

Universidad Nacional de San Martín
Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr.
Carlos G. Malbrán”

*Epidemiología del Virus de Hepatitis E (VHE) en diferentes
poblaciones de la Provincia de Buenos Aires, Argentina:
estudio en pacientes y medio ambiente.*

Tesis presentada para optar al título de Magíster en Microbiología Molecular

Bqca. Regina Ercole

Directora de Tesis: Dra. Mirna Biglione
CoDirectora de Tesis: Dra. Cecilia María Delfino

Buenos Aires, Diciembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

A los “no”, que me ayudaron y alentaron a encontrar los “si”.

A los sí:

A Willi (Williams René Pedrozo), por presentarme a Mirna y su grupo de trabajo.

A Mirna Biglione, por su aceptación, dedicación y confianza. Gracias por las correcciones, la paciencia, el apoyo e interés.

A la Dra. Cecilia María Delfino, Ceci!!, por su excelente disposición, su entusiasmo, su energía y su ayuda para la escritura y realización de esta tesis. Sin ella esto no sería posible.

A la Dra. Verónica Mathet, por sus consejos y opiniones.

A Carolina Berini, Gabriela Pataccini, Camila Cánepa, Emiliano, Amalia, Luján. Gracias por su ayuda y colaboración en el laboratorio.

A todos los becarios, pasantes, investigadores y trabajadores del INBIRS e IMPaM, por su cordialidad y colaboración.

A las autoridades del INBIRS, por su aceptación

A Norberto Baumgartner, ex-jefe del banco de homoinjertos valvulares y cardíacos HIEAyC San Juan de Dios - CUCAIBA-, por su generosidad y colaboración.

A Juana Lucila Ayala, banco de homoinjertos valvulares y cardíacos HIEAyC San Juan de Dios - CUCAIBA, por su colaboración en la conservación de las muestras.

A Cecilia Digirónimo, por el muestreo de aguas y asesoramiento.

A Vanina Cambiaggi –Ma. Eva y Juan-, por su ayuda durante la cursada de la maestría

A Cora Gallinger, por su colaboración y apoyo incondicional.

A la directora ejecutiva del HIEAyC San Juan de Dios de La Plata, Dra. Gabriela Alberich, por su aprobación.

Al jefe de docencia e Investigación de HIEAyC San Juan de Dios de La Plata, Dr. Guillermo Prat, por su apoyo.

A Adriana, bibliotecaria del hospital, por sus búsquedas bibliográficas.

A Norma Domancich, por ayudarme a ordenar y expresar conceptos. Una gran ayuda.

A mis compañeros del laboratorio central del HIEAyC San Juan de Dios, por su colaboración. Gracias Paola Prener, Marisa González, Silvina Bien, Roxana Álvarez, Morgana Colaiani, Cristina Quintana, Graciela Balbuena, Sebastián Álvarez, Eugenia Bravis López, Andrés Angelletti, Humberto, Carlitos López, Ana, Laura, Alejandra, Marita B., Marita S., Santiago, Marcos, Sergio, Estela.

A las residentes de bioquímica: Paula Mendicino, María José Parente, Susana González, Maite Bovari, Catalina Protto, Verónica Raggi.

A mis compañeros de Virología del Hospital, Virginia Minervini, Silvia Gálvez, Gustavo Fragosa, Liliana Coronel, Francisco Echeverría.

Al Dr. César Crespi, por su colaboración y asesoramiento.

A todos mis compañeros del Hospital.

A mis compañeros de UNAJ, por su comprensión. Gracias Marcela, Fernando, Verónica, Lisa, Lisandro, Ezequiel, Guillermina, Ma. Ángeles, Juliana, Paula.

A mis compañeros de UNLP: Mariana Viegas por su colaboración con la bioinformática; Elsa Baumeister, Rosana Toro, Daniel Mazziotta y Raúl Girardi, por su apoyo y estímulo.

A las recomendaciones para el programa PROFITE, que me ayudó a costear parte de esto. Gracias Néstor Caffini, Marcela Castillo, Elsa Baumeister y Daniel Mazziotta.

Al Dr. Prof. Paul CHAN Kay Sheung, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Hong Kong, por proveerme de los controles positivos.

A Victoria Avila Diez, por su inmensa colaboración

A mis amigos, por haberlos aburrido.

DEDICATORIA

A mi mamá y Raúl, por alentarme y ayudarme a seguir. Gracias.

A Sergio, por tomar las riendas de la familia y apoyarme.

*A toda mi familia, que cuidaron de mis hijas mientras viajaba. Gracias Mamá, Ser, Gaby,
Guille, Juan, Leo y Nico.*

A mi papá y mi hermana.

A mis hijas, Lara y Maite, a quienes amo con todo mi corazón.

ABREVIATURAS

Abreviatura: significado en español / significado en inglés

A°: arroyo

aa: aminoácidos

AAHI: Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología

Acs: anticuerpos

ADA: Autoridad del agua

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

AgP24: antígeno P24

ALT: alanina aminotransferasa

Alte.: Almirante

Anti-HBc: anticuerpos anti-core del VHB

Anti-HCV: anticuerpos anti VHC

Anti-HDV: anticuerpos Anti-HDV

ARN: Ácido ribonucleico

AST: aspartato aminotransferasa

BbD: bilirrubina directa

BbT: bilirrubina total

ChLIA: Inmunoanálisis por quimioluminiscencia

CMIA: Inmunoanálisis de macropartículas por quimioluminiscencia

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

ELFA: enzimo inmuno ensayo por fluorescencia

ELISA: enzimo inmuno ensayo por absorción

FAL: fosfatasa alcalina

FH: falla hepática

FHF: falla hepática fulminante

HAV-G: anticuerpos tipo IgG anti-VHA.

HAV-M: anticuerpos tipo IgM anti-VHA.

