

## El virus de la hepatitis E: implicaciones zoonóticas

Nereida Jiménez de Oya, Estela Escribano-Romero, Ana Belén Blázquez y Juan Carlos Saiz

Laboratorio de Zoonosis y Virología Medioambiental. Departamento de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Madrid. España.

### RESUMEN

El virus de la hepatitis E (VHE) se transmite principalmente por vía feco-oral a través de aguas y/o alimentos contaminados, y es una de las principales causas de hepatitis agudas en el mundo. La hepatitis E presenta una elevada morbilidad, pero una baja mortalidad, excepto en mujeres embarazadas, en las que puede alcanzar el 30%. El VHE origina tanto casos esporádicos como brotes epidémicos, especialmente en muchas regiones de África, Asia y América Central. En Europa, cada vez se describen más casos autóctonos no relacionados con viajes a zonas consideradas endémicas. Además, el VHE también infecta a diversos animales, incluido el cerdo, y, recientemente, se ha demostrado su carácter zoonótico. De hecho, las secuencias de VHE porcinas y humanas de una zona determinada son más parecidas entre sí que lo que lo son con cepas de la misma especie, pero de distinta zona geográfica, y existen datos que indican que las personas en contacto con cerdos presentan una mayor prevalencia de anticuerpos específicos frente al VHE. Todo ello, ha llevado a un creciente interés por determinar la incidencia de la enfermedad en animales, su posible riesgo zoonótico y sus implicaciones para la sanidad. En el presente artículo se repasan los conocimientos actuales sobre el VHE, con especial énfasis en las posibles consecuencias de su carácter zoonótico.

### HEPATITIS E VIRUS: ZONOTIC IMPLICATIONS

The Hepatitis E virus (HEV) is transmitted primarily by the feco-oral route throughout contaminated water and/or food, and is one of the main causes of acute hepatitis worldwide. Hepatitis E shows a high mobility but a low mortality rate, except in pregnant women, where it can be as high as 30%. HEV causes sporadic cases and epidemic outbreaks, mainly in Africa, Asia and Central America. In Europe, there is an increase in the number of reported autochthonous cases not related with travel to endemic areas. In addition, HEV also infects animals, including pigs, and its zoonotic potential has been recently demonstrated. In fact, porcine and human strains of the same area are genetically more closely related to each other than to strains of the same species but a different geographical region, and there are data suggesting that people in close contact with pigs presents a higher prevalence of specific anti-HEV antibodies. All together, these data have drove to an increase interest in determining the incidence of the disease in animals, its possible zoonotic risk, and its implications for human health. In the present article we revised the current knowledge about HEV, with special emphasis in the possible consequences of its zoonotic potential.

### INTRODUCCIÓN

La hepatitis E, conocida previamente como hepatitis no A, no B de transmisión entérica, es una infección causada por el virus de la hepatitis E (VHE), cuyas características clínicas y epidemiológicas son las de una hepatitis aguda. La infección se transmite principalmente por vía fecal-oral a través de aguas contaminadas, y se manifiesta

tanto en forma de casos esporádicos como de brotes epidémicos, especialmente en áreas con condiciones sanitarias y suministro de aguas inadecuados, donde es la causa principal de hepatitis agudas. Además, en zonas consideradas como no endémicas, incluida España, cada vez se describen más casos autóctonos no relacionados con viajes a zonas endémicas. Aunque la enfermedad generalmente presenta una baja mortalidad (0,2-3%), puede llegar a ser extremadamente grave en mujeres embarazadas, en las que con frecuencia origina un fallo hepático fulminante (FHF) con tasas de mortalidad superiores al 20%, así como una elevada mortalidad temprana neonatal debida a un aborto espontáneo. La detección de la infección en animales, especialmente en

Correspondencia: Dr. J.C. Saiz.  
Laboratorio de Zoonosis y Virología Medioambiental.  
Departamento de Biotecnología. INIA.  
Ctra. de la Coruña, km 7,5. 08040 Madrid. España.  
Correo electrónico: jcsaiz@inia.es

Recibido el 12-12-2006; aceptado para su publicación el 12-12-2006.

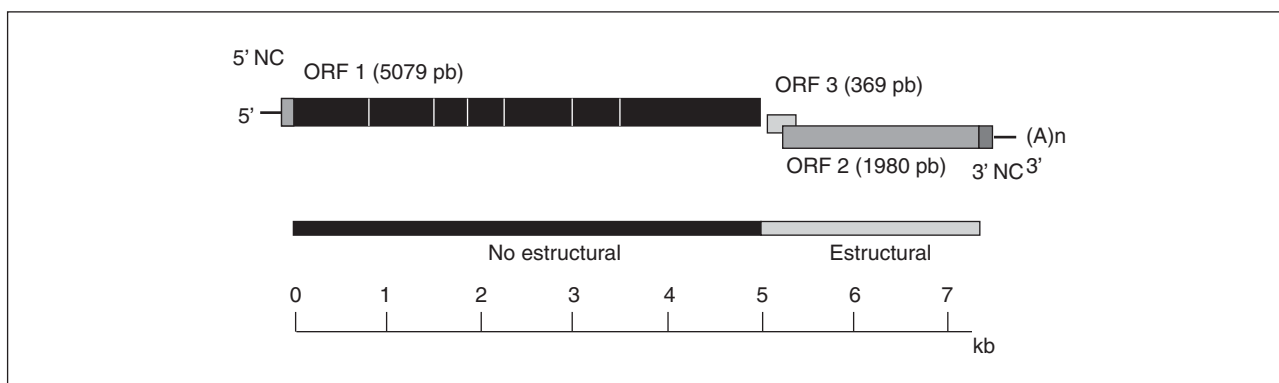


Fig. 1. Representación esquemática del genoma del virus de la hepatitis E. El ARN, de unas 7,2 kb, de cadena sencilla y polaridad positiva, codifica 3 marcos de lectura abiertos (ORF): ORF-1 codifica las proteínas no estructurales, ORF-2 es la proteína de la cápsida y ORF-3 es una proteína pequeña de función desconocida. NC: región no codificante; M: metiltransferasa; Y: dominio «Y»; P: proteasa; Pro: dominio rico en prolina que puede conferir flexibilidad; X: región hipervariable; H: helicasa; R: ARN polimerasa dependiente de ARN.

cerdos, y sus posibles consecuencias en el xenotrasplante, han alertado sobre el riesgo de transmisión zoonótica a seres humanos a través del contacto con excrementos animales y/o agua o comida contaminadas, y han puesto de manifiesto la necesidad de evaluar tales posibilidades en profundidad. Por ello, a continuación se revisan en detalle los conocimientos actuales sobre la incidencia y las características de la infección con el VHE en humanos y animales, así como sus posibles riesgos para la sanidad.

## ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E

La identidad del agente causante de la hepatitis E fue descrita por primera vez en 1990<sup>1</sup>, y un año después se publicó su genoma completo<sup>2</sup>. El VHE se clasificó inicialmente como un miembro de la familia *Caliciviridae*, pero actualmente se adscribe a la familia *Hepaviridae*<sup>3</sup>. La partícula viral es esférica, sin envuelta, de unos 32-34 nm de diámetro. El genoma está constituido por una única molécula de ARN de polaridad positiva, de unos 7,2 kb, que contiene una cola de poli-A en el extremo 3' y codifica para 3 marcos de lectura abierta superpuestos (*open reading frames* [ORF])<sup>4,6</sup> (fig. 1).

