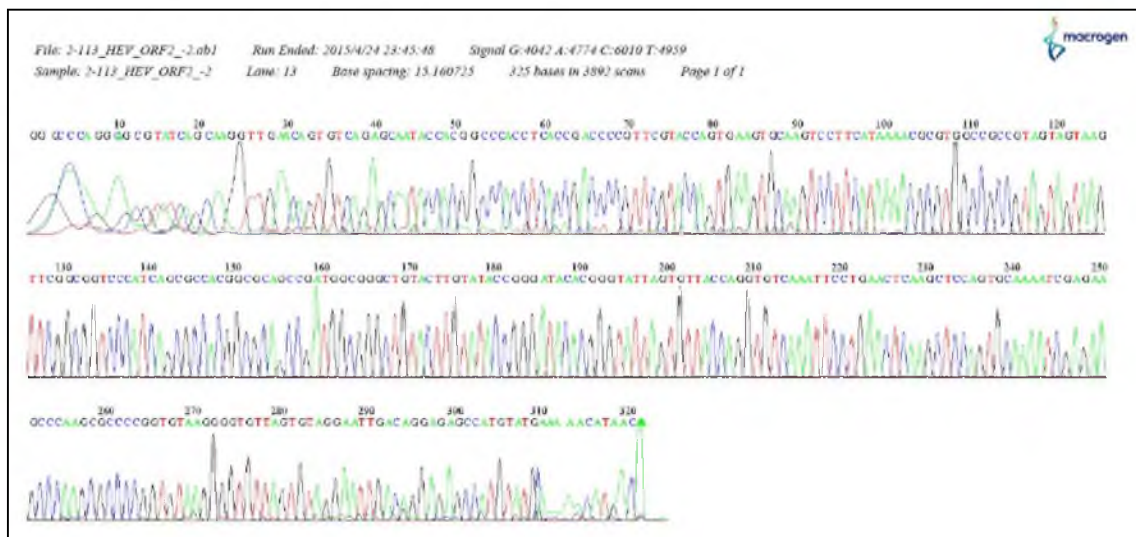


Figura 26: Resultado del secuenciamiento directo en sentido 3'-5' (*antisense*) de la muestra rotulada como "SW CbaArg-2-113" en un fragmento parcial del ORF-2

La Figura 27 muestra el árbol filogenético con las secuencias de RNA halladas en las muestras de materia fecal porcina conjuntamente con las muestras ambientales descritas en el capítulo anterior.

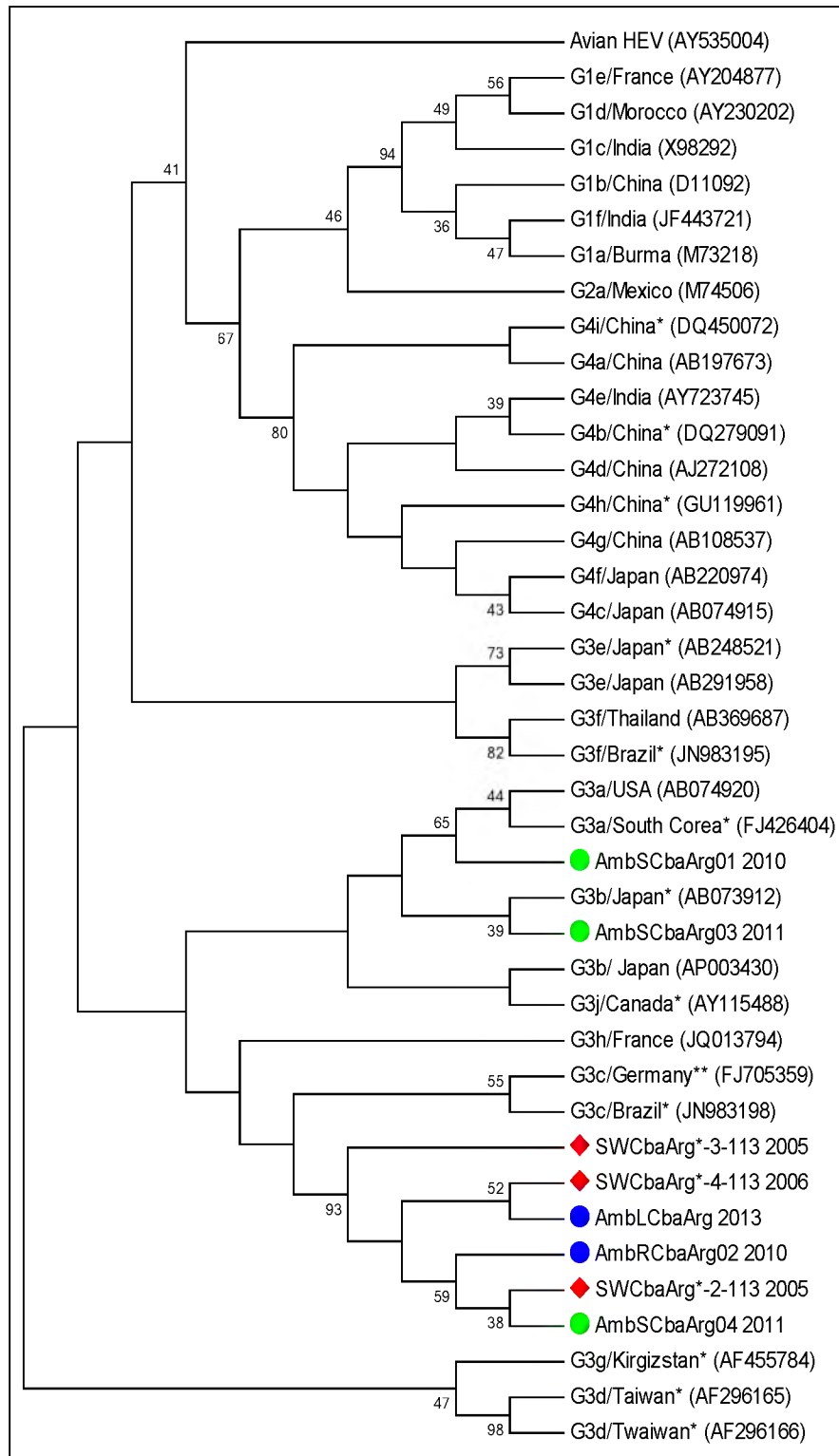


Figura 27: Árbol filogenético construido por el método de Maximum Likelihood basado en alineamientos de fragmentos de 235 nt del ORF-2 provenientes de las secuencias halladas en muestras de heces porcinas conjuntamente con las encontradas en líquidos residuales, río Suquía y embalse San Roque junto a otras 32 secuencias de referencia. Las secuencias caracterizadas en este estudio se muestran en río con un ●, en aguas residuales con un ■, en embalse con un ◆ y las de cerdos con un ◆. Cada secuencia viral se identifica con el número de acceso al GenBank, el país de origen y su respectivo genotipo. Los asteriscos indican fuentes distintas a las humanas: * cerdos, ** jabalí y *** camelo. Una secuencia de HEV aviar se incluyó como outgroup. Los valores de bootstrap se indican en los nodos mayores como porcentajes de los datos obtenidos de 2000 réplicas.

CAPÍTULO IV

VIRUS DE HEPATITIS E EN HUMANOS

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En nuestro medio la hepatitis E es considerada poco común y los aspectos clínico-epidemiológicos de la infección por HEV en Argentina son escasos. Existen estudios serológicos realizados hace más de 10 años en la región metropolitana de Buenos Aires que informan bajas tasas de prevalencia en banco de sangre, en población pediátrica y en pacientes HIV positivos. Además, se han diagnosticado casos clínicos en humanos en la misma región. -

En Argentina no existen estudios de prevalencia en población adulta sana y en la región central del país no se han registrado datos de infección en humanos, tanto en población general como tampoco en grupos de riesgo.

La ausencia de un ensayo para la detección de anticuerpos anti-HEV, aprobados por ANMAT en agosto de 2013, fue la causa, en parte, de la falta de datos de prevalencia y el rol del HEV en la epidemiología de las hepatitis agudas y crónicas.

Este estudio permitirá recabar datos sobre la epidemiología de la infección en seres humanos inmunocompetentes e inmunocomprometidos, y sobre el papel del HEV como agente causal de hepatitis agudas y /o crónicas en nuestro medio. Este trabajo constituye además una herramienta de información para alertar a las autoridades sanitarias sobre el estado de situación de la circulación del HEV en la población.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Detectar la presencia de anticuerpos IgM e IgG anti-HEV muestras de suero de población general de la zona central de Argentina.
- ◆ Detectar la presencia de anticuerpos IgM e IgG anti-HEV en individuos inmunocomprometidos (dializados, trasplantados y pacientes infectados con HIV).
- ◆ Evaluar factores de riesgo asociados a la infección por HEV en las poblaciones estudiadas.
- ◆ Identificar casos de hepatitis E en humanos a partir del análisis de muestras clínicas con diagnóstico de hepatitis aguda No A-No C

- ◆ Detectar la presencia de RNA –HEV en muestras de suero de pacientes compatibles con hepatitis aguda No A-No C y en pacientes inmunosuprimidos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras analizadas

3.1.1. Población general

Se realizó un estudio retrospectivo utilizando 433 muestras de suero proveniente de individuos que asistieron a centros de salud de la ciudad de Córdoba entre Septiembre de 2009 y Septiembre de 2010. Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su análisis.

Los individuos enrolados fueron clasificados en tres grupos de acuerdo a la edad (rango entre 18-78 años de edad): menores de 30 años, entre 31-45 años y mayores de 46 años de edad. Asimismo, los participantes fueron catalogados en dos grupos de acuerdo a su nivel socioeconómico (bajo y medio/alto) siguiendo una clasificación propuesta por la Municipalidad de Córdoba basada en el nivel económico, social y educativo de cada persona¹⁵⁴. Se marcó en un mapa de la ciudad de Córdoba la localización aproximada de las muestras utilizando la información de los barrios de dónde provenía cada individuo participante (Figura 28).

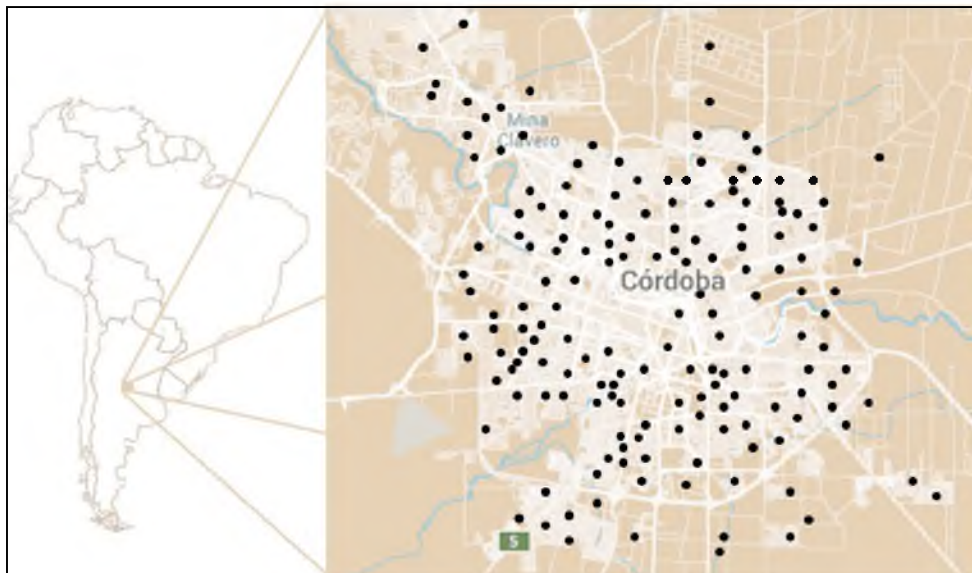


Figura 28: Mapa de la ciudad de Córdoba ($31^{\circ}23'51''$ S $64^{\circ}10'57''$ O) donde se marcan con puntos negros la localización aproximada de la toma de muestras de suero de población general.

3.1.2. Pacientes con diagnóstico de hepatitis aguda

Para el desarrollo de este estudio se tomaron 318 muestras de suero provenientes de adultos que asistieron a LACE Laboratorios con sospecha de hepatitis aguda de origen viral entre Marzo-2014 y Enero-2015. Esos pacientes tenían la indicación de análisis de IgM anti-hepatitis A (IgM-HAV), antígeno de superficie del virus de hepatitis B (AgHBs) e IgG anti-hepatitis C (IgG-HCV). Además se les determinó IgM anti-citomegalovirus (IgM-CMV) e IgM anti-virus de Epstein-Barr (IgM-EBV). Por otro lado, a las mismas muestras, se les realizaron anticuerpos antinucleares (ANA) (Biosystem®) para descartar causas autoinmunes. A todas las muestras se les determinó aspartatoaminotransferasa (AST), alaninoaminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FAL), gamaglutamiltranspeptidasa (GGT) y bilirrubina directa, indirecta y total (BD, BI y BT) por métodos colorimétricos (Roche® Diagnostics).

Del total de las muestras analizadas, 92 resultaron negativas para los cinco marcadores virales antes mencionados y el marcador de hepatitis autoinmune. Luego, a esas mismas 92 muestras se les realizaron estudios de presencia de HEV. Todas las muestras incluidas en este estudio fueron conservadas a -80°C hasta su análisis.

3.1.3. Pacientes HIV positivos

Se analizaron retrospectivamente 204 muestras de suero de pacientes HIV[+] recolectadas en el año 2010 en distintos centros de salud de la ciudad de Córdoba. De estas muestras, 68 provenían de pacientes que recibían terapia antiretroviral (TARV) en una clínica privada y que fueron estudiadas previamente¹⁵⁵, 96 fueron recolectadas en otras diferentes clínicas privadas (58 de ellos bajo TARV) y 40 fueron recolectadas en un hospital público y correspondían a pacientes que habían concurrido por primera vez a un control luego del diagnóstico de HIV[+] y no estaban bajo TARV. En el momento de la extracción de la muestra se recolectaron los datos clínicos y de laboratorio, que incluyeron valores de transaminasas y recuentos de linfocitos T CD4[+], y además resultados de ultrasonidos realizados al paciente.

3.1.4. Pacientes dializados y trasplantados

Se analizaron un total de 208 muestras de sangre recolectadas entre los años 2014 y 2015 de pacientes de un centro de salud privado de la ciudad de Córdoba, 88 de ellos sometidos a diálisis (82 con hemodiálisis y 6 con diálisis peritoneal) y 120 receptores de trasplantes de órganos sólidos (106 de riñón y 14 de hígado). Las muestras recolectadas fueron conservadas a -80°C hasta su análisis.

En todos los sujetos se analizaron condiciones clínicas, datos de laboratorio (AST, ALT, FAL, GGT, BD, BI, BT), hábitos sociales y la presencia de riesgos potenciales de infección con el HEV (consumo de carne de cerdo y/o pescado, acceso a agua potable, historia de transfusiones y viajes).

3.2. Metodologías utilizadas

3.2.1. Detección de anticuerpos específicos anti-HEV

El análisis serológico fue realizado con la técnica de ELISA Sandwich de 3ra generación para la detección de IgG e IgM específicos anti-HEV (Dia.Pro® -Milán, Italia-) siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante y utilizando un equipo automatizado de ELISA. Los antígenos utilizados en las placas corresponden a determinantes antigénicos conservados e inmunodominantes derivados de las regiones de ORF-2 y ORF-3 de todos los genotipos. Los anticuerpos policlonales que reconocen los anticuerpos específicos (IgG o IgM) presentes en las muestras se encuentran marcados con la enzima peroxidasa de rabanito (HRP).

Los resultados fueron interpretados con el índice de reactividad (IR) de las muestras calculado a partir de la relación de absorbancias (densidad óptica) de la muestra (M) y el *cut-off* o valor de corte (CO) (M/CO). El índice de reactividad indica las veces que el valor de la absorbancia de la muestra supera el valor de la absorbancia del CO. El CO se calculó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y en base al valor de densidad óptica del control negativo (CN) (IgM anti-HEV [CO=CN+0,250] e IgG anti-HEV [CO=CN+0,50]). Las muestras con un IR menor de 0,9 fueron consideradas negativas, entre 0,9 y 1,1 se consideraron equívocas y mayores a 1,1 se consideraron positivas.

El límite de detección del kit fue calculado sobre el reactivo de referencia internacional para anticuerpos anti-HEV aportados por NIBSC/WHO con código N°95/584 y corresponde a 10 UI/mL. La especificidad diagnóstica (probabilidad del ensayo de detectar negativos en ausencia del analito reactivo) es mayor o igual al 98% y la sensibilidad diagnóstica (probabilidad del ensayo de detectar positivos en presencia del analito reactivo) es mayor o igual al 98%.

3.2.2. Detección de RNA-HEV

El análisis de la presencia de HEV en muestras de suero en seres humanos incluyó, al igual que en las muestras ambientales y de cerdos, procesos de extracción de ácidos nucleicos, retrotranscripción, amplificación de los cDNA mediante técnicas de Nested-

PCR y corridas en geles de agarosa para la visualización de los productos de las PCR. Todas las técnicas fueron realizadas bajo campana de seguridad biológica, con limpieza previa y esterilización de la superficie de trabajo con luz ultravioleta.

Todas las metodologías utilizadas para el análisis de las muestras humanas fueron las mismas que se utilizaron para la búsqueda de RNA-HEV en muestras hídricas y porcinas utilizando como método extractivo el de columnas comerciales (Qiagen®) siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Estas metodologías se encuentran descritas detalladamente en el Capítulo III: Virus de Hepatitis E en el Medioambiente.

3.3. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando los programas Infostat v2015¹⁵¹, Microsoft Office Excel v2013¹⁵² y SPSS v17.0 statistical package¹⁵⁶.

En el análisis de la población general y casos con diagnóstico de hepatitis aguda se utilizaron porcentajes para expresar las prevalencias y se aplicó un test univariado (χ^2 o test exacto de Fisher) para evaluar las correlaciones entre los marcadores serológicos y los factores de riesgo. Se calcularon los intervalos de confianza del 95% (IC95%) y la asociación entre las variables se expresó con odds ratios (ODs). La significación estadística se definió con un $p < 0.05$.

En la población de pacientes HIV[+] se utilizaron test T y test exacto de Fisher para comparar la variación de prevalencias. Se consideraron significativos valores de $p < 0.05$. Se utilizó una regresión logística para calcular los ODs de los LT-CD4[+] ajustados por edad y χ^2 para analizar los valores de corte (cut off) de los LT-CD4[+]. Además, se calcularon medias, medianas, intervalos de confianza del 95% (IC95%) y rangos intercuartílicos (RIQ) de acuerdo a la homogeneidad de los datos.

Por último, en la población de pacientes dializados y trasplantados, las variables continuas se expresaron con medias y desvíos estándares (SD) o medianas y RIQ de acuerdo a su homogeneidad. Las variables categóricas se expresaron como números y porcentajes. Se utilizaron test T independiente o χ^2 para analizar la asociación entre los factores de riesgo individuales y las IgG anti-HEV. Además, todas las variables que fueron significativas en el análisis univariado considerando un $p < 0.20$, fueron consideradas en un análisis multivariado de regresión logística para determinar los factores de riesgo independientes para la IgG anti-HEV. Las asociaciones se presentan como ORs con un IC95%. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo en una prueba de dos colas.

3.4. Aspectos éticos de la investigación en seres humanos

Todos los estudios incluidos en este trabajo fueron evaluados y aprobados por Comités de Ética de Investigaciones en Salud: Oulton-Romagosa (RePIS 001), Córdoba, – Argentina, Universidad de Minnesota, Minnesota – Estados Unidos, Hospital Privado (CIEIS HP 4-231/14), Córdoba - Argentina.

4. RESULTADOS

4.1. Población general

De las 433 muestras de suero analizadas, 19 resultaron positivas para IgG anti-HEV (4,4% [IC95%: 2,5-6,3]). La Figura 29 muestra una fotografía de una placa de Elisa finalizado de IgG anti-HEV y los porcentajes de cada grupo estudiado se detallan en la Tabla 6.

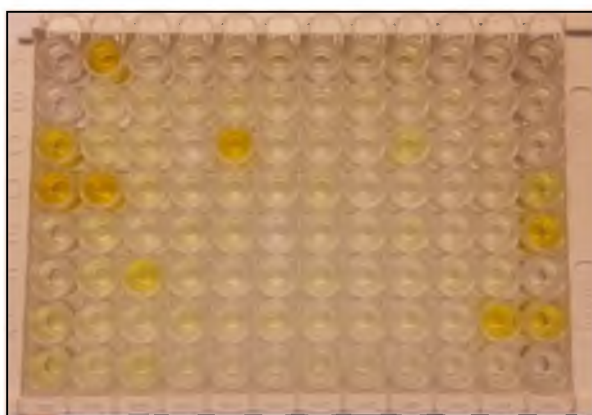


Figura 29: Fotografía de una placa de Elisa luego de terminado el proceso de determinación de IgG anti-HEV. En los pocillos A1-D1 se muestran el blanco, control negativo, control positivo bajo y control positivo alto. Se observan muestras positivas en los pocillos A2, D2, F3, C5, C9, G11, D12, E12 y G12

Se observó que la seroprevalencia aumentó con la edad (OR: 3,50; IC95%: 1,39–8,87; $p = 0,0065$): la mayor prevalencia se observó en los individuos mayores de 46 años (8,1%) mientras que en los menores de 30 años la prevalencia fue menor (0,7%).

Tabla 6: Porcentajes de individuos con anticuerpos IgG anti-HEV positivos en suero clasificados por rango etario y nivel socioeconómico

Edad (años)	N IgG anti-HEV+, %(n)	IgG anti-HEV+ en nivel socioeconómico Medio/Alto %(n)	IgG anti-HEV+ en nivel socioeconómico Bajo %(n)	valor de p
<30	0,7 (1/149)	1,4 (1/71)	0 (0/78)	NS*
31-45	4,4 (6/136)	0 (0/66)	8,6 (6/70)	0,0150
>46	8,1 (12/148)	6,8 (5/74)	9,5 (7/74)	NS*
Total	4,4 (19/433)	2,8 (6/211)	5,9 (13/222)	NS*

* Un valor de $p > 0.05$ fue considerado estadísticamente no significativo.

No se observó diferencia significativa entre las prevalencias halladas en los grupos según sus características socio-económicas. Sin embargo, sí se observó diferencia significativa en las prevalencias halladas entre ambos grupos respecto al grupo etario de 31–45 años ($p=0,0150$).

Los resultados de la presencia del HEV en población general fueron publicados: First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. *Journal of Clinical Virology*. 2014; 61(3)¹⁵³ (Anexos).

4.2. Pacientes con diagnóstico de hepatitis aguda

De las 318 muestras estudiadas para los cinco marcadores virales (AgHBs, IgM-HAV, IgG-HCV, IgM-EBV e IgM-CMV) y el marcador de hepatitis autoinmune (ANA), resultaron positivas 81 para AgHBs (25,47% [81/318]), 4 para IgM-HAV (1,26% [4/318]), 33 para IgG-HCV (10,38% [33/318]), 25 para IgM-EBV (7,86% [25/318]), 36 para IgM-CMV (11,32% [36/318]), 47 para ANA (14,78% [47/318]). Del total de las muestras analizadas, 92 (28,93% [92/318]) resultaron negativas para todos estos parámetros. Los resultados de los marcadores bioquímicos que expresan daño hepático de las 318 muestras se encuentran expresados en la Tabla 7.

Tabla 7: Marcadores de daño hepático en las muestras con diagnóstico de hepatitis aguda

Marcadores de daño hepático (unidades)	Media aritmética	IC95%	Valores Normales*
AST (UI/L)	91	53-129	menor de 40 UI/L
ALT (UI/L)	82	43-121	menor de 40 UI/mL
GGT (UI/L)	189	117-261	10-41 UI/L
FAL (UI/L)	375	287-463	40-190 UI/L
BD (mg/dL)	0,52	0,26-0,79	hasta 0,4 mg/dL
BI (mg/dL)	0,66	0,28-1,05	hasta 0,6 mg/dL
BT (mg/dL)	1,14	0,52-1,77	hasta 1,0 mg/dL

AST: aspartatoaminotransferasa; ALT: alaninoaminotransferasa; GGT: gamaglutamiltranspeptidasa; FAL: fosfatasa alcalina; BD: bilirrubina directa; BI: bilirrubina indirecta; BT: bilirrubina total; UI/L: unidades internacionales por litro; mg/dL: miligramos por decilitro. *: recomendados por la Federación Internacional de Química Clínica.

De las 92 muestras sin etiología viral o autoinmune 4 resultaron positivas para IgM anti-HEV (4,4% [4/92]) y 2 resultaron positivas para IgG anti-HEV (2,2% [2/92]). Del total de muestras con diagnóstico de hepatitis aguda, las que resultaron IgM anti-HEV positiva representan el 1,26% (4/318). Ninguna de las 92 muestras resultó positiva para RNA-HEV. Las muestras que no fueron positivas para ningún marcador viral agudo o autoinmune fueron desestimadas como hepatitis agudas de origen viral u autoinmune, considerándose otros diagnósticos según criterio médico.

Por otro lado, al realizar una comparación de los porcentajes obtenidos para IgG anti-HEV en este grupo con la prevalencia obtenida en población general (4,4% [19/433]) no se observó diferencia estadísticamente significativa ($p>0,05$).

4.3. Pacientes HIV positivos

De los 204 sujetos HIV[+] estudiados, 15 tuvieron resultados positivos para IgG anti-HEV en suero (7,37% [IC95% 3,74-10,96]). Al comparar estos resultados con los obtenidos en población general (4,4% [IC95% 2,5-6,3%], 19/433) no se observó diferencia estadísticamente significativa ($p=0,12$). La media de edad en los pacientes HEV positivos fue de 44,9 años versus 39,7 años en aquellos HEV negativos ($p>0,05$; no significativo). Cuando se compararon los recuentos de linfocitos T CD4[+] (células/mm³) de los pacientes HIV[+] que presentaron IgG anti-HEV con los recuentos de aquellos que resultaron IgG anti-HEV negativos, el grupo de pacientes HIV[+]IgG anti-HEV[+] presentó menores recuentos de CD4 que aquellos con IgG anti-HEV[-] (234 células/mm³ vs. 422 células/mm³; $p=0,01$). Basado en el análisis de regresión logística el coeficiente del recuento de CD4 fue significativo ($Z=-2,44$; $p=0,01$) con un OD menor de 1:0,967 (IC95%: 0,942-0,994) para un aumento de CD4 de 10 veces, indicando que aquellos individuos con menores recuentos de CD4 tienen mayor probabilidad de infección por HEV (Figura 30). El mayor riesgo de seropositividad para HEV con menores valores de CD4 continuó siendo significativo después de realizar el ajuste por edad ($Z=-2,69$; $p=0,006$; OR=0,969; IC95%: 0,943-0,995).

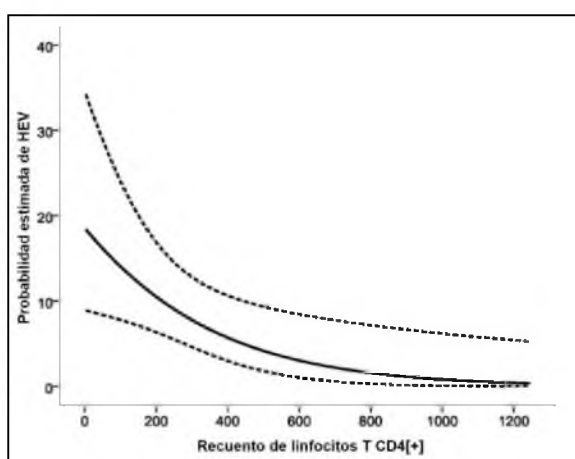


Figura 30: Probabilidad estimada de seropositividad de HEV de acuerdo al recuento de CD4[+] (línea continua) con su intervalo de confianza del 95% (líneas punteadas).

Cuando se compararon los pacientes con inmunosupresión severa, definida por un recuento de CD4 <200 células/mm³, con aquellos cuyos recuentos eran >200 células/mm³, se encontró que la seropositividad de IgG anti-HEV fue del 16% (IC95%: 5,48-26,5%) versus 4,5% (IC95%: 1,22-7,87), respectivamente ($p=0,012$). La edad media para ambos grupos (seropositivos y seronegativos) fue similar: 39 años para los

HEV seropositivos (RIQ 35-41) y 38 años (RIQ 31-46) para aquellos HEV seronegativos (Tabla 8). No se encontraron diferencias significativas entre aquellos pacientes con TARV comparados con aquellos sin TARV (8,4% versus 6,4%, $p > 0,05$).