HBcAc: anticuerpos anti-cápside del VHB

HBeAg: antígeno de envoltura del VHB

HBsAg: antígeno de superficie del VHB

HClO: ácido hipocloroso

HDag: antígeno de VHD

HE: hepatitis E

HIEAyC: Hospital Interzonal Especializado de Agudos y Crónicos

IC: intervalo de confianza

IFN- γ : Interferón gama

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IgM anti-HBc: inmunoglobulina M anti-core del VHB

I κ B α : inhibidor de NF κ B

IL-10: Interleuquina 10

IL-2: interleuquina 2

IL-6: interleuquina 6

IL-8: Interleuquina 8

INBIRS: Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA

Kb: kilobases

LCR: líquido cefalorraquídeo

LIA: inmunoensayo luminiscente

MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

MSIV: marcador serológico de infección viral

NAT: testeo de ácidos nucleicos

NFkB: factor transcripcional anti-apoptótico

NK: células asesinas naturales

nm: nanómetros

nt: nucleótido

OMS: organización mundial de la salud

ORF: marco abierto de lectura

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDLC: Agua subterránea en planta de Desechos Líquidos Cloacales

PE: pacientes embarazadas

PHA: Pacientes con Hepatograma alterado

poliA: poliadenilado

PRRSU: Planta de Reciclado de Residuos Sólidos Urbanos

PTLC Planta de tratamiento de líquidos cloacales

real time PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

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

RT-nPCR: retrotranscripción seguida de una reacción en cadena de la polimerasa anidada

SAAM: sustancias activas al azul de metileno

SS: sólidos sedimentables

TGO (AST – GOT): transaminasa glutámico oxalacético

TGP (ALT - GPT): transaminasa glutámico pirúvico

Th1: linfocito T helper tipo 1

Th2: linfocito T helper tipo 2

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

VHA: Virus de la hepatitis A

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VHD: Virus de la hepatitis D

VHE: Virus de la hepatitis E

VHE-IgG: anticuerpos tipo IgG anti-VHE

VHE-IgM: anticuerpos IgM anti-VHE

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VLPs: partículas tipo virales

WB: *Western Blot*

Índice

I. Introducción	12
1. Historia de la hepatitis E	13
2. Características virológicas	16
2.1. Genoma viral	16
2.2. Proteínas virales	17
3. Ciclo de replicación viral	19
4. Curso clínico de la infección	20
4.1. Infecciones agudas (sintomáticas y asintomáticas)	21
4.2. Infecciones crónicas	23
5. Diagnóstico de la infección por VHE	25
6. Inmunopatogenia	26
7. Epidemiología molecular de la infección por VHE	29
7.1. Prevalencias	29
7.2. Genotipos	29
8. Situación de VHE en latinoamérica y Argentina	31
9. VHE y medio ambiente	34
10. Medidas de prevención	36
11. Otros marcadores de infección viral	36
11.1. Virus de Hepatitis A (VHA)	36
11.2. Virus de Hepatitis B (VHB)	37
11.3. Virus de Hepatitis C (VHC)	39
11.4. Virus de Hepatitis D (VHD)	40
11.5. Virus de Inmunodeficiencia humana (VIH)	41
II. Objetivos	44
III. Metodología	46
1. Poblaciones estudiadas	47
1.1. Pacientes embarazadas (PE)	47

1.2. Pacientes con hepatograma alterado (PHA)	47
1.3. Criterios de inclusión y exclusión	47
1.4. Consideraciones éticas	47
1.5. Obtención de muestras y procesamiento	48
2. Muestras de agua analizadas	48
2.1. Obtención de muestras y procesamiento	50
3. Metodología empleada para el estudio del virus de hepatitis E	55
3.1. Diagnóstico serológico de infección por VHE	55
3.2. Diagnóstico molecular de VHE	55
3.2.1. Extracción del ARN	55
3.2.2. Transcripción inversa	55
3.2.3. Amplificación de la región parcial del ORF1 y ORF2	56
4. Detección de marcadores serológicos de los virus de hepatitis A, B, C, D, y Virus de Inmunodeficiencia humana	58
4.1. Detección de anticuerpos anti-VHA	58
4.2. Detección de VHB: antígeno de superficie (HbsAg) y anticuerpos anti-core (HBcAc)	58
4.3. Detección de anticuerpos totales anti-VHC	58
4.4. Detección de anticuerpos totales anti-VHD	58
4.5. Detección de VIH	59
5. Análisis de marcadores hepáticos	59
5.1. Niveles de transaminasas	59
5.2. Niveles de fosfatasa alcalina	59
5.3. Niveles de bilirrubina total y directa	59
6. Análisis de aguas	59
6.1. Análisis bacteriológico	59
6.2. Sólidos sedimentables	59
6.3. Cloruros y detergentes aniónicos	60

7. Análisis de Datos	60
IV. Resultados	61
1. Poblaciones estudiadas	62
1.1. Datos demográficos de las poblaciones estudiadas	62
1.2. Diagnóstico serológico de infección por VHE	63
1.3. Detección de otros marcadores serológicos de infección viral	63
2. Muestras de aguas analizadas	65
3. Diagnóstico molecular de VHE	66
V. Discusión	67
VI. Conclusión	73
VII. Anexos	75
VIII. Bibliografía	80

I. INTRODUCCIÓN

1. *Historia de la Hepatitis E*

El término hepatitis, proveniente del griego *hepatos* (hígado) y el sufijo *-itis* (inflamación), denota la inflamación de la glándula hepática caracterizada por la presencia de células inflamatorias en el tejido del órgano. Su causa puede ser infecciosa (viral, bacteriana, micótica o parasitaria), inmunológica (debido a auto-anticuerpos) o tóxica (inducida por alcohol, toxinas o fármacos) [Robbins SL *et al.*, 2003]. Se denominan hepatitis virales a aquellas infecciones del hígado con inflamación hepatobiliar causadas por al menos uno de los cinco virus primariamente hepatotrópos que se conocen en la actualidad: Virus de Hepatitis A (VHA), Virus de Hepatitis B (VHB), Virus de Hepatitis C (VHC), Virus de Hepatitis D (VHD) y Virus de Hepatitis E (VHE).

Los primeros reportes de ictericias epidémicas fueron documentados por Hipócrates en Grecia durante el siglo 5 a.c. Más tarde se denominaron también “ictericias de campaña” debido a los brotes que se producían en las tropas durante las guerras, documentándose por ejemplo más de 70.000 casos durante la guerra civil americana (también llamada guerra de Secesión, 1861-1865) entre los miembros de la *Union Army*; y varios cientos de miles en las tropas Americanas, Inglesas y Francesas durante la Segunda Guerra Mundial (1939-1945). Esos brotes habrían sido causados por el VHA. En cambio, el brote de hepatitis ocurrido en 1942 en personal militar de los Estados Unidos que causó 25.585 casos, se atribuyó al VHB, y se debió a vacunas para fiebre amarilla en las que el componente sérico humano estaba contaminado con el virus, hecho desconocido al momento de la inmunización [Krugman S., 1992].