El ARN del VHE tiene una región en el extremo 5', que no se traduce, de alrededor de 27-35 nucleótidos (nt), y presenta una caperuza (*cap*) en su extremo<sup>7</sup>. A continuación se sitúa el ORF-1, que da lugar a un producto de alrededor de 1.693 aminoácidos (aa) que codifica las proteínas no estructurales con actividad enzimática involucradas en la replicación viral, la transcripción y el procesamiento proteico<sup>5</sup>. El ORF-2 se extiende a lo largo de 1.980 nt, termina 65 nt antes de una cola de poli-A, y da lugar a una proteína de 660 aa, que es la proteína estructural de la cápsida<sup>2</sup>. Diversos experimentos *in vitro* sugieren que la proteína ORF-2 se sintetiza como un precursor glucoproteico, de unos 88 kDa, que posteriormente se procesa para dar lugar a la proteína madura<sup>8,9</sup>. La proteína ORF-2 contiene epítomos que inducen anticuerpos neutra-

lizantes, localizados principalmente cerca del extremo carboxilo<sup>2</sup>. El ORF-3 se superpone en 1 nt en su extremo 5' con el ORF-1 y en 328 nt con el ORF-2. Codifica para 123 aa, que dan lugar a una proteína fosforilizada, no glucosilada, de alrededor de 13,5 kDa<sup>5</sup>. Esta fosfoproteína se asocia con el citoesqueleto hepatocelular<sup>10</sup>, formando un complejo con la proteína de la cápsida ORF-2, por lo que se cree que puede estar implicada en el ensamblaje de la partícula viral<sup>8</sup>. ORF-3 podría también tener funciones reguladoras implicadas en la modulación de la señalización celular<sup>5</sup>. Además, la proteína ORF-3 presenta, próximos a su extremo 3', epítomos neutralizantes<sup>2</sup>. En cualquier caso, hay que resaltar que la ausencia de un sistema adecuado y eficaz de cultivo celular para la replicación del VHE ha limitado el estudio del ciclo biológico del virus<sup>5</sup>.

## Variabilidad genómica

La secuencia genómica del VHE es bastante estable<sup>11</sup>. Los estudios realizados mediante el pase seriado del virus en animales no han mostrado variaciones en el genoma y, además, los aislados de un mismo brote presentan una gran similitud en sus secuencias genómicas<sup>4,6</sup>. A pesar de ello, hay datos que apoyan la naturaleza en cuasiespecies del VHE<sup>12</sup>. Por otro lado, los aislados de distintas regiones geográficas presentan secuencias genómicas diferentes. Debido a esta heterogeneidad, el VHE se ha clasificado dentro de 4 genotipos diferentes<sup>4,6,13</sup> (fig. 2). El genotipo I está presente, principalmente, en áreas endémicas de Asia y África. El genotipo II incluye los aislados de México y algunas variantes de Nigeria. Dentro del genotipo III se agrupan los aislados de regiones consideradas hasta ahora como no endémicas (Estados Unidos, Italia, Grecia...) y representan un grupo de secuencias más diverso. En España, la gran mayoría de los aislados humanos y porcinos secuenciados hasta la fecha son también de genotipo III. Por último, el genotipo IV incluye principalmente aislados de China. A pesar de esta diversidad genotípica, no hay evidencias claras de que haya di-

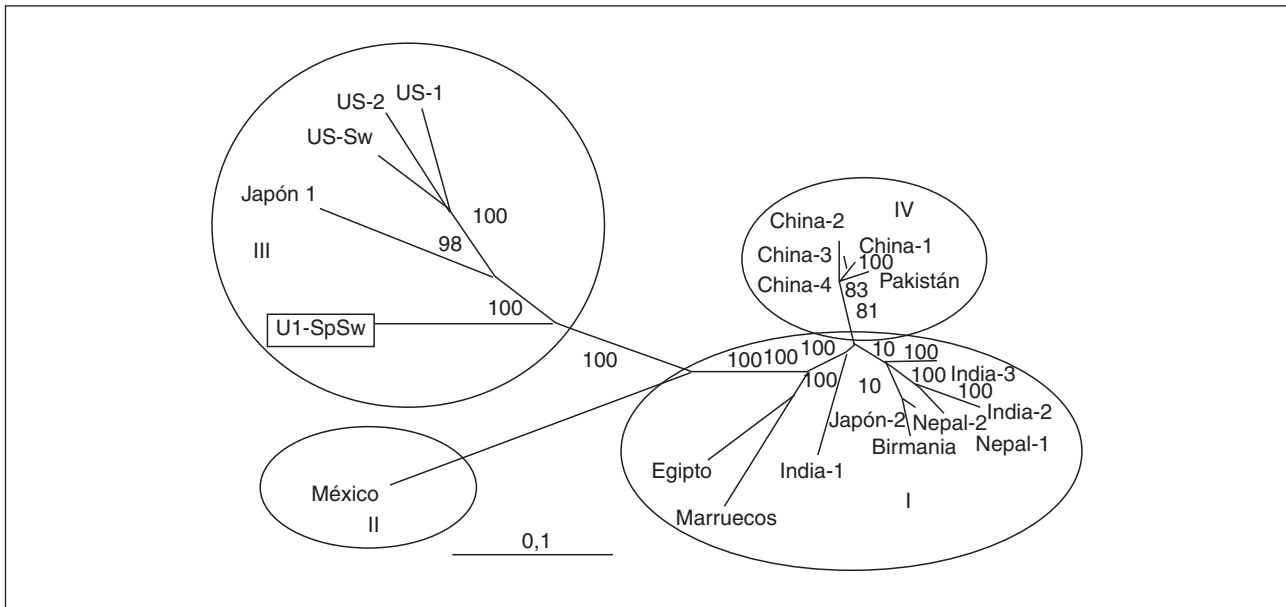


Fig. 2. Árbol filogenético basado en las secuencias genómicas porcinas y humanas correspondientes al ORF-2 completo de cepas representativas de los 4 genotipos del VHE. Los números de acceso de las secuencias al banco de datos son: US-1 (AF060668), US-2 (AF-060669), US-Sw (AF-082843), Japón-1 (AP-003430), Japón-2 (E-17119), México (M74506), Egipto (AF-051351), Marruecos (AF-65061), India-1 (X-98292), India-2 (AF-076239), India-3 (X-99441), Birmania (D1-10330), Nepal-1 (AF-051830), Nepal-2 (M-73218), Pakistán (M-80581), China-1 (D-11092), China-2 (D-11093), China-3 (L-25547), China-4 (L-25595) y U-1-Spain-Sw (M.T. Pérez-Gracia y J.C. Saiz, resultados sin publicar) que aparece en un cuadro. El árbol se realizó con el programa PHYLIP. Los números en *itálica* representan el valor de bootstrap (en porcentaje) tras 100 iteraciones. La barra representa un 10% de divergencia nucleotídica. Los círculos engloban las secuencias de genotipo I, II, III y IV.

ferencias serotípicas y, por tanto, parece que hay un único serotipo del VHE.

## HEPATITIS E

### Características clínicas

La hepatitis E presenta unas características clínicas y epidemiológicas similares a las de la hepatitis A aguda. Ambas infecciones se transmiten principalmente por vía fecal-oral a través de aguas contaminadas y se manifiestan tanto en forma de casos esporádicos como de brotes epidémicos<sup>14</sup>.