Tabla 8: Seroprevalencia de IgG anti-HEV de acuerdo a los valores de LT-CD4[+] informados en cada paciente.

Cohorte	IgG anti-HEV positivos			OR de CD4 <i>por incremento de 10 veces IC95%</i>	Valor de p [§]
Total	N*	n [#]	Prevalencia, IC95% (%)		
	204	15	7,35 (3,74-11,96)	0,967 (0,942-0,994)	0,006
Total	N*	n [#]	Prevalencia, IC95% (%)	OR para CD4 <200 vs >200 /mm ³ IC95%	Valor de p [§]
CD4 < 200 células/mm ³	50	8	16,00 (5,48-26,52)	4,00 (1,37-11,67)	0,012
CD4 > 200 células/mm ³	147	7	4,55 (1,22-7,87)	1 (referencia)	

*número de muestras estudiadas totales; #número de muestras positivas para IgG-HEV; §probabilidad expresada en logaritmo en base 10

Cinco sujetos que fueron positivos para IgG anti-HEV fueron también positivos para IgM anti-HEV, sugiriendo infección aguda o reciente. En aquellos individuos positivos para IgG anti-HEV de los cuales contábamos con información clínica (n=4), las enzimas hepáticas eran normales, no presentaron síntomas gastrointestinales y no mostraban evidencia clínica de hepatitis crónica, pero todos presentaban anomalías en el hígado en el estudio con ultrasonido, tales como aumento de tamaño del hígado (n=3) o aumento de la ecogenicidad (n=3).

Por otro lado, RNA-HEV resultó positivo en una de las 204 muestras de los pacientes HIV[+] pero no pudo ser secuenciado, probablemente debido a una baja carga viral, ya que la banda obtenida por RT-Nested-PCR fue muy débil (Figura 31). Esta muestra pertenecía a un sujeto con síntomas de náuseas, vómitos y diarrea, severamente inmunosuprimido (recuento de CD4 = 29 células/mm³) y sin TARV.

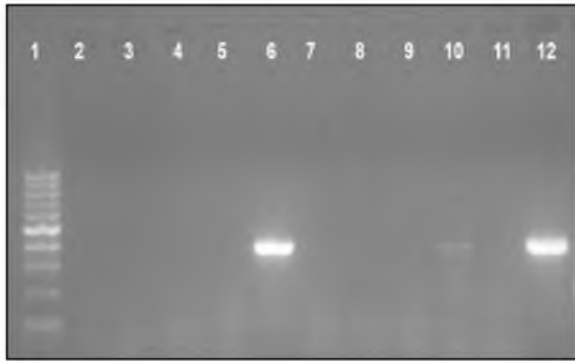


Figura 31: Gel de agarosa que muestra los fragmentos parciales de ORF-2 de muestras de pacientes HIV[+]. En la calle 10 se observa una muestra débil positiva. En la calle 1 se observa el marcador de peso molecular (100 bp), en la 2 el blanco de reactivos y en las calles 6 y 12 controles positivos.

Los resultados expuestos fueron publicados: Increased Hepatitis E Virus Seroprevalence Correlates with Lower CD4 + Cell Counts in HIV-Infected Persons in Argentina. *PLoS One*. 2016;11(7)¹⁰⁷ (Anexos).

4.4. Pacientes dializados y trasplantados

De los 88 pacientes en diálisis crónica evaluados, la proporción de hombres y mujeres fue de 2,4/1 con una media de edad de 60 años (SD=15,57; rango 23-88 años). De los 120 receptores de trasplante de órganos sólidos estudiados, la relación hombre/mujer fue de 1,5/1, con una media de edad de 50 años (SD=15,62; rango 18-77 años).

Se observó una seropositividad de IgG anti-HEV en 9 de los 88 pacientes dializados (10,2%). La media de la edad de los pacientes que resultaron positivos fue de 59 años (SD=14,6; rango 36-75 años) y la relación hombre/mujer fue de 2,3/1. Dentro de este mismo grupo, resultaron positivos 9,7% (8/82) de los pacientes hemodializados y 16,7% (1/6) de los pacientes con diálisis peritoneal. Respecto al grupo de receptores de órganos sólidos, 7 de los 120 resultaron positivos para IgG anti-HEV (5,83%), dentro de los cuales 6 fueron trasplantados renales (5,7%) y 1 hepático (7,1%) (Tabla 9). La edad media dentro de este grupo de pacientes positivos fue de 61 años (SD=17,0; rango 42-77 años) y la relación hombre/mujer fue de 1,5/1.

Se halló diferencia estadísticamente significativa entre la seroprevalencia hallada en los pacientes dializados respecto a la seroprevalencia del grupo control previamente estudiado (10,22% vs 4,4%: OR = 2,48, IC95%: 1,08-5,67; p=0.031) (Tabla 9). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la seroprevalencia de IgG anti-HEV hallada en pacientes trasplantados respecto del grupo control (5,8% vs. 4,4%; p>0,05), ni entre pacientes trasplantados renales y hepáticos (5,7% vs. 7,1%; p>0,05) (Tabla 9). Tampoco hubo diferencias significativas entre pacientes trasplantados y dializados (5,8% vs. 10,2%; p>0,05) (Tabla 9).

Tabla 9: Comparación de seroprevalencia de IgG anti-HEV en pacientes dializados y trasplantados vs grupo control (población general).

	N	IgG anti-HEV % (n)	OR	95% CI	Valor p
Grupo control	433	4,4 (19/433)	1 (referencia)		
Dializados	88	10,2 (9/88)	2,48	1,08-5,67	0,031
Hemodiálisis	82	9,7 (8/82)	2,36	0,99-5,58	0,052*
Diálisis Peritoneal	6	16,7 (1/6)	4,36	0,48-39,16	0,19*
Trasplantados	120	5,8 (7/120)	1,35	0,55-3,29	0,66*
Riñón - TR	106	5,7 (6/106)	1,31	0,51-3,36	0,56*
Hígado - TH	14	7,1 (1/14)	1,68	0,21-13,49	0,62*

* Un valor de $p > 0.05$ fue considerado estadísticamente no significativo.

De los 8 pacientes sometidos a hemodiálisis IgG anti-HEV [+], 5 (62,5%) resultaron IgM anti-HEV[+]. No se demostró presencia de IgM anti-HEV en los pacientes trasplantados. Ninguno de los pacientes seropositivos mostró síntomas clínicos de hepatitis aguda o crónica. Finalmente, ninguno de los 202 pacientes estudiados resultó positivo para RNA-HEV.

No se halló diferencia significativa en la seroprevalencia de HEV en ambos grupos estudiados en relación al género y edad. Entre todas las variables evaluadas mediante el análisis univariado, sólo el consumo de pescado y la ausencia de viajes al exterior resultaron estadísticamente asociados con la seropositividad de IgG anti-HEV ($p < 0,05$ en cada variable). Llamativamente, el consumo de carne de cerdo o chacinados no se correlacionaron con la seropositividad del HEV (Tabla 10).

Debido a la dependencia estructural entre covariables se ensayaron modelos de regresión logística múltiples para poder obtener los estimados de los riesgos ajustados. Este análisis multivariado mostró que la mayor frecuencia de consumo de pescado (más de una vez a la semana) fue la única variable asociada estadísticamente con la infección con el HEV (OR 9,33; IC95%: 2,07-42,2) (Tabla 11).

Los resultados de la presencia del HEV en muestras de pacientes dializados y con trasplante de órganos sólidos fueron publicados: Hepatitis E virus infection among patients on dialysis and solid organ transplant recipients in Argentina: exploring associated risk factors. *Archives of Virology*. 2016 DOI 10.1007/s00705-016-3171-6 (Anexos).

Tabla 10: Análisis univariado de los factores asociados con la seroprevalencia de IgG anti-HEV

Variable	IgG anti-HEV+ n (%) (N=16)	IgG anti-HEV- n (%) (N= 192)	Valor p
Edad (años)	57,3 (SD 15,5)	52,9 (SD 15,9)	0,31
Género, masculino*	9 (56,3%)	103 (52,0%)	0,75
Comorbilidades*			
Hemodiálisis	8 (9,7%)	74 (90,2%)	0,32
Diálisis Peritoneal	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0,94
Trasplante hepático	1 (7,1%)	13 (92,9%)	0,64
Trasplante renal	6 (5,7%)	100 (94,3%)	0,46
Grupo de comorbilidades			
Diálisis	9 (10,2%)	79 (89,8%)	0,20
Trasplante	7 (5,83%)	113 (94,2%)	0,24
Transfusión de sangre*	10/16 (62,5%)	109/156 (69,9%)	0,54
Hábitos alimentarios*			
Carne de cerdo	12/16 (75%)	106/159 (66,7%)	0,59
≤1/semana	7/7 (100%)	110/115 (95,7%)	0,67
>1/semana	0/7 (0%)	5/115 (4,3%)	0,67
Chacinados	10/16 (62,5%)	104/159 (65,4%)	0,81
≤1/semana	6/7 (85,7%)	99/115 (86,1%)	0,98
>1/semana	1/7 (14,3%)	16/115 (13,9%)	0,98
Pescado	13/16 (81,3%)	121/159 (76,1%)	0,77
≤1/semana	4/8 (50%)	113/125 (90,4%)	0,004
>1/semana	4/8 (50%)	12/125 (9,6%)	0,004
Agua de la canilla	10/15 (66,7%)	94/156 (60,3%)	0,63
Agua mineral	8/16 (50%)	79/156 (50,6%)	0,96
Alcohol	3/16 (18,8%)	55/159 (34,6%)	0,27
≤1/semana	2/2 (100%)	58/71 (81,7%)	0,79
>1/semana	0/2 (0%)	13/71 (18,3%)	0,79
Café	13/16 (81,3%)	106/158 (67,1%)	0,39
≤1/semana	4/8 (50%)	45/115 (39,1%)	0,81
>1/semana	4/8 (50%)	70/115 (60,1%)	0,81
Residencia*			
Ciudad de Córdoba (urbano)	12/16 (75%)	90/159 (56,6%)	0,19
Periferia de Córdoba (no urbano)	4/16 (25%)	41/159 (25,8%)	0,94
Otras provincias	0/16 (0%)	28/159 (17,6%)	0,08
Viajes al exterior*			
Sí	4/14 (28,6%)	52/84 (61,9)	0,04
Nunca	10/14 (71,4%)	32/84 (38,1%)	0,04

* Sólo los datos provenientes de individuos con estos factores fueron incluidos en el análisis.

Tabla 11: Análisis multivariado de los factores independientes asociados con la seroprevalencia de IgG anti-HEV.

Variable	OR (IC95%)	OR ajustado (95% CI)	Valor de p
Consumo de pescado >1/semana	9,42 (2,08-42.6)	9,33 (2,07-42.2)	0,04
Nunca haber viajado al exterior	4,06 (1.18-14.04)	-	NS*

* Un valor de $p > 0.05$ fue considerado estadísticamente no significativo.

CAPÍTULO V

NUEVA CLASIFICACIÓN DE SUBTIPOS DEL VIRUS DE HEPATITIS E

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La clasificación original del HEV propuesta por Lu y col. (2006)²⁴ diferenciaba genotipos y subtipos de acuerdo al porcentaje de divergencia de las secuencias nucleotídicas pero se utilizaban para el análisis fragmentos parciales de los extremos 5' y 3' del ORF-1 y ORF-2, que variaban entre 287 y 450 nt. De esta manera, clasificaron al HEV en 4 genotipos y 24 subtipos: 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f y 4g. Esta clasificación fue la que se utilizó al inicio de nuestros estudios en el que publicamos la presencia de HEV en muestras ambientales¹⁵³ (Ver Capítulo II)

Posteriormente, Smith y col.(2014 y 2016)^{4,31} propusieron utilizar el mismo criterio de Lu y col (2006) de análisis de divergencia nucleotídica pero utilizando secuencias de genomas completos con más de 7000 nt e incluyendo en los análisis mayor cantidad de secuencias publicadas en GenBank, las que aumentaron de manera logarítmica en los últimos años. De esta manera se clasificó al HEV en 7 genotipos⁴ y 31 subtipos³¹: 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 3ra, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4i, 5a, 6a y 7a. Además, debido al patrón complejo con múltiples jerarquías de similitud genética que muestran las secuencias dentro del gt3, los mismos autores sugirieron la conformación de dos clados en el gt3: “3abchij” que agrupa a los subtipos 3a, 3b, 3c, 3h, 3i y 3j y “3efg” que incluye los subtipos 3e, 3f y 3g.

Asimismo, recomiendan y proporcionan un listado de secuencias de referencia que deberían ser usadas por los investigadores en la temática para lograr un mejor consenso en la clasificación de subtipos del HEV que permita comparar los resultados hallados en todas partes del mundo³¹.

Esta nueva información relacionada con la clasificación del HEV merece el planteo de un re-análisis de las secuencias previamente analizadas según Lu y col. (2006)²⁴, sumando nuevas secuencias amplificadas en las últimas etapas del estudio, lo que permitirá corroborar lo propuesto por Smith y col.³¹, aportar datos para la nueva propuesta de subtipificación y abordar estudios de evolución viral.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Realizar el análisis filogenético de las secuencias halladas en muestras ambientales y porcinas utilizando las secuencias de referencia propuestas por Smith y col. (2016).
- ◆ Re-clasificar las secuencias halladas en muestras ambientales y porcinas respetando la nueva propuesta de subtipificación de Smith y col. (2016).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Secuencias analizadas

Se utilizaron las secuencias del HEV halladas en muestras ambientales y porcinas pertenecientes a fragmentos parciales del ORF-2:

- ◆ AmbSCbaArg01: líquido residual (Septiembre 2010)
[GenBank: KF751218]
- ◆ AmbRCbaArg02: río Suquía (Primavera 2010)
[GenBank: KF751219]
- ◆ AmbSCbaArg03: líquido residual (Marzo 2011)
[GenBank: KF751220]
- ◆ AmbSCbaArg04: líquido residual (Abril 2007)
[GenBank: KF751221]
- ◆ AgoP3CbaArg2013: embalse San Roque (Club de Pescadores – Agosto 2013)
[GenBank: KX812464]
- ◆ SW CbaArg-2-113: cerdo macho (Noviembre 2005)
[GenBank: KX812460]
- ◆ SW CbaArg-3-113: cerda hembra (Noviembre 2005)
[GenBank: KX812461]
- ◆ SW CbaArg-4-113: cerda hembra (Enero 2006)
[GenBank: KX812462].

3.2. Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético con el programa MEGA 5.05 usando los métodos de Neighbour-Joining y Maximum Likelihood previo alineamiento de fragmentos de 235 nt de la región ORF-2 de las secuencias obtenidas en este estudio y secuencias de referencia propuestas por Smith y col. (2016)³¹ (Tabla 12). Además se utilizaron otras secuencias del GenBank provenientes de aislamientos de HEV en humanos y animales en distintas partes del mundo.

4. RESULTADOS

El árbol filogenético mostró que todas las secuencias de HEV halladas en este estudio agruparon en el clado 3abchij, coincidiendo con la designación del subtipo previamente reportado por nuestro grupo.

Las secuencias AmbRCbaArg02, AmbSCbaArg04 y AgoP3CbaArg2013, agrupan junto a las tres muestras porcinas (SW CbaArg-2-113; SW CbaArg-3-113 y SW CbaArg-4-113) con un alto porcentaje de bootstrap pero alejadas de las muestras de líquidos residuales AmbSCbaArg03 y AmbSCbaArg01.

Tabla 12: Secuencias de referencia de subtipos de HEV según Smith y col. (2016)³¹

Genotipo	Subtipo*	Nro acceso GenBank	Cepa	Secuencias de Referencias Subgenómicas/Comentarios
1	1a	M73218	Burma	
	1b	D11092	HPECG	
	1c	X98292	I1	
	1d	AY230202	Morocco	
	1e	AY204877	T3	
	1f	JF443721	IND-HEV-AVH5-2010	
2	2a	M74506	M1	
	2b			AF173231, AF173232, AY903950 (ORF2)#
3	3a	AF082843	Meng	
	3b	AP003430	JRA1	
	3c	FJ705359	wbGER27	
	3d			AF296165–AF296167 (ORF2)#
	3e	AB248521	swJ8-5	
	3f	AB369687	E116-YKH98C	
	3g	AF455784	Osh 205	
	3h	JQ013794	TR19	
	3i	FJ998008	BB02	
	3j	AY115488	Arkell	Aislado de un pool de muestras
	3	AB290312	swMN06-A1288	
	3	JQ953664	FR-SHEV3c-like	
	3	AB369689	E088-STM04C	
	3	AB290313	swMN06-C1056	
	3	EU360977	swX07-E1	
	3	KJ873911	FR_R	
3	EU723513	SW627		
3ra	FJ906895	GDC9	Mayormente de ratón	
3	KJ013415	CHN-BJ-r14(9)	De conejo - divergente del clado 3ra	
3	JQ013791	W1-11	De conejo - divergente del clado 3ra	
4	4a	AB197673	JKO-ChiSai98C	
	4b	DQ279091	swDQ	
	4c	AB074915	JAK-Sai	
	4d	AJ272108	T1	
	4e	AY723745	IND-SW-00-01	
	4f	AB220974	HE-JA2	
	4g	AB108537	CCC220	
	4h	GU119961	CHN-XJ-SW13	
	4i	DQ450072	swCH31	
	4	AB369688	E087-SAP04C	
5	5a	AB573435	JBOAR135-Shiz09	Proveniente de jabalí
6	6a	AB602441	wbJOY_06	Proveniente de jabalí
	6	AB856243	wbJNN_13	Proveniente de jabalí
7	7a	KJ496143	178C	Proveniente de camello
	7	KJ496144	180C	Proveniente de camello

Se destacan en negrita las secuencias de referencia no asignadas por Lu y col. (2006). *Subtipos no asignados: se denotan por el genotipo y sin una designación subtipo. # Subtipos 3d y 2b se definen de Lu y col. (2006) utilizando las secuencias subgenómicas indicadas.

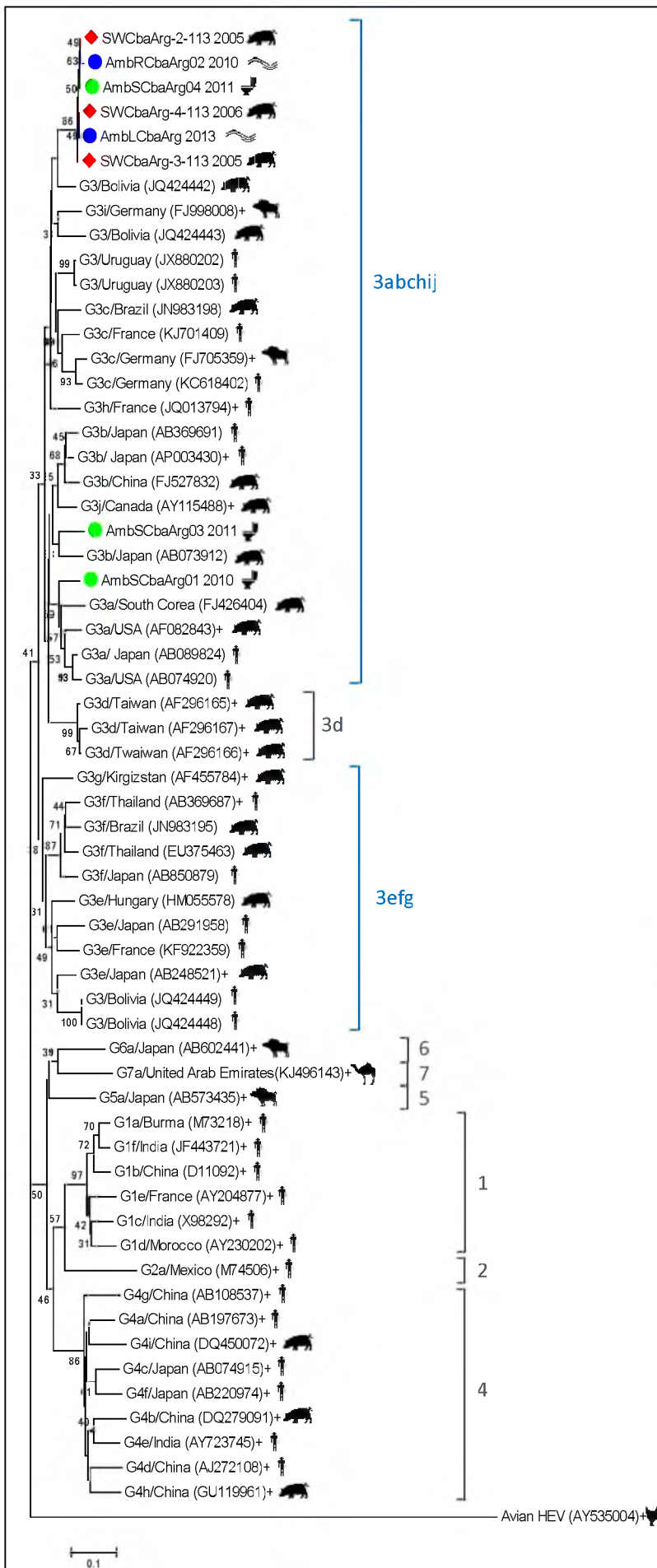


Figura 30: Árbol filogenético realizado con el programa MEGA 5.05 utilizando el test de Neighbour-Joining y el método de distancias de Maximum Likelihood basado en alineamientos de fragmentos de 235 nt del ORF-2. Las secuencias caracterizadas en este estudio se muestran con el año de identificación y en río y embalse con un ●, en aguas residuales con un ● y en cerdos con un ◆. Cada secuencia viral se identifica con el número de acceso al GenBank, el país de origen, su respectivo genotipo y la fuente donde se identificó (🐷 cerdo, 🌊 río/embalse, 🗑️ líquido residual, 🐗 jabalí, 👤 hombre, 🐪 camello y 🐔 gallina). Las secuencias de HEV aviar se incluyó como outgroup. Los valores de bootstrap se indican en los nodos mayores como porcentajes de los datos obtenidos de 2000 réplicas (barra: 0.1 sustituciones por sitio).

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

El virus de hepatitis E es un agente subestimado en nuestra región. Varias causas son responsables de este hecho, una de ellas radica en que en nuestro medio la mayoría de las infecciones parecen ser asintomáticas, por lo que su papel como agente causal de hepatitis aguda es minimizado. Además, como recientemente se lo ha considerado a nivel mundial como un agente emergente, la generación de conocimientos ha tomado escalas logarítmicas y la información de aspectos asociados a la cronicidad en inmunosuprimidos es muy reciente, se está incrementando día a día pero aún es desconocida para muchos. Esto sumado a que las metodologías diagnósticas no se encuentran globalmente distribuidas¹⁵⁷, no existe un conocimiento extendido sobre los aspectos que rodean a la infección, ni el alcance clínico - epidemiológico y menos aún las características de su circulación, que según se reporta en otras partes del mundo, son amplias y diversas. Mucho se desconoce sobre su papel zoonótico y sus reservorios en el ambiente. En este contexto, es necesario ahondar en el conocimiento de este virus en regiones donde éste es escaso o ausente y aunque en Argentina existen algunos reportes valiosos, algunos son antiguos y se confinan especialmente a la región metropolitana de Buenos Aires. En la región central de Argentina no existía, hasta este estudio, ninguna información sobre su circulación.

1. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE HEV

Actualmente no existen técnicas consensos para la detección, diagnóstico y análisis filogenético del HEV^{31,158}. Se utilizan una variedad de técnicas de PCR, cualitativas y cuantitativas, que amplifican genomas completos o fragmentos parciales del ORF-1, ORF-2, u ORF-2/ORF3, una región superpuesta de ambos fragmentos. Desde el punto de vista serológico, no difiere mucho la situación. Existen disponibles en el mercado internacional una multitud de equipos de ELISAS que determinan anticuerpos de tipo IgM, IgG o ambos y que son de marcas comerciales que reportan sensibilidades y especificidades variables¹¹⁸.

En Argentina, el panorama refleja lo que ocurre internacionalmente, sumado a que el HEV es poco considerado como agente causal de hepatitis, no existiendo muchos estudios que alerten sobre su circulación en el país. Por otro lado, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologías Médicas (A.N.M.A.T) aprobó no

hace mucho tiempo, a finales del 2013, el uso diagnóstico de un solo equipo comercial de ELISA (sólo una marca) para la determinación de anticuerpos frente al virus, por lo que la elección es bastante limitada.

Al inicio de este estudio, se ensayaron distintas técnicas de extracción comerciales (Invitrogen®, Axygen® y Qiagen®) e *in-house* (fenol-cloroformo y Trizol®). Al comparar las eficiencias de las mismas se decidió que las técnicas más adecuadas para utilizar con las muestras del estudio eran, dentro de las comerciales, las de Invitrogen® y Qiagen® y, dentro de las técnicas *in-house*, la de fenol-cloroformo. Las tres técnicas extractivas presentaron una sensibilidad comparable y por lo tanto las tres fueron utilizadas de acuerdo a la disponibilidad en el laboratorio.

Asimismo, se decidió implementar metodologías descritas previamente por Wang y col. 1999¹⁴⁷ y Huang y col. 2002⁶⁴ que amplifican fragmentos parciales del ORF-1 (418 bp) y del ORF-2 (348 bp), respectivamente. Se modificaron estos protocolos originales disminuyendo proporcionalmente algunos reactivos para lograr una optimización del uso de los mismos en el laboratorio. Se comprobó que estas modificaciones no alteraron la sensibilidad y por lo tanto los análisis de las muestras se llevaron a cabo respetando estos cambios.

Por otro lado, se conoce que el uso de las regiones genómicas ORF-1 y ORF-2 para la detección de HEV es controvertido. Muchos autores señalan a la región ORF-1 como la adecuada para su detección¹⁵⁹ pero muchos otros la descartan, señalando a la región ORF-2 como la región de elección para su detección¹⁶⁰. En este estudio, inicialmente, se procesaron las muestras utilizando los dos protocolos en paralelo pero luego de ensayadas varias de las muestras de ambiente y notando que no todas las muestras positivas para ORF-2 resultaban positivas para ORF-1 se decidió utilizar como técnica de *screening* la RT-Nested PCR que amplifica el fragmento parcial de ORF-2 y en aquellas muestras positivas para este fragmento amplificar ORF-1.

Esto coincidió posteriormente con reportes de los últimos años en los que se mostró que ORF-2 parece ser la región de elección para estudios de vigilancia ambiental de HEV¹⁶¹. Coincidentemente Munné y col. (2014)³⁰, al analizar muestras clínicas en Argentina, reportaron la misma sensibilidad en la técnica cuando amplificaba un fragmento parcial de ORF-2 y/ o de ORF-2/ORF-3, siendo mayor que cuando amplificaron la región ORF-1. Sumado a lo expuesto esta región ORF-2 tiene la ventaja adicional de ser la región genómica de elección para la genotipificación¹⁶⁰⁻¹⁶⁴.

Respecto a la detección serológica, internacionalmente existen muchas marcas comerciales que producen equipos para la detección de inmunoglobulinas específicas

anti-HEV (Adaltis -Italia-, DSI -Rusia-, DRG -Alemania-, Mikrogen -Alemania-, Wantai -China-, Euroimmun -Alemania- y MP Diagnostics -Singapur- y Dia.Pro -Italia-) pero difieren en sensibilidad y especificidad y por lo tanto se dificultan los análisis comparativos entre estudios de diferentes áreas y años, por la constante actualización de las versiones de los mismos kits^{19,118,165}. En Argentina, la única marca comercial que está disponible en el mercado luego de la aprobación de la A.N.M.A.T., es Dia.Pro (Milán -Italia-) y por lo tanto el estudio fue realizado utilizando estos kits diagnóstico. Tiempo después, Pas y col. (2013)¹⁶⁵ reportaron una comparación de kits de distintas marcas comerciales, que incluyeron a Dia.Pro y otras siete marcas más (Adaltis -Italia-, DSI -Rusia-, DRG -Alemania-, Mikrogen -Alemania-, Wantai -China-, Euroimmun -Alemania- y MP Diagnostics -Singapur-)¹⁶⁵, concluyendo que Dia.Pro resultó eficiente para diagnosticar la infección por HEV-3 en un entorno clínico, con rangos de sensibilidad entre 52-79% y especificidad de 84-99%. Avellon y col. (2015)¹¹⁸ señalaron a Dia.Pro, en su formato de detección de IgM anti-HEV, como segundo dentro del grupo de los más sensibles (junto a Euroimmun y MP Diagnostics) detrás de DSI, Mikrogen y All Diag. En dicho estudio se reportó una sensibilidad de 79% y una especificidad del 90% para el kit de IgM anti-HEV de Dia.Pro, frente a intervalos de 65-97% y 74-100% respectivamente para el grupo de kits estudiados (Wantai, Adaltis, Dia.pro, MP Diagnostics, DSI, Mikrogen recomWell)¹¹⁸. En cuanto al formato IgG anti-HEV, el kit de Dia.Pro presentó la mejor sensibilidad, con 77,5%, en un intervalo entre 57,5 y 77,5%, aunque las diferencias entre los kits comerciales no resultaron significativas ($p > 0,05$)¹¹⁸.