La identificación del VHE como agente etiológico fue posible gracias al análisis retrospectivo de muestras de una epidemia de hepatitis en 1978 en Kashmir, India, la que se estima involucró 52.000 casos de hepatitis icterica y 1.700 muertes. Esta se debió al consumo de aguas contaminadas afectando principalmente a jóvenes adultos, con mayor severidad y fatalidad entre las mujeres embarazadas. Debido a que los sobrevivientes de este estudio retrospectivo no presentaban marcadores serológicos de hepatitis aguda por VHA o VHB, se postuló la posibilidad de un virus diferente [Khuroo MS, 1980]. De hecho, todos los pacientes presentaron Inmunoglobulina G contra el virus de hepatitis A (IgG-VHA) pero no inmunoglobulina M (IgM), indicando que habían sido infectados con el VHA en el pasado y serían presumiblemente inmunes a reinfección. Unos años más tarde, en 1983, Balayan y colaboradores confirmaron la existencia de un nuevo virus de hepatitis mediante la transmisión de este virus a un voluntario a

partir de un paciente involucrado en un brote de hepatitis entérica no-A no-B en Asia central [Balayan et al, 1983]. El voluntario, que presentaba anticuerpos anti-VHA, desarrolló hepatitis severa eliminando partículas tipo virales (*Virus like particles - VLPs*) en las heces con presencia de anticuerpos en la fase de convalecencia contra esas VLPs. Posteriormente Wong y colaboradores, estudiaron también retrospectivamente muestras de un brote de ictericia ocurrido entre 1955 y 1956 en Nueva Delhi, India, encontrando a este agente viral, el VHE, como responsable de dicho brote [Wong DC *et al.*, 1980]. En la tabla 1 se observan los principales hitos en el conocimiento de la etiología y prevención del VHE.

Tabla 1. Principales hitos en el conocimiento de la etiología y prevención de la hepatitis E.

Año	Evento
1955	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inundación de Nueva Delhi que por acción de los monzones, lleva al desborde del río Yamuna a una acequia colectora de residuos cloacales. ✓ Rotura del equipo de cloración de la Planta de provisión de agua a la ciudad. ✓ Una semana de provisión de agua a la ciudad, sin tratamiento alguno. ✓ Epidemia de hepatitis en diciembre de 1955. ✓ Una -entonces- técnica de laboratorio, Korshed Pavri, colecta los sueros de los casos de hepatitis.
Fines de la década de 1970	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Robert H. Purcell estudia los sueros remitidos por la -entonces- Jefa del laboratorio de Virología de Nueva Delhi, -Korshed Pavri- y determina que el brote epidémico no había sido causado por VHA. ✓ Epidemia de hepatitis en el Valle de Kashmir, India, en 1978: ≈ 50.000 casos de ictericia y 1.700 defunciones. Mohammad Sultan Khuroo realiza una meticulosa investigación epidemiológica del brote. ✓ Purcell y otros investigadores estudian los sueros remitidos por Khuroo y establecen que la epidemia de Kashmir no había sido tampoco causada por VHA.
1980	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Khuroo propone la existencia de un nuevo virus causante de hepatitis entérica no-A no-B.
1983	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mikhail Balayan, estudia un brote en la ex-URSS (Afganistán): carece de refrigeración para llevar el material a Moscú. Ingiere un yogur con heces filtradas y se enferma a las semanas; infecta animales: ¡no era VHA!
1990	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Gregory H. Reyes y cols. secuencian el genoma del VHE. ✓ Sergei A. Tsarev desarrolla VLP (<i>viral like particles</i>) de VHE.
2004	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Una vacuna a VLP (proteína de 56 kDa codificada por el ORF 2) expresada en células de insecto protege al ejército de Nepal. Tiene una eficacia del 95,5% contra la hepatitis E.
2012	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se otorga la licencia en China a la vacuna a VLP VHE 239 (proteína de 26 kDa codificada por el ORF 2) expresada en <i>E. coli</i>. Tiene una eficacia del 100% contra la hepatitis E.

*Adaptado de Tinks J *et al*, 2014.

Una de las principales vías de infección de VHE son las aguas contaminadas por el virus. Las aguas se contaminan por el vertido de efluentes cloacales, ya que este virus se elimina por

materia fecal. En los cuerpos de aguas superficiales (mares, ríos, arroyos), los tratamientos que permiten el consumo humano, como por ejemplo el clorado, suelen ser suficientes para la eliminación de éste patógeno. Los cuerpos de agua subterránea en cambio tienen más riesgo de contaminación, en especial los pozos de captación domiciliaria, y más aun si no son realizados a profundidades adecuadas, ya que las napas superficiales tienen más riesgo de contaminación con pozos de vertidos cloacales. Por otro lado, si estas aguas son usadas para el riego de cultivos, los vegetales regados van a estar contaminados; y si son consumidos sin el adecuado lavado o cocción, pasarán a ser la fuente de contagio del individuo que las consuma. Otra fuente de infección bastante frecuente que suele observarse es el consumo de moluscos bivalvos, como por ejemplo ostras. Estos moluscos son grandes filtradores de agua; si las aguas están contaminadas, grandes volúmenes del líquido pasan a través del tracto digestivo de los moluscos siendo filtrado y los virus retenidos de manera inespecífica. El consumo de estos mariscos sin la adecuada cocción puede ser así la vía de infección por VHE. Cabe mencionar que el VHE no tiene capacidad de replicar ni en los vegetales ni en los moluscos, donde es adsorbido de manera inespecífica, pero sí se encuentra infectivo y el consumo de estos alimentos sin el adecuado lavado o cocción puede dar lugar a la infección.