El curso clínico de la infección se describió por primera vez en un voluntario humano que ingirió una preparación obtenida a partir de un cultivo purificado procedente de un paciente con hepatitis E<sup>15</sup>. El período medio de incubación es de unos 40 días (rango, 15-60). La elevación de los valores séricos de enzimas hepáticas se produce normalmente entre 30 y 120 días después de la infección<sup>16,17</sup>. La excreción fecal del VHE comienza alrededor de una semana antes del inicio de los síntomas de la enfermedad y continúa durante 2 o 3 semanas después<sup>16,17</sup>. La fase ictericia se caracteriza por un cuadro similar al de la gripe, con malestar general, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos; también se puede observar anorexia, artralgias, astenia, heces de color arcilloso, orina de color oscuro, diarrea, prurito, exantemas cutáneos, hepatomegalia y esplenomegalia<sup>16,17</sup>. Sin embargo, la mayor parte de las in-

fecciones son asintomáticas y no hay evidencia de que la enfermedad se haga crónica<sup>14,18</sup>.

En regiones endémicas se ha estimado que la tasa total de afectados se sitúa alrededor del 2,5% en adultos y del 1,2% en niños y jóvenes<sup>19</sup>. Esta menor incidencia en la población infantil y juvenil puede ser consecuencia de infecciones anictéricas y/o subclínicas. De cualquier modo, la mortalidad es generalmente baja (del 0,2-3%).

Una de las características más llamativas de la infección por el VHE es la extrema gravedad que la enfermedad presenta en mujeres embarazadas. Si bien la prevalencia de anticuerpos frente al VHE observada en mujeres embarazadas no es superior a la de la población general, la incidencia de fallo hepático fulminante (FHF) complicado con encefalopatía y coagulación intravascular diseminada es mucho mayor, con tasas de mortalidad superiores al 20%<sup>20,21</sup>, que aumentan con el estado de gestación y llegan a doblarse durante el tercer trimestre de embarazo<sup>22</sup>. De hecho, 2 estudios independientes han mostrado el desarrollo de FHF en más del 60% de las embarazadas infectadas por el VHE<sup>22,23</sup>. Estos episodios de FHF llegan a ocasionar un 100% de mortalidad en embarazadas infectadas por el VHE, en comparación con el 50% observado en embarazadas no infectadas<sup>23</sup>. Además, las tasas de muerte temprana neonatal debidas a aborto espontáneo establecidas por la Organización Mundial de la Salud en mujeres embarazadas infectadas por el VHE se sitúan en torno al 33%<sup>21</sup>. Por otro lado, en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas, la infección por el VHE puede desencadenar una descom-

pensación hepática grave y originar encefalopatía hepática y fallo renal<sup>24,25</sup>.

### Anatomía patológica

Las primeras biopsias hepáticas obtenidas durante un brote ocurrido en Delhi en los años cincuenta<sup>19</sup> permitieron observar que un 60% de los casos presentaba alteración colestásica, caracterizada por la presencia de estasis biliar en los canalículos y en las células parenquimatosas que se disponían de forma pseudoangular, si bien otros estudios han encontrado una menor alteración degenerativa de los hepatocitos y una menor frecuencia de necrosis focal. En los pacientes que no presentan alteraciones colestásicas, se observa con mayor frecuencia un abombamiento y una degeneración acidófila de los hepatocitos y la formación de cuerpos acidófilos<sup>16</sup>.

### Patogenia

Los estudios de patogenicidad se han llevado a cabo mayoritariamente en voluntarios humanos y en modelos animales de experimentación, principalmente en primates. El virus alcanza el hígado por mecanismos aún desconocidos y, tras la replicación viral en este órgano, se acumula en la bilis, desde donde alcanza el intestino a través del conducto biliar para, posteriormente, ser excretado en las heces durante unas 2 semanas<sup>26</sup>, período durante el cual el virus también suele estar presente en el suero. De cualquier modo, el VHE se ha detectado en la sangre y las heces durante períodos más largos, de hasta 16 semanas, lo que implica que la posibilidad de que los individuos infectados asintomáticos pueden almacenar el virus y servir como reservorios de éste entre epidemias y, de esta forma, originar infecciones esporádicas entre personas o por contaminación del agua y la comida.

Actualmente, se desconoce el papel exacto de la respuesta inmune del huésped en la patogenia de las células dañadas, y aún hay una cierta controversia acerca del papel preponderante que pueden desempeñar en el daño hepático la citopaticidad propia del virus y/o la acción del sistema inmunitario<sup>27</sup>. La aparición en suero de inmunoglobulinas (Ig) M específicas frente al VHE coincide con la aparición de síntomas y se mantienen en sangre durante 2 o 3 meses. Las IgG específicas aparecen poco después que las IgM y sus valores aumentan durante la fase aguda de la enfermedad, incluso pueden detectarse en suero varios años después de la infección inicial<sup>28</sup>.

### Tratamiento

No hay un tratamiento específico para la hepatitis E. A pesar de que en modelos animales se ha logrado una inmunización pasiva mediante la administración de sueros de la fase convaleciente<sup>29</sup>, en los seres humanos la administración de inmunoglobulinas obtenidas de habitantes

de regiones endémicas para el VHE no tuvo éxito<sup>30</sup>; si bien cabe reseñar que en estos estudios no se había seleccionado el plasma y que, incluso en regiones endémicas, tanto la prevalencia como los títulos de anti-VHE suelen ser bajos. Por ello, no se puede descartar que el uso de Ig específicas frente al VHE con títulos elevados pueda ser útil, sobre todo en mujeres embarazadas y durante las epidemias.

### Vacunas

La teórica viabilidad de las vacunas frente al VHE está basada en diversas evidencias: a) después de la infección se produce un aumento de anticuerpos específicos; b) las personas infectadas por el VHE están normalmente protegidas en sucesivas epidemias; c) la experimentación con animales ha demostrado que la profilaxis basada en la inmunización pasiva induce inmunidad humoral, y d) la existencia de un único serotipo del VHE respalda la posibilidad de encontrar una vacuna que tenga una amplia reactividad cruzada. La disponibilidad de tal vacuna sería útil para proteger frente a la infección por el VHE, sobre todo en mujeres embarazadas y en los habitantes de las regiones endémicas y viajeros a estas áreas. Sin embargo, la ausencia de un cultivo celular susceptible al VHE ha impedido el uso de vacunas con virus vivos atenuados o inactivados<sup>31</sup>, de modo que, hasta la fecha, no se dispone de vacunas comerciales frente al virus de la hepatitis E.

La mayoría de las investigaciones encaminadas al desarrollo de vacunas frente al VHE se basan en el uso de la proteína ORF-2 completa, o de péptidos de ésta, dado que posee epítomos que inducen anticuerpos neutralizantes capaces de reconocer epítomos presentes en los diferentes genotipos<sup>31-34</sup>. La expresión de candidatos vacunales se ha llevado a cabo en distintos sistemas celulares, incluidas las células de mamífero, de insecto, de levadura, bacterianas y vegetales<sup>31,33</sup>. Los ensayos realizados en modelos animales de experimentación han mostrado que la administración de algunas de estas proteínas recombinantes del ORF-2 protegen frente al desafío tanto con virus homólogos como heterólogos<sup>29,35-37</sup>. Así, por ejemplo, se ha demostrado que la expresión en el sistema de baculovirus de una forma truncada del ORF-2, que da lugar de forma espontánea a partículas similares a las virales (*viral-like particles* [VLP]), es un buen inmunógeno<sup>38,39</sup>. En la actualidad, alguno de estos candidatos vacunales está siendo utilizado en ensayos preclínicos.

### EPIDEMIOLOGÍA

Puesto que el VHE se transmite principalmente por la vía fecal-oral, la mayoría de las epidemias se pueden asociar con brotes que tienen su origen en el agua, principalmente en países en vías de desarrollo con clima templado, alta densidad de población y deficientes condiciones sanitarias. De hecho, el VHE es endémico en muchas regiones de Asia, Oriente Medio, norte de África y América Central<sup>5,6</sup>,

aunque que cada vez se describen más casos esporádicos en regiones consideradas no endémicas, incluida España<sup>18,34</sup>.