La implementación de técnicas de biología molecular *in-house*, no disponibles en la región hasta este estudio, y la incorporación de equipos de detección serológica resultan en un importante aporte que comienza permitiendo el acceso al conocimiento del virus en la región, y brinda al ámbito de la salud pública y privada, herramientas para el diagnóstico local de un virus considerado emergente a nivel mundial.

2. HEV EN EL MEDIOAMBIENTE

En el mundo, la detección de virus en el medioambiente y en muestras de agua potable está comenzando a ser una opción estratégica importante para prevenir brotes de infecciones con virus de transmisión hídrica. En este sentido, la vigilancia ambiental es una herramienta adicional para determinar la epidemiología de los virus que circulan en una comunidad por lo que el monitoreo de los virus entéricos en líquidos residuales se transforma en una herramienta muy útil para conocer su circulación en una población^{166,167}. Cuando analizamos una muestra de líquidos residuales, estamos analizando una muestra representativa de esa comunidad ya que incluye los casos

sintomáticos que asisten a centros asistenciales pero también aquellos casos asintomáticos que no llegan a la consulta médica. Asimismo, estudios anteriores en nuestra región han demostrado una correlación entre el patrón genético viral detectado en las aguas residuales y el hallado en los casos clínicos analizados en el mismo período para estudios de rotavirus, por lo que se esperaría un comportamiento similar para el resto de los virus que comparten la misma vía de transmisión¹⁶⁸. De igual manera, dos estudios reportaron por un lado la presencia y caracterización genética de norovirus y por otro la vigilancia de excreción de virus polio vacunal en la región, mediante su estudio en matrices residuales ^{146,169}. En el presente estudio ésta herramienta permitió describir por primera vez en Sudamérica la presencia de HEV en matrices hídricas recreacionales. El hallazgo de HEV en aguas residuales demostró la excreción y circulación local, histórica y actual, del virus en la población.

Los líquidos residuales actúan como una importante fuente de diseminación de microorganismos patógenos en el ambiente y esta situación se agrava en aquellas poblaciones donde los sistemas higiénicos-sanitarios son deficientes. La planta de tratamiento de líquidos residuales de la ciudad de Córdoba se encuentra en el curso del río Suquía y en la actualidad, si bien el tratamiento juega un rol preponderante en la reducción de microorganismos, la detección viral en los efluentes tratados no está reglamentada, planteando un nuevo desafío en el tratamiento cloacal y la desinfección. En este sentido, el río Suquía ha sido previamente reportado como una fuente hídrica de transmisión de virus entéricos tales como HAV y Norovirus^{169,170}. En este contexto, la detección del HEV en aguas del río Suquía muestra que dicho curso de agua forma parte de su historia natural de circulación y podría constituir un potencial riesgo para los individuos susceptibles expuestos.

El río Suquía recorre la totalidad del paisaje de la ciudad de Córdoba y es un recurso hídrico recreacional muy importante para un gran número de individuos. Asimismo, el embalse San Roque, donde también se detectó genoma del HEV, es utilizado como fuente de agua de bebida y con fines recreativos en la ciudad de Córdoba y alrededores. Esto muestra el riesgo que conlleva para la salud y la importancia del monitoreo de virus entéricos en los cuerpos y cursos de agua recreativos. Recientemente, Prez y col. (2015)¹⁷¹ realizaron el primer estudio en Argentina de evaluación cuantitativa del riesgo microbiano (QMRA, por sus siglas en inglés) en los ríos Suquía y Xanaes, demostrando que existe un alto riesgo de infección por rotavirus en el río Suquía y un riesgo significativamente menor de infección en el río Xanaes, pero que resulta igual un riesgo para la salud pública.

La magnitud del problema es tal que la carga de morbilidad mundial por diarrea y hepatitis virales está asociada en un 94% a factores de riesgo ambientales tales como consumo de agua no potable y saneamiento e higiene insuficientes¹⁷².

En las muestras analizadas para HEV, tanto en el río Suquía como en el embalse San Roque, en el marco de otros estudios realizados por el Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella^{143,145}, no sólo se detectó simultáneamente HAV en varios de los puntos en los que se detectó HEV sino que también se detectaron virus productores de gastroenteritis como: rotavirus, norovirus, astrovirus, poliomavirus BK y JC, picobirnavirus y enterovirus viables en todos los puntos de muestreo y durante todo el año, indicando que los cursos y fuentes de agua constituyen un reservorio de agentes virales^{143,145}.

Es importante mencionar en este punto que en Córdoba las reglamentaciones vigentes para el control de aguas y vertidos de efluentes a cursos y cuerpos de agua, incluyen como parámetros de aptitud microbiológica la medición de bacterias coliformes totales y termotolerantes (Decreto 847/16)¹⁷³ y no se incluyen indicadores virales. Además actualmente no hay consenso a nivel internacional respecto a los valores límites de detección de los indicadores bacterianos en aguas recreacionales que permita establecer niveles guía para asegurar la salud humana. En Argentina no se dispone de estudios epidemiológicos locales que estimen valores de estos indicadores bacterianos en relación al riesgo de enfermedad por exposición a las aguas por lo que se ha adoptado los niveles guía recomendados por la Agencia de Protección del Ambiente (EPA) de los Estados Unidos de América¹⁴⁹. En este contexto, en nuestro país se encuentran establecidos los niveles máximos de recuentos bacterianos pero no se especifican indicadores virales de contaminación fecal. Esto hace que un curso o cuerpo de agua pueda ser considerado apto para su uso recreativo porque posee niveles aceptables de contenido bacteriano, pero esto, no necesariamente se correlaciona con el contenido viral de dicho curso.

Existen escasos estudios sobre vigilancia ambiental a nivel mundial que reporten el virus HEV en aguas residuales y superficiales. Un estudio realizado en el Sur de India, zona endémica de HEV, demostró la presencia del virus en el 55% de las muestras de aguas residuales analizadas en los años 2009-2010, los cuales estuvieron íntimamente relacionadas a los casos esporádicos detectados en el mismo período¹⁷⁴. En Suiza, se reportó 32,2% de positividad de HEV en líquidos estudiados al ingreso de 32 plantas de tratamiento¹⁷⁵. Sin embargo, otro estudio realizado en Delhi reportó la presencia de HEV con una frecuencia mucho menor, de 4,5% muy similar a la reportada en el presente estudio¹⁷⁶. En Túnez, un estudio reportó un 2% de positividad de las muestras con HEV¹⁷⁷. En Italia, el virus fue detectado en 25% de los efluentes no tratados y en 25%

de las muestras de aguas superficiales estudiadas¹⁷⁸. Recientemente, en una pequeña isla en Francia ocurrió un brote de hepatitis E, en este contexto, se evaluó la asociación entre el número de los casos de hepatitis E en la comunidad con la concentración de virus detectados en los líquidos residuales, determinando que el virus se volvía detectable si entre el 1-4% de los infectados se encontraba conectado al sistema de drenaje sanitario; esto implicaba que muy poca cantidad de virus era necesaria para contaminar dichos líquidos residuales¹⁷⁹.

En América del Sur, si bien existen gran variedad de reportes previos de la circulación de HEV en humanos y animales¹⁹, este es el primer reporte de circulación de HEV en matrices hídricas ambientales mostrando que el virus circula en nuestra población al menos desde hace 10 años, considerando que una de las muestras de aguas residuales HEV[+] correspondió al año 2007 .

El análisis filogenético de los fragmentos parciales de la región del ORF-2 secuenciados muestra la circulación en el ambiente de HEV-3, subtipos 3a, 3b y 3c, o subtipos pertenecientes al clado “3abchij” según la nueva clasificación propuesta por Smith y col. (2016)³¹. Las secuencias de los fragmentos parciales de la región del ORF-1 no se pudieron obtener en todas las muestras, posiblemente debido a una falta de sensibilidad, relacionado al bajo número de partículas virales presentes en las muestras de agua. La detección del subtipo 3a y 3b coincide con los subtipos previamente descritos en muestras clínicas de pacientes en Argentina²⁶. El subtipo 3c no había sido descrito previamente en nuestra región.

Llamativamente, las dos secuencias de 2010 (de río y líquidos residuales) no agruparon juntas, lo que podría indicar la circulación simultánea de más de un linaje el mismo año. Más aún, el estrecho agrupamiento de las secuencias de líquido residual de 2007 con aquellas del río de 2010 y del embalse de 2013, podría poner en evidencia la circulación persistente de una misma cepa a través de los años proponiendo al medioambiente hídrico como un posible reservorio del HEV.

3. HEV EN CERDOS

En Latinoamérica se ha reportado la detección de IgG anti-HEV en cerdos en Argentina²⁹, Bolivia¹⁸⁰, Brasil¹⁸¹⁻¹⁸³, Chile¹⁸⁴, Costa Rica¹⁹ y Méjico⁶⁶ lo que marca la circulación del virus en piaras locales pero existen pocos estudios que reporten la presencia de , y estos muestran una amplia variabilidad en los porcentajes de positividad (entre 4 y 98%)^{21,185}. En Argentina, los estudios que determinaron RNA-HEV hallaron prevalencias del 96% (n=54) en Buenos Aires, 29% (n=21) en Santa Fe, 62% (n=34) y

97% (n=39) en Mendoza, todos mayores que los reportados en este estudio (11,1% [12/108]), posiblemente debido a que en el resto del país los estudios se efectuaron en cerdos de 1-2 meses de edad, mientras que en nuestro estudio se incluyeron cerdos de 0-2 años de edad. Dichas diferencias podrían explicarse considerando que reportes previos plantean que la infección en los cerdos ocurre con frecuencia entre las 6 y 10 semanas vida, momento en el cual disminuyen los títulos de anticuerpos protectivos maternos⁷⁴. Estas disparidades han sido también reportadas en Brasil¹⁸⁶, Japón¹⁸⁷, Holanda¹⁸⁸, Canadá¹⁸⁹, España¹⁹⁰ y Reino Unido¹⁹¹. Adicionalmente, se ha descrito que la seroprevalencia observada al final de la etapa de engorde en los cerdos en criaderos revela una transmisión eficaz del HEV entre los integrantes de la misma piara¹⁹². Esto fue confirmado por la valoración experimental del índice de reproducción básica del HEV estimada en 8,8 (IC95%: 4–19), lo que muestra la posibilidad teórica de que 1 cerdo infectado puede transmitir el virus a más de 8 animales en una población que nunca estuvo en contacto con el HEV durante su periodo infeccioso¹⁹². Asimismo, esta característica de la infección temprana también se observa en los resultados de la presencia del RNA-HEV en la chancha que analizamos en el seguimiento, donde las muestras positivas corresponden solamente al periodo de 1-5 meses de vida (Sep2005-Ene2006). Esto indicaría además que los anticuerpos resultarían protectivos a largo plazo e impedirían una reinfección, ya que en los ciclos reproductivos, donde se espera que tenga una mayor exposición al virus debido al periodo de primo-infección de sus crías, sumado a un periodo de cambios hormonales e inmunosupresión por el estado de gravidez, el animal en estudio no volvió a presentar niveles detectables de RNA-HEV en su materia fecal (Jun-Ago2006 y Julio 2007).

Alrededor del mundo, cada vez más casos de infección por el HEV en humanos se han relacionado con el consumo de productos alimenticios contaminados^{193,194}. Se han detectado secuencias del virus en diversos tejidos y órganos de cerdos¹⁹⁵, ciervos y jabalíes^{68,196}, así como también en bivalvos, como mejillones, berberechos y ostras^{197–199}. Se ha determinado que en productos derivados cárnicos como hígados de cerdo que pueden ser adquiridos comercialmente en mercados pueden estar contaminados con HEV^{200–202} y algunos de ellos pueden contener virus infeccioso²⁰¹. Un estudio realizado por Di Bartolo y col. (2010)²⁰³ en España, Italia y República Checa hallaron HEV en carne de cerdo en los mataderos y en los puntos de venta en salchichas. Además se ha detectado HEV en carne de cerdo ofrecida para el consumo^{203,204} por lo que la ingestión de productos crudos o mal cocidos se ha identificado como un factor de riesgo más alto²⁰⁵ y puede ser causal de casos de hepatitis aguda y/o fulminante²⁰⁶. En un estudio de casos y controles realizado por Wichmann y col. (2008)²⁰⁷ en Alemania,

se ha demostrado que el consumo de carne de jabalí cruda o cocinada insuficientemente, y de vísceras (hígado, riñón e intestino) se asoció significativamente con la infección por HEV. Asimismo, utilizando un sistema de cultivo celular se ha demostrado la presencia de virus de hepatitis E viable en una salchicha Figatelli, un producto alimenticio tradicional del sur de Francia realizado con hígado de cerdo crudo, secado y ahumado en frío²⁰⁸. Esto pone de manifiesto que el consumo de productos alimenticios que contengan hígado de cerdo crudo debe ser considerado como de alto riesgo de transmisión del HEV.

Por otro lado, y desde el punto de vista molecular de los hallazgos en este estudio, la caracterización filogenética mostró que tres secuencias designadas como gt3c agruparon estrechamente con lo detectado en muestras ambientales lo que nos lleva a pensar en un posible origen filogenético común, planteando para el futuro estudios de evolución viral para corroborar esta hipótesis. Este hallazgo difiere a lo reportado en piaras de Buenos Aires y Mendoza donde se hallaron subtipos gt3i³⁰. Sin embargo, si nos guiamos por la reciente propuesta de subtipificación de HEV sugerida por Smith y col. (2016)³¹ en la que el gt3 es clasificado en dos clados en el que tanto 3c y 3i agruparían en el mismo clado (3abchij), y considerando: a) las inconsistencias reportadas en la clasificación de los subtipos 3i y 3c en las que con la nueva clasificación algunas muestras pasaron de ser clasificadas como 3c a ser re-clasificadas como 3i y viceversa (Smith, 2016) y b) que las muestras reportadas por Munné y col. (2014)³⁰ fueron analizadas con un fragmento genómico limitado (98bp de región ORF-2), podríamos estimar que estas muestras pertenecerían a un mismo linaje.

El aumento de la cantidad de secuencias documentadas y el acceso reciente a secuencias de genoma viral completo de la mayoría de los subtipos, plantea la posibilidad de mejorar los análisis moleculares y re-clasificar las muestras previamente analizadas y los futuros aislamientos.

Además, tanto las cepas halladas en este estudio a partir de cerdos y en ambiente, en la región central de Argentina están relacionados con los casos humanos reportados en nuestro país en los que se reportó HEV-3, subtipos 3a, 3b y 3i^{26,30}.

Finalmente, la descripción de la circulación de HEV en cerdos, posiciona a estos animales en el escenario de circulación del virus en la región desde hace más de una década como reservorios virales y plantea la necesidad de ampliar y profundizar su estudio enfatizando las implicancias de la transmisión alimentaria y el impacto en la salud en los trabajadores en contacto frecuente con porcinos.

4. HEV EN POBLACIÓN GENERAL

Argentina es considerado un país de baja endemicidad para la hepatitis E y por lo tanto este virus es escasamente diagnosticado. Esta situación sumada a que la A.N.M.A.T. aprobó los kits de detección de IgM e IgG anti-HEV para diagnóstico recién a finales de 2013, hicieron que el diagnóstico de hepatitis E aguda y los estudios de prevalencias poblacionales sean escasos. En la región metropolitana de Buenos Aires, diez años atrás, se reportaron porcentajes de prevalencia en donantes de sangre (1,8%), población pediátrica (0,15%) y en pacientes HIV[+] (6,6%)^{41,50}, sin embargo, cabe destacar que la sensibilidad y especificidad de los kits diagnósticos usados en ese momento arrojaban resultados variables según los genotipos infectantes¹⁹. La detección de IgG anti-HEV en población general contribuye a mejorar y actualizar el conocimiento epidemiológico de la circulación del HEV en regiones específicas, como la región central de Argentina, donde no existían datos previos. En este sentido, la detección de anticuerpos IgG anti-HEV en individuos sin historia de hepatitis aguda es una herramienta útil para estimar la presencia de infecciones asintomáticas. Los estudios de seroprevalencia en población general en Sudamérica son escasos. La prevalencia en nuestra población (4,4%) fue ligeramente superior a la reportada en Brasil (3,3%)²⁰⁹, pero menor a la encontrada en Cuba (10%)⁶². Sin embargo, en este caso la comparación también se dificulta por la ausencia de consenso en el uso de equipos diagnóstico y por lo tanto, surge la disparidad de resultados como ya fue mencionado anteriormente^{19,118,165}.

Acordando con estudios previos, la seroprevalencia anti-HEV obtenida en el presente estudio aumentó con la edad^{62,210-213}. Los bajos niveles de anticuerpos anti-HEV en adultos jóvenes (<30 años de edad) confirma la susceptibilidad de este grupo a la infección, como fue reportado en Cuba²¹³ y en Brasil^{211,213}. El alto porcentaje de anti-HEV hallada en adultos mayores (>46 años de edad) se puede explicar por la combinación de una exposición acumulativa a través de los años y un efecto de la cohorte en la prevalencia, reflejando mayores niveles de exposición al HEV en el pasado.

Algunos reportes muestran el rol del factor socioeconómico en la transmisión de las infecciones a través del agua^{212,214}. Un ejemplo de esto se observa en múltiples estudios respecto al virus de la hepatitis A (HAV), incluso en Córdoba, donde se reportó mayores prevalencias de infección por este virus en grupos de condiciones socio-económicas debilitadas²¹⁵. Para el HEV, en cambio, no pudimos establecer dicha asociación, si bien se observó una mayor tendencia de infección en pacientes de condiciones socio-

económicas bajas, los resultados no fueron corroborados estadísticamente, por lo que se necesita ampliar los estudios para corroborar este comportamiento. Un aspecto a destacar en este estudio, es que la mayoría de las personas involucradas (90%) habitaba en viviendas con agua corriente, pero algunos individuos vivían en áreas suburbanas donde el servicio de agua potable no estaba disponible. No puede excluirse la posibilidad de que la infección por HEV pueda estar asociada a la contaminación del agua con líquidos residuales que contengan el virus, como así también considerar como posible fuente de infección de esta población el uso recreativo de fuentes de agua inadecuadas para ese uso. Sin embargo, otras vías de transmisión no fueron exploradas en nuestro estudio abordado en población general, como son: historia de viajes al exterior, ingestión de carne de cerdo cruda o mal cocida y/o derivados porcinos, transfusiones de sangre o derivados y trabajos de riesgo asociados a la infección por HEV. Por otra parte, el hallazgo de IgG anti-HEV, muestra que HEV no sólo circula en ambiente, y está en cerdos, sino que un porcentaje considerable de la población contacta con el mismo, aunque aparentemente, sufriendo infecciones subclínicas. La ausencia de síntomas se podría explicar por la circulación de un único genotipo, el HEV-3, reportado de ser endémico, producir infecciones subclínicas o reportes de casos esporádicos leves.¹⁰ En este sentido, las infecciones subclínicas ayudarían a perpetuar al virus en áreas endémicas promoviendo la circulación en la comunidad y su mantenimiento a través de los años.

Finalmente, el hallazgo de prevalencias tan disímiles (HAV ~90%²¹⁵ y HEV ~4%) en la misma población de estudio plantea un claro interrogante respecto a las vías y ciclos de transmisión que estos virus tienen en nuestro medio.

5. HEV EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS AGUDA

Las hepatitis virales son una de las enfermedades infecciosas más comunes en el mundo y los virus de hepatitis A, B, C, D y E, además de los herpes virus como el citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, son los agentes virales identificados como principales causantes^{23,51}. Sin embargo, la epidemiología mundial ha cambiado en varias partes del mundo desde la introducción de los programas de vacunación anti-hepatitis A y hepatitis B que ha sido responsable de la disminución de la incidencia de las infecciones agudas por estos virus¹⁵⁷. Al mismo tiempo, el HEV ha sido reconocido globalmente como causa cada vez más importante de hepatitis aguda^{23,157}. El hallazgo de un porcentaje importante de IgM anti-HEV (4,35% [4/92]) en muestras con diagnóstico de hepatitis aguda viral “fuera de los agentes convencionales” indicaría que la región central de Argentina, y muy probablemente el resto del país, acompañaría este

cambio de paradigma global. Asimismo, el hecho que del total de muestras estudiadas inicialmente, tanto hepatitis A como hepatitis E compartan el número de muestras positivas (1,26% [4/318]), refuerza la presunción que el HEV sería hoy un agente causal de importancia por lo menos equiparable al HAV. Por otro lado, los resultados negativos de RNA-HEV en las muestras positivas para IgM-HEV podrían deberse a una viremia transitoria ya que el RNA viral se vuelve indetectable dentro de los 21 días posteriores al inicio de los síntomas²³, y además, los requerimientos de conservación de las muestras son más rigurosos, haciendo de la detección de RNA un diagnóstico más delicado. En cambio, la detección de IgM anti-HEV se puede realizar durante la fase aguda de la enfermedad y hasta 4-5 meses después del inicio de la infección^{23,216}. Es por esta causa que si bien la detección de RNA es un test confirmatorio indiscutible de la infección posee sus limitaciones, transformando al diagnóstico serológico como una alternativa más práctica para el diagnóstico en el laboratorio del HEV³⁷.

Finalmente, debido a que se ha demostrado la circulación del HEV en la población y su causalidad en las hepatitis agudas sumado a la disponibilidad en el mercado de los kits de diagnóstico serológico de la infección, consideramos que se justificaría la inclusión del HEV en el algoritmo diagnóstico de las hepatitis agudas. Fierro y col. (2016)¹⁸⁵ informaron que mundialmente se estima que existen 2,3 billones de personas infectadas por HEV, lo que presenta un problema de gran importancia para la salud pública. Mirazo y col. (2014)³⁷ reportan que casi el 50% de las hepatitis agudas en los países en vías de desarrollo de Asia, África y Latinoamérica son causadas por el HEV, y que los síntomas en personas entre 15 y 40 años suelen ser leves. En este contexto, Harvala y col. (2014)¹⁵⁷ detallan que se ahorrarían sumas altísimas de dinero con sólo evitar la solicitud de IgM-HAV en aquellos pacientes que no poseen valores de transaminasas mayores a 100 UI/L y que este dinero sería más que suficiente para cubrir el costo de la inclusión de la IgM anti-HEV en el algoritmo diagnóstico.

Nuestro estudio permitió incorporar conocimientos y metodología que acercan a la comunidad médica y centros de salud de la región al diagnóstico de este agente viral antes desconocido y subestimado, lo que además nos permitirá continuar profundizando en su conocimiento e implicancias en la salud de la población.

6. HEV EN INDIVIDUOS INMUNOSUPRIMIDOS

6.1. HEV en pacientes infectados con HIV

Tal como se expresó, en individuos inmunocompetentes, la infección por HEV es usualmente asintomática. Sin embargo, en pacientes inmunosuprimidos, pacientes

HIV[+], y especialmente, receptores de trasplante de órganos sólidos HEV puede desarrollar una infección crónica.

En este sentido, varios estudios sobre seroprevalencia e implicancias clínicas de HEV en pacientes infectados con HIV revelan resultados controversiales. Sin embargo, ha sido ampliamente reportado que el recuento de CD4 en sangre de estos pacientes parece ser uno de los factores de riesgo mayormente asociado a la infección por HEV²¹⁷⁻²¹⁹, mientras que otras variables como consumir carne de cerdo cruda o mal cocida, o la proximidad laboral a cerdos son factores de asociación epidemiológicas con la infección por HEV menos claros^{2,4,194}.

La progresión a la cronicidad, tanto como las manifestaciones extrahepáticas de HEV en la población de infectados con HIV parece ser más rara y las implicancias de HEV en la progresión a la enfermedad hepática aún no son muy claramente comprendidas.

Los estudios que tratan de dilucidar la causa del aumento de los porcentajes de prevalencia de infección en este grupo son escasos y con resultados discordantes. Variables asociadas a la infección por HEV han sido propuestas incluyendo: edad, género, etnia, uso de drogas endovenosas, orientación sexual, contacto con cerdos, consumir carne de cerdo, recuento de CD4 en sangre, carga viral de HIV, uso de TARV, estadio clínico de SIDA, coinfección con HAV, HBV, HCV y cirrosis²¹⁹.

Con el fin de aportar en el conocimiento nuestro estudio intentó describir la situación de HEV en la población de individuos infectados con HIV en nuestro medio y reconocer factores de riesgo asociados a dicha infección.

Los resultados muestran que este grupo de pacientes presentó una mayor tendencia a la infección por HEV, aunque la diferencia respecto de la población general no pudo ser corroborada estadísticamente. Sin embargo, en aquellos individuos HIV[+] con bajos recuentos de linfocitos T CD4[+] (<200 células/mm³), la seroprevalencia fue significativamente mayor que en aquellos sujetos HIV[+] con altos recuentos de CD4 y cuando se los comparó con la población general HIV[-], señalando que la inmunosupresión pudo predisponer a la infección por HEV.

En concordancia con nuestro hallazgo, la inmunosupresión severa, definida por la disminución de CD4 en <100–200 células/mm³, ha sido reportada como el factor más ampliamente asociado a la infección en individuos HIV[+]²¹⁹. De acuerdo a la literatura 8 casos han sido documentados como RNA HEV positivos en este grupo de individuos^{105,220–225}. De los cuales 3 casos, presentaban recuento de CD4 <200 células/mm³ y desarrollo de hepatitis persistente. Sin embargo, un estudio reciente reportó el caso de una mujer que adquirió la infección por HEV con un bajo recuento de

CD4 (<200 células/mm³), pero la viremia de HEV se mantuvo persistente incluso cuando los linfocitos T CD4 aumentaron por encima de 200 células/mm³ post-infección²¹⁸. De manera similar, en nuestro estudio logramos detectar genoma viral en un paciente con inmunosupresión severa, (CD4 ≤ 29 células/mm³), signos y síntomas asociados a afección hepática, lo que nos alerta a incorporar el diagnóstico de este virus en esta población en riesgo de desarrollar hepatitis E crónica. Lamentablemente, no contamos con la posibilidad de realizar el seguimiento del paciente para comprobar si logró seroconvertir o progresó a la cronicidad.

Adicionalmente, factores de riesgo tales como la edad, género, condición socio-económica, carga viral de HIV y tratamiento antirretroviral fueron estudiados pero no fueron asociados a la infección por HEV en esta población.

Basado en los resultados y en la revisión de los estudios reportados hasta el momento, la sola evidencia de la infección por HIV parece no ser suficiente factor de riesgo asociado a la infección con HEV. Sin embargo, una vez que el virus afecta significativamente al sistema inmune de los individuos, éstos están en mayor riesgo de infección.

En resumen, los datos sugieren que pacientes infectados con HIV con bajo recuento de células CD4 pueden ser considerados un grupo de riesgo para HEV.

6.2. HEV en pacientes dializados y trasplantados

En países que no son endémicos, como la Argentina, las vías de transmisión del HEV-3 propuestas son aquellas asociadas a reservorios animales (zoonótica) y ambientales (fuentes de agua contaminada). Sin embargo, las rutas de transmisión específicas y los factores de riesgo para el desarrollo de la infección no están muy esclarecidos, especialmente en poblaciones susceptibles donde ha sido descrito, como es el caso de Argentina, huérfana de conocimientos en esta temática.

Este estudio constituye la primera evaluación de la seroprevalencia de HEV y los factores de riesgo en pacientes dializados y receptores de trasplantes de órganos en nuestro país.