El consumo de carne de animales que padecen la infección por VHE es otra de las vías de transmisión, como es el caso del cerdo como animal de cría o de otros animales salvajes cuya carne puede consumirse. Se ha documentado la presencia de VHE en salchichas u otros derivados porcinos, y el consumo se asocia entonces con el riesgo de zoonosis. Los cerdos representan un gran reservorio de VHE en regiones no endémicas, siendo considerados una fuente potencial de infección, y el consumo de carne y/o derivados mal cocidos, así como la contaminación con su materia fecal, son factores de riesgo. Los trabajadores de criaderos/mataderos y los veterinarios, son una población de riesgo para VHE. Además se ha reportado la recombinación de genomas porcinos y humanos de VHE, que contribuiría a la diversidad viral.

De manera menos frecuente pero posible debemos mencionar la transmisión del virus a través de la sangre y trasplante de órganos. Dado que el virus hace viremia y este período suele ser asintomático, la sangre puede ser una fuente de contaminación. Sin embargo como este período es muy acotado, éste es un fenómeno que ocurre con baja probabilidad.

Si bien no es frecuente, puede suceder la transmisión in útero desde la mujer embarazada al feto. No está documentada la transmisión persona-persona.

En lugares de muy alta endemicidad, como India, una de las formas más frecuentes de transmisión asociada a grandes brotes es por consumo de aguas contaminadas.

2. Características virológicas

El VHE ha sido recientemente clasificado como miembro de su propio género *Hepevirus* y es el único miembro de la familia *Hepeviridae* [Reyes GR *et al.*, 1990; Emerson SU *et al.*, 2006]. Antiguamente fue asignado a la familia *Caliciviridae* por las características del virión (tamaño y morfología) y su organización genómica. Al ver que su genoma tenía diferencias con cualquier familia viral existente como la organización de los marcos abiertos de lectura (ORFs por su acrónimo del inglés *Open Reading Frame*) y la presencia de un extremo 5' Cap fue reclasificado [Zuckerman A *et al.*, 2009].

El VHE es un virus sin envoltura, de cápside icosaédrica, con un diámetro de 27-34 nm., sin ninguna otra característica distintiva en su morfología (Figura 1I).

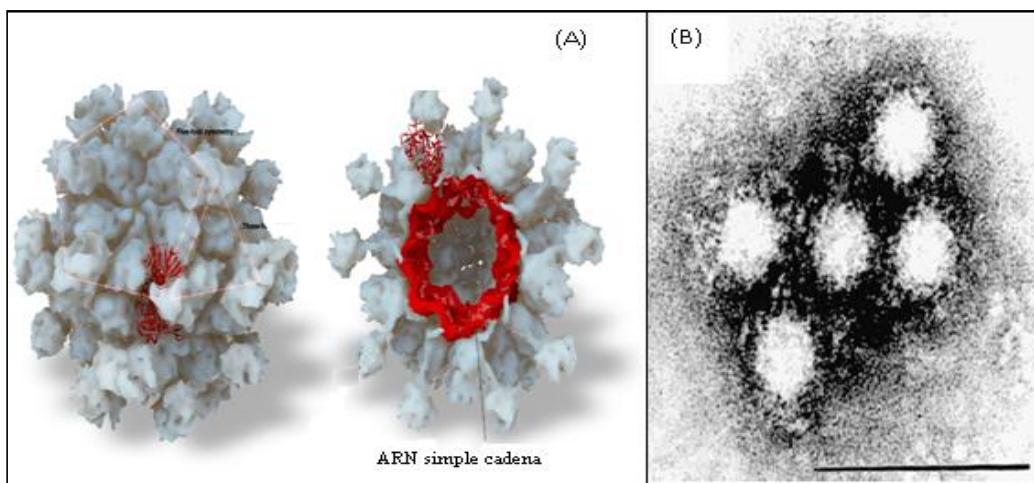


Figura 1I. (A) Estructura de la VLP de VHE. (B) Partículas virales recubiertas de anticuerpos anti-VHE detectadas en heces de paciente pakistaní con hepatitis E por microscopía electrónica (Adaptado de Ticehurst J *et al.*, 1992).

2.1. Genoma viral

Su genoma es ARN de cadena sencilla y sentido positivo (+), con una longitud de aproximadamente 7.3 kb. Este posee una corta región 5' no codificante (NCR) y una 3' NCR y 3 ORF, que se distribuyen como 5'- ORF1 – ORF3 – ORF2 – 3', con solapamiento de los ORF3 y ORF2 (Figura 2I). En el extremo 5' del genoma posee un Cap de 7-metilguanosina que es esencial para la infectividad, y en el extremo 3' posee una cola de poliA. La región entre el final del ORF1 y el comienzo de ORF3/ORF2 es compleja y contiene elementos regulatorios.

El ORF1 codifica una poliproteína no estructural esencial para la replicación del ARN viral ya que incluye una ARN polimerasa- ARN dependiente; el ORF2 codifica para la proteína de la cápside viral, además de permitir la entrada del virus a las células es blanco para anticuerpos neutralizantes [Chandra V *et al.*, 2008]. En cuanto al ORF3, este codifica una pequeña proteína fosforilada que es importante para la liberación de virus e interactúa con varias proteínas celulares [Panda SK *et al.*, 2013].