El primer brote documentado del VHE ocurrió en Delhi (India) entre 1955 y 1956<sup>19</sup>. En él se registraron unos 29.000 casos de hepatitis icterica que inicialmente se atribuyeron a una infección por el virus de la hepatitis A (VHA). Con posterioridad, se confirmó que en realidad se debieron a una infección por el VHE que había contaminado las aguas residuales vertidas al río que suministraba el agua a las plantas potabilizadoras de la ciudad, lo que confirma que el tratamiento con cloro aplicado prevenía la contaminación bacteriana, pero no la originada por el VHE<sup>40</sup>. Una de las mayores áreas epidémicas es China, donde se han descrito, al menos, 11 grandes brotes. El de mayor magnitud ocurrió entre 1986 y 1988, y originó unos 119.000 casos y más de 700 muertes.

Hasta hace poco, en los países considerados no endémicos, la mayoría de los casos descritos correspondían a pacientes que habían viajado recientemente a zonas endémicas; sin embargo, en los últimos años cada vez se describen más casos de hepatitis E esporádicas en pacientes que nunca han viajado a dichas zonas<sup>18,34</sup>, incluida España, donde en los últimos años cada vez se están reportando más casos de hepatitis E esporádicas autóctonas en personas que no presentaban otros factores de riesgo epidemiológico<sup>41-44</sup>. Es factible que este aumento en el número de casos descritos se deba a una combinación de factores, como los siguientes: la adscripción de casos previos considerados como hepatitis agudas de etiología desconocida (al no haberse analizado anteriormente la presencia de marcadores específicos del VHE); el hecho de que las IgG específicas pueden llegar a ser indetectable con el paso del tiempo, en sólo 3 o 4 meses, e incluso no detectarse en ningún momento de la infección; la mayor disponibilidad de sistemas de diagnóstico; el aumento del turismo y de la inmigración proveniente de zonas endémicas, etc.

### Seroprevalencia

La prevalencia total de anticuerpos frente al VHE en países endémicos es bastante variable (del 3-27%), aunque menor que la esperada<sup>4,45,46</sup>. A diferencia de otros virus entéricos, como el de la polio o el VHA, la prevalencia de IgG anti-VHE es menor en los niños y jóvenes que en los adultos<sup>47,48</sup>. Una posible explicación a este hecho podría ser que la inmunidad frente al VHE adquirida en infecciones subclínicas durante la infancia desaparece con el tiempo<sup>20</sup>. En áreas no endémicas, con buenas condiciones sanitarias y de control del abastecimiento de aguas, la prevalencia de anticuerpos anti-VHE en la población general es relativamente elevada (hasta de un 7-10%), incluso mayor que la descrita en algunas áreas endémicas<sup>13,34,49</sup>. En Europa occidental, los datos más recientes que se están recogiendo en el programa EVENT de la Unión Europea, en el que nuestro país participa activamente, indican que los porcentajes de seropositividad entre los pacientes con hepatitis agudas virales están en torno al 4-8%. En España (tabla I), los primeros estudios realizados en donantes de

**TABLA I. Prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis E en distintos grupos de población española**

Población	+/total	(%)	Referencia
Donantes de sangre	24/863	2,8	47
Población sana	3/54	5,5	55
Mujeres embarazadas caucásicas	2/235	0,8	57
Mujeres embarazadas no caucásicas	2/99	2	57
Población subsahariana inmigrante	4/90	4,4	58
Pacientes en hemodiálisis	4/63	6,3	47
Pacientes infantiles transfundidos	0/42	0	47
Pacientes hemofílicos	0/55	0	55
Pacientes con alteración de los valores de enzimas hepáticas*	30/336	8,9	56
Pacientes con hepatitis viral aguda	22/362	6,1	55
Hepatitis A	10/244	4,1	55
Hepatitis B y/o D	3/48	6,2	55
Hepatitis no A-no C	5/90	5,6	55

En todos los estudios se determinó la presencia de IgG específicas, salvo en\*, donde se determinó la IgM específica.

sangre mostraron una prevalencia de IgG anti-VHE del 2,8%<sup>50</sup>, ligeramente inferior a la encontrada en personas sanas (5,5%) y en pacientes con hepatitis agudas de distinta etiología (6%)<sup>51</sup>. Recientemente, se ha descrito una prevalencia de IgM específica del 9% en pacientes con alteraciones en los valores de enzimas hepáticas y ausencia de marcadores de otros virus hepatotrópicos<sup>52</sup>.

Por otra parte, se ha postulado que el aumento de casos de hepatitis E podría estar relacionado con la llegada de población inmigrante proveniente de zonas endémicas; sin embargo, los datos obtenidos en nuestro país no parecen indicar que dicha población deba considerarse como una fuente clara de riesgo de transmisión del VHE (tabla I). En un estudio reciente<sup>53</sup> no se apreciaron diferencias significativas en la prevalencia de IgG anti-VHE entre mujeres embarazadas de raza caucásica (0,6%) y no caucásica (2%). De igual modo, los porcentajes de seropositividad (5,5%) encontrados entre la población asintomática subsahariana inmigrante tampoco difieren de los establecidos para otros grupos de población autóctona<sup>54</sup>.

En cualquier caso, hay que resaltar que las diferencias en el diseño de los estudios (estado de salud, variables demográficas, etc.) dificultan la comparación de los datos recogidos; además hay resultados contradictorios que cuestionan la fiabilidad de los ensayos de diagnóstico usados para la detección de anti-VHE en los diferentes estudios<sup>5,6,34</sup>. Por tanto, para poder disponer de datos fiables sobre la incidencia real de infección por el VHE, es necesario realizar análisis de poblaciones bien seleccionadas y utilizar reactivos bien estandarizados.

### DIAGNÓSTICO

#### Detección serológica

El inmunoanálisis enzimático (ELISA) es la herramienta de diagnóstico principal para la detección de IgG e IgM anti-VHE<sup>4</sup>. En general, un resultado positivo para IgM anti-VHE<sup>4</sup> es indicativo de una hepatitis E en fase aguda; por tanto, para evitar falsos negativos, los análisis se deberían hacer durante dicha fase de la infección. Aunque la detec-

ción de IgG anti-VHE no es una prueba concluyente de que haya una infección por el VHE, el diagnóstico de hepatitis E aguda puede estar apoyado en la detección de IgG con títulos elevados, o en el incremento de dichos títulos en muestras consecutivas. En general, las muestras positivas deben de ser confirmadas mediante ensayos de *immunoblot*. Una vez establecida la presencia de varios dominios antigénicos en los 3 ORF del VHE, para la detección de anticuerpos anti-VHE se están empleando diferentes péptidos sintéticos y proteínas recombinantes derivadas de los extremos carboxilo del ORF-2 y el ORF-3<sup>34</sup>. Dada la elevada prevalencia descrita mundialmente, incluso en países no endémicos, se ha especulado con la posibilidad de que estos ensayos estén detectando también anticuerpos no específicos que presentan una reactividad cruzada<sup>34,55</sup>; sin embargo, los análisis más recientes indican que, en general, tienen una buena especificidad, sensibilidad y reproducibilidad<sup>5,55,56</sup>. En la actualidad, únicamente hay disponibles 2 sistemas comerciales de ELISA: uno de los laboratorios Genelabs que utiliza 4 fragmentos proteicos recombinantes obtenidos de los ORF-2 y ORF-3 de una cepa prototipo birmana de genotipo I y de una cepa mexicana de genotipo II, y otro de los laboratorios Abbott, que emplea 2 proteínas recombinantes del ORF-2 y el ORF-3 del prototipo birmano. Ninguno de estos sistemas incorpora proteínas recombinantes del genotipo III, el más prevalente en España y en Europa y, a pesar de la relativamente escasa diferencia aminoacídica entre los distintos genotipos, es posible que estos sistemas no sean los más adecuados para su utilización con muestras de individuos infectados con este genotipo.