En pacientes trasplantados reportamos una seroprevalencia de IgG anti-HEV de 5,83%, mayor que la reportada en Italia (3,3%)²²⁶ y menor que el encontrado entre receptores de trasplante renal en Irán (30,8%)²²⁷, usando el mismo kit diagnóstico que en este estudio (Dia.Pro -Milán, Italia-).

Globalmente existe una controversia sobre si los receptores de trasplantes de algunos órganos presentan una variabilidad en la prevalencia de HEV. Algunos estudios sugieren que los pacientes que han sido sometidos a trasplantes renales podrían ser más susceptibles a la infección por HEV debido a la exposición a mayores dosis de drogas inmunodepresoras²²⁸, otros indican que aquellos que reciben un trasplante de hígado podrían ser más propensos a desarrollar una infección por el HEV que progrese a una enfermedad crónica como resultado de una afectación hepática generalizada que generaría un escenario favorable en el órgano target^{115,204}. En este sentido, nuestro estudio no mostró prevalencias de HEV significativamente diferentes entre receptores de riñón o hígado.

Numerosos estudios han reportado el desarrollo de enfermedades crónicas por HEV en pacientes trasplantados^{113,130,229–233}. Sin embargo, coincidiendo con Harrison y col. (2013)¹⁰⁹, Naik y col. (2013)²³⁴ y Scotto y col. (2015)²²⁶, los cuales no describieron persistencia viral en sus reportes, en este estudio no se logró amplificar el RNA-HEV en ninguna muestra, sugiriendo que la infección activa por HEV no sería un problema en nuestra comunidad.

En este grupo, unos de los factores asociados a la infección por HEV descrito es el uso de la droga inmunosupresora tacrolimus, que ha sido reportada como una variable independientemente asociada a la infección crónica con HEV cuando se la compara con el uso de ciclosporina A¹¹⁵. Sin embargo, es importante notar el hecho que si bien todos los receptores de trasplantes fueron tratados con tacrolimus, ninguno de los pacientes presentó RNA-HEV en sangre.

Respecto a los pacientes dializados estudiados y su relación con la seroprevalencia de HEV, es conocido que la enfermedad renal crónica induce deficiencias en la inmunidad celular y humoral caracterizada por un incremento en la susceptibilidad a infecciones virales y bacterianas¹⁰⁹. En este contexto, este estudio encontró mayores seroprevalencias en pacientes dializados (10,2%) cuando se las comparó con la población general (4,4%). Estos resultados son comparables con aquellos reportados en Italia (6,0%)²²⁶, Irán (7,4-10,6%)^{235–237} y Turquía (20,6%)²³⁸, donde todos utilizaron el mismo kit de ELISA para anticuerpos anti-HEV.

Scotto y col. (2015)²²⁶, reportaron una baja frecuencia de hepatitis E aguda (detección de IgM anti-HEV) en pacientes sometidos a hemodiálisis y receptores de trasplantes de órganos (0,9% y 0,8%, respectivamente). Nuestro estudio encontró mayores porcentajes de IgM anti-HEV entre los pacientes hemodializados: 6,09% (5/82) de todos los pacientes muestreados y 62,5% (5/8) de aquellos con IgG anti-HEV positivos.

Ninguno de estos pacientes mostraron síntomas consistentes con casos de hepatitis viral aguda y los niveles de transaminasas en sangre fueron similares a aquellos pacientes con IgM anti-HEV negativo. Sin embargo, es importante notar que en estos pacientes hubo un cambio más pronunciado de ALT (6,75 U/L) comparada con el de AST (0,86 U/L) tres meses después de la detección de IgM anti-HEV. Es difícil evaluar si estos cambios estaban relacionados o no con la infección aguda por HEV debido al bajo número de sujetos positivos involucrados en el estudio.

No se conoce verdaderamente por qué los pacientes sometidos a hemodiálisis presentan más seroprevalencia de HEV que los controles sanos. Algunos han propuesto que la continua exposición de estos pacientes a la heparina podría estar relacionado¹⁰⁹. La heparina es un derivado del intestino del cerdo y el HEV ha sido encontrado en el tracto digestivo de estos animales luego de infecciones experimentales. Nosotros realizamos una PCR para la amplificación de HEV en un pequeño lote de heparina usada en los pacientes estudiados, pero no logramos amplificar el RNA-HEV en ninguna de las muestras. La transmisión parenteral también ha sido propuesta como una explicación posible de las mayores prevalencias en este grupo²²⁶. Los pacientes con enfermedad renal crónica tienen la eritropoyesis alterada y por lo tanto son propensos a recibir más transfusiones de sangre que la población general. Por otro lado, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre las prevalencias halladas o factores de riesgo estudiados entre aquellos sujetos sometidos a hemodiálisis y aquellos en diálisis peritoneal, aunque el número de pacientes del segundo subgrupo fue bastante acotado. Se necesitaría aumentar el número de sujetos con diálisis peritoneal para poder emitir mayores conclusiones.

Curiosamente, no se encontraron factores de riesgo comúnmente asociados a la infección con HEV como son el consumo de productos cárnicos derivados del cerdo, la ingestión de agua de red o antecedentes de viajes al exterior. Inesperadamente, el consumo frecuente de pescado (más de una vez por semana) fue la única variable independientemente asociada con el aumento de la detección de IgG anti-HEV. Una limitación de este estudio es que la encuesta no ahondó en el tipo de pescado que consumían comúnmente los pacientes interrogados (pescado de mar, de agua dulce o mariscos), lugares de donde adquirió el mismo o tipo de consumo (crudo o cocido), lo que habría proporcionado más información sobre esta probable vía de transmisión. Aunque no existen estudios que reporten la asociación entre el HEV y el consumo de pescado, Yugo & Meng (2013)²³⁹ reportaron que las aguas costeras que están contaminadas con HEV llevarían a la acumulación del virus en los tejidos digestivos de los mariscos, lo que aumentaría el riesgo de infección de aquellas personas que lo

consumen. Muy a menudo mejillones, berberechos y ostras se comen crudos o ligeramente cocidos, y el hecho de que el HEV es estable en ambientes alcalinos y ácidos, congelado por más de 10 años y sigue siendo infeccioso hasta el calentamiento a 60 °C por 20 minutos, sugiere que mariscos contaminados que se consumen crudos, ligeramente cocidos o al vapor podrían transmitir el HEV a sus consumidores^{198,239}. También, se ha reportado una alta prevalencia de HEV en trabajadores de procesamiento de pescados y mariscos en China²⁴⁰. Nuestro hallazgo, aunque interesante, también está limitado por el bajo número de pacientes que informaron sobre el pescado que consumen, y por lo tanto, sería importante abordar estudios con un mayor número de individuos que incluyan estos factores de riesgo.

Finalmente, nuestro estudio encontró una mayor prevalencia de IgG anti-HEV entre pacientes sometidos a diálisis pero no entre pacientes receptores de trasplantes de órganos sólidos cuando los comparamos con controles sanos. No se observaron casos de hepatitis crónica debido al HEV. Por último, los efectos a largo plazo de la exposición al HEV en la función hepática son aún desconocidos, y se necesitan más estudios de este tipo que evalúen la seroprevalencia y la prevalencia de RNA-HEV en pacientes inmunocomprometidos y su papel en la fisiología hepática.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- ✓ El virus de la hepatitis E circula en la región central de Argentina y un elevado porcentaje de la población adulta es susceptible a la infección.
- ✓ La seroprevalencia fue diferente en las poblaciones estudiadas siendo, respecto al grupo control, similar en individuos receptores de trasplantes, dos veces más elevada en individuos dializados e infectados con HIV y cuatro veces mayor en individuos con inmunosupresión severa ($CD4 < 200$ células/mm³).
- ✓ Se demostró asociación significativa de la seroprevalencia de HEV con la inmunosupresión severa, diálisis y el consumo de pescado. No se asoció la infección por HEV con edad, género, condición socio-sanitaria, carga viral de HIV, tratamiento antirretroviral, transfusiones, consumo de cerdo y derivados.
- ✓ La identificación de IgM anti-HEV en muestras retrospectivas de pacientes con hepatitis aguda de causa desconocida muestra que el HEV es un agente emergente capaz de causar hepatitis aguda en nuestra población.
- ✓ Se reportó por primera vez en Sudamérica la presencia de HEV-3 en muestras ambientales de origen hídrico (líquidos residuales, fuentes de agua potable y aguas de uso recreativo), demostrando la excreción viral poblacional y el posible riesgo de infección a población expuesta a dichos cursos de agua.
- ✓ Se demostró una vez más la utilidad de la vigilancia ambiental como herramienta para el estudio de circulación viral y epidemiología molecular, especialmente para virus escasamente conocidos en una región.
- ✓ La detección de HEV-3 en cerdos y la demostración de la relación filogenética estrecha con cepas humanas del mismo genotipo nos acerca a la sospecha de un ciclo zoonótico local de transmisión.
- ✓ Se halló HEV-3 (subtipos a, b, c) en todas las secuencias amplificadas de diferentes fuentes de orígenes y años de recolección, evidenciando por un lado, la estrecha relación filogenética entre ellas y por otro, demostrando la circulación constante del mismo subtipo desde hace al menos 7 años y de subtipos diferentes en las mismas fuentes de origen, lo que nos alienta en un futuro a profundizar en estudios de evolución y dispersión viral.

- ✓ La suma de los hallazgos obtenidos sumado a la incorporación de metodología adecuada para la detección de este virus en nuestro medio resaltan la necesidad de incluir la detección de HEV en el algoritmo diagnóstico ante la sospecha de hepatitis virales de causa desconocida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mayo MA, Ball LA. ICTV in San Francisco: A report from the Plenary Session. In: *Archives of Virology*. Vol 151.; 2006:413-422.
2. Meng X. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis*. 2013;33:41-49.
3. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses*. 2016;8(10):270. doi:10.3390/v8100270.
4. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WHM, Purdy MA. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol*. 2014;95:2223-2232. doi:10.1099/vir.0.068429-0.
5. International Committee on Taxonomy of Viruses. *ICTV Master Species List 2015*.; 2016. http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/5208/download.aspx.
6. Perez-Gracia MT, Garcia M, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Current Knowledge on Hepatitis E. *J Clin Transl Hepatol*. 2015;3(2):117-126. doi:10.14218/JCTH.2015.00009.
7. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1990;247(4948):1335-1339.
8. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang C-C, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 1991;185(1):120-131. doi:10.1016/0042-6822(91)90760-9.
9. Teo C. Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis E. *Epidemiol Infect*. 2012;140(5):767-787.
10. Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Current concepts. Hepatitis E. *N Engl J Med*. 2012;367(13):1237-1244. doi:10.1056/NEJMra1204512.
11. Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol*. 1999;73(10):8848-8850.
12. Emerson S, Purcell R. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*. 2003;13(3):145-154.
13. Meng X. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2003;278:186-216.
14. Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res*. 2011;161(1):47-58. doi:10.1055/s-0033-1338110.
15. Chandra V, Kar-Roy A, Kumari S, Mayor S, Jameel S. The hepatitis E virus ORF3

- protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response. *J Virol.* 2008;82:7100-7110.
16. Chandra V, Kalia M, Hajela K, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus delays degradation of activated growth factor receptors by interacting with CIN85 and blocking formation of the Cbl-CIN85 complex. *J Virol.* 2010;84:3857-3867.
 17. Chandra V, Holla P, Ghosh D, Chakrabarti D, Padigar M, Jameel S. The hepatitis E virus ORF3 protein regulates the expression of liver-specific genes by modulating localization of hepatocyte nuclear factor 4. *PLoS One* 7. 2011;e22412.
 18. Schlauder G, Mushahwar I. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol.* 2001;65(2):282-292. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536234>.
 19. Echevarría J, González J, Lewis-Ximenez L, Dos Santos D, Munné M, Pinto M, Pujol F, Rodríguez-Lay L. Hepatitis E Virus Infection in Latin America: A Review. 2013;1045(December 2012):1037-1045. doi:10.1002/jmv.
 20. Tanaka T, Takahashi M, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Nagashima S, Mizuo H, Okamoto H. Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1906-1910. doi:10.1128/JCM.00629-09.
 21. Echevarría JM, Fogeda M, Avellón A. Update of cases of acute hepatitis E confirmed by the National Centre of Microbiology (Spain, 2004-2011). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(1):57-58. doi:10.1016/j.eimc.2012.06.008.
 22. Pérez-Gracia M, Mateos Lindemann M, Caridad Montalvo Villalba M. Hepatitis E: current status. *Rev Med Virol.* 2013;23(6):384-398. doi:10.1002/rmv.1759.
 23. Pérez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: An emerging disease. *Infect Genet Evol.* 2014;22:40-59. doi:10.1016/j.meegid.2014.01.002.
 24. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol.* 2006;16(1):5-36.
 25. Mirazo S, Mainardi V, Ramos N, Gerona S, Rocca a, J A. Indigenous Hepatitis E Virus Genotype 1. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(1):171-173. doi:10.3201.
 26. Munné MS, Altabert NR, Vladimirov SN, Moreiro R, Mares LOO, Soto SS, Brajterman LS, Castro RE, González JE. Identifications of polyphyletic variants in acute hepatitis suggest an underdiagnosed circulation of hepatitis E virus in Argentina. *J Clin Virol.* 2011;52(2):138-141. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.015.
 27. Jiménez de Oya N, Galindo I, Gironés O, Duizer E, Escribano JM, Saiz J-C. Serological immunoassay for detection of hepatitis E virus on the basis of genotype 3 open reading frame 2 recombinant proteins produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3276-3282. doi:10.1128/JCM.00750-09.

28. 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(1):294-297.
29. Munné MS, Vladimírsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, Guarnera E, Molina V, Monfellano M, Schlauder GG, González JE. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol.* 2006;78(12):1579-1583. doi:10.1002/jmv.
30. Munné MS, Altabert NR, M LOO, Vladimírsky SN, Moreiro R, María P, Espul C, Manzur A, Soto SS, Brajterman LS, González JE. Updating the knowledge of hepatitis E : new variants and higher prevalence of anti-HEV in Argentina. 2014;(5):496-502.
31. Smith DB, Simmonds P, Izopet J, Oliveira-Filho EF, Ulrich RG, Johne R, Koenig M, Jameel S, Harrison TJ, Meng X-J, Okamoto H, van der Poel WHM, Purdy MA. Proposed reference sequences for Hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol.* 2016;97(3):537-542. doi:10.1099/jgv.0.000393.
32. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, Mizuo H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. Hepatitis e virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: Characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1112-1125. doi:10.1128/JCM.02002-09.
33. Debing Y, Moradpour D, Neyts J, Gouttenoire J. Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *J Hepatol.* 2016;xxx(1):1-13. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.045.
34. Kamar N, Dalton H, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E Virus Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(1):116-138. doi:10.1128/CMR.00057-13.
35. Echevarría J-M. Light and Darkness: Prevalence of Hepatitis E Virus Infection among the General Population. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:481016. doi:10.1155/2014/481016.
36. Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD. The two faces of hepatitis E virus. *Clin Infect Dis.* 2010;51(3):328-334. doi:10.1086/653943.
37. Mirazo S, Ramos N, Mainardi V, Gerona S, Arbiza J. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat Med.* 2014;6:45-59. doi:10.2147/HMER.S63417.
38. Purcell R, Nguyen H, Shapiro M, Engle R, Govindarajan S, Blsckwelder W. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine.* 2003;21:2607-2615.
39. Teshale EH, Howard CM, Grytdal SP, Handzel TR, Barry V, Kamili S, Drobeniuc J, Okware S, Downing R, Tappero JW, Bakamutumaho B, Teo C-G, Ward JW, Holmberg SD, Hu DJ. Hepatitis E Epidemic, Uganda. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(1):126-129.

- doi:10.3201/eid1601.090764.
40. Shrestha AC, Faddy HM, Flower RLP, Seed CR, Keller AJ. Hepatitis E virus: do locally acquired infections in Australia necessitate laboratory testing in acute hepatitis patients with no overseas travel history? *Pathology*. 2015;47(2):97-100.
doi:10.1097/PAT.0000000000000229.
 41. Rey J, Findor J, Daruich J, Velazco C, Igartua E, Schmee E, Kohan A. Prevalence of IgG Anti-HEV in Buenos Aires, a Nonendemic Area for Hepatitis E. *J Travel Med*. 1997;4(2):100-101.
 42. Feldt T, Sarfo FS, Zoufaly A, Phillips RO, Burchard G, van Lunzen J, Jochum J, Chadwick D, Awasom C, Claussen L, Drosten C, Drexler JF, Eis-Hübinger AM. Hepatitis E virus infections in HIV-infected patients in Ghana and Cameroon. *J Clin Virol*. 2013;58(1):18-23. doi:10.1016/j.jcv.2013.05.004.
 43. Ducancelle A, Payan C, Nicand E, Le Guillou H, Calès P, Lunel-Fabiani F. Intrafamilial hepatitis E in France. *J Clin Virol*. 2007;39(1):21-53.
 44. Piper-Jenks N, Horowitz HW, Schwartz E. Risk of hepatitis E infection to travelers. *J Travel Med*. 2000;7(4):194-199.
 45. Lewis HC, Boisson S, Ijaz S, Hewitt K, Siew LN, Boxall E, Chong GT, Morgan D. Hepatitis E in England and Wales. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(1):165-167.
doi:10.3201/eid1401.070307.
 46. Echevarría J, Fogeda M, Avellón A. Diagnosis of acute hepatitis E by antibody and molecular testing: a study on 277 suspected cases. *J Clin Virol*. 2011;50(1):69-71.
 47. Worm H, Schlauder G, Brandstatter G. Hepatitis E and its emergence in non-endemic areas. *Wien Klin Wochenschr*;114: 663-670. *Wien Klin Wochenschr*. 2002;114:663-670.
 48. Liang H, Su S, Deng S, Gu H, Ji F, Wang L, Liang C, Wang H, Zhang G. The Prevalence of Hepatitis E Virus Infections among Swine, Swine Farmers and the General Population in Guangdong Province, China. *PLoS One*. 2014;9(2):e88106.
doi:10.1371/journal.pone.0088106.
 49. de Carvalho LG, Marchevsky RS, dos Santos DRL, de Oliveira JM, de Paula VS, Lopes LM, Van der Poel WHM, González JE, Munné MS, Moran J, Cajaraville ACRA, Pelajo-Machado M, Cruz OG, Pinto MA. Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. *BMC Infect Dis*. 2013;13:495. doi:10.1186/1471-2334-13-495.
 50. Fainboim H, González J, Fassio E, Martínez A, Otegui L, Eposto M, Cahn P, Marino R, Landeira G, Suaya G, Gancedo E, Castro R, Brajterman L, Laplumé H. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat*. 1999;6(1):53-57.

51. Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK. Hepatitis E virus: the current scenario. *Int J Infect Dis*. 2013;17(4):e228-e233. doi:10.1016/j.ijid.2012.11.026.
52. Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(9):1484-1493. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.05933.x.
53. Song Y-J, Park W-J, Park B-J, Lee J-B, Park S-Y, Song C-S, Lee N-H, Seo K-H, Kang Y-S, Choi I-S. Hepatitis E virus infections in humans and animals. *Clin Exp Vaccine Res*. 2014;3(1):29-36. doi:10.7774/cevr.2014.3.1.29.
54. Bouamra Y, Gérolami R, Arzouni JP, Grimaud JC, Lafforgue P, Nelli M, Tivoli N, Ferretti A, Motte A, Colson P. Emergence of autochthonous infections with hepatitis E virus of genotype 4 in Europe. *Intervirology*. 2013;57(1):43-48. doi:10.1159/000354801.
55. Hsieh SY, Meng XJ, Wu YH, Liu ST, Tam AW, Lin DY, Liaw YF. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*. 1999;37(12):3828-3834.
56. Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol*. 1990;32(1):58-59.
57. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(18):9860-9865.
58. Jiménez de Oya N, de Blas I, Blázquez A-B, Martín-Acebes M a, Halaihel N, Gironés O, Saiz J-C, Escribano-Romero E. Widespread distribution of hepatitis E virus in Spanish pig herds. *BMC Res Notes*. 2011;4(1):412. doi:10.1186/1756-0500-4-412.
59. Krumbholz A, Joel S, Neubert A, Dremsek P, Dürrwald R, Johne R, Hlinak A, Walther M, Lange J, Wutzler P, Sauerbrei A, Ulrich RG, Zell R. Age-related and regional differences in the prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in pigs in Germany. *Vet Microbiol*. 2013;167(3-4):394-402. doi:10.1016/j.vetmic.2013.10.001.
60. Masia G, Orrù G, Liciardi M, Desogus G, Coppola RC, Murru V, Argiolas M. Evidence of hepatitis E virus (HEV) infection in human and pigs in Sardinia, Italy. *J Prev Med Hyg*. 2009;50(4):227-231. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20812518>.
61. Meng X, Wiseman B, Elvinger F, Guenette D, Toth T, Engle R. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol*. 2002;40:117-122.
62. de la Caridad Montalvo Villalba M, Owot JC, Correia B, Corredor MB, Flaquet PP, Frometa SS, Wong MS, Rodríguez Lay L de los Á. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Cuba. *Infect Genet Evol*. 2013;14:335-339. doi:10.1016/j.meegid.2012.12.022.
63. Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Lita T, Tsuda F, Okamoto H. Swine

- hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 2003;84(4):851-862.
64. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1326-1332. doi:10.1128/JCM.40.4.1326.
65. Choi I-S, Kwon H-J, Shin N-R, Yoo HS. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3602-3608. doi:10.1128/JCM.41.8.3602.
66. Cooper K, Huang F, Batista L, Rayo C, Dezanilla J, Toth T, Meng X. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol.* 2005;43:16884-16888.
67. Jiménez de Oya N, Escribano-Romero E, Belén Blázquez A, Carlos Saiz J. El virus de la hepatitis E: implicaciones zoonóticas. *Gastroenterol Hepatol.* 2007;30(7):408-418. doi:10.1157/13108819.
68. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet.* 2003;362(9381):371-373.
69. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, Purcell RH, Emerson SU. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol.* 1998;72(12):9714-9721.
70. Usmanov R, Balaian M, Dvořnikova O, Alymbaeva D, Zamiatina N, Kazachkov I, Belov V. [An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus]. *Vopr Virusol.* 1994;39(4):165-168.
71. Maneerat Y, Clayson E, Myint K, Young G, Innis B. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol.* 1996;49(2):121-128.
72. Hewitt PE, Ijaz S, Brailsford SR, Brett R, Dicks S, Haywood B, Kennedy ITR, Kitchen A, Patel P, Poh J, Russell K, Tettmar KI, Tossell J, Ushiro-Lumb I, Tedder RS. Hepatitis E virus in blood components: A prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet.* 2014;384(9956):1766-1773. doi:10.1016/S0140-6736(14)61034-5.
73. Krain LJ, Atwell JE, Nelson KE, Labrique AB. Fetal and neonatal health consequences of vertically transmitted hepatitis E virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):365-370. doi:10.4269/ajtmh.13-0265.
74. Pavio N, Meng X-J, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res.* 2010;41(6):46. doi:10.1051/vetres/2010018.
75. Krawczynski K, Kamili S, Aggarwal R. Global epidemiology and medical aspects of

- hepatitis E. *Forum (Genova)*. 2001;11:166-179.
76. Peron J, Danjoux M, Kamar N, Missouri R, Poirson H, Vinel J, Mansuy J, Bureau C, Izopet J, Brousset P, Selves J. Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. *Virchows Arch*. 2007;450(4):405-410.
77. Malcolm P, Dalton H, Hussaini H, Mathew J. The histology of acute autochthonous hepatitis E virus infection. *Histopathology*. 2007;51(2):190-194.
78. Vishwanathan R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-1956). A critical study: epidemiology. *Ind J Med Res*. 1957;45:1-29.
79. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata M. Hepatitis E and Pregnancy- Understanding the pathogenesis. *Liver Int*. 2008;28(9):1190-1199. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01840.x.Hepatitis.
80. Ohnishi S, Kang J, Maekubo H, Arakawa T, Karino Y, Toyota J, Takahashi K, Mishiro S. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *Hepatol Res*. 2006;36(4):301-307.
81. Lindemann MLM, Morales JG, Fernández-Barredo S, Rodríguez Domínguez M, García De La Hoz F, Halfon P, Pérez Gracia MT. Case report: Fulminant hepatitis E in a woman taking oral contraceptive medication. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(1):12-15. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0436.
82. Kamar N, Selves J, Mansuy J-M, Ouezzani L, Péron J-M, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel J-P, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2008;358(8):811-817. doi:10.1056/NEJMoa0706992.
83. le Coutre P, Meisel H, Hofmann J, Röcken C, Vuong GL, Neuburger S, Hemmati PG, Dörken B, Arnold R. Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut*. 2009;58(5):699-702. doi:10.1136/gut.2008.165571.
84. Kamar N, Mansuy J-M, Cointault O, Selves J, Abravanel F, Danjoux M, Otal P, Esposito L, Durand D, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E Virus-Related Cirrhosis in Kidney-and Kidney-Pancreas-Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2008;8(8):1744-1748. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02286.x.
85. Galdamez ALG, Mateos-lindemann ML. Patients Infected With HIV Are At High-Risk for Hepatitis E Virus Infection in Spain. 2014;74(August 2013):71-74. doi:10.1002/jmv.
86. Mateos-Lindemann ML, Gonzalez-Galdámez A, Bordallo-Cardona M, Pérez-Gracia MT. Are HIV-infected patients a high-risk population for hepatitis E virus infection in Spain? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(xx):582-583. doi:10.1016/j.eimc.2012.03.010.
87. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia N, Ijaz S, Izopet J, Dalton H. Hepatitis E.

- Lancet*. 2012;379(9835):2477-2488. doi:10.1016/S0140-6736(11)61849-7.
88. Dalton H, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(11):698-709. doi:10.1016/S1473-3099(08)70255-X.
 89. Skidmore S. Overview of hepatitis E virus. *Curr Infect Dis Rep*. 2002;4(2):118-123.
 90. Huang F, Yang C, Zhou X, Yu W, Pan Q. Rhesus macaques persistently infected with hepatitis E shed virus into urine. *J Hepatol*. 2016;64(6):1446-1447. doi:10.1016/j.jhep.2015.12.026.
 91. Aggarwal R. Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(April 1979):72-82. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06540.x.
 92. Dalton H, Bendall R, Rashid M, Ellis V, Ali R, Ramnarace R, Stableforth W, Headdon W, Abbott R, McLaughlin C, Froment E, Hall K, Michell N, Thatcher P, Henley W. Host risk factors and autochthonous hepatitis E infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(12):1200-1205.
 93. Craighead J. *Pathology and Pathogenesis of Human Viral Disease*. San Diego: Academic Press; 2000.
 94. Previsani N, Lavanchy D. *Hepatitis E*.; 2001.
 95. Khuroo MS, Kamili S. Aetiology and prognostic factors in acute liver failure in India. *J Viral Hepat*. 2003;10(3):224-231. doi:10.1046/j.1365-2893.2003.00415.x.
 96. Mushahwar IK. Hepatitis E virus: Molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol*. 2008;80(4):646-658. doi:10.1002/jmv.
 97. Singh S. Mother-to-child transmission of hepatitis E virus infection. *Indian J Pediatr*. 2003;70:37-39.
 98. Begum N, Devi S, Husain S, Ashok K, Kar P. Seroprevalence of subclinical HEV infection in pregnant women from north India: a hospital based study. *Indian J Med Res*. 2009;130(6):709-713.
 99. Khuroo MS, Teli MR, Skidmore S, Sofi MA, Khuroo MI. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med*. 1981;70(2):252-255. doi:10.1016/0002-9343(81)90758-0.
 100. Freshwater DA. Hepatitis E: The forgotten virus. *J R Army Med Corps*. 2013;159(3):167-168. doi:10.1136/jramc-2013-000095.
 101. Organización Mundial de la Salud. *Hepatitis E, Nota Descriptiva N°280*.; 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/es/>.
 102. Mufti A, Reau N. Liver disease in pregnancy. *Clin Liver Dis*. 2012;16(2):247-269.