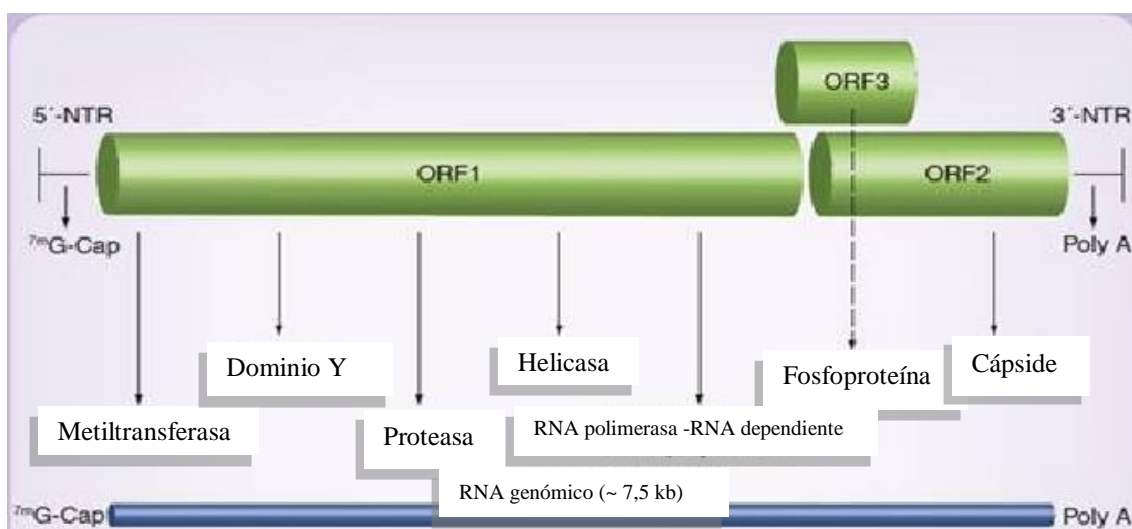


Figura 2I. Genoma del VHE

2.2. Proteínas virales

La presencia de anticuerpos en humanos y animales de experimentación contra las proteínas del VHE confirma la expresión de éstas en el curso de la infección, aun cuando su cinética de expresión en el ciclo de replicación viral y las funciones de algunas de ellas no está todavía claramente establecida [Khudyakov YuE *et al.*, 1994; Panda SK *et al.*, 1995].

El ORF1 del VHE codifica para una poliproteína de 1693 aminoácidos (aa) que por comparación con dominios similares en otros virus ARN (+), daría lugar a proteínas involucradas en las funciones no estructurales del virus [Koonin et al, 1992]. Desde el extremo N-terminal estos dominios son: Metiltransferasa (MeT) - Cistenproteasa (PCP) - ARN Helicasa (Hel) - ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp). Además de éstos, se encuentran otros dos dominios, débilmente caracterizados, homólogos a los hallados en algunos animales y vegetales ARN (+), denominados dominio Macro (previamente denominado dominio X) y dominio Y (Figura 3I).

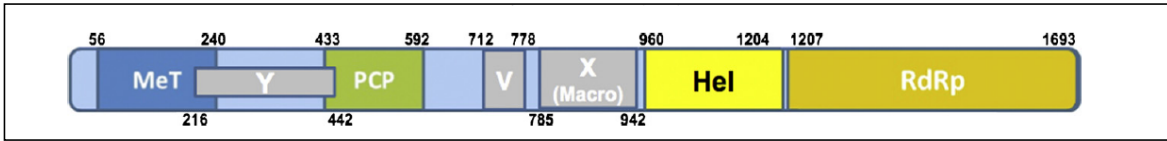


Figura 3I. El gen ORF1 con cuatro dominios funcionales (tomado de Ahmad I. et al., Virus Research 2011).

El ORF2 codifica para una proteína de 660 aa que se propone como formadora de la cápside viral [Purdy MA *et al.*, 1993]. Está contiene una secuencia señal en el extremo N-terminal que permite a la proteína translocar al retículo endoplasmático donde es glicosilada (Figura 4I).

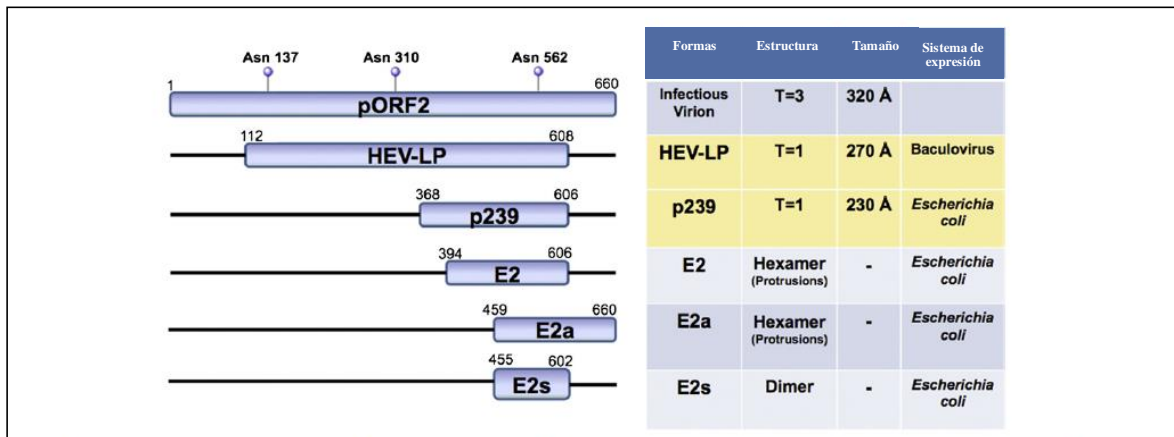


Figura 4I. El ORF2 codifica para la proteína de la cápside. En animales presenta 3 sitios de glicosilación en residuos de Asparagina. La proteína truncada de 56 Kda puede autoensamblarse en insectos; las VLPs resultantes muestran los mismos determinantes antigénicos que el virión. En E.coli se han expresado formas más cortas; p239 forma partículas por interacciones diméricas mientras que E y E2a presentan protrusiones hexaméricas en la superficie. Las proteínas HEV-LP y p239, resaltadas en amarillo, son candidatos para la vacuna contra VHE y se han realizados ensayos clínicos en humanos (Ahmad I *et al.*, Virus Research 2011).

El ORF3 es transcrito a un ARN bicistrónico, dando lugar a una proteína de 114 aminoácidos [Graff J *et al.*, 2006]. Esta proteína es importante para la salida del virus de la célula huésped y está presente en la superficie del virión [Yamada K *et al.*, 2009], es necesaria para la infección y probablemente afecte la respuesta del huésped a la misma [Graff J *et al.*, 2005] (Figura 5I).