### DetECCIÓN MOLECULAR

La detección del VHE por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es un claro indicador de infección activa. La disponibilidad de un número cada vez mayor de secuencias del VHE de diferentes orígenes y regiones geográficas ha propiciado el diseño de cebadores oligonucleótidos específicos que permiten la detección del VHE, mediante RT-PCR «case-ras», en sueros de la fase aguda, bilis, tejidos, heces y aguas contaminadas y residuales<sup>6,18,57</sup>. Sin embargo, hay que destacar que para la detección del VHE en aguas, y debido a que los posibles patógenos contaminantes están normalmente muy diluidos, se deben aplicar previamente procedimientos de concentración eficientes y métodos de detección muy sensibles<sup>58</sup>. En los últimos años, también se han descrito diversos métodos de detección por RT-PCR a tiempo real<sup>59-63</sup> y mediante el uso de microchips<sup>64</sup>.

## TRANSMISIÓN

### Agua

El VHE se transmite principalmente por la vía fecal-oral, de modo que las epidemias de hepatitis E en áreas endé-

micas se deben generalmente a aguas contaminadas fecalmente<sup>18,65</sup>. Las circunstancias óptimas para que ocurran epidemias de hepatitis E se dan cuando las aguas residuales sin tratar entran en contacto con el agua potable durante las épocas de fuertes lluvias, inundaciones, monzones, etc. Tal fue el caso de la epidemia de Delhi (India) ocurrida durante los años cincuenta, que estuvo precedida de fuertes lluvias e inundaciones<sup>19</sup> y en la que las tuberías con filtraciones pusieron el agua potable en contacto con suelos contaminados y aguas residuales<sup>66</sup>. En la mayoría de los casos, las personas afectadas por los brotes de hepatitis E viven en condiciones sanitarias precarias y cerca de algún río<sup>67</sup>, de manera que hay una correlación directa entre una incidencia elevada de serología positiva para el VHE y el uso de aguas superficiales sin hervir para el consumo, la condimentación de alimentos o la higiene personal. Asimismo, la gente que habita campamentos de refugiados y suburbios urbanos abarrotados tiene mayor riesgo de contraer enfermedades de transmisión fecal-oral, incluidas las infecciones por el VHE<sup>66,68</sup>. Por ejemplo, en la población de desplazados de Darfur (Sudán) se han registrado, en sólo 6 meses, más de 2.600 casos de hepatitis E que han originado 45 muertes, incluidas 19 mujeres embarazadas<sup>69,70</sup>. Otro ejemplo del riesgo que pueden ocasionar las aguas contaminadas lo representa el hecho de que el VHE se detectara en las aguas residuales que fluían hacia las plantas potabilizadoras de Madrás (India) y en alrededor del 80% de las aguas efluentes de dichas plantas, lo que confirma que los tratamientos aplicados a las aguas de consumo no era tan efectivos como debían.

Más recientemente, algunos estudios han descrito la presencia de partículas virales y/o ARN del virus en aguas residuales de ciudades y de mataderos de ganado porcino de países industrializados, incluida España<sup>71-73</sup>. Sin embargo, estudios posteriores no han confirmado que haya un riesgo de infección a través de este tipo de aguas contaminadas por el VHE en países industrializados. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en Estados Unidos no se detectó el VHE en aguas de consumo o en aguas superficiales recogidas en granjas de cerdos que estaban afectados por el VHE<sup>74</sup>. Esta discrepancia de resultados puede reflejar la dificultad que entraña la detección de patógenos en muestras de aguas, donde normalmente se encuentran muy diluidos, y pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo estudios sistemáticos que permitan determinar con claridad el riesgo que pueden representar estas aguas contaminadas en los países no endémicos.

### De persona a persona

La incidencia de transmisión de persona a persona es baja<sup>65,67,68</sup>. Los casos documentados de pacientes con VHE miembros de una misma familia suponen entre el 1 y el 2% del total de casos descritos<sup>65</sup>. Por el contrario, los datos de la tasa de transmisión del VHE de madre a hijo, aunque variables, son en general elevados (del 30-100%)<sup>24,75</sup>, y se ha descrito que hasta dos tercios de las

mujeres embarazadas podrían sufrir partos prematuros<sup>24</sup>, con una elevada mortalidad neonatal<sup>21</sup>. También se ha detectado ARN del VHE en la sangre de recién nacidos cuando el virus no se podía detectar en las madres<sup>75</sup>. En cuanto a la transmisión de persona a persona en hospitales, los datos disponible son contradictorios, tanto sobre la incidencia de infección por el VHE en pacientes hospitalizados como en la población con riesgo de infección a través de sangre contaminada<sup>18</sup>. En nuestro país, los datos obtenidos en varios estudios no han encontrado diferencias significativas entre los pacientes sanos y los pacientes con riesgo de adquisición de infecciones por vía sanguínea<sup>50,51</sup> (tabla I).

### Comida

El lavado, el riego y la preparación de la comida con agua contaminada con el VHE puede llevar a la aparición de brotes de hepatitis E, especialmente si la comida se consume sin cocinar o si los manipuladores de ésta están infectados por el virus y no guardan las medidas higiénicas apropiadas. De cualquier modo, hasta fecha reciente, los casos de hepatitis E agudas asociados al consumo de alimentos eran escasos; por ejemplo, un brote ocurrido en Sicilia (Italia), que fue atribuido al consumo de marisco contaminado<sup>76</sup>, la descripción de casos de hepatitis E aguda tras la ingestión de hierbas medicinales chinas<sup>77</sup> o, más recientemente, algunos casos de hepatitis esporádica aguda, o fulminante, ocurridos en Japón y relacionados con el consumo de hígado de cerdo y carne de jabalí crudas<sup>78,79</sup>. Finalmente, la demostración definitiva del riesgo de infección que puede representar la comida la ha aportado la descripción de varios casos de hepatitis E aguda tras el consumo de carne cruda de ciervo infectado por el VHE<sup>80</sup>. En este estudio, 4 de los 5 individuos que consumieron la carne infectada presentaron hepatitis, mientras que los 3 miembros restantes de la familia, que no la habían consumido, no se llegaron a infectar. Además, el único niño que no se infectó a pesar de haber comido carne de ciervo declaró haber ingerido una porción muy pequeña, lo que apoya la teoría de que la infección por el VHE es dependiente de la dosis. Los análisis de la secuencia del VHE obtenidas de los pacientes y de la carne de ciervo que sobró y se guardó congelada mostraron, en la mayoría de los casos, un 100% de homología genómica<sup>80</sup>.

### ZONOSIS

La primera descripción de la presencia de anticuerpos anti-VHE en cerdos y la caracterización del VHE porcino se remontan a los años noventa<sup>81-83</sup>. Posteriormente, la infección experimental de cerdos con VHE porcino, o con aislados de humanos, 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 enfermedad<sup>84,85</sup>. Recientemente, un estudio reali-

zado en Cataluña con cerdos infectados de forma natural por el VHE ha mostrado que el 32% de los animales presentaba una hepatitis leve o moderada, y que en el 68% de ellos se podía detectar el ARN del VHE en, al menos, uno de los tejidos analizados<sup>86</sup>. La detección fue más frecuente en la bilis, seguida de los ganglios linfáticos mesentéricos y el hígado y, en menor medida, en las heces y el suero, lo que indica que la mayoría de las muestras positivas no se podrían haber testado en animales vivos.