103. Devhare PB, Chatterjee SN, Arankalle VA, Lole KS. Analysis of Antiviral Response in Human Epithelial Cells Infected with Hepatitis E Virus. *PLoS One*. 2013;8(5). doi:10.1371/journal.pone.0063793.
104. Tripathy AS, Das R, Rathod SB, Arankalle VA. Cytokine profiles, CTL response and T cell frequencies in the peripheral blood of acute patients and individuals recovered from hepatitis E infection. *PLoS One*. 2012;7(2):3-8. doi:10.1371/journal.pone.0031822.
105. Colson P, Kaba M, Moreau J, Brouqui P. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol*. 2009;45(4):269-271.
106. Moal V, Legris T, Motte A, Vacher-Coponat H, Fages L, Jourde-Chiche N, Borentain P, Jaubert D, Gerolami R, Colson P. Systematic serological testing for hepatitis E virus in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2015;33(February):JCM.03624-14. doi:10.1128/JCM.03624-14.
107. Debes JD, Martinez Wassaf M, Pisano MB, Isa MB, Lotto M, Marianelli LG, Frassone N, Ballari E. Increased Hepatitis E Virus Seroprevalence Correlates with Lower CD4 + Cell Counts in HIV-Infected Persons in Argentina. *PLoS One*. 2016;11(7). doi:10.1371/journal.pone.0160082.
108. Fujiwara S, Yokokawa Y, Morino K, Hayasaka K, Kawabata M, Shimizu T. Chronic hepatitis E : a review of the literature. *J Viral Hepat*. 2014;21:78-89. doi:10.1111/jvh.12156.
109. Harrison A, Scobie L, Crossan C, Parry R, Johnston P, Stratton J, Dickinson S, Ellis V, Hunter J, Prescott O, Madden R, Lin N, Henley W, Bendall R, Dalton H. Hepatitis E seroprevalence in recipients of renal transplants or haemodialysis in southwest England: a case-control study. *J Med Virol*. 2013;85(2):266-271.
110. Murali AR, Kotwal V, Chawla S. Chronic hepatitis E: A brief review. *World J Hepatol*. 2015;7(19):2194-2201. doi:10.4254/wjh.v7.i19.2194.
111. Grewal P, Kamili S, Motamed D. Chronic hepatitis E in an immunocompetent patient: A case report. *Hepatology*. 2014;59(1):347-348. doi:10.1002/hep.26636.
112. González Tallón AI, Moreira Vicente V, Mateos Lindemann ML, Achécar Justo LM. Hepatitis crónica E en paciente inmunocompetente. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;34(6):1-5. doi:10.1016/j.gastrohep.2011.02.011.
113. Moal V, Textoris J, Ben Amara A, Mehraj V, Berland Y, Colson P, Mege J. Chronic hepatitis E virus infection is specifically associated with an interferon-related transcriptional program. *J Infect Dis*. 2013;207(1):125-132.
114. Suneetha P, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J, Fytilli P, Gronert A, Bremer B, Markova A, Jaroszewicz J, Bara C, Manns M, Cornberg M, Wedemeyer H. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology*. 2012;55(3):695-708.

115. Kamar N, Garrouste C, Haagsma E, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, Dumortier J, Cannesson A, Cassuto-Viguié E, Thervet E, Conti F, Lebray P, Dalton H, Santella R, Kanaan N, Essig M, Mousson C, Radenne S, Roque-Afonso A, Izope J, Rostaing L. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*. 2011;140(5):1481-1489.
116. Versluis J, Pas S, Agteresch H, de Man R, Maaskant J, Schipper M, Osterhaus A, Cornelissen J, van der Eijk A. Hepatitis E virus: an underestimated opportunistic pathogen in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013;122(6):1079-1086.
117. Baylis SA, Hanschmann KM, Blümel J, Nübling CM. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: An initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol*. 2011;49(4):1234-1239. doi:10.1128/JCM.02578-10.
118. Avellón A, Morago L, García-Galera del Carmen M, Muñoz M, Echevarría JM. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J Med Virol*. 2015;87(11):1934-1939. doi:10.1002/jmv.24251.
119. Wu W, Su C, Yang J, Lin S, Chen J, Wu J. Application of serologic assays for diagnosing acute hepatitis E in national surveillance of a nonendemic area. *J Med Virol*. 2014;86(4):720-728.
120. Legrand-Abravanel F, Thevenet I, Mansuy JM, Saune K, Vischi F, Peron JM, Kamar N, Rostaing L, Izope J. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis e virus infections. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(5):772-774. doi:10.1128/CVI.00438-08.
121. Drobeniuc J, Meng J, Reuter G, Greene-Montfort T, Khudyakova N, Dimitrova Z, Kamili S, Teo C-G. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin Infect Dis*. 2010;51(3):e24-e27. doi:10.1086/654801.
122. Herremans M, Bakker J, Duizer E, Vennema H, Koopmans MPG. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis e virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(5):562-568. doi:10.1128/CVI.00231-06.
123. Fogeda M, de Ory F, Avellón A, Echevarría J. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol*. 2009;45(3):259-261.
124. Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Lhomme S, Miedougé M, Peron J, Alric L, Rostaing L, Kamar N, J I. Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. *J Clin Virol*. 2013;58(4):624-628.
125. Jothikumar N, Cromeans T, Robertson B, Meng X, Hill V. A broadly reactive one-step

- real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*. 2006;131(1):65-71.
126. Pischke S, Suneetha P, Baechlein C, Barg-Hock H, Heim A, Kamar N, Schlue J, Strassburg C, Lehner F, Raupach R, Bremer B, Magerstedt P, Cornberg M, Seehusen F, Baumgaertner W, Klempnauer J, Izopet J, Manns M, Grummer B, Wedemeyer H. Hepatitis E Virus Infection as a Cause of Graft Hepatitis in Liver Transplant Recipients. *Liver Transpl*. 2010;16(1):74-82. doi:10.1002/lt.
127. Kamar N, Izopet J, Tripon S, Bismuth M, Hillaire S, Dumortier J, Radenne S, Coilly A, Garrigue V, D'Alteroche L, Buchler M, Couzi L, Lebray P, Dharancy S, Minello A, Hourmant M, Roque-Afonso A-M, Abravanel F, Pol S, Rostaing L, Mallet V. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1111-1120. doi:10.1056/NEJMoa1215246.
128. Mallet V, Nicand E, Sultanik P, Chakvetadze C, Tessé S, Thervet E, Mouthon L, Sogni P, Pol S. Brief communication: case reports of ribavirin treatment for chronic hepatitis E. *Ann Intern Med*. 2010;153(2):85-89. doi:10.1059/0003-4819-153-2-201007200-00257.
129. Chaillon A, Sirinelli A, De Muret A, Nicand E, d'Alteroche L, Goudeau A. Sustained virologic response with ribavirin in chronic hepatitis E virus infection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(7):841-843. doi:10.1016/j.healun.2011.03.013.
130. Koning L, Pas SD, De Man RA, Balk AHMM, De Knegt RJ, Ten Kate FJ, Osterhaus ADME, Van Der Eijk AA. Clinical implications of chronic hepatitis e virus infection in heart transplant recipients. *J Hear Lung Transplant*. 2013;32(1):78-85. doi:10.1016/j.healun.2012.10.008.
131. Jimenez de Oya N, Escribano-Romero E, Blazquez A-B, Lorenzo M, Martin-Acebes MA, Blasco R, Saiz J-C. Characterization of Hepatitis E Virus Recombinant ORF2 Proteins Expressed by Vaccinia Viruses. *J Virol*. 2012;86(15):7880-7886.
132. Kamili S, Spelbring J, Carson D, Krawczynski K. Protective efficacy of hepatitis E virus DNA vaccine administered by gene gun in the cynomolgus macaque model of infection. *J Infect Dis*. 2004;189(2):258-264.
133. Li S, Zhang J, Li Y, Ou S, Huang G, He Z, Ge S, Xian Y, Pang S, Ng M, Xia N. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine*. 2005;23:2893-2901.
134. Wu T, Li S, Zhang J, Ng M, Xia N, Zhao Q. Hepatitis E vaccine development: a 14 year odyssey. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8:823-827.
135. Zhu F, Zhang J, Zhang X, Zhou C, Wang Z, Huang S, Wang H, Yang C, Jiang H, Cai J, Wang Y, Ai X, Hu Y, Tang Q, Yao X, Yan Q, Xian Y, Wu T, Li Y, Miao J, Ng M, Shih J, Xia N. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-

- scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:895-902.
136. Zhang J, Shih J, Wu T, Li S, Xia N. Development of the hepatitis E vaccine: from bench to field. *Semin Liver Dis*. 2013;33:78-88.
137. Park SB. Hepatitis E vaccine debuts. *Nature*. 2012;491(7422):21-22.
doi:10.1038/491021a.
138. Li SW, Zhao Q, Wu T, Chen S, Zhang J, Xia NS. The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239. *Hum Vaccines Immunother*. 2015;11(4):908-914.
doi:10.1080/21645515.2015.1008870.
139. Zhang J, Zhang X-F, Huang S-J, Wu T, Hu Y-M, Wang Z-Z, Wang H, Jiang H-M, Wang Y-J, Yan Q, Guo M, Liu X-H, Li J-X, Yang C-L, Tang Q, Jiang R-J, Pan H-R, Li Y-M, Shih JW-K, Ng M-H, Zhu F-C, Xia N-S. Long-Term Efficacy of a Hepatitis E Vaccine. *N Engl J Med*. 2015;372(10):914-922. doi:10.1056/NEJMoa1406011.
140. Quintana-González A. Virus de la hepatitis E . *Rev Biomed*. 2003;14(3):165-189.
141. INDEC IN de E y C. *Censo Nacional de Población, Hogares Y Viviendas*.; 2010.
142. Ministerio del Interior Obras Públicas y Vivienda/Presidencia de la Nación Argentina. Instituto Nacional del Agua. Centro de la Región Semiárida (CIRSA). 2016.
<http://www.ina.gov.ar/cirsa/index.php>.
143. Barril P, Martínez L, Masachessi G, Nates S, Paván J, Re V, Aguirre B, Diaz Panero M, Ferreyra L, Giordano M, Grumelli Y, Isa M, Martínez Wassaf M, Mateos C, Pisano M, Prez V, Welter A. El pizarrón del Agua. 2015. <http://elpizarrondelagua.blogspot.com.ar/>.
144. Nadal F, Brandalise V, Rodríguez MI, Larrosa N, Ruiz M, Halac S, Olivera P. Evaluación de la calidad de agua para uso recreativo del embalse San Roque, Córdoba, Argentina. In: *IV Congreso de Internacional Sobre Gestión Y Tratamiento Integral Del Agua*.; 2012:12.
145. Pavan J, Masachessi G, Mateos C, Barril P, Prez V, Martínez L, Giordano M, Ferreyra L, Isa M, Welter A, Martínez Wassaf M, Ré V, Nates S. Towards the selection of the best discriminating parameters of microbiological water quality : a case study of an urban recreational water resource involving a dam complex in Córdoba , Argentina. In: *Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms*.; 2016:140-144.
146. Mueller J, Bessaud M, Huang Q, Martinez L, Barril P, Morel V, Balanant J, Bocacao J, Hewitt J, Gessner B, Delpeyroux F, Nates S. Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Córdoba Province, Argentina. *Appl Env Microbiol*. 2009;75(5):1395-2401.
147. Wang Y, Ling R, Erker JC, Zhang H, Li H, Desai S, Mushahwar IK, Harrison TJ. A

- divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 1):169-177. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9934699>.
148. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121.
 149. Health and Ecological Criteria Division - Office of Science and Technology - United States. *Recreational Water Quality Criteria.*; 2012.
 150. APHA, AWWA, WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition.*; 1999.
 151. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2015. 2015:300. <http://www.infostat.com.ar>.
 152. Microsoft-Corporation. Microsoft Excel Professional Plus 2013. 2012.
 153. Martínez Wassaf MG, Pisano MB, Barril PA, Elbarcha OC, Pinto MA, Mendes de Oliveira J, Digiusto P, Nates S V, Ré VE. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina : Environmental and serological survey. *J Clin Virol.* 2014;61(3):334-339.
 154. Aballay LR, Osella AR, Celi A, Díaz M del P. Overweight and obesity: Prevalence and their association with some social characteristics in a random sample population-based study in Córdoba city, Argentina. *Obes Res Clin Pract.* 2009;3(2):75-83. doi:10.1016/j.orcp.2009.01.001.
 155. Isa M, Pavan J, Sicilia Don P, Grutadauria S, Martinez L, Giordano M, Masachessi G, Barril P, Nates S. Persistence of measles neutralizing antibody related to vaccine and natural infection acquired before HIV infection. *Epidemiol Infect.* 2014;142(8):1708-1712. doi:10.1017/S0950268813002628.
 156. Inc. S. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. 2008. <http://www.ibm.com/analytics/us/en/technology/spss/>.
 157. Harvala H, Wong V, Simmonds P, Johannessen I, Ramalingam S. Acute viral hepatitis - Should the current screening strategy be modified? *J Clin Virol.* 2014;59(3):184-187. doi:10.1016/j.jcv.2014.01.001.
 158. Smith DB, Purdy M a, Simmonds P. Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol.* 2013;87(8):4161-4169. doi:10.1128/JVI.02762-12.
 159. dos Santos DRL, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol.* 2011;149(1-2):236-241. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.024.
 160. Mirazo S, Ramos N, Russi JC, Arbiza J. Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res.* 2013;173(2):364-370.

- doi:10.1016/j.virusres.2013.01.005.
161. Smith DB, Paddy JO, Simmonds P. The Use of Human Sewage Screening for Community Surveillance of Hepatitis E Virus in the UK. *J Med Virol.* 2016;88:915-918. doi:10.1002/jmv.
 162. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardí R, Martín M, Bofill-Mas S, Girones R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(4):448-454. doi:10.3201/eid0904.020351.
 163. Clemente-Casares P, Rodríguez-Manzano J, Girones R. Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain. *J Water Heal.* 2009;7(4):664-673.
 164. Myrmet M, Lange H, Rimstad E. A 1-year quantitative survey of Noro-, Adeno-, Human Boca-, and hepatitis E viruses in raw and secondarily treated sewage from two plants in Norway. *Food Env Virol.* 2015;7(3):213-223. doi:10.1007/s12560-015-9200-x.
 165. Pas SD, Streefkerk RHRA, Pronk M, de Man RA, Beersma MF, Osterhaus ADME, Van der Eijk AA. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *J Clin Virol.* 2013;58(4):629-634. doi:10.1016/j.jcv.2013.10.010.
 166. Kokkinos P, Ziros P, Meri D, Filippidou S, Kolla S, Galanis A, Vantarakis A. Environmental surveillance. An additional/alternative approach for virological surveillance in Greece? *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(6):1914-1922. doi:10.3390/ijerph8061914.
 167. Prado T, Silva DM, Guilayn WC, Rose TL, Gaspar AMC, Miagostovich MP. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res.* 2011;45(3):1287-1297. doi:10.1016/j.watres.2010.10.012.
 168. Barril P, Giordano M, Isa M, Masachessi G, Ferreyra L, Castello A, Glikmann G, Nates S. Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *J Med Virol.* 2010;82(7):1277-1281. doi:10.1002.
 169. Blanco Fernández MD, Torres C, Martínez LC, Giordano MO, Masachessi G, Barril PA, Isa MB, Campos RH, Nates S V., Mbayed VA. Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Córdoba City, Argentina. *Infect Genet Evol.* 2011;11(7):1631-1637. doi:10.1016/j.meegid.2011.06.005.
 170. Blanco Fernández MD, Torres C, Riviello-López G, Poma HR, Rajal VB, Nates S, Cisterna DM, Campos RH, Mbayed V. Analysis of the circulation of hepatitis A virus in Argentina since vaccine introduction. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(12):1-4.
 171. Prez V, Gil P, Temprana C, Cuadrado P, Martínez L, Giordano M, Masachessi G, Isa M,

- Ré V, Paván J, Nates S, Barril P. Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina. *Sci Total Environ.* 2015;538:220-229.
172. Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res.* 2011;161(1):3-14. doi:10.1016/j.virusres.2011.02.007.
173. Secretaría de Recursos Hídricos / Ministerio de Agua Ambiente y Servicios Públicos / Provincia de Córdoba. *Decreto 847/16: REGLAMENTACIÓN DE ESTÁNDARES Y NORMAS SOBRE VERTIDOS PARA LA PRESERVACIÓN DEL RECURSO HÍDRICO PROVINCIAL.*; 2016:132.
174. Vivek R, Zachariah U, Ramachandran J, Eapen C, Rajan D, Kang G. Characterization of hepatitis E virus from sporadic hepatitis cases and sewage samples from Vellore, south India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(6):363-367.
175. Masclaux F, Hotz P, Friedli D, Savova-Bianchi D, Oppliger A. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Res.* 2013;47(14):5101-5109. doi:10.1016/j.watres.2013.05.050.
176. Hazam R, Singla R, Kishore J, Singh S, Gupta R, Kar P. Surveillance of hepatitis E virus in sewage and drinking water in a resettlement colony of Delhi: what has been the experience? *Arch Virol.* 2010;155(8):1227-1233. doi:10.1007/s00705-010-0707-z.
177. Béji-Hamza A, Hassine-Zaafraane M, Khélifi-Gharbi H, Della Libera S, Iaconelli M, Muscillo M, Petricca S, Ciccaglione AR, Bruni R, Taffon S, Aouni M, La Rosa G. Hepatitis E virus genotypes 1 and 3 in wastewater samples in Tunisia. *Arch Virol.* 2015;160(1):183-189. doi:10.1007/s00705-014-2251-8.
178. Idolo A, Serio F, Lugoli F, Grassi T, Bagordo F, Guido M, Privitera G, Lobreglio G, De Donno A. Identification of HEV in symptom-free migrants and environmental samples in Italy. *J Viral Hepat.* 2013;20(6):438-443. doi:10.1111/jvh.12038.
179. Miura T, Lhomme S, Le Saux J-C, Le Mehaute P, Guillois Y, Couturier E, Izopet J, Abranavel F, Le Guyader FS. Detection of Hepatitis E Virus in Sewage After an Outbreak on a French Island. *Food Environ Virol.* 2016:1-6. doi:10.1007/s12560-016-9241-9.
180. Dell'Amico M. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Humans and Swine, Bolivia. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(8):2-4. doi:10.3201/eid1708.100769.
181. Vitral CL, Pinto M a, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, Santos DR Dos, Gaspar AMC. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(2):117-122. doi:10.1590/S0074-02762005000200003.
182. Guimarães FR, Saddi TM, Vitral CL, Pinto MA, Gaspar AMC, Souto FJD. Hepatitis E

- virus antibodies in swine herds of Mato Grosso State, central Brazil. 2005:223-226.
183. De Souza AJS, Gomes-Gouvêa MS, Soares MDCP, Pinho JRR, Malheiros AP, Carneiro LA, Dos Santos DRL, Pereira WLA. HEV infection in swine from Eastern Brazilian Amazon: Evidence of co-infection by different subtypes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2012;35(5):477-485. doi:10.1016/j.cimid.2012.04.004.
 184. V HI, G SR, Reinhardt V, a MC. en Chile ? 2007:997-1001.
 185. Fierro NA, Realpe M, Meraz-Medina T, Roman S, Panduro A. Hepatitis E virus: An ancient hidden enemy in Latin America. *World J Gastroenterol*. 2016;22(7):2271-2283. doi:10.3748/wjg.v22.i7.2271.
 186. dos Santos DRL, Vitral CL, de Paula VS, Marchevsky RS, Lopes JF, Gaspar AMC, Saddi TM, J??nior NC de M, Guimar??es F de R, J??nior JGC, Ximenes LLL, Souto FJD, Pinto MA. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J*. 2009;182(3):474-480. doi:10.1016/j.tvjl.2008.08.001.
 187. Takahashi M, Nishizawa T, Tanaka T, Tsatsralt-Od B, Inoue J, Okamoto H. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J Gen Virol*. 2005;86(6):1807-1813. doi:10.1099/vir.0.80909-0.
 188. Rutjes S, Lodder W, Bouwknecht M, de Roda Husman A. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J Virol Methods*. 2007;143(1):112-116.
 189. Leblanc D, Ward P, Gagné M, Poitras E, Müller P, Trottier Y, Simard C, Houde A. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int J Food Microbiol*. 2007;117(2):160-166.
 190. Fernández-Barredo S, Galiana C, García A, Vega S, Gómez MT, Pérez-Gracia MT. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*. 2006;18(5):462-465.
 191. McCreary C, Martelli F, Grierson S, Ostanello F, Nevel A, Banks M. Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Vet Rec*. 2008;163(9):261-265. doi:10.1136/vr.163.9.261.
 192. Bouwknecht M, Frankena K, Rutjes SA, Wellenberg GJ, De Roda Husman AM, Van Der Poel WH, De Jong MC. Original article Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res*. 2008;39(40). doi:10.1051/vetres.
 193. Van Der Poel WH. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Curr Opin Virol*. 2014;4:91-96. doi:10.1016/j.coviro.2014.01.006.
 194. Andraud M, Dumarest M, Cariolet R, Aylaj B, Barnaud E, Eono F, Pavio N, Rose N.

- Direct contact and environmental contaminations are responsible for HEV transmission in pigs. *Vet Res.* 2013;44(1):102. doi:10.1186/1297-9716-44-102.
195. Bouwknecht M, Rutjes SA, Reusken CBEM, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong MCM, de Roda Husman AM, Poel WHM Van Der. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res.* 2009;5:7-19. doi:10.1186/1746-6148-5-7.
196. Takahashi M, Okamoto H. Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatol Res.* 2014;44(1):43-58. doi:10.1111/hepr.12175.
197. Crossan C, Baker PJ, Craft J, Takeuchi Y, Dalton HR, Scobie L. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Shellfish, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(12):2085-2087. doi:10.3201/eid1812.120924.
198. Donia D, Dell'Amico M, Petrinca A, Martinucci I, Mazzei M, Tolari F, Divizia M. Presence of hepatitis E RNA in mussels used as bio-monitors of viral marine pollution. *J Virol Methods.* 2012;186(1-2):198-202.
199. Namsai A, Louisirirothanakul S, Wongchinda N, Siripanyaphinyo U, Virulhakul P, Puthavathana P, Myint KS, Gannarong M, Ittpong R. Surveillance of hepatitis A and E viruses contamination in shellfish in Thailand. *Lett Appl Microbiol.* 2011;53(6):608-613. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03152.x.
200. Bouwknecht M, Lodder-Verschoor F, van der Poel WHM, Rutjes SA, de Roda Husman AM, de Roda Husman AM. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot.* 2007;12(12):2889-2895. <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2007/00000070/00000012/art00030>.
201. Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery in the USA. *J Gen Virol.* 2007;88(3):912-917. doi:10.1099/vir.0.82613-0.
202. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis.* 2010;202(6):825-834. doi:10.1086/655898.
203. Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, Ostanello F, Bouwknecht M, Rodríguez-Lázaro D, Pavlik I, Ruggeri FM. Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1282-1289. doi:10.3201/eid1808.111783.
204. Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Lhomme S, Mansuy JM, Muscari F, Sallusto F, Rostaing L, Izopet J. Hepatitis E virus infection without reactivation in solid-organ transplant recipients, France. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(1):30-37. doi:10.3201/eid1701.100527.
205. Purcell RH, Emerson SU. Hidden Danger: The Raw Facts about Hepatitis E Virus

- Robert. *J Infect Dis.* 2010;202(6):819-821. doi:10.1086/655900.Hidden.
206. Miyashita K, Kang J, Saga A, Takahashi K, Shimamura T, Yasumoto A, Fukushima H, Sogabe S, Konishi K, Uchida T, Fujinaga A, Matsui T, Sakurai Y, Tsuji K, Maguchi H, Taniguchi M, Abe N, Fazle Akbar S, Arai M, Mishiro S. Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. *Hepatol Res.* 2012;42(9):870-878.
207. Wichmann O, Schimanski S, Koch J, Kohler M, Rothe C, Plentz A, Jilg W, Stark K. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis.* 2008;198(12):1732-1741. doi:10.1086/593211.
208. Berto A, Grierson S, Hakze-van der Honing R, Martelli F, Johne R, Reetz J, Ulrich RG, Pavio N, Poel WHM Van Der, Banks M. HEV in Pork Liver sausages, France. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(2):3-5. doi:10.3201/eid1902.121255.
209. Carrilho FJ, Clemente CM, Silva LC. Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. *Gastroenterol Hepatol.* 2005;28(3):118-125.
210. Montalvo Villalba MC, Guan M, Pérez A, Corredor MB, Frometa SS, Moreno AG, Hu WP, Howard T, Lay L a R, Anderson D. Seroprevalence of antibodies to hepatitis E virus in two large communities in Havana, Cuba. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(12):772-776. doi:10.1016/j.trstmh.2010.08.006.
211. Martins RMB, Freitas NR, Kozłowski a., Reis NRS, Lopes CLR, Teles S a., Gardinali NR, Pinto M a. Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a population of recyclable waste pickers in Brazil. *J Clin Virol.* 2014;59(3):188-191. doi:10.1016/j.jcv.2014.01.002.
212. Rapicetta M, Monarca R, Kondili LA, Chionne P, Madonna E, Madeddu G, Soddu A, Candido A, Carbonara S, Mura MS, Starnini G, Babudieri S. Hepatitis E virus and hepatitis A virus exposures in an apparently healthy high-risk population in Italy. *Infection.* 2013;41(1):69-76.
213. Martínez Campos J, Pérez A, Montalvo Villalba M, Rodríguez L, Gutiérrez A, Moreno A et al. Serological prevalence and risk factors associated to hepatitis C in the municipalities of Playa and Marianao. *Rev Panam Infectol.* 2005;7:8-14.
214. Atabek M, Fýndýk D, Gulyuz A, Erkul I. Prevalence of anti-HAV and anti-HEV antibodies in Konya, Turkey. *Health Policy (New York).* 2004;67(3):265-269.
215. Yanez L a., Lucero NS, Barril P a., D??az MDP, Tenaglia MM, Spinsanti LI, Nates S V., Isa MB, R?? VE. Evidence of Hepatitis A virus circulation in central Argentina: Seroprevalence and environmental surveillance. *J Clin Virol.* 2014;59(1):38-43. doi:10.1016/j.jcv.2013.11.005.
216. Lewis HC, Wichmann O, Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol*

- Infect.* 2010;138(2):145-166. doi:10.1017/S0950268809990847.
217. Pineda J, Cifuentes C, Parra M, Merchante N, Pérez-Navarro E, Rivero-Juárez A, Monje P, Rivero A, Macías J, Real L. Incidence and natural history of hepatitis E virus coinfection among HIV-infected patients. *AIDS.* 2014;28(13):1931-1937. doi:10.1097/QAD.0000000000000378.
218. Kuniholm M, Ong E, Hogema B, Koppelman M, Anastos K, Peters M, Seaberg E, Chen Y, Nelson K, Linnen J. Acute and Chronic Hepatitis E Virus Infection in Human Immunodeficiency Virus-Infected U.S. Women. *Hepatology.* 2016;63(3):712-720.
219. Debes JD, Pisano MB, Lotto M, Re V. Hepatitis E virus infection in the HIV-positive patient. *J Clin Virol.* 2016;80:102-106. doi:10.1016/j.jcv.2016.05.006.
220. Kenfak-Foguena A, Schöni-Affolter F, Bürgisser P, Witteck A, Darling KEA, Kovari H, Kaiser L, Evison J-M, Elzi L, Gurter-De La Fuente V, Jost J, Moradpour D, Abravanel F, Izpopet J, Cavassini M. Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(6):1074-1078. doi:10.3201/eid1706.101067.
221. Colson P, Dhiver C, Gérolami R. Hepatitis E virus as a newly identified cause of acute viral hepatitis during human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(12):1176-1180. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02102.x.
222. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med.* 2009;361(10):1025-1027. doi:10.1056/NEJMc0903778.
223. Curry J, Adams N, Crum-Cianflone NF. Acute Hepatitis E Virus (HEV) Infection in an HIV-Infected Person in the U.S. *Ann Intern Med.* 2009;150(3):226-227. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
224. Renou C, Lafeuillade A, Cadranel J, Pavio N, Pariente A, Allègre T, Poggi C, Pénaranda G, Cordier F, Nicand E, ANGH. Hepatitis E virus in HIV-infected patients. *AIDS.* 2010;24(10):1493-1499.
225. Thoden J, Venhoff N, Miehle N, Klar M, Huzly D, Panther E, Jilg N, Kunz M, Warnatz K. Hepatitis E and jaundice in an HIV-positive pregnant woman. *Aids.* 2008;22(7):905-912. doi:10.1097/01.aids.0000111467.61782.bf.
226. Scotto G, Aucella F, Grandaliano G, Martinelli D, Querques M, Gesuete A, Infante B, Carri PD, Massa S, Salatino G, Bulla F, Fazio V, Irccs U, Sollievo C, Giovanni S, Querques M, Carri PD, Salatino G. Hepatitis E in hemodialysis and kidney transplant patients in south-east Italy. *World J Gastroenterol.* 2015;21(11):3266-3273. doi:10.3748/wjg.v21.i11.3266.
227. Khameneh ZR, Sepehrvand N, Masudi S. Seroprevalence of hepatitis E among iranian renal transplant recipients. *Hepat Mon.* 2011;11(8):646-651.