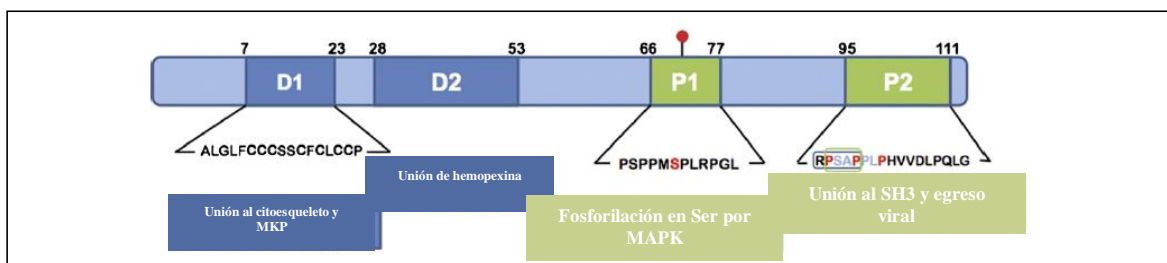


Figura 5I. El ORF3 codifica para una proteína multifuncional de 114 aa., que presenta dos dominios hidrofóbicos (D1 y D2) y dos dominios ricos en prolina (P1 y P2). En células de mamífero P1 es fosforilado en un residuo de Serina mediante la MAP quinasa celular. El dominio P2 tiene un motivo implicado en el egreso de la célula. (tomado de Ahmad I. *et al.*, Virus Research 2011).

3. Ciclo de replicación viral

Hasta el momento, la biología del VHE no ha sido comprendida completamente, debido a la falta de un sólido modelo experimental de infección tanto *in vivo* como *in vitro*.

El primer modelo planteado por Reyes y colaboradores, en base al genoma y analogía con otros virus ARN (+), está aún vigente [Reyes GR *et al.*, 1993]. A este modelo se le ha añadido nuevos detalles en base a estudios con replicones y expresión *in vitro*. Sin embargo, poco se sabe aún acerca de la unión y entrada del VHE a la célula huésped, y de su tráfico intracelular. Luego del ingreso del virus al organismo, los viriones se concentran en la superficie de la célula blanco para su ingreso mediante la unión a proteoglicanos de heparan-sulfato que actúan como factores de anclaje (Figura 6I; paso 1), para unirse luego a un receptor aún no caracterizado y así ser internalizados (paso 2 y 3). En el citoplasma, el virus se descapsida liberando el ARN genómico que es traducido en el mismo a proteínas no estructurales (paso 4 y 5). Estas proteínas incluyen a la ARN polimerasa- ARN dependiente que replica el ARN (+) genómico (paso 6) en ARN (-) que servirá como templado para la síntesis del ARN subgenómico de 2,2 kb (paso 7a) y genomas completos (paso 7b). El ARN (+) subgenómico se traduce en proteínas del ORF2 (violeta) y ORF3 (fucsia; paso 8). Las proteínas del ORF2 se empaquetan en ARN genómico formando nuevos viriones (paso 9) mientras que las ORF3 optimizarían el ambiente celular para la replicación viral. Las proteínas del ORF3 se asocian también a endomembranas (paso 10a) o membranas plasmáticas (10b) y podrían ayudar a la salida del virus. Estudios recientes sugieren que los viriones maduros tienen asociadas proteínas del ORF3 y lípidos (paso 11) que serán removidos luego a través de un proceso no elucidado para convertirse en partículas infectivas. Además se sugiere en estudios previos que la densidad de las partículas séricas de VHE es menor

que las fecales, sugiriendo así que la cubierta lipídica podría perderse durante el paso por el sistema entérico [Takahashi M *et al.*, 2008].

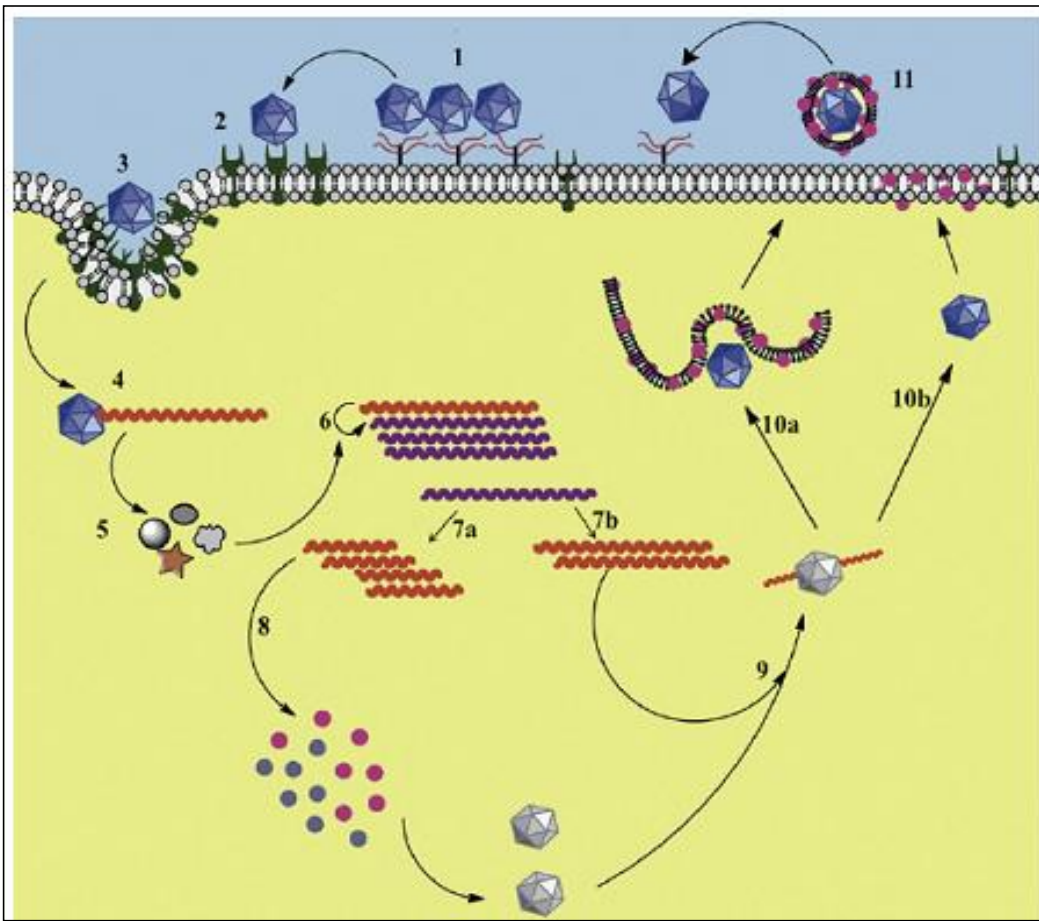


Figura 6I. Ciclo de replicación del VHE (adaptado de Ahmad I *et al.*, Virus Research, 2011).