Los primeros estudios de seroprevalencia en ganado porcino de Estados Unidos encontraron unos porcentajes de seropositividad del 35% en los animales, y se observó además que en más de la mitad de las piaras había animales seropositivos<sup>87</sup>. Posteriormente, estudios realizados en América, Asia y Oceanía han mostrado también unas prevalencias muy elevadas, entre el 20 y el 100%<sup>13</sup>. En España, los primeros resultados mostraron una prevalencia de anticuerpos anti-VHE en cerdos de alrededor del 25%<sup>72</sup>. Los datos que estamos obteniendo en colaboración con la Dra. O. Gironés (UPIE, F. Veterinaria, Universidad de Zaragoza) indican que la prevalencia de IgG anti-VHE en la cabaña porcina es de alrededor del 28%, y es mayor en animales adultos (33%) que en jóvenes (16%).

Por otra parte, la detección del ARN del VHE en heces y sueros porcinos es mucho mayor en animales jóvenes (de 1-4 meses de edad) que en adultos. Los primeros datos obtenidos en Holanda<sup>88</sup> indicaban que el ARN del VHE se detectaba en heces en el 22% de las 105 granjas analizadas. Datos similares se están obteniendo en el ganado porcino de diversos países europeos (proyecto EVENT), de modo que alrededor del 20-50% de los cerdos analizados excretan ARN del VHE en las heces. En España, se ha descrito la presencia de ARN del VHE en alrededor del 23% de las heces de los animales jóvenes analizados (de entre 0 y 24 semanas de edad), y es prácticamente del 60% en los animales de entre 9 y 12 semanas de edad<sup>89</sup>. También se detectó en el estiércol del 50% de las granjas analizadas. Nuestros propios resultados (O. Gironés y J.C. Saiz, datos sin publicar) muestran la presencia de ARN del VHE de genotipo III en el suero de alrededor del 25% de los cerdos jóvenes analizados. Todos estos datos indican que el VHE está diseminado en la población porcina mundial, y no sólo en la de los países considerados endémicos.

La observación de la elevada incidencia de la infección por el VHE en ganado porcino dio origen a los primeros estudios de vigilancia epidemiológica en personas que estaban en contacto directo con cerdos. Los primeros estudios llevados a cabo en regiones endémicas (China, Tailandia...) en un número muy reducido de ganaderos mostraron una prevalencia muy elevada, entre el 50 y el 100%<sup>13</sup>. Los estudios posteriores, realizados en países industrializados considerados no endémicos, han reducido los porcentajes de seropositividad, aunque éstos se han mantenido elevados. Así, los análisis iniciales realizados en Estados Unidos indicaban que la prevalencia de anticuerpos anti-VHE era mayor en veterinarios que estaban en contacto con cerdos (26%) que en donantes de sangre (18%)<sup>48</sup>. Un estudio posterior describió una seroprevalen-

cia del 35% en cerdos, y del 11% en personas que estaban en contacto con cerdos (granjeros, veterinarios...), frente al 2,5% encontrado en personas que no lo estaban<sup>90</sup>. Otro estudio más reciente realizado en China ha descrito que el riesgo de infección por el VHE es un 74% mayor en los trabajadores que realizan actividades relacionadas con la cría de cerdos que en los que se dedican a otras ocupaciones<sup>91</sup>. Aunque varios estudios más han aportado resultados similares<sup>13</sup>, cabe destacar también que en otras regiones no endémicas, como Suecia<sup>92</sup>, no se han observado diferencias estadísticas entre los granjeros del sector porcino (13%) y los sujetos control (9,3%).

Así pues, la sugerencia inicial de que el VHE podría tratarse de un agente potencialmente zoonótico se ha visto reforzada con los datos más recientes: *a)* la prevalencia de anticuerpos anti-VHE en piaras, tanto de áreas endémicas como no endémicas, es muy elevada; *b)* el VHE se ha detectado en aguas residuales contaminadas con heces porcinas; *c)* hay datos que sugieren que las personas que consumen agua superficiales próximas a granjas porcinas tiene un mayor riesgo de infección por el VHE, al igual que parece ocurrir con los trabajadores relacionados con explotaciones porcinas, y *d)* los aislados de cerdo están más relacionados genéticamente con las variantes humanas de la misma región geográfica, que con cepas porcinas de otras partes del mundo. Finalmente, la demostración definitiva del carácter zoonótico del VHE fue, tal y como se ha comentado anteriormente, la descripción de casos de hepatitis aguda tras la ingesta de carne cruda de ciervo infectado por el VHE<sup>80</sup>.

Además de en cerdos, la infección por el VHE se ha detectado en otras especies animales. Así, la presencia de anticuerpos específicos se ha descrito en el 44-90% de las ratas testadas en Estados Unidos<sup>93-95</sup>, en el 12% de las del Nepal<sup>96</sup> y en el 9% de las de Vietnam, donde también se detectó en el 44% de las gallinas y en el 27% de los perros analizados<sup>97</sup>. Del mismo modo, la infección se ha descrito en el 29-62% del ganado vacuno de regiones tan diversas como Somalia, Ucrania, Tayikistán y Turkmenistán<sup>98</sup>, y en el 4-7% de la India, donde también se ha encontrado en el 22% de los perros y en el 2-22% de las ratas<sup>99</sup>. Por otra parte, el 33% de los gatos estudiados en Japón presentó una serología positiva<sup>100</sup>. En España, se acaban de publicar datos que indican que el 24% de los perros analizados eran seropositivos<sup>101</sup>. A pesar de ello, de entre todas estas especies, el ARN del VHE sólo se ha aislado de humanos, cerdos y roedores y, en todos los casos, las secuencias obtenidas en una región determinada son muy similares, independientemente de la especie de procedencia. Hace poco se ha descrito un VHE aviar<sup>102</sup> que, aunque genéticamente está menos relacionado con el VHE humano que el porcino, comparte epítomos antigénicos con ambos<sup>103</sup>. Todas estas observaciones han reforzado la hipótesis de que el VHE es un agente zoonótico, aunque la probabilidad de una transmisión zoonótica a humanos a través del contacto con excrementos animales y/o de aguas contaminadas necesita todavía ser evaluada de forma más exhaustiva.

## Xenotrasplante

En la actualidad se desconoce cuál es el órgano primordial de replicación del VHE en el cerdo, pero se sabe que el virus replica en el hígado<sup>104</sup>, uno de los principales órganos candidatos a ser utilizados en xenotrasplantes. Asimismo, mediante RT-PCR, se ha detectado la banda negativa del ARN del virus, lo que es indicativo de que se está produciendo una replicación viral no sólo en el hígado, sino también en el intestino delgado, el colon, el bazo, los riñones y en diversos nódulos linfáticos<sup>105</sup>. Así pues, hay un riesgo teórico de que se produzca una xenozoonosis como consecuencia del trasplante a humanos de órganos de cerdo infectados por el VHE y/o de una posible ulterior transmisión entre humanos. Además del posible riesgo de infección mediante el órgano trasplantado, también hay un riesgo teórico de que dicho órgano esté dañado, lo que limita su utilidad para el receptor. Es más, aunque el VHE parece ocasionar infecciones subclínicas en los cerdos, no se puede descartar que su patogenicidad se viera alterada en un receptor inmunodeprimido. De cualquier modo, el riesgo de xenozoonosis debida al VHE es en estos momentos una mera hipótesis que, muy probablemente, llegado el caso, podría prevenirse mediante la utilización de animales bien seleccionados a los que se les aplicaran sistemas de escrutinio del VHE adecuados.