- doi:10.5812/kowsar.1735143X.690.
228. Hoerning A, Hegen B, Wingen A-M, Cetiner M, Lainka E, Kathemann S, Fiedler M, Timm J, Wenzel JJ, Hoyer PF, Gerner P. Prevalence of hepatitis E virus infection in pediatric solid organ transplant recipients--a single-center experience. *Pediatr Transplant*. 2012;16(7):742-747. doi:10.1111/j.1399-3046.2012.01740.x.
229. Gérolami R, Moal V, Colson P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med*. 2008;358(8):859-860. doi:10.1056/NEJMc0708687.
230. Gérolami R, Moal V, Picard C, Colson P. Hepatitis E virus as an emerging cause of chronic liver disease in organ transplant recipients. *J Hepatol*. 2009;50(3):622-624. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.008.
231. Haagsma E, Niesters H, van den Berg A, Riezebos-Brilman A, Porte R, Vennema H, Reimerink J, Koopmans M. Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Liver Transplant Recipients. *Liver Transplant*. 2009;15:1225-1228. doi:10.1002/lt.21819.
232. Junge N, Pischke S, Baumann U, Goldschmidt I, Manns M, Wedemeyer H, Pfister ED. Results of single-center screening for chronic hepatitis e in children after liver transplantation and report on successful treatment with ribavirin. *Pediatr Transplant*. 2013;17(4):343-347. doi:10.1111/ptr.12077.
233. Riezebos-Brilman A, Puchhammer-Stöckl E, van der Weide H, Haagsma E, Jaksch P, Bejvl I, Niesters H, Verschuuren E. Chronic hepatitis E infection in lung transplant recipients. *J Hear Lung Transplant*. 2013;32(3):341-346. doi:10.1016/j.healun.2012.11.027.
234. Naik A, Gupta N, Goel D, Ippagunta SK, Sharma RK, Aggarwal R. Lack of evidence of hepatitis e virus infection among renal transplant recipients in a disease-endemic area. *J Viral Hepat*. 2013;20(4):138-140. doi:10.1111/jvh.12027.
235. Taremi M, Khoshbaten M, Gachkar L, EhsaniArdakani M, Zali M. Hepatitis E virus infection in hemodialysis patients: a seroepidemiological survey in Iran. *BMC Infect Dis*. 2005;5:36. doi:10.1186/1471-2334-5-36.
236. Beladi Mousavi SS, Motemednia F, Beladi Mousavi M. Epidemiology of hepatitis E virus infection in patients on chronic hemodialysis. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7(5):5-8. doi:10.5812/jjm.6993.
237. Mobaien A, Mohammadi R, Sorouri R, Sadeghi K. Hepatitis E virus seroprevalence in haemodialysis patients in Zanjan Province, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Heal J*. 2013;19(7):608-612.
238. Uçar E, Cetin M, Kuvandik C, Helvaci M, Güllü M, Hüzmeli C. Hepatitis E virus seropositivity in hemodialysis patients in Hatay province, Turkey. *Mikrobiyol Bul*. 2009;43(2):299-302.

-
239. Yugo DM, Meng X-J. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(10):4507-4533. doi:10.3390/ijerph10104507.
240. Cui W, Sun Y, Xu A, Gao R, Gong L, Zhang L, Jiang M. Hepatitis E seroprevalence and related risk factors among seafood processing workers: a cross-sectional survey in Shandong Province, China. *Int J Infect Dis*. 2016;49:62-66. doi:10.1016/j.ijid.2016.05.028.

ANEXOS



First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey



Maribel G. Martínez Wassaf^{a,b,*}, María B. Pisano^{a,c}, Patricia A. Barril^c,
Oswaldo C. Elbarcha^{a,b}, Marcelo A. Pinto^d, Jaqueline Mendes de Oliveira^d,
Pablo DiGiusto^c, Silvia V. Nates^c, Viviana E. Ré^{a,c}

^a Department of Virology, School of Chemical Sciences, Catholic University of Córdoba, Argentina

^b Department of Virology and Molecular Biology, LACE Laboratories, Córdoba, Argentina

^c Virology Institute "Dr. J.M. Vanella", School of Medical Sciences, National University of Córdoba, Argentina

^d Laboratory of Technological Development in Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2014

Received in revised form 12 August 2014

Accepted 19 August 2014

Keywords:

Hepatitis E virus
Environmental surveillance
Seroprevalence
Argentina
Molecular epidemiology
Subtyping

ABSTRACT

Background: The hepatitis E virus (HEV) is an emergent causative agent of acute hepatitis worldwide, transmitted by fecal–oral route. In Argentina it is considered rare, so differential laboratory testing is not routinely performed. Besides, in Argentina's central area epidemiological and molecular characteristics of HEV are still unknown.

Objectives: Provide evidence of local circulation of HEV by molecular detection on environmental samples and by serological survey in healthy adult population of Córdoba city, Argentina.

Study design: Environmental surveillance was conducted in river and sewage samples collected between 2007 and 2009–2011. Viral detection was performed by RT-Nested PCR of ORF-1 and ORF-2 partial regions. Anti-HEV IgG was determined by EIA in 433 serum samples collected between 2009 and 2010.

Results: HEV was detected in 6.3% of raw sewage samples and in 3.2% of riverine samples. Nucleotide sequencing analyses revealed that all isolates belonged to genotype 3, subtypes a, b and c. The prevalence of IgG anti-HEV was 4.4%. Seroprevalence increased with the age of the individuals (OR: 3.50; 95% CI 1.39–8.87; $p = 0.0065$) and, although the prevalence was higher in low income population, no statistical relation was found between anti-HEV and socioeconomic level.

Conclusions: The environmental findings added to serological results, demonstrate that HEV circulates in central Argentina. Contamination of water with HEV could represent a route of transmission for local populations, which have a high number of susceptible individuals. This fact alerts local health care systems in order to include detection of HEV in the diagnostic algorithm of viral hepatitis.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: HEV, hepatitis E virus; RNA, ribonucleic acid; Nested RT-PCR, reverse transcription reaction followed by a nested polymerase chain; ORF, open reading frame; IgG, immunoglobulin G; anti-HEV IgG, anti-HEV IgG antibodies; EIA, enzyme immunoassay; hIgG, human immunoglobulin G; CO, cut-off; S, sample; HAV, hepatitis A virus.

* Corresponding author at: Department of Virology, School of Chemical Sciences, Catholic University of Córdoba, Avenida Armada Argentina 3555, Córdoba X5016DHK, Argentina. Tel.: +54 93512272626; fax: +54 3514218013.

E-mail addresses: maribel.martinez@laboratoriolace.com.ar (M.G. Martínez Wassaf), mbelenpisano@gmail.com (M.B. Pisano), patricia.barril@fcm.unc.edu.ar (P.A. Barril), oswaldo@laboratoriolace.com.ar (O.C. Elbarcha), marcelop@ioc.fiocruz.br (M.A. Pinto), jackie@ioc.fiocruz.br (J. Mendes de Oliveira), pablodigiusto91@gmail.com (P. DiGiusto), snates@fcm.unc.edu.ar (S.V. Nates), vivianare@fcm.unc.edu.ar (V.E. Ré).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.016>

1386-6532/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

The hepatitis E virus (HEV) (Hepevirus, *Hepeviridae*) is the causative agent of human acute hepatitis E with a worldwide distribution [1,2], responsible for both sporadic cases and large hepatitis epidemics in developing countries [3,4]. It is a single strand, positive sense, RNA non-enveloped virus which is classified into 4 genotypes of mammalian HEV [5]. HEV is mostly transmitted by fecal–oral routes following ingestion of contaminated water or consumption of fruits and vegetables that have been washed with contaminated water [6]. Two epidemiological patterns are observed for HEV infection. In areas of high endemicity, hepatitis E is mainly caused by genotypes 1 (Gnt-1) and 2 (Gnt-2), and primarily transmitted via the fecal–oral route. The second epidemiological pattern occurs worldwide, and consists of sporadic cases of

hepatitis E of zoonotic and/or foodborne transmission, mainly from pigs, caused by genotypes 3 (Gnt-3) and 4 (Gnt-4) [1].

With the exception of Venezuela – where outbreaks of HEV Gnt-1 have been reported, no epidemics of hepatitis E have been documented in South America yet [7]. Sporadic cases E have been documented in Argentina (Metropolitan region), Brazil, Venezuela, Peru, Chile and Uruguay [7] by IgM detection and/or RNA amplification. Until recently, Gnt-3 was the only genotype of HEV detected in autochthonous cases [8–10]. But recent studies placed Gnt-1 as the responsible of an autochthonous case of hepatitis in Uruguay [11], showing more than one genotype circulating in Latin America. Gnt-3 has also been detected in swine and effluent samples from farms and slaughterhouses from Brazil [8,12].

Argentina is considered a low endemic country for hepatitis E [7]. However, seroprevalence data reported are scarce. Previous studies performed ten years ago in the metropolitan region of Buenos Aires showed seroprevalence rates of 0.15% in pediatric population [13], 1.8% in blood donors and 6.6% in HIV infected individuals [14]. Furthermore, human clinical cases of hepatitis E have been diagnosed in the same area [10,15–17]. HEV has also been detected in pigs of commercial farms in many provinces [18]. However, there are no studies on environmental monitoring or serological surveys involving healthy adult population in our country. The lack of epidemiological information is, in part, due to the absence of commercial kits for detection of IgG and IgM anti-HEV until the middle of 2013, when the National Administration of Medicine, Food and Technology (ANMAT) of Argentina approved their use in our country.

Environmental surveillance using molecular technology is an additional tool to determine the epidemiology of different viruses circulating in a given community [19,20]. Previous studies in our area have shown a correlation between virus detected in sewage and clinical cases [18], showing that this type of study is very useful for virus monitoring.

Herein, we present the data from the first study of environmental surveillance and serological survey of HEV in Córdoba, Argentina.

2. Objectives

The aim of this study was to provide evidence of HEV circulation in central region of Argentina. For that, molecular detection of HEV was performed on environmental samples, as well as detection of IgG-anti HEV in healthy adult population of Córdoba city.

3. Study design

3.1. Environmental samples collection

Wastewater samples ($n=48$) were monthly collected in the years 2007, 2009, 2010 and 2011 from the main pipe that enters the treatment plant which receives sewage discharges from about 61% of the population of Córdoba city (1,330,023 inhabitants, census 2010). Samples of the Suquía River ($n=31$) were collected seasonally during 2010 in eight sampling points that cover the whole of its course across Córdoba city. During spring, point 7 could not be sampled (Fig. 1).

For each sample, 1500 mL of water were collected in sterile plastic bottles, stored at 4 °C and transported to the laboratory for immediate analysis.

3.2. Sample concentration, viral extraction and reverse transcription

Samples were concentrated 100× by centrifugation and polyethyleneglycol precipitation (10). RNA was extracted from 140 µL of concentrated samples using a QIAamp® Viral RNA Kit (Qiagen GmbH, Germany). Then, reverse transcription was performed adding 10 µL of extracted RNA to 10 µL of mix containing: 1 µL Reverse Transcriptase (ImPromII – Reverse Transcriptase – Promega, Madison WI, USA), 0.5 µL RNase Out (RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor, 40 U/µL – Invitrogen, CA, USA), 4 µL buffer 5× (ImPromII – Reverse Transcriptase – Promega, Madison WI, USA), 2.4 µL MgCl₂ 25 mM, 1 µL random primers (10 pmol/µL) (Promega, Madison WI, USA), 1 µL dNTPs 10 mM and 0.1 µL free RNase water (final volume of 20 µL).

3.3. PCR, Nested-PCR and molecular analyses

During this study, two Nested-PCR assays were performed, targeting ORF 1 and ORF 2 regions, following protocols previously described [21,22]. Amplification of ORF 2 was utilized as screening, and positive specimens were processed for ORF 1 detection.

Specific PCR products of 418 bp and 348 bp respectively were sequenced directly in both directions by Macrogen automatic sequencing service, Korea. Phylogenetic analyses were performed using MEGA software v5.0 [23]. Phylogenetic trees were constructed with neighbor-joining method and Kimura two-parameter as model of nucleotide substitution. Bootstrap values were determined with 2000 resamplings of the datasets. A consensus tree was generated and bootstrap values greater than 50% provide significant evidence for phylogenetic grouping.

3.4. Nucleotide sequence accession numbers

Nucleotide sequences analyzed in this work were deposited at GenBank under accession numbers KF751218–KF751221 for ORF 2 genomic region and KF765479 for ORF 1 genomic region (see Table 1).

3.5. Serum samples

A retrospective study was carried out with 433 serum samples from individuals who attended health care centers of Córdoba city during September 2009 and September 2010. The enrolled individuals were classified into three groups according to age (range 18–78 years old: younger than 30 years old, 31–45 years old and older than 46 years old) and two groups according to socioeconomic level (low-income population and middle/high-income populations) following a classification provided by the Municipality of Córdoba, which is based on the economic, social and educational level of each person [24]. The location of collected samples is shown in Fig. 1.

3.6. Serological test

A third generation enzyme immunoassay (EIA) for the determination of IgG specific antibodies against HEV (Diapro, Milan, Italy) was used. EIA microplates were coated with HEV-specific synthetic antigens encoding for conservative and immunodominant determinants derived from ORF2 and ORF3 of all genotypes. This EIA was performed strictly following the manufacturer's instructions. Test results were interpreted as ratio of the sample (S) and the cut-off (CO) (S/CO). Samples with ratio below 0.9 were considered negative, between 0.9 and 1.1 as equivocal result and above 1.1 were considered positive results.

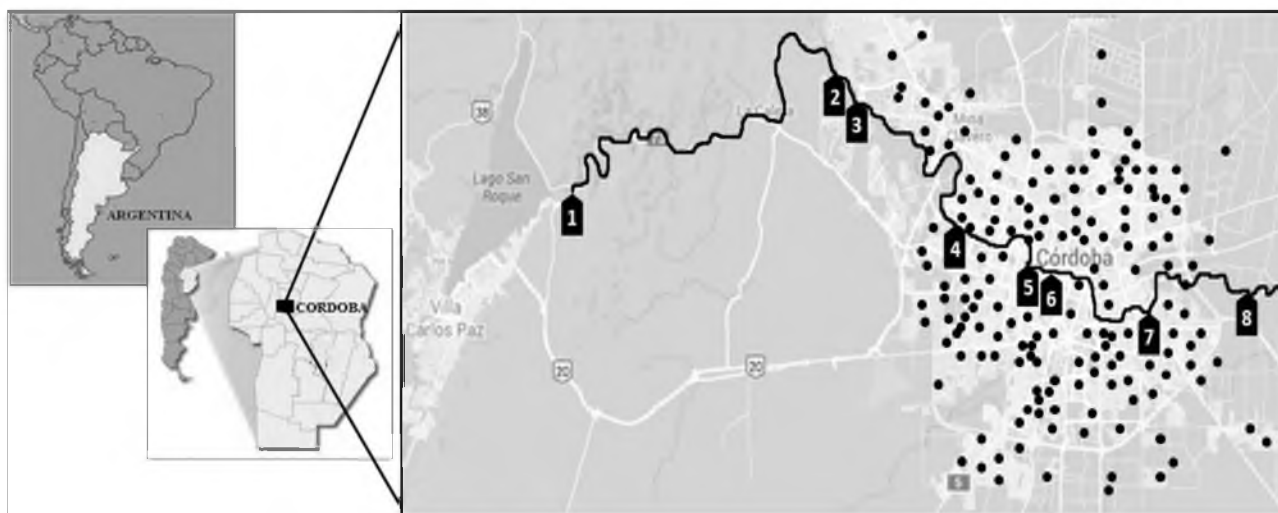


Fig. 1. Map showing the location of the city of Córdoba ($31^{\circ}23'51''$ S $64^{\circ}10'57''$ O), in the province of Córdoba, Argentina, with the location of the sampling points throughout the Suquia River: (1) Funnel San Roque Dam, (2) Villa Warcalde Bridge, (3) San Antonio Ford, (4) Zipoli Bridge, (5) Ducks Island, (6) Centennial Bridge, (7) Sargento Cabral Ford and (8) San Jose Bridge. Sewage treatment plant is located between sampling points 7 and 8. This figure also shown the approximate location of the serum samples collected for this study as black dots.

3.7. Statistical analysis

Prevalence values were expressed as percentages and the univariate analysis (χ^2 test and the Fisher exact test) was performed to check out possible correlations between the serological marker and the risk factors assessed. Exact 95% confidence intervals (CIs) were calculated. Association between the variables was expressed as odds ratio (OR). Statistical significance was defined at $p < 0.05$.

The statistical package STATISTIC version 6.0 (2300 EAST 14th Street, Tulsa, OK, USA, 2005) for windows from Satatsoft was used for the model fitting process.

4. Results

4.1. Environmental surveillance

HEV was detected in 6.3% of sewage samples (3/48: April-2007, September-2010 and March-2011) and in 3.2% of river samples (1/31: Spring-2010) by amplification of ORF 2 genomic region. From these, only one sample tested positive to ORF 1 amplification, probably due to a low sensitivity of the technique. The nucleotide sequencing analysis of both regions allowed assigning all HEV strains as Gnt-3. All samples formed distinct sequence clusters with high nucleotide similarity (Fig. 2). No segregation of the sequences was found and they grouped intermittently between samples from different geographic regions, years of isolation and origins (human or pig). Analyses of partial ORF2 sequences showed that samples obtained from the river in 2010 and the wastewater sample of 2007 (AmbRCbaArg02 and AmbSCbaArg04) clustered within subtype G3c and showed high homology between them. Sequence AmbSCbaArg03 was classified as G3b and AmbSCbaArg01 clustered within subtype G3a (Fig. 2).

4.2. Serological survey

The overall prevalence of IgG anti-HEV was 4.4% (19/433). The percentages for each group studied are shown in Table 2.

Seroprevalence increased with age (OR: 3.50; 95% CI 1.39–8.87; $p = 0.0065$): the higher prevalence was found in older than 46 years old group (8.1%), while in young adults (<30 years old) prevalence was low (0.7%) (Table 2).

Although higher anti-HEV prevalence was found in the low income population (5.9%), compared to middle/high income population (2.8%), this gap was not statistically significant. Nevertheless, in the group between 30 and 45 years, significant differences between both groups (middle/high income population vs. low income population) was found (0–8.6%) ($p = 0.0150$). It is necessary to increase the number of samples to corroborate these results.

5. Discussion

The epidemiology of viral hepatitis has changed in several parts of the world since the introduction of hepatitis A and hepatitis B immunization programs and the incidence of acute infections caused by these viruses has been declining [25]. Hepatitis E virus has been worldwide recognized as an increasingly important cause of acute hepatitis, but testing is not widely available.

This study reports, for the first time in Argentina, the presence of Gnt-3 HEV on environmental samples. Having found HEV in wastewater samples suggests its circulation in general population and its discovery in riverine samples would indicate the existence of an environmental reservoir in the city of Córdoba. This fact alerts local health care systems in order to consider HEV as a possible etiological agent of hepatitis, because it is not yet considered in the diagnosis algorithm of this group of pathologies. HEV has been associated with serious acute hepatitis disease in pregnant women and in patients with pre-existing chronic liver disease [26]. Chronic HEV infections with clinical relevance have been described in immunocompromised patients, such as organ transplant recipients [27], and HIV patients [28]. This previous reports, together with our findings, show the importance of the implementation of specific diagnostic of HEV in our area, not only in individuals with acute hepatitis, but also in other populations, like pregnant women and immunocompromised patients.

Waterborne transmission of HEV from watercourses in direct contact with humans poses a serious public health problem, especially in the summertime when these water sources can be used recreationally.

Phylogenetic analyses based on ORF-2 detection showed environmental circulation of HEV Gnt-3 (subtypes 3a, 3b, and 3c). Sequences of the ORF-1 region could not be obtained in all samples, possibly due to a sensitivity problem, as a result of the low number of viral particles present in water samples. This is also

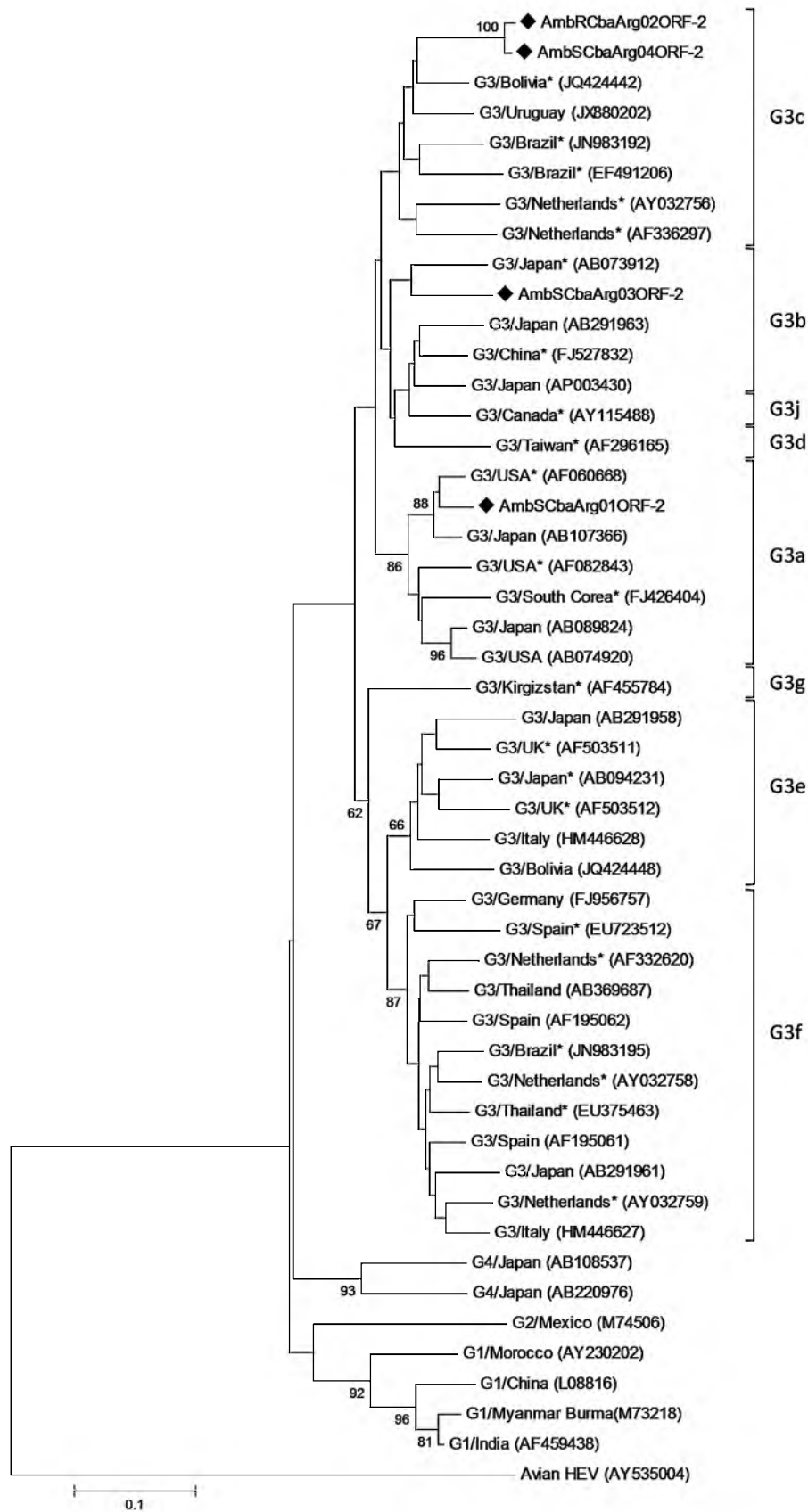


Fig. 2. Phylogenetic tree for subtyping studies reconstructed by the neighbor-joining method with common 280 nt ORF-2 sequences from 49 HEV isolates. Each viral strain is identified by the Genebank accession number, also there is indicated the name of the country of origin and its respective genotype. An avian HEV was included as outgroup. The Argentine environmental sequences are marked with a ◆. Asterisks indicate swine* HEV reference strains. Bootstrap values are indicated for the major nodes as a percentage of the data obtained from 2000 replicates (bar: 0.1 substitutions per site). AmbSCbaArg01 corresponded to sewage sample/September-2010, AmbRCbaArg02 to river sample/Spring-2010, AmbSCbaArg03 to sewage sample/March-2011 and AmbSCbaArg04 to sewage sample/April-2007, respectively.

Table 1
Source, date of sampling and accession numbers of the nucleotide sequences deposited in GenBank.

Sample ID	Source	Date	ORF 2 amplification – acc. number	ORF 1 amplification – acc. number
AmbSCbaArg01	Sewage	Sep-10	Yes – KF751218	Yes – KF765479
AmbRCbaArg02	River	Spring 2010	Yes – KF751219	No
AmbSCbaArg03	Sewage	Mar-11	Yes – KF7512120	No
AmbSCbaArg04	Sewage	Apr-07	Yes – KF7512121	No

Table 2
Percentage of individuals within each age group and socioeconomic characteristics with anti-HEV IgG serum antibodies.

Age (y)	N anti-HEV IgG+, %(n)	Middle/high income population anti-HEV IgG+, %(n)	Low income population anti-HEV IgG+, %(n)	p value
<30	0.7 (1/149)	1.4 (1/71)	0 (0/78)	NS*
31–45	4.4 (6/136)	0 (0/66)	8.6 (6/70)	0.0150
>46	8.1 (12/148)	6.8 (5/74)	9.5 (7/74)	NS*
Total	4.4 (19/433)	2.8 (6/211)	5.9 (13/222)	NS*

* A p value > 0.05 was considered non statistically significant.

evidenced in other reports [21,29]. Even though ORF-2 region has been extensively studied to infer phylogenetic relationships among HEV genotypes and subtypes [30–32], phylodynamic and coalescent studies among this region has been recently reported [12,29,33,34]. Detection of subtypes 3a and 3b agrees with subtypes previously detected in clinical samples from Argentinean patients [10]. Subtype 3c had not been previously described in our region.

Interestingly, the two sequences of 2010 (from river and sewage) did not cluster together, which could indicate more than one strain circulating simultaneously. Moreover, the clustering of the wastewater-2007 sequence with the riverine-2010 sequence, could show circulation of the same strain in the general population through several years.

Detection of IgG anti-HEV antibodies in general population contributes to improve and actualize the epidemiological knowledge of HEV circulation in specific geographic areas, such as the central area of Argentina, where there is no previous data. In this sense, conducting studies of IgG detection in individuals without previous history of acute hepatitis is a useful tool for estimating the presence of asymptomatic HEV infection [35]. Seroprevalence studies of HEV in the general populations of Latin America are scarce. The prevalence found in our population (4.4%) was slightly higher than that reported in Brazil (3.3%) [36], but lower than the found in Cuba (10%) [35]. Nevertheless, these studies are difficult to compare due to the different populations studied and different diagnostic tests used [37].

In accordance with previous studies, seroprevalence obtained of anti-HEV increased with age [35,38–40]. The low levels of anti-HEV in young adults (<30 years old) confirmed the susceptibility of this group to HEV infection, as reported in Cuba [41] and Brazil [39,42]. The high rates observed in elderly groups could be explained by a combination of cumulative exposure overtime and a cohort effect on prevalence, reflecting higher levels of HEV exposure in the past.