4. Curso clínico de la infección

Las infecciones por VHE pueden ser de tipo agudas (*asintomáticas y sintomáticas*) o crónicas (Figura 7I).

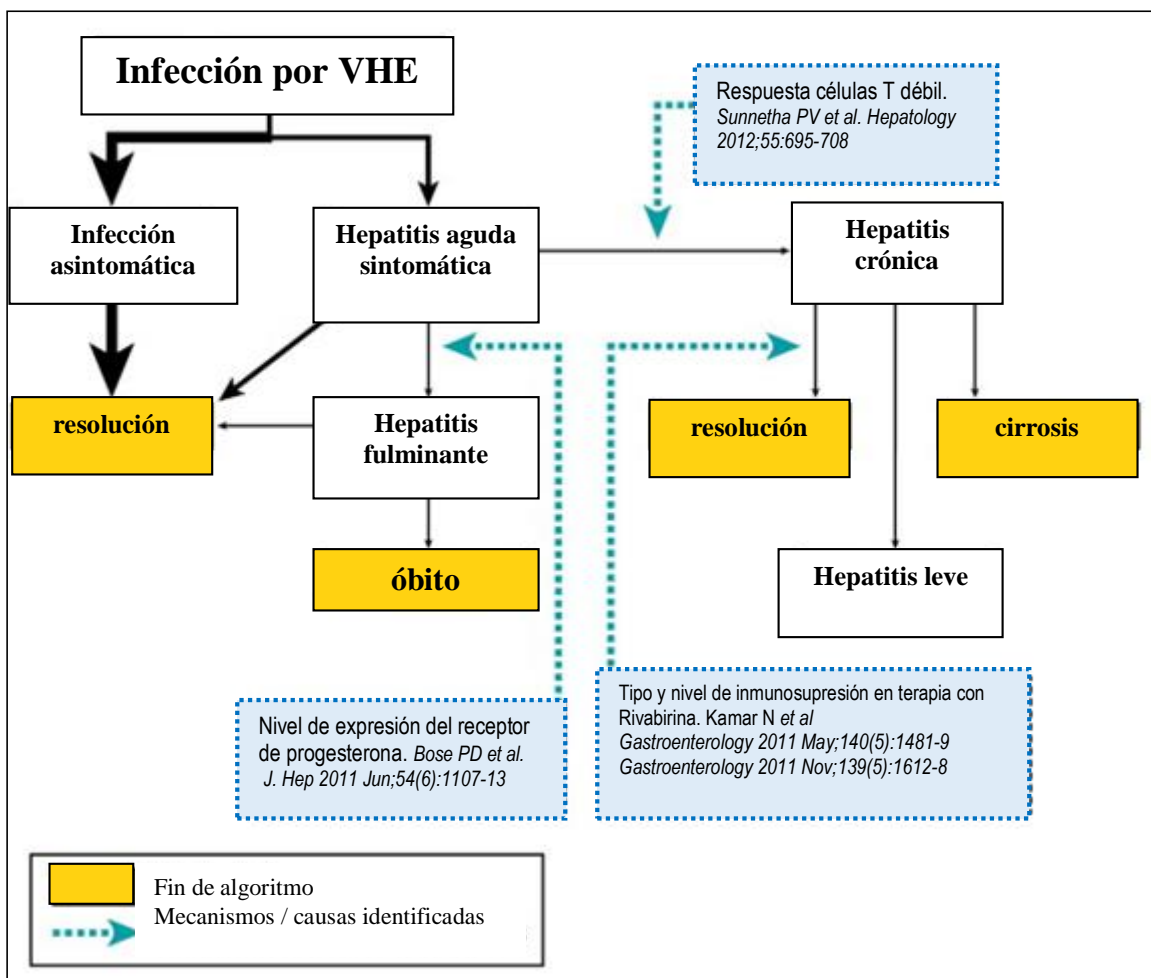


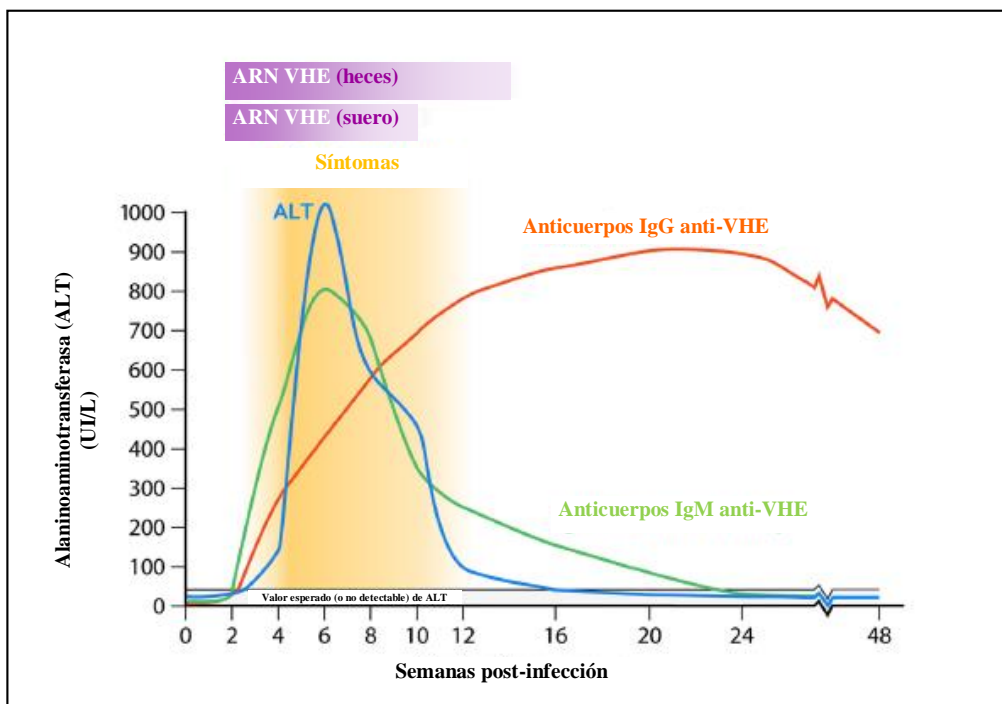
Figura 7I: Formas de presentación clínica de la infección por VHE (adaptado de Wedemeyer H. et al, 2012).