## CONCLUSIONES

La mortalidad en mujeres embarazadas y la morbilidad y trastornos en la población general asociadas con la hepatitis E son preocupantes, principalmente en áreas endémicas donde las pérdidas económicas y de productividad pueden resultar elevadas. Debido a que el VHE se transmite principalmente por aguas contaminadas, para la prevención de las infecciones por el VHE es muy importante la mejora en la calidad de las aguas, especialmente el apropiado tratamiento de las residuales. En áreas endémicas, medidas tan sencillas como hervir el agua y mantener costumbres de higiene personal y alimenticia, pueden ayudar a controlar la hepatitis E. En los países industrializados, con tratamientos de aguas apropiados y buenas condiciones sanitarias e higiénicas, es poco probable que se produzcan epidemias de hepatitis E. El principal riesgo podría venir del uso de vegetales, frutas y otros productos importados de regiones endémicas, donde las aguas que se usan para el riego y el lavado muy probablemente están tratadas de manera insuficiente, o contaminadas con aguas residuales o heces animales. Por otro lado, la posible transmisión zoonótica del VHE puede contribuir también a una continua propagación del virus. Por tanto, para la prevención del riesgo zoonótico, es necesario profundizar en el conocimiento y las consecuencias que las infecciones causadas por el VHE tienen en los animales domésticos y silvestres.

El riesgo de una diseminación zoonótica del virus, el aumento de casos esporádicos en zonas consideradas no endémicas, tal como parece estar ocurriendo en Europa, y el



continuo aumento en el número de brotes en regiones endémicas conllevan que cada vez haya un mayor interés en comprender mejor la biología y el comportamiento del VHE, así como en mejorar las herramientas diagnósticas disponibles.

## AGRADECIMIENTOS

Algunos de los datos expuestos han sido obtenidos durante el desarrollo de los proyectos AGL2004-06071, CSD2006-0007-CONSO-LIDER y EVENT. N.J.O. disfruta de una beca predoctoral del INIA y E.E.R. de un contrato «Juan de la Cierva».

## BIBLIOGRAFÍA

1. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1990;247:1335-9.
2. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 1991;185:120-31.
3. Mayo MA, Ball LA. ICTV in San Francisco: a report from the Plenary Session. *Arch Virol*. 2006;151:413-22.
4. Worm HC, Van der Poel WH, Brandstatter G. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect*. 2002;4:657-66.
5. Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*. 2003;13:145-54.
6. Schlauder G. Viral hepatitis: molecular biology, diagnosis, epidemiology and control. En: Mushahwar A, editor. *Perspective in medial virology*. Amsterdam: Elsevier; 2004. p. 199-222.
7. Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol*. 1999;73:8848-50.
8. Jameel S, Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol*. 1996;70:207-16.
9. Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, Panda SK, Jameel S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol*. 1999;73:4074-82.
10. Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol*. 1997;71:9045-53.
11. Arankalle VA, Paranjape S, Emerson SU, Purcell RH, Walimbe AM. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). *J Gen Virol*. 1999;80:1691-700.
12. Grandadam M, Tebbal S, Caron M, Siriwardana M, Larouze B, Koeck JL, et al. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol*. 2004;85:3189-94.
13. Meng XJ. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2003;278:185-216.
14. Purcell R, Emerson S. Hepatitis E virus. En: Fields BN, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2001. p. 2831-43.
15. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20:23-31.
16. Krawczynski K, Kamili S, Aggarwal R. Global epidemiology and medical aspects of hepatitis E. *Forum (Génova)*. 2001;11:166-79.
17. Skidmore S. Overview of hepatitis E virus. *Curr Infect Dis Rep*. 2002;4:118-23.
18. Smith JL. A review of hepatitis E virus. *J Food Prot*. 2001;64:572-86.
19. Vishwanathan R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-1956). A critical study: epidemiology. *Ind J Med Res*. 1957;45 Suppl:1-29.
20. Craighead JE. Pathology and pathogenesis of human viral disease. San Diego: Academic Press; 2000.
21. Previsani N, Lavanchy D. Hepatitis E. Genève: World Health Organization. Department of Communicable Disease Surveillance and Response; 2001.
22. Khuroo MS, Kamili S. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat*. 2003;10:61-9.
23. Singh S, Mohanty A, Joshi YK, Deka D, Mohanty S, Panda SK. Mother-to-child transmission of hepatitis E virus infection. *Indian J Pediatr*. 2003;70:37-9.
24. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS. Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*. 2004;85:240-4.
25. Monga R, Garg S, Tyagi P, Kumar N. Superimposed acute hepatitis E infection in patients with chronic liver disease. *Indian J Gastroenterol*. 2004;23:50-2.
26. Aggarwal R, Naik SR. Faecal excretion of hepatitis E virus. *Lancet*. 1992;340:787.
27. Purcell RH, Emerson SU. Animal models of hepatitis A and E. *Ilar J*. 2001;42:161-77.
28. Clayton ET, Myint KS, Snitbhan R, Vaughn DW, Innis BL, Chan L, et al. Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis*. 1995;172:927-33.
29. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Govindarajan S, Shapiro M, Gerin JL, et al. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:10198-202.
30. Khuroo MS, Dar MY. Hepatitis E: evidence for person-to-person transmission and inability of low dose immune serum globulin from an Indian source to prevent it. *Indian J Gastroenterol*. 1992;11:113-6.
31. Wang L, Zhuang H. Hepatitis E: an overview and recent advances in vaccine research. *World J Gastroenterol*. 2004;10:2157-62.
32. Meng J, Dai X, Chang JC, Lopareva E, Pillot J, Fields HA, et al. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology*. 2001;288:203-11.
33. Emerson SU, Purcell RH. Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol Med*. 2001;7:462-6.
34. Worm HC, Schlauder GG, Brandstatter G. Hepatitis E and its emergence in non-endemic areas. *Wien Klin Wochenschr*. 2002;114:663-70.
35. Purdy MA, McCaustland KA, Krawczynski K, Spelbring J, Reyes GR, Bradley DW. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol*. 1993;41:90-4.
36. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Govindarajan S, Shapiro M, Gerin JL, et al. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine*. 1997;15:1834-8.
37. Im SW, Zhang JZ, Zhuang H, Che XY, Zhu WF, Xu GM, et al. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine*. 2001;19:3726-32.
38. Xing L, Kato K, Li T, Takeda N, Miyamura T, Hammar L, et al. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology*. 1999;265:35-45.
39. Li T, Takeda N, Miyamura T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine*. 2001;19:3476-84.
40. Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet*. 1980;2:876-9.
41. Romero Gómez M, Suárez García E, Vargas J, Castro Fernández M. Un caso de hepatitis aguda E en Sevilla. *Gastroenterol Hepatol*. 1997;20:217-8.
42. Sánchez M, Moreno M, García Avello A, Mateos M. Dos nuevos casos de hepatitis E autóctonos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002;20:136-8.
43. Buti M, Clemente-Casares P, Jardi R, Formiga-Cruz M, Schaper M, Valdes A, et al. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol*. 2004;41:126-31.
44. Mateos ML, Molina A, Ta TH, Moreira V, Milicica JM, Bárcena R. Hepatitis aguda E en Madrid: descripción de 18 casos. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29:397-400.
45. Purcell RH. Hepatitis viruses: changing patterns of human disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:2401-6.