Some reports show the important role of low socio-economic factors in the transmission of water-borne infections [40,43]. In Córdoba, it has been reported that low income populations had higher prevalence of anti-HAV [44] antibodies. For HEV, more research is needed to establish whether the anti-HEV prevalence follows the same behavior. It is important to note that most of the people included in the study (90%) lived in houses with tap water, but some individuals lived in suburban areas where the potable water supply was not available. It cannot be excluded that HEV infection could be associated with the possibility of water contamination with sewage containing HEV. Another contamination source may be the use of recreational waters that are not appropriate for that purpose and may contain the virus. However, the international travel history, ingestion of raw or undercooked pork meet and risk occupations were not explored among the persons studied.

On the other hand, the findings of IgG anti-HEV show that there is a portion of the general population that has suffered subclinical infections. This absence of symptoms could be explained by the circulating genotype 3, found in environmental local samples, which produces mild or asymptomatic clinical presentation [1]. Sub-clinical HEV infection may well contribute to the perpetuation of the virus in endemic areas because it promotes its circulation in the community and its maintenance over the years.

The serological results, added to environmental findings, demonstrate that HEV circulates in central Argentina and that contamination of water could represent a significant route of transmission for local human populations. Sewage may act as a possible reservoir of HEV in this area. This fact alerts local health care systems in order to include detection of HEV in the diagnostic algorithm of viral hepatitis. Recent incorporation of serological kits and optimized molecular technology, will allow further investigations gain inside into the knowledge of this virus in our region.

Funding

This study was supported by grants from: Secyt-Universidad Nacional de Córdoba (Secyt UNC-05/H343), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica-Foncyt (PICT 2012-0998), Ministerio de Ciencia y Tecnología, Gobierno de la Provincia de Córdoba (MINCYT-Cba PIO 170/11 and 198/11-CICAL 175/10), SIV-Universidad Católica de Córdoba and Alberto J. Roemmers Foundation. PAB and VER are members of the researcher career from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas – CONICET – Argentina. MBP is recipient of CONICET posdoctoral fellowship.

Competing interests

None declared.

Ethical approval

Ethics committee of the Health Ministry of the Province of Córdoba.

Authors' contributions

MMW designed the study, collection the data, performed the statistical analysis and drafted the manuscript; MBP, PAB and PDG contributed to the acquisition of samples and data. VER participated in revised the analysis plan, the data analysis and revised critically the manuscript. SVN, OCE, JMO and MAP revised the analysis plan

and made an important intellectual contribution in the content. All authors read and approved the final version of this manuscript.

Acknowledgments

We thank Lorena Spinsanti for allowing the use of serum samples and to LACE Laboratories and Vanella Virology Institute for the use of facilities and equipment necessary for the development part of this study.

References

- [1] Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Current concepts. Hepatitis E. *N Engl J Med* 2012;367(13):1237–44. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1204512>.
- [2] Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK. Hepatitis E virus: the current scenario. *Int J Infect Dis* 2013;17(4):e228–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.11.026>.
- [3] Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res* 2011;161(1):3–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.007>.
- [4] Meng X. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* 2011;161(1):23–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.016>.
- [5] Meng X, Anderson D, Arankalle V, Emerson S, Harrison T, Jameel S, et al. *Hep- e viridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus Taxonomy 9th Report of the ICTV*, vol. 9. London: Elsevier Acad Press; 2012. p. 1021–8.
- [6] Pérez-Gracia M, Mateos Lindemann M, Caridad Montalvo Villalba M. Hepatitis E: current status. *Rev Med Virol* 2013;23:384–98.
- [7] Echevarría J, González J, Lewis-Ximenez L, Lopes dos Santos D, Munné M, Alves Pinto M, et al. Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. *J Med Virol* 2012;1045(December):1037–45. doi:10.1002/jmv.
- [8] Dos Santos DRL, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol* 2011;149(1–2):236–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.024>.
- [9] Mirazo S, Ramos N, Russi JC, Gagliano G, Arbiza J. Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human hepatitis E virus infection in Uruguay. *Arch Virol* 2011;156(8):1451–4. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-011-0991-2>.
- [10] Munné MS, Altaber NR, Vladimirovsky SN, Moreiro R, Otegui Mares LO, Soto SS, et al. Identifications of polyphyletic variants in acute hepatitis suggest an underdiagnosed circulation of hepatitis E virus in Argentina. *J Clin Virol* 2011;52(2):138–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.06.015>.
- [11] Mirazo S, Mainardi V, Ramos N, Geron S, Rocca AJA. Indigenous hepatitis E virus genotype 1. *Emerg Infect Dis* 2014;20(1):171–3. doi:10.3201.
- [12] Da Costa Lana MV, Gardinali NR, Sales da Cruz RA, Lerner Lopes L, Sousa Silva G, García Caramori J, et al. Evaluation of hepatitis E virus infection between different production systems of pigs in Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2014;46(2):399–404.
- [13] Rey J, Findor JA, Daruich JR, Velazco CC, Igartua EB, Schmee E, et al. Prevalence of IgG Anti-HEV in Buenos Aires, a nonendemic area for hepatitis E. *J Travel Med* 1997;4(2):100–1.
- [14] Fainboim H, González J, Fassio E, Martínez A, Otegui L, Eposto M, et al. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat* 1999;6(1):53–7.
- [15] Munné MS, Vladimirovsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, et al. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol* 2006;78(12):1579–83. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv>.
- [16] Munné MS, Vladimirovsky S, Otegui L, Brajterman L, Castro R, Soto S, et al. Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2006;36(3):125–30.
- [17] Schlauder GG, Frider B, Sookoian S, Castañón GC, Mushahwar IK. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J Infect Dis* 2000;182(1):294–7.
- [18] Barril PA, Giordano MQ, Isa MB, Maschessi G, Ferreyra IJ, Castello AA, et al. Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *J Med Virol* 2010;82(7):1277–81. doi:10.1002.
- [19] Kokkinos P, Ziros P, Meri D, Filippidou S, Kolla S, Galanis A, et al. Environmental surveillance. An additional/alternative approach for virological surveillance in Greece? *Int J Environ Res Public Health* 2011;8(6):1914–22. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph8061914>.
- [20] Prado T, Fumian TM, Miagostovich MP, Gaspar AMC. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012;106(2):104–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.005>.
- [21] Wang Y, Ling R, Erker JC, Zhang H, Li H, Desai S, et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 1):169–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9934699>
- [22] Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, et al. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* 2002;40(4):1326–32. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.4.1326>.
- [23] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28(10):2731–9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- [24] Aballay L, Osella A, Celi A, Del Pilar Díaz M. Overweight and obesity: prevalence and their association with some social characteristics in a random sample population-based study in Córdoba city, Argentina. *Obes Res Clin Pract* 2009;3(2):1–11.
- [25] Harvala H, Wong V, Simmonds P, Johannessen I, Ramalingam S. Acute viral hepatitis – should the current screening strategy be modified? *J Clin Virol* 2014;59(3):184–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.01.001>.
- [26] Aggarwal R. Hepatitis E: historical, contemporary and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26(Suppl. 1 (April 1979)):72–82. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06540.x>.
- [27] Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezani L, Péron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008;358(8):811–7. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0706992>.
- [28] Colson P, Kaba M, Moreau J, Brouqui P. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol* 2009;45:269–71.
- [29] Mirazo S, Ramos N, Russi JC, Arbiza J. Genetic heterogeneity and subtyping of human hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res* 2013;173(2):364–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.005>.
- [30] Dell'Amico MC, Cavallo A, Gonzales JL, Bonelli SI, Valda Y, Pieri A, et al. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Bolivia. *Emerg Infect Dis* 2011;17(8):1488–90. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1708.100769>.
- [31] Liang H, Su S, Deng S, Gu H, Ji F, Wang L, et al. The prevalence of hepatitis E virus infections among swine, swine farmers and the general population in Guangdong Province, China. *PLOS ONE* 2014;9(2):e88106. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088106>.
- [32] La Rosa G, Fratini M, Muscillo M, Iaconelli M, Taffon S, Equestre M, et al. Molecular characterisation of human hepatitis E virus from Italy: comparative analysis of five reverse transcription-PCR assays. *Virol J* 2014;11(1):72. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-11-72>.
- [33] Zehender G, Ebranati E, Lai A, Luzzago C, Paladini S, Tagliacarne C, et al. Phylogeography and phylodynamics of European genotype 3 hepatitis E virus. *Infect Genet Evol* 2014 May;25:138–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.016>.
- [34] Ren F, Zhao C, Wang L, Wang Z, Gong X, Song M, et al. Hepatitis E virus seroprevalence and molecular study among blood donors in China. *Transfusion* 2014;54(3 Pt 2):910–7.
- [35] Montalvo Villalba MC, Guan M, Pérez A, Corredor MB, Frometa SS, Gutiérrez Moreno A, et al. Seroprevalence of antibodies to hepatitis E virus in two large communities in Havana, Cuba. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010;104(12):772–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.08.006>.
- [36] Carrilho EJ, Clemente CM, Silva LC. Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. *Gastroenterol Hepatol* 2005;28(3):118–25.
- [37] Khudyakov Y, Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res* 2011;161(1):84–92.
- [38] Montalvo Villalba MC, Owot JC, Correia B, et al. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Cuba. *Infect Genet Evol* 2013;14(1):335–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.022>.
- [39] Martins RMB, Freitas NR, Kozłowski A, Reis NRS, Lopes CLR, Teles SA, et al. Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a population of recyclable waste pickers in Brazil. *J Clin Virol* 2014;59(3):188–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.01.002>.
- [40] Rapicetta M, Monarca R, Kondili LA, Chionne P, Madonna E, Madeddu G, et al. Hepatitis E virus and hepatitis A virus exposures in an apparently healthy high-risk population in Italy. *Infection* 2013;41(1):69–76.
- [41] Martínez Campos J, Pérez A, Montalvo Villalba M, Rodríguez L, Gutiérrez A, Moreno A, et al. Serological prevalence and risk factors associated to hepatitis C in the municipalities of Playa and Marianao. *Rev Panam Infectol* 2005;7:8–14.
- [42] Buti M, Domínguez A, Plans P, Jardi R, Schaper M, Espuñes J, et al. Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(12):1328–32. <http://dx.doi.org/10.1128/CI00255-256>.
- [43] Atabek M, Fyñdyk D, Gulyuz A, Erkul I. Prevalence of anti-HAV and anti-HEV antibodies in Konya, Turkey. *Health Policy (NY)* 2004;67(3):265–9.
- [44] Yanez LA, Lucero NS, Barril PA, Díaz MP, Tenaglia MM, Spinsanti LI, et al. Evidence of hepatitis A virus circulation in central Argentina: seroprevalence and environmental surveillance. *J Clin Virol* 2014;59(1):38–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.11.005>.

RESEARCH ARTICLE

Increased Hepatitis E Virus Seroprevalence Correlates with Lower CD4+ Cell Counts in HIV-Infected Persons in Argentina

José D. Debes^{1*}, Maribel Martínez Wassaf², María Belén Pisano³, María Beatriz Isa³, Martín Lotto³, Leonardo G. Marianelli⁴, Natalia Frassone⁴, Estefanía Ballari⁴, Paul R. Bohjanen¹, Bettina E. Hansen⁵, Viviana Ré³

1 Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, MN, United States of America, **2** Departamento Virología, LACE, Córdoba, Argentina, **3** Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, **4** Hospital Rawson, Córdoba, Argentina, **5** Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus MC, Rotterdam, the Netherlands

* debes003@umn.edu



OPEN ACCESS

Citation: Debes JD, Martínez Wassaf M, Pisano MB, Isa MB, Lotto M, Marianelli LG, et al. (2016) Increased Hepatitis E Virus Seroprevalence Correlates with Lower CD4+ Cell Counts in HIV-Infected Persons in Argentina. *PLoS ONE* 11(7): e0160082. doi:10.1371/journal.pone.0160082

Editor: Naglaa H. Shoukry, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), CANADA

Received: March 5, 2015

Accepted: July 12, 2016

Published: July 28, 2016

Copyright: © 2016 Debes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Relevant data are in the paper and Supporting Information files. For any additional information, please contact Jose Debes, the corresponding author, at debes003@umn.edu.

Funding: This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Gobierno de la Provincia de Córdoba to VR (PID 2012 MINCyT-Cba), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica-Foncyt to MBP (PICT-2014 2537), and American College of Gastroenterology CRA to JD; MBP and VER are members of the researcher

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is a single-stranded RNA virus that can cause hepatitis in an epidemic fashion. HEV usually causes asymptomatic or limited acute infections in immunocompetent individuals, whereas in immunosuppressed individuals such as transplant recipients, HEV can cause chronic infections. The risks and outcomes of HEV co-infection in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) are poorly characterized. We used a third generation immunoassay to measure serum IgG antibodies specific for HEV in 204 HIV-infected individuals from Argentina and a control group of 433 HIV-negative individuals. We found 15 of 204 (7.3%, 95%CI 3.74–10.96%) individuals in the HIV-positive group to have positive HEV IgG levels suggestive of previous infection, compared to 19 of 433 (4.4%, 95% CI 2.5–6.3%) individuals in the HIV-negative control group ($p = 0.12$). Among HIV-positive individuals, those with HEV seropositivity had lower CD4 counts compared to those that were HEV seronegative (average CD4 count of 234 vs 422 mm^3 , $p = 0.01$), indicating that patients with lower CD4 counts were more likely to be HEV IgG positive. Moreover, HEV seropositivity in patients with CD4 counts $<200 \text{ mm}^3$ was 16%, compared to 4.5% in those with CD4 counts $>200 \text{ mm}^3$ ($p = 0.012$). We found a positive PCR result for HEV in one individual. Our study found that increased seroprevalence of HEV IgG correlated with lower CD4 counts in HIV-infected patients in Argentina.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a single-stranded, non-enveloped RNA virus that can cause hepatitis and is transmitted through an enteric route [1]. In the majority of cases, infection with HEV leads to silent seroconversion or acute self-limited disease [1]. In areas of high endemicity, HEV genotypes 1 and 2 are common and can present in outbreaks. Particularly severe disease

career from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas – CONICET –Argentina.

Competing Interests: MMW is an employee of LACE, Córdoba, Argentina. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials. All other authors report no competing interests.

can occur in pregnant women during these outbreaks [1]. Clinically evident infections by HEV genotypes 3 and 4 occur in developed countries as sporadic cases, not associated with outbreaks [2]. When cases occur in immunocompetent individuals, infection with HEV usually leads to silent seroconversion and a chronic course is unlikely [2]. In recent years, however, individuals who are immunosuppressed, particularly solid organ transplant recipients, have been shown to develop acute infection, chronic infection or viral reactivation [3, 4].

Although HEV infection is well characterized in immunosuppressed solid organ transplant recipients, HEV infection in those with immunosuppression due to other reasons such as human immunodeficiency virus (HIV) infection is less studied. A study from Switzerland showed a 2% seroprevalence of HEV in HIV-infected subjects, but no comparison was made with the immunocompetent population [5]. A recent study in the United States showed 20% seroprevalence of HEV in HIV-infected subjects awaiting liver or renal transplantation [6]. In the following study, we evaluated for the first time the seroprevalence of HEV in HIV-infected persons in central Argentina.

Methods

Study population

We analyzed samples from 204 HIV+ persons recruited in Cordoba, Argentina (2010). Of these, 68 were receiving antiretroviral therapy (ART) in a private clinic and were described previously [7], 96 were seen at a different private clinic (58 of them on ART), and 40 were seen at a public hospital for the first time in response to a positive HIV test but were not on ART. Clinical, laboratory and ultrasound information was collected from these subjects at the time of sample collection. A group of 433 HIV-negative subjects described elsewhere [8] was used as a control group. All samples were stored at -80°C before analysis.

Ethics statements

IRB approval for this study was obtained from the University of Minnesota and Hospital Rawson in Cordoba, Argentina. Written informed consent was obtained from all subjects.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

IgG and IgM antibodies against HEV were purchased commercially (Diapro, Milan, Italy) and ELISAs were performed strictly following the manufacturer's instructions. ELISA microplates were coated with HEV-specific synthetic conserved and immunodominant antigens derived from ORF2 and ORF3 of all genotypes. Test results were interpreted as ratio of the sample (S) and the cut-off (CO) (S/CO). Samples with ratio below 0.9 were considered negative, between 0.9–1.1 were equivocal, and above 1.1 were considered positive results.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Nested-PCR was performed targeting ORF 2, following protocols previously described [8, 9]. PCR products (10 µL) were analyzed by electrophoresis using TBE buffer and a 2% agarose gel containing 0.5 g/mL of ethidium bromide, and visualized under UV light. The lower limit of detection of the nested PCR was 31.6 PID (pig infectious dose) [9].

Statistical analysis

When comparing variation of prevalence, students t-tests and Fisher exact test were used. P values <0.05 were considered significant. Logistic regression was used to compute the odds ratio for CD4 adjusted for age. The chi-square test was used when analyzing CD4 cut offs.

Results

In our cohort of 204 HIV-positive subjects, 15 (7.35%, 95% CI 3.74–10.96%) were positive for HEV IgG in serum. In our previous study in 433 HIV-negative subjects at the same research site, the prevalence of HEV was 4.4% (95% CI 2.5–6.3%, 19/433, $p = 0.12$) [8]. The mean age of HEV-positive patients was 44.9 years versus 39.7 years in those HEV-negative ($p = 0.11$, not significant). We compared CD4 counts for the HIV-positive subjects who were HEV IgG positive versus negative. The group of HIV-infected subjects that were seropositive for HEV had lower CD4 counts when compared to those that were seronegative for HEV (average count of CD4/mm³ 234 vs 422, $p = 0.01$). Based on logistic regression analysis the coefficient for CD4 count was significant, $Z = -2.44$, $p = 0.01$, with an odds ratio lower than 1: 0.967 (95% CI: 0.942–0.994) for a CD4 increase of 10 counts, indicating that individuals with low CD4 counts were more likely to be HEV seropositive (Fig 1). The higher risk for HEV seropositivity with decreasing CD4 count remained significant after adjusting for age ($Z = -2.69$, $p = 0.006$, OR = 0.969, 95% CI: 0.943–0.995).

When we divided patients among those with severe immunosuppression, defined as CD4 counts <200 mm³ versus those with CD4 counts >200 mm³, we found that seropositivity for HEV IgG was 16% (95% CI 5.48–26.5%) versus 4.5% (95% CI 1.22–7.87%) respectively ($p = 0.012$). The median age for both groups (seropositive and seronegative) was similar: 39 years for those HEV seropositive (IQR 35–41) and 38 years (IQR 31–46) for those HEV seronegative (Table 1). We found no difference in HEV seroprevalence among those on ART or not on ART (8.4% versus 6.4%, $p = 0.59$).

Five subjects that were positive for HEV IgG were also positive for HEV IgM, suggesting acute or recent infection. We had access to clinical information for only one of these five individuals; this person had normal liver enzymes and no gastrointestinal symptoms at the time of sample collection. HEV RNA detection through PCR was positive in only one of the 204 samples from HIV+ subjects. This sample belonged to a subject with a CD4 count of 29/mm³ who

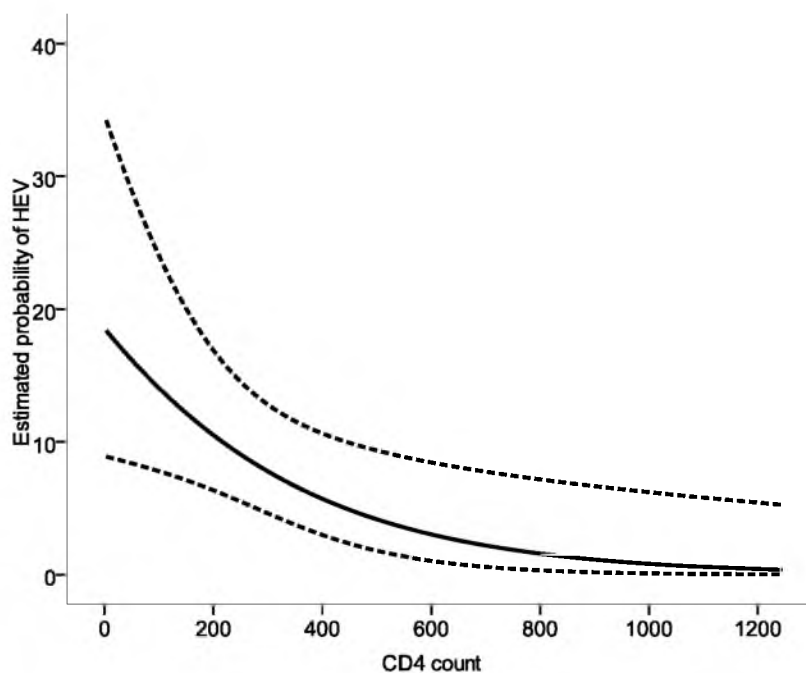


Fig 1. Estimated probability of HEV by CD4 count (full line) with 95% confidence interval (dotted lines).

doi:10.1371/journal.pone.0160082.g001

Table 1. HEV seroprevalence according to CD4 count cut off.

Cohort	Cohort Size	HEV IgG		Odds Ratio of CD4	p-value
		Seropositive		<i>by increase 10 counts,</i>	
	N	n	prevalence, 95% CI (%)	95% CI	<i>log-Likelihood</i>
Total	204	15	7.35 (3.74–11.96)	0.967 (0.942–0.994)	0.006
				Odds Ratio of CD4 <200 versus ≥200 mm³,	p-value
	N	n	prevalence, 95% CI (%)	95% CI	<i>log-Likelihood</i>
Total					
CD4<200 mm ³	50	8	16.00 (5.48–26.52)	4.00 (1.37–11.67)	0.012
CD4≥200 mm ³	147	7	4.55 (1.22–7.87)	1 (reference)	

OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval

doi:10.1371/journal.pone.0160082.t001

was not on ART. Interestingly, this subject had symptoms of nausea and vomiting but had negative HEV IgG and IgM ELISA tests, suggesting that this could have represented a case of acute HEV infection where seroconversion had not yet occurred.

Discussion

Our study shows that HIV-positive subjects in central Argentina have a higher but not statistically significant seroprevalence of HEV when compared to HIV-negative controls. In HIV-infected subjects with low CD4 counts, the seroprevalence was significantly higher than in HIV-infected subjects with high CD4 counts or HIV-negative subjects.

Our group recently performed a study on HEV infection in immunocompetent persons in central Argentina and found a seroprevalence of 4.4% for HEV IgG [8]. In other studies, the seroprevalence of HEV antibodies varies among immunocompetent and immunosuppressed subjects [2]. The increased seroprevalence of HEV in immunosuppressed populations is of importance since immunosuppressed individuals, particularly those that have undergone solid-organ transplantation, can develop chronic infection with HEV [4]. Hering et al. found 15% HEV seroprevalence among renal transplant recipients, and 10% of these subjects had positive HEV RNA, suggesting they had chronic infection with persistent viral replication [10]. Very few samples in that study had both positive HEV IgG and HEV RNA, and therefore acute infection could not be excluded. The prevalence of HEV in transplant recipients varies depending on geographical location. In France 13% to 39% of renal and liver transplant recipients were positive for HEV IgG, while this number was 2% and 2.9% in liver and transplant recipients in the Netherlands and Germany, respectively [4, 11, 12].

Although most studies suggest an increased prevalence of HEV in immunosuppressed subjects, as well as a higher risk of chronic disease, little is known about the effect of HIV on HEV infection and results are mixed across different studies. Kenfak-Foguena et al. reported a seroprevalence of HEV of 2.6% in HIV-infected subjects in Switzerland. Interestingly, this study was performed on subjects with unexplained elevated liver enzymes, in which a higher seroprevalence of HEV might have been expected [5]. Sherman et al. found an HEV seroprevalence of 20% in HIV-infected subjects awaiting solid-organ transplant. The study found no active infection, based on RNA levels of HEV, in any of the subjects. In that study, patients had well-controlled HIV viremia, as expected in a cohort waiting for solid organ transplantation [6]. Pineda et al. reported a seroprevalence of HEV IgG of 26% in an HIV-infected population in Spain [13].

Some of the differences in HEV IgG prevalence across studies can be attributed to differences in the commercially available assays. While initial assays showed a very high number of

false positives, newer tests, including the one used in our study, have shown to have good sensitivity and specificity for detecting HEV IgG antibodies [14]. Caution is necessary when interpreting results from immunoglobulin assays in the setting of humoral or cellular immunosuppression, since the assay performance might not be optimal.

Overall, studies addressing HEV prevalence in HIV infected subjects have been cross-sectional and performed on individuals with controlled HIV disease. In our study, although there was a difference of HEV IgG seroprevalence in HIV-positive persons compared to HIV-negative controls, this difference was significant only in the subgroup of subjects with low CD4 counts. This difference was seen regardless of whether or not subjects were receiving ART. Our results are consistent with Pineda et al., who found increased seroprevalence of HEV in HIV-infected subjects in Spain with CD4 counts below 500/mm³ when compared to those CD4 counts above 500/mm³ [13]. It might be expected that detection of IgG would have lower sensitivity in HIV-infected subjects with lower CD4 counts, and therefore, more profound immunosuppression, but we found higher seroprevalence in the subgroup with the lowest CD4 counts. It appears, however, that marked immunosuppression, indicated by lower CD4 counts, may predispose subjects to infection with HEV.

There might be differences in the socio-economic status of our HIV-infected subjects from different clinics. Although we did not use a specific questionnaire to address these differences, some subjects were seen in a private hospital (likely of higher income), while other subjects were seen in a public hospital (likely of lower income). In our previous study in immunocompetent subjects, we found a difference in HEV seroprevalence based on socioeconomic status [8]. Since HEV is transmitted in a fecal-oral route, it might be expected to be more prevalent in populations where hygiene standards are lower.

In those subjects positive for HEV IgG in which we had clinical information available ($n = 4$), liver enzymes were normal and none showed clinical evidence of chronic hepatitis, but all had some abnormality on liver US, such as increased size ($n = 3$) or increased echogenicity ($n = 3$). RNA levels were positive in only one sample from the entire cohort of samples. This subject had symptoms of nausea, vomiting and diarrhea, suggesting an early acute infection with HEV.

The clinical significance of positive HEV IgG in our population is unclear. With reports indicating higher likelihood of chronic infection in subjects with solid organ transplant, we believe studies are necessary to perform longer follow-up of subjects with HIV and HEV to better characterize the chronicity of HEV infection in HIV-infected patients, particularly since HEV can now be treated with ribavirin [15].

In summary, this study shows a higher prevalence of HEV IgG in HIV-positive subjects with low CD4 counts. Studies evaluating a larger number of HIV-infected subjects, including those receiving and not receiving ART, are necessary to further understand this finding and its clinical significance.

Supporting Information

S1 File. Minimal data set Debes et al.
(XLSX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JDD PRB VR MBP LGM. Performed the experiments: MMW MBP EB NF MBI ML. Analyzed the data: JDD PRB VR LGM NF BH ML. Contributed reagents/materials/analysis tools: JDD VR. Wrote the paper: JDD PRB VR LGM.