46. Purcell RH, Nguyen H, Shapiro M, Engle RE, Govindarajan S, Blackwelder WC, et al. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine*. 2003;21:2607-15.
47. Arankalle VA, Tsarev SA, Chadha MS, Alling DW, Emerson SU, Banerjee K, et al. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J Infect Dis*. 1995;171:447-50.
48. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol*. 2002;40:117-22.
49. Abe K, Li T-C, Ding X, Win KM, Shrestha PK, Quang VX, et al. International collaborative survey on epidemiology of hepatitis E virus in 11 countries. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006;37:90-5.
50. Mateos ML, Camarero C, Lasa E, Teruel JL, Mir N, Baquero F. Hepatitis E virus: relevance in blood donors and risk groups. *Vox Sang*. 1999;76:78-80.
51. Buti M, Jardi R, Cotrina M, Rodríguez-Frías F, Troonen H, Viladomiu L, et al. Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. *J Virol Methods*. 1995;55:49-54.
52. Pérez-Gracia MT, García-Valdivia MS, Galán F, Rodríguez-Iglesias MA. Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol*. 2004;48:197-200.
53. Suárez González A, Solís Sánchez G, Otero Guerra L, Viejo de la Guerra G, Álvarez Navascues C. Prevalence of immunity to hepatitis viruses in pregnant women from the health area of Gijón (Spain). *Gastroenterol Hepatol*. 2004;27:347-52.
54. Tarrago D, López-Vélez R, Turrientes C, Baquero F, Mateos ML. Prevalence of hepatitis E antibodies in immigrants from developing countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19:309-11.
55. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology*. 1998;27:857-61.
56. Myint KS, Endy TP, Gibbons RV, Laras K, Mammen MP Jr, Sedyaningsih ER, et al. Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1581-3.
57. Meng J, Dubreuil P, Pillot J. A new PCR-based seroneutralization assay in cell culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1373-7.
58. Jiménez-Clavero MA, Escribano-Romero E, Mansilla C, Gómez N, Córdoba L, Roblas N, et al. Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:3536-43.
59. Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, Poirson H, Dubois M, Miedouge M, et al. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol*. 2004;74:419-24.
60. Orru G, Masia G, Romano L, Piras V, Coppola RC. Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J Virol Methods*. 2004;118:77-82.
61. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*. 2006;131:65-71.
62. Enouf V, Dos Reis G, Guthmann JP, Guerin PJ, Caron M, Marechal V, et al. Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J Med Virol*. 2006;78:1076-82.
63. Ahn JM, Rayamajhi N, Gyun Kang S, Sang Yoo H. Comparison of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nested or commercial reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;24:17-9.
64. Liu HH, Cao X, Yang Y, Liu MG, Wang YF. Array-based nano-amplification technique was applied in detection of hepatitis E virus. *J Biochem Mol Biol*. 2006;39:247-52.
65. Aggarwal R, Naik SR. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J Hepatol*. 1994;21:718-23.
66. Khuroo MS, Kamili S. Hepatitis E: from hypothesis to reality. *Indian J Gastroenterol*. 1994;13:39-43.
67. Bile K, Isse A, Mohamud O, Allebeck P, Nilsson L, Norder H, et al. Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;51:466-74.
68. Mast E, Polish L, Favorov M, Khudyakova N, Collins C, Tukei P, et al. En: Nishioka NSH, Mishiro S, Oda T, editors. *Viral hepatitis and liver disease*. Tokyo: Springer-Verlag; 1994. p. 375-8.
69. Boccia D, Guthmann JP, Klovstad H, Hamid N, Tatay M, Ciglenecki I, et al. High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. *Clin Infect Dis*. 2006;42:1679-84.
70. Guthmann JP, Klovstad H, Boccia D, Hamid N, Pinoges L, Nizou JY, et al. A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin Infect Dis*. 2006;42:1685-91.
71. Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:4485-8.
72. Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol*. 2000;33:826-33.
73. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martin M, Bofill-Mas S, et al. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:448-54.
74. Kasorndorkbua C, Opriessnig T, Huang FF, Guenette DK, Thomas PJ, Meng XJ, et al. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:7831-7.
75. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet*. 1995;345:1025-6.
76. Cacopardo B, Russo R, Preiser W, Benanti F, Brancati G, Nunnari A. Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection*. 1997;25:313-6.
77. Ishikawa K, Matsui K, Madarame T, Sato S, Oikawa K, Uchida T. Hepatitis E probably contracted via a Chinese herbal medicine, demonstrated by nucleotide sequencing. *J Gastroenterol*. 1995;30:534-8.
78. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol*. 2003;84:2351-7.
79. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1958-60.
80. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 2003;362:371-3.
81. Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol*. 1990;32:58-9.
82. Clayton ET, Innis BL, Myint KS, Narupiti S, Vaughn DW, Giri S, et al. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53:228-32.
83. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:9860-5.
84. Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, et al. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol*. 1998;143:1405-15.
85. Halbur PG, Kasorndorkbua C, Gilbert C, Guenette D, Potters MB, Purcell RH, et al. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol*. 2001;39:918-23.
86. De Deus N, Seminati C, Pina S, Mateu E, Martin M, Segales J. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol*. 2006;34:56-60.

87. 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;40:1326-32.
88. Van der Poel WH, Verschoor F, Van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M, et al. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:970-6.
89. 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;18:462-5.
90. Withers MR, Correa MT, Morrow M, Stebbins ME, Seriwatana J, Webster WD, et al. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:384-8.
91. Zheng Y, Ge S, Zhang J, Guo Q, Ng MH, Wang F, et al. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *J Infect Dis.* 2006;193:1643-9.
92. Olsen B, Axelsson-Olsson D, Thelin A, Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis.* 2006;38:55-8.
93. Clayson ET, Snitbhan R, Ngarm-pochana M, Vaughn DW, Shrestha MP. Evidence that the hepatitis E virus (HEV) is a zoonotic virus: detection of natural infections among swine, rats, and chickens in an area endemic for human disease. En: Buisson Y, Kane M, editors. *Enterically transmitted hepatitis viruses. La Simarre: Joue-les-Tours; 1996.* p. 329-35.
94. Kabrane-Lazizi Y, Fine JB, Elm J, Glass GE, Higa H, Diwan A, et al. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:331-5.
95. Favorov M, Kosoy M, Tsarev S, Childs J, Margolis H. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Infect Dis.* 2000;181:449-55.
96. He J, Innis BL, Shrestha MP, Clayson ET, Scott RM, Linthicum KJ, et al. Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4493-8.
97. Tien N, Clayson H, Khiem H, Sac P, Corwin A, Myint K, et al. Detection of immunoglobulin G to the hepatitis E virus among several animal species in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57:211.
98. Favorov MO, Margolis HS. Hepatitis E virus infection: an enterically transmitted cause of hepatitis. En: Schied WM, Craig WA, editors. *Emerging infections.* Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 1999. p. 1-16.
99. Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM, Gandhe SS, Chobe LP, Rautmare SS, et al. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat.* 2001;8:223-7.
100. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Usui R, Kobayashi E. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection.* 2004;32:57-8.
101. Peralta B, Martín M, Mateu E. Detección de IgG e IgM contra el virus de la hepatitis E en la población canina de Barcelona. *Laboratorio Veterinario Avedila.* 2006;36:2-6.
102. Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol.* 2001;82:2449-62.
103. Haqshenas G, Huang FF, Fenaux M, Guenette DK, Pierson FW, Larsen CT, et al. The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J Gen Virol.* 2002;83:2201-9.
104. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, et al. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol.* 1998;72:9714-21.
105. Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3040-6.