References

1. Fujiwara S, Yokokawa Y, Morino K, Hayasaka K, Kawabata M, Shimizu T. Chronic hepatitis E: a review of the literature. *J Viral Hepat*. 2014 Feb; 21(2):78–89. doi: [10.1111/jvh.12156](https://doi.org/10.1111/jvh.12156) PMID: [24383921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24383921/)
2. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al. Hepatitis E. *Lancet*. 2012 Jun; 379(9835):2477–88. doi: [10.1016/S0140-6736\(11\)61849-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61849-7) PMID: [22549046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22549046/)
3. Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Muscari F, Sallusto F, et al. Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients can evolve into chronic infections. *J Infect Dis*. 2014 Jun; 209(12):1900–6. doi: [10.1093/infdis/jiu032](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu032) PMID: [24436450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24436450/)
4. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Péron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2008 Feb; 358(8):811–7. doi: [10.1056/NEJMoa0706992](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706992) PMID: [18287603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18287603/)
5. Kenfak-Foguena A, Schöni-Affolter F, Bürgisser P, Witteck A, Darling KE, Kovari H, et al. Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jun; 17(6):1074–8. doi: [10.3201/eid1706.101067](https://doi.org/10.3201/eid1706.101067) PMID: [21749774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21749774/)
6. Sherman KE, Terrault N, Barin B, Rouster SD, Shata MT, Investigators H-T. Hepatitis E infection in HIV-infected liver and kidney transplant candidates. *J Viral Hepat*. 2014 Aug; 21(8):e74–7. doi: [10.1111/jvh.12233](https://doi.org/10.1111/jvh.12233) PMID: [24773782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24773782/)
7. Isa MB, Pavan JV, Sicilia Don P, Grutadauria S, Martinez LC, Giordano MO, et al. Persistence of measles neutralizing antibody related to vaccine and natural infection acquired before HIV infection. *Epidemiol Infect*. 2014 Aug; 142(8):1708–12. doi: [10.1017/S0950268813002628](https://doi.org/10.1017/S0950268813002628) PMID: [24139476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24139476/)
8. Martínez Wassaf MG, Pisano MB, Barril PA, Elbarcha OC, Pinto MA, Mendes de Oliveira J, et al. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. *J Clin Virol*. 2014 Aug.
9. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, et al. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol*. 2002 Apr; 40(4):1326–32. PMID: [11923352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11923352/)
10. Hering T, Passos AM, Perez RM, Bilal J, Fragano D, Granato C, et al. Past and current hepatitis E virus infection in renal transplant patients. *J Med Virol*. 2014 Jun; 86(6):948–53. doi: [10.1002/jmv.23915](https://doi.org/10.1002/jmv.23915) PMID: [24619955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24619955/)
11. Haagsma EB, Niesters HG, van den Berg AP, Riezebos-Brilman A, Porte RJ, Vennema H, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2009 Oct; 15(10):1225–8. doi: [10.1002/lt.21819](https://doi.org/10.1002/lt.21819) PMID: [19790147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19790147/)
12. Pischke S, Wedemeyer H. Chronic hepatitis E in liver transplant recipients: a significant clinical problem? *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2010 Jun; 56(2):121–8. PMID: [20485250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20485250/)
13. Pineda JA, Cifuentes C, Parra M, Merchante N, Pérez-Navarro E, Rivero-Juárez A, et al. Incidence and natural history of hepatitis E virus coinfection among HIV-infected patients. *AIDS*. 2014 Aug; 28(13):1931–7. doi: [10.1097/QAD.0000000000000378](https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000378) PMID: [24979724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24979724/)
14. Pas SD, Streefkerk RH, Pronk M, de Man RA, Beersma MF, Osterhaus AD, et al. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *J Clin Virol*. 2013 Dec; 58(4):629–34. doi: [10.1016/j.icv.2013.10.010](https://doi.org/10.1016/j.icv.2013.10.010) PMID: [24210958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24210958/)
15. Kamar N, Mallet V, Izopet J. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection. *N Engl J Med*. 2014 Jun; 370(25):2447–8.

Hepatitis E virus infection in patients on dialysis and in solid organ transplant recipients in Argentina: exploring associated risk factors

María Belén Pisano^{1,2} · Domingo Balderramo³ · Maribel Martínez Wassal^{2,4} · Martín Lotto¹ · Yanina Carlino³ · Viviana Elizabeth Ré^{1,2} · José D. Debes⁵

Received: 26 October 2016 / Accepted: 27 October 2016
© Springer-Verlag Wien 2016

Abstract Infection with hepatitis E virus (HEV) leads to acute hepatitis infection in immunocompetent hosts. HEV genotype 3 can present with high frequency and lead to chronic infection in individuals with a compromised immune system. The risk factors related to increased seroprevalence or chronicity in this population are not entirely understood. Moreover, most studies addressing risk factors for HEV in non-endemic areas come from developed areas such as North America and Europe. In this study we evaluated seroprevalence, chronicity and risk factors for HEV in 120 transplant recipients and 88 patients on dialysis in Argentina. We found a significantly higher seroprevalence of HEV IgG in those undergoing dialysis compared with healthy controls (10.2% and 4.3% respectively, $p = 0.03$). No difference in HEV seroprevalence was observed between healthy controls and transplant recipients (5.8%). We found no association between previously identified risk factors for HEV, such as pork

consumption or use of tacrolimus, and HEV seroprevalence. In univariate and multivariate analyses, consumption of fish was associated with higher seroprevalence of HEV (OR = 9.33; 95% CI: 2.07–42.2; $p = 0.04$). None of the samples showed HEV RNA amplification, indicating that chronicity does not seem to be an issue in these cohorts. Our results show increased seroprevalence of HEV in individuals undergoing dialysis but not in transplant recipients. We also found that fish consumption can be a potential risk factor for acquiring HEV.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) infection has traditionally been considered an acute, self-limited disease, characterized by the development of hepatitis, when clinically evident. Recently, HEV, specifically genotype 3 (HEV-3), has been recognized as a cause of chronic hepatitis in immunosuppressed individuals, particularly in solid organ transplant recipients [1–3]. Also, some reports indicate a higher seroprevalence of HEV in patients undergoing hemodialysis, although there is no evidence of chronicity in these patients [4–6].

Most studies involving HEV infection in transplant recipients or patients on hemodialysis have been performed in high-income developed countries [4, 7, 8]. Little is known about HEV infection in medically immunosuppressed individuals in low- and medium-income countries. In Argentina, human cases of hepatitis E have been diagnosed sporadically in many parts of the country; all detected viruses belonged to genotype 3 [9, 10]. HEV-3 has also been detected in pigs of commercial farms in different areas [11] and our group has reported presence of HEV in watercourses in the central region of Argentina [12].

✉ María Belén Pisano
mbelenpisano@gmail.com

¹ Virology Institute “Dr. J.M. Vanella”, School of Medical Sciences, CONICET, National University of Córdoba, Enfermera Gordillo Gómez s/n, 5016 Córdoba, Argentina

² Department of Virology, School of Chemical Sciences, Catholic University of Córdoba, Av. Armada Argentina, 3555 Córdoba, Argentina

³ Gastroenterology Department, Private Hospital of Córdoba, University Institute of Biomedical Sciences of Córdoba, Av. Naciones Unidas 346, Córdoba, Argentina

⁴ Department of Virology and Molecular Biology, LACE Laboratories, Av. Vélez Sársfield 528, Córdoba, Argentina

⁵ Department of Medicine, Division of Infectious Disease and International Medicine, University of Minnesota, 2001 6th St. SE, Minneapolis, MN, USA

Seroprevalence data reported in the country varied according to the population studied: 4.4% in healthy adults [12], 0.15% in children [13] and 1.8% in blood donors [14]. Among HIV-infected individuals, HEV seroprevalence values ranged between 6.6 and 35% [14–16].

Overall, the role of HEV in causing liver disease and the seroprevalence of HEV in immunocompromised patients in low- and medium-income countries is not well defined. Moreover, the risk factors associated with HEV infection or development of clinical significant disease are unknown in certain areas such as South America.

The aim of this study was to investigate the seroprevalence, presence of chronic infection and associated risk factors of HEV infection in solid organ recipients and in patients on dialysis in a prospective fashion.

Materials and methods

Study population

A total of 208 patients, who were on dialysis or who were solid organ transplant recipients (TR), were randomly and prospectively evaluated in a healthcare center in Córdoba, the second largest city in Argentina (1,329,604 inhabitants, located in the central area of the country). All subjects were analyzed according to their clinical conditions, social habits and the presence of the following potential risk factors for HEV infection: consumption of pork and/or fish, access to potable water, history of transfusion and traveling abroad. Each patient had a sample of blood taken during a clinical visit (for either hemodialysis or clinical follow up) after written informed consent was obtained by the primary physician. All samples were stored at -80°C before analysis. A group of 433 healthy adult subjects described elsewhere [12] was used as a control group.

Ethical approval

Ethics committee of the Health Ministry of the Province of Córdoba (CIEIS HP 4-231/14).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Commercially available IgG and IgM antibodies against HEV were used (Dia.pro, Milan, Italy) and ELISA assays were performed following the manufacturer's instructions. ELISA microplates were coated with HEV-specific, synthetic, conserved and immunodominant antigens, derived from the open reading frames 2 and 3 (ORF-2 and ORF-3) of HEV genome of all genotypes. Test results were used to calculate the ratio of the sample (S) and the cut-off (CO) (S/CO). Samples with S/CO ratio below 0.9 were

considered negative, between 0.9–1.1 as equivocal results, and above 1.1 as positive results.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Nested-PCR assay, targeting ORF-2, was performed following previously described protocols [17]. PCR products were analyzed by gel electrophoresis using TBE buffer and a 2% agarose gel containing GelRed (Biotium, Inc), following the manufacturer's instructions, and visualized under UV light. The lower limit of detection for this PCR was 31.6 PID (pig infectious dose) [17].

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as means and standard deviations (SD) or as medians and ranges, on the basis of their homogeneity. Categorical variables are expressed as numbers and percentages. To assess the association between individual risk factors and IgG anti-HEV, we used independent t or chi-square tests. All variables that were significant in the univariate analysis with a P value <0.20 were considered for a multivariate logistic regression analysis, to determine the independent risk factors for anti-HEV IgG. The associations are presented as odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). A two-sided probability value <0.05 was considered to be significant. Statistical analysis was performed with the SPSS 17.0 statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Results

We evaluated a total of 208 patients: of these, 88 were undergoing dialysis and 120 were solid organ transplant recipients. The male-to-female ratio for patients on dialysis was 2.4/1 with a mean age of 60 years (SD = 15.57; range = 23–88 yrs). The male-to-female ratio in transplant recipients was 1.5/1, with a mean age of 50 years (SD = 15.62; range = 18–77 yrs). There were 106 kidney transplant recipients, 14 liver transplant recipients, 82 patients on hemodialysis and 6 on peritoneal dialysis. Seropositivity for anti-HEV IgG was observed in 9 out of 88 patients on dialysis (10.22%). The mean age for those who tested positive for HEV, was 59 years (SD = 14.6; range = 36–75 yrs) and the male-to-female ratio was 2.3/1. Prevalence of HEV infection among patients on hemodialysis was 9.7% (8/82), and this was 16.7% (1/6) among patients on peritoneal dialysis. Among solid organ transplant recipients, 7 out of 120 tested positive for anti-HEV IgG (5.83%) (Table 1). The mean age among HEV-positive transplant recipients was 61 years (SD = 17.0; range = 42–77 yrs) and the male-to-female ratio was 1.5/1.

Table 1 Comparison of anti-HEV IgG seroprevalence in transplant recipients, patients on dialysis and healthy controls

	N	anti-HEV IgG		95% CI	p-value
		Positive samples (%)	OR		
Control group	433	4.4	Reference		
Transplant recipients	120	5.8	1.35	0.55–3.29	0.66
Kidney - TR	106	5.7	1.31	0.51–3.36	0.56
Liver - TR	14	7.1	1.68	0.21–13.49	0.62
Dialysis	88	10.2	2.48	1.08–5.67	0.031
HD patients	82	9.7	2.36	0.99–5.58	0.052
Peritoneal dialysis	6	16.7	4.36	0.48–39.16	0.19

None of the patients showed any clinical symptom that could be attributed to acute or chronic hepatitis.

Seropositivity for anti-HEV IgM was detected in 5 of the 8 anti-HEV IgG-positive patients on hemodialysis. None of the transplant patients had anti-HEV IgM. All patients were negative for HEV RNA.

In our previous study there was a statistically significant difference between the rates of HEV IgG seroprevalence in patients on dialysis and healthy controls (10.22 % vs. 4.4%) with an OR of 2.48 of being HEV IgG-positive for dialysis patients vs. healthy controls (95% CI: 1.08–5.67, $p = 0.03$). Interestingly, we found no statistically significant difference in HEV seroprevalence between transplant recipients and healthy controls (5.8% vs. 4.4%, $p = 0.51$), or between transplant recipients and patients on dialysis (5.8% vs. 10.2%, $p > 0.05$). There were also no differences in HEV seroprevalence between kidney or liver transplant recipients (5.7% vs. 7.1%, $p > 0.05$). There was no significant correlation between HEV seroprevalence and gender or age, in any of the patient groups studied.

Among all the variables evaluated by univariate analysis, only fish consumption and lack of traveling abroad were significantly associated with HEV seropositivity ($p < 0.05$ for each variable) (Table 2). Interestingly, consumption of pork or charcuterie did not correlate with HEV seropositivity. Due to the dependence structure between covariates, we fitted multiple logistic regression models in order to obtain the adjusted risk estimates. This multivariate analysis found that fish consumption (more than once a week) was the only statistically significant variable associated with HEV infection (OR = 9.33, 95% CI: 2.07–42.2) (Table 3).

Discussion

In non-endemic countries, such as Argentina, HEV genotype 3 has been proposed to be transmitted to humans in a zoonotic fashion, from animal reservoirs or from water sources. However, the specific routes of transmission and risk factors for the development of infection are not

entirely understood. It is therefore important to investigate the epidemiological pattern of circulation of HEV, especially in susceptible populations from areas where HEV has been reported [12].

This is the first assessment of HEV seroprevalence and risk factors in hemodialysis patients and transplant recipients in Argentina. In transplant recipients, the HEV IgG seroprevalence was 5.83%. This prevalence was higher than that reported in Italy (3.3%) using the same ELISA kit (Dia.pro, Milan, Italy) and lower than that found among Iranian kidney transplant recipients (30.8%) [6, 18]. Globally, there is controversy on whether transplant recipients of specific organs have variable prevalence of HEV. Some studies suggest that patients who have undergone a kidney transplant could be more susceptible to infection by HEV, due to exposure to higher doses of immunosuppressive drugs. Other studies indicate that patients who receive a liver transplant could be more likely to develop HEV infection and progress to a chronic infection as a result of local inflammation, which can generate a favorable environment in the target organ [19–21]. Our study found no significant differences between HEV prevalence among recipients of different organs (kidney or liver).

Numerous studies have reported the development of chronic infections with HEV in transplant recipients [7, 22–28]. However, in line with other studies, such as Harrison et al. (2013), Naik et al. (2013) and Scotto et al. (2015), which did not describe such viral persistence, we did not find HEV RNA amplification in any sample, suggesting that progression of HEV infection to chronicity does not seem to represent a problem in our community [4, 6, 29].

The use of the immunosuppressive drug tacrolimus has been found to be a factor independently associated with chronic HEV infection, when compared with the use of cyclosporine A [20]. In our study we could not evaluate this association because all the patients were treated with tacrolimus. Nonetheless it is important to note that, although all transplant recipients in our study were treated with a drug associated to HEV infection, none had HEV RNA in their blood.

Table 2 Univariate analysis of factors associated with anti-HEV seroprevalence

Variable	IgG positive, n (%) (N = 16)	IgG negative, n (%) (N = 192)	p-value
Age (years)	57.3 (SD = 15,5)	52.9 (SD = 15.9)	0.31
Gender, male*	9 (56.3%)	103 (52.0%)	0.75
Comorbidities*			
Hemodialysis	8 (9.7%)	74 (90.2%)	0.32
Peritoneal dialysis	1 (16.7%)	5 (83.3%)	0.94
Liver - transplant	1 (7.1%)	13 (92.9%)	0.64
Kidney - transplant	6 (5.7%)	100 (94.3%)	0.46
Grouped comorbidities			
Dialysis	9 (10.2%)	79 (89.8%)	0.20
Transplant	7 (5.83%)	113 (94.2%)	0.24
Blood transfusion*	10/16 (62.5%)	109/156 (69.9%)	0.54
Food habits*			
Pork meat consumption	12/16 (75%)	106/159 (66.7%)	0.59
≤1/week	7/7 (100%)	110/115 (95.7%)	0.67
>1/week	0/7 (0%)	5/115 (4.3%)	0.67
Charcuterie consumption	10/16 (62.5%)	104/159 (65.4%)	0.81
≤1/week	6/7 (85.7%)	99/115 (86.1%)	0.98
>1/week	1/7 (14.3%)	16/115 (13.9%)	0.98
Fish consumption	13/16 (81.3%)	121/159 (76.1%)	0.77
≤1/week	4/8 (50%)	113/125 (90.4%)	0.004
>1 week	4/8 (50%)	12/125 (9.6%)	0.004
Drinks tap water	10/15 (66.7%)	94/156 (60.3%)	0.63
Drinks bottled water	8/16 (50%)	79/156 (50.6%)	0.96
Alcohol consumption	3/16 (18.8%)	55/159 (34.6%)	0.27
≤1/week	2/2 (100%)	58/71 (81.7%)	0.79
>1/week	0/2 (0%)	13/71 (18.3%)	0.79
Coffee consumption	13/16 (81.3%)	106/158 (67.1%)	0.39
≤1/week	4/8 (50%)	45/115 (39.1%)	0.81
>1/week	4/8 (50%)	70/115 (60.1%)	0.81
Residence*			
Cordoba city (urban)	12/16 (75%)	90/159 (56.6%)	0.19
Periphery of Cordoba city (non-urban)	4/16 (25%)	41/159 (25.8%)	0.94
Others provinces	0/16 (0%)	28/159 (17.6%)	0.08
Travel abroad*			
Yes	4/14 (28.6%)	52/84 (61.9)	0.04
Never	10/14 (71.4%)	32/84 (38.1%)	0.04

*Only data from individuals having this factor were included

Table 3 Multivariate analysis of factors independently associated with anti-HEV seroprevalence

Variable	OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p-value
Fish consumption	9.42 (2.08–42.6)	9.33 (2.07–42.2)	0.04
>1/week			
Never travel abroad	4.06 (1.18–14.04)	-	NS

Regarding hemodialysis patients and HEV seropositivity, it is known that chronic renal disease induces defects in cellular and humoral immunity characterized by increased

susceptibility to viral and bacterial infections [4]. In this context, our study found a higher HEV seroprevalence in patients undergoing hemodialysis, compared with a control

group. These results are similar to those observed in Italy (6.0%), Iran (7.4–10.6%) and Turkey (20.6%), which were obtained using the same commercial ELISA test to detect anti-HEV antibodies, but our seroprevalence data is much lower than that detected in England (36%) using a different ELISA test [4–6, 30–32].

Scotto et al. (2015) reported a low frequency of acute HEV infection (IgM positive) in hemodialysis patients and transplant recipients, 0.9% and 0.8%, respectively [6]. Our study found a high percentage of HEV IgM positivity among patients on HD: 6.09% of the entire cohort and 62.5% of those who were positive for HEV IgG. None of these patients exhibited symptoms consistent with acute viral hepatitis and liver transaminases level in blood were similar to those from patients that were HEV IgM-negative. It should be noted though that there was a more pronounced change in ALT (6.75 U/l) than in AST (0.86 U/l), three months after diagnosis in those patients with HEV IgM. Whether these changes were related or not to acute infection with HEV is difficult to assess, due to the low number of patients.

Continuous exposure of HD patients to heparin could be related to higher HEV seroprevalence rates when compared to healthy controls [4]. Heparin is derived from porcine small intestine and HEV has been found in the digestive organs of these animals after experimental infection [33]. We performed PCR for HEV in a small batch of heparin samples used in these patients, but found no amplification of HEV RNA. Parenteral transmission has also been proposed as a potential explanation for higher HEV seroprevalence in this group [6]. Patients with chronic kidney disease have impaired erythropoiesis and therefore are prone to receive more blood transfusion than the general population. However, in our study, blood transfusion was not a risk factor independently associated with HEV infection. We found no significant differences in prevalence or risk factors between those on hemodialysis or peritoneal dialysis. However, the number of patients on peritoneal dialysis was quite low.

Interestingly, we did not find risk factors commonly reported to be associated with HEV infection, such as consumption of pork or sausages, drinking of tap water and traveling abroad, to correlate with HEV seropositivity. Unexpectedly, fish consumption, with a frequency of more than once per week, was the only variable independently associated with increased IgG HEV detection. A limitation of this study is that the survey did not inquire about the kind of fish consumed (sea fish, freshwater or shellfish), sources of fish or type of consumption (raw or cooked), which would have provided more information about fish consumption and routes of transmission. Although there are no studies that report an association between HEV and consumption of fish, Yugo and Meng (2013) reported that

coastal waters could be contaminated by HEV, leading to accumulation of the virus in the digestive tissues of shellfish, which could be a risk for human infection through ingestion [34]. Most often, mussels, cockles, and oysters are eaten raw or slightly cooked, and HEV is stable in both alkaline and acidic environments, as well as in frozen food for more than 10 years, and remains infectious at temperatures of up to 60 °C, suggesting that raw, poorly-cooked, or slightly steamed contaminated seafood may transmit HEV to consumers [35]. Also, high seroprevalence of HEV infection in seafood processing workers from China has been reported [36]. In that study, Cui et al. (2016) showed that direct contact with raw seafood was a significant risk factor for HEV infection [36]. Our findings, albeit interesting, are also limited by the low number of patients who reported consuming fish, and therefore larger studies addressing this risk factor will be needed.

In conclusion, our study found a higher seroprevalence of HEV IgG among patients on dialysis, but not in solid organ transplant recipients, compared with healthy controls. Chronic hepatitis due to HEV was not observed. The long-term effects of HEV exposure in liver function are still unknown and further long-term studies are needed to evaluate HEV seroprevalence and HEV RNA prevalence in the blood of immunocompromised patients as well as HEV's effect on liver physiology.

Acknowledgements We thank Belén Latzke, Andrea Bolomo and Fernando Diehl, for contributing to the data collection, and Jorge de la Fuente (Chief of Nephrology Department, Hospital Privado) for facilitating the access to patients. MBP and VER are members of the researcher career from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET – Argentina.

Compliance with ethical standards

This study was approved by the ethics committee of the Health Ministry of the Province of Córdoba (CIEIS HP 4-231/14).

Funding This study was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Gobierno de la Provincia de Córdoba to VER (PID 2012 MINCyT-Cba), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica-Foncyt and Roemmers Foundation to MBP (PICT-2014 2537), and American College of Gastroenterology, Clinical Research Award to JDD.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abrevanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J et al (2012) Hepatitis E. *Lancet* 379(9835):2477–2488
2. Murali AR, Kotwal V, Chawla S (2015) Chronic hepatitis E: A brief review. *World J Hepatol* 7(19):2194–2201
3. Nijskens CM, Pas SD, Cornelissen J, Caliskan K, Hoek RA, Hesselink RA et al (2016) Hepatitis E virus genotype 3 infection

- in a tertiary referral center in the Netherlands: Clinical relevance and impact on patient morbidity. *J Clin Virol* 74:82–87
4. Harrison A, Scobie L, Crossan C, Parry R, Johnston P, Stratton J et al (2013) Hepatitis E seroprevalence in recipients of renal transplants or haemodialysis in southwest England: a case-control study. *J Med Virol* 85(2):266–271
 5. Mobaeni AR, Mohammadi R, Sorouri R, Sadeghi K (2013) Hepatitis E virus seroprevalence in haemodialysis patients in Zanjan Province, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 19(7):608–612
 6. Scotto G, Aucella F, Grandaliano G, Martinelli D, Querques M, Gesuete A et al (2015) Hepatitis E in hemodialysis and kidney transplant patients in south-east Italy. *World J Gastroenterol* 21(11):3266–3273
 7. Pas SD, de Man RA, Mulders C, Balk AH, Van Hal PT, Weimar W et al (2012) Hepatitis E virus infection among solid organ transplant recipients, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 18(5):869–872
 8. Behrendt P, Steinmann E, Manns MP, Wedemeyer H (2014) The impact of hepatitis E in the liver transplant setting. *J Hepatol* 61(6):1418–1429
 9. Munné MS, Vladimirsky S, Otegui L, Brajterman L, Castro R, Soto S et al (2006) Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina. *Acta Gastroenterol Latinoam* 36(3):125–130
 10. Munné MS, Altabert NR, Vladimirsky SN, Moreiro R, Mares LO, Soto SS et al (2011) Identifications of polyphyletic variants in acute hepatitis suggest an underdiagnosed circulation of hepatitis E virus in Argentina. *J Clin Virol* 52(2):138–141
 11. Munné MS, Vladimirsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S et al (2006) Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol* 78(12):1579–1583
 12. Martínez Wassaf MG, Pisano MB, Barril PA, Elbarcha OC, Pinto MA, Mendes de Oliveira J et al (2014) First detection of hepatitis E virus in central Argentina: environmental and serological survey. *J Clin Virol* 61(3):334–339
 13. Rey J, Findor JA, Daruich JR, Velazco CC, Igartua EB, Schmee E et al (1997) Prevalence of IgG anti-HEV in Buenos Aires, a non endemic area for hepatitis E. *J Travel Med* 4(2):100–101
 14. Fainboim H, González J, Fassio E, Martínez A, Otegui L, Episto M et al (1999) Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat* 6(1):53–57
 15. Munné MS, Altabert NR, Otegui MLO, Vladimirsky SN, Moreiro R, Espul MP et al (2014) Updating the knowledge of hepatitis E: new variants and higher prevalence of anti-HEV in Argentina. *Ann Hepatol* 13(5):496–502
 16. Debes J, Martínez Wassaf M, Pisano MB, Isa MB, Lotto M, Marianelli LG et al (2016) Increased hepatitis E virus seroprevalence correlates with lower CD4+ cell counts in HIV-infected persons in Argentina. *PlosOne* 11(7):e0160082
 17. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW et al (2002) Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* 40(4):1326–1332
 18. Rostamzadeh Khameneh Z, Sepehrvand N, Masudi S (2011) Seroprevalence of hepatitis E among Iranian renal transplant recipients. *Hepat Mon* 11(8):646–651
 19. Hoerning A, Hegen B, Wingen AM, Cetiner M, Lainka E, Kathemann S et al (2012) Prevalence of hepatitis E virus infection in pediatric solid organ transplant recipients—a single-center experience. *Pediatr Transplant* 16(7):742–747
 20. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C et al (2011) Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* 140(5):1481–1489
 21. Legrand-Abrevanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Lhomme S, Mansuy JM, Muscari F et al (2011) Hepatitis E virus infection without reactivation in solid-organ transplant recipients, France. *Emerg Infect Dis* 17:30–37
 22. Gérolami R, Moal V, Colson P (2008) Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med* 358(8):859–860
 23. Gérolami R, Moal V, Picard C, Colson P (2009) Hepatitis E virus as an emerging cause of chronic liver disease in organ transplant recipients. *J Hepatol* 50(3):622–624
 24. Haagsma EB, Niesters HG, Van Den Berg AP, Riezebos-Brilman A, Porte JR, Vennema H et al (2009) Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Liver Transplant Recipients. *Liver Transplant* 15(10):1225–1228
 25. Junge N, Pischke S, Baumann U, Goldschmidt I, Manns M, Wedemeyer H et al (2013) Results of single-center screening for chronic hepatitis E in children after liver transplantation and report on successful treatment with ribavirin. *Pediatr Transplant* 17(4):343–347
 26. Koning L, Pas SD, de Man RA, Balk AH, de Knecht RJ, ten Kate FJ et al (2013) Clinical implications of chronic hepatitis E virus infection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 32(1):78–85
 27. Moal V, Legris T, Burtey S, Morange S, Purgus R, Dussol B et al (2013) Infection with hepatitis E virus in kidney transplant recipients in southeastern France. *J Med Virol* 85(3):462–471
 28. Riezebos-Brilman A, Puchhammer-Stöckl E, van der Weide HY, Haagsma EB, Jaksch P, Bejvl I et al (2013) Chronic hepatitis E infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 32(3):341–346
 29. Naik A, Gupta N, Goel D, Ippagunta SK, Sharma RK, Aggarwal R (2013) Lack of evidence of hepatitis E virus infection among renal transplant recipients in a disease-endemic area. *J Viral Hepat* 20(4):e138–e140
 30. Taremi M, Khoshbaten M, Gachkar L, Ehsani Ardakani M, Zali M (2005) Hepatitis E virus infection in hemodialysis patients: a seroepidemiological survey in Iran. *BMC Infect Dis* 5:36
 31. Beladi Mousavi SS, Motemednia F, Beladi Mousavi M (2014) Epidemiology of hepatitis E virus infection in patients on chronic hemodialysis. *Jundishapur J Microbiol* 7(5):e6993
 32. Uçar E, Cetin M, Kuvandik C, Helvacı MR, Güllü M, Hüzmeli C (2009) Hepatitis E virus seropositivity in hemodialysis patients in Hatay province, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 43(2):299–302
 33. Lee YH, Ha Y, Ahn KK, Chae C (2009) Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet J* 179:417–421
 34. Yugo MD, Meng XJ (2013) Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health* 10(10):4507–4533
 35. Emerson S, Arankalle V, Purcell R (2005) Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 192:930–933
 36. Cui W, Sun Y, Xu A, Gao R, Gong L, Zhang L et al (2016) Hepatitis E seroprevalence and related risk factors among seafood processing workers: a cross-sectional survey in Shandong Province, China. *Int J Infect Dis* 49:62–66