4.1. Infecciones agudas (asintomáticas y sintomáticas)

Las infecciones asintomáticas son 10 a 30 veces más frecuentes que las sintomáticas. Las características clínicas son comunes a las otras hepatitis virales; sin embargo existen patrones epidemiológicos de transmisión que permiten distinguirlas. Los primeros síntomas se presentan a las 5 semanas post-infección, duran hasta 10 semanas, y generalmente son inespecíficos (malestar general, dolor articular, mialgia, fatiga, anorexia, náuseas, vómitos y malestar abdominal). Además, el individuo puede presentar signos de hepatomegalia, aumento de las transaminasas (frecuentemente medido por la actividad de la alanina aminotransferasa, ALT dada su hepatoespecificidad) y de bilirrubina.

La enfermedad viral hepática aguda por VHE puede dividirse en las siguientes etapas: un período de incubación, una fase aguda y un período de convalecencia. El período de incubación es el tiempo que transcurre desde la adquisición de la infección hasta la aparición de los primeros síntomas, y puede durar desde 28 a 40 días (4-6 semanas) según lo estimado en base a la epidemia por aguas contaminadas de 1957 de la cual se conoce el momento de exposición de la población afectada por el virus [Viswanathan R, 1957]. El aumento de las transaminasas ocurre entre 2 y 6 semanas antes de que el paciente se sienta “enfermo”. Los anticuerpos anti-VHE, tanto IgM como IgG, comienzan a aumentar a las dos semanas de ocurrida la infección, llegando al pico máximo cuando comienza la sintomatología. La viremia puede ser detectada por RT-PCR desde la semana 2 antes del inicio de los síntomas y hasta semana 3 después de este, pudiendo persistir de 4 a 16 semanas. Generalmente no suele ser detectable al momento de la consulta médica cuando la sintomatología ya está iniciada. La virocupria se presenta desde una semana previa al inicio de los síntomas pudiendo ser detectable hasta dos semanas después de tornarse indetectable la viremia [Trinks J *et al.*, 2014]. En la fase de convalecencia de la enfermedad se detectan los anticuerpos IgM-VHE, que suelen desaparecer luego de 3 meses, y los anticuerpos IgG anti-VHE que suelen persistir meses-años (Figura 8I).

Figura 8I: Curso de la infección aguda por VHE.



Es importante destacar que se puede desarrollar en el curso de la infección, una falla hepática fulminante (FHF) dentro de las 8 semanas del inicio de síntomas. Generalmente es una complicación rara que ocurre sólo en un bajo porcentaje (0,6% a 2,8 %) en hombres y mujeres no embarazadas [CDC, 1987; Khuroo MS *et al.*, 1981; Gurley ES *et al.*, 2012; Rayis DA *et al.*, 2013]. Sin embargo, la FHF es mucho más frecuente durante el embarazo (22,2%) con una mortalidad de hasta el 25% al 30%. Además, los reportes de abortos, mortinatos o muertes neonatales se ven acrecentadas en las embarazadas infectadas con VHE [Khuroo MS *et al.*, 1995; Labrique A *et al.*, 2010]. Se han documentado ciertos cambios hormonales e inmunológicos en mujeres embarazadas infectadas por VHE que se asociarían al desarrollo de FHF. Estudios en India revelan un incremento de factor de necrosis tumoral (TNF- α) [Salam GD *et al.*, 2013], de células T citotóxicas en biopsia hepática [Prabhu SB *et al.*, 2011], disminución de CD4 con aumentos de CD8, de estrógeno, progesterona y de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (HCG- β) [Jilani N *et al.*, 2007], acompañado de aumento de carga viral de VHE. Por otra parte, se ha observado un incremento de incidencia de FHF y mortalidad infantil en pacientes con mutaciones en el gen del receptor de progesterona, disminución de su receptor y factor inhibidor de progesterona [Bose PD *et al.*, 2011].

4.2. Infecciones crónicas

Comúnmente la infección por VHE causa una enfermedad aguda, seguida de una rápida eliminación viral debido a una respuesta inmune adecuada con la producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes que le confieren inmunidad protectora. Sin embargo, en los últimos años una presentación clínica inusual como la infección crónica por VHE se ha detectado en América del Norte y Europa [Parvez M., 2013] (Figura 9I). Recientemente, varios casos de infección persistente por VHE relacionados con una enfermedad hepática progresiva han sido reportados en Holanda, Alemania, Francia y Canadá en pacientes inmunosuprimidos con trasplante de órgano sólido como hígado, riñón y médula ósea [Gérolami R *et al.*, 2009; Pischke S *et al.*, 2010; Kamar N *et al.*, 2012]. Por otra parte, casos de reactivación viral han sido observados después de trasplantes de células madre en pacientes con leucemia [le Coutre P *et al.*, 2009]. Todos estos casos de hepatitis E crónicas confirmados mostraron enzimas hepáticas elevadas en forma persistente, anticuerpos anti-VHE IgG y ARN-VHE en el suero y heces por un período mayor a 12 meses. Hasta ahora, la cirrosis hepática relacionada con VHE no ha sido establecida,

pero se ha reportado el desarrollo de cirrosis en el hígado de los receptores de trasplante [Parvez M., 2013]. Recientemente, Kamar y colaboradores describieron que alrededor del 66 % de los casos con HE crónica encontrados en receptores de trasplantes de órganos mostraban además, una reducción significativa en el recuento de linfocitos T CD2⁺, CD3⁺ y CD4⁺, así como un mayor riesgo de desarrollar una insuficiencia hepática fulminante [Kamar N *et al.*, 2011a]. En otro estudio conducido en pacientes suizos infectados con VIH-1 -que presentaban muy bajo recuento de células T CD4⁺- se observó una persistencia mayor a 24 meses del ARN-VHE [Kenfak-Foguena A *et al.*, 2011]. Por otro lado, la quimioterapia con fármacos inmunosupresores se considera el principal factor de riesgo para el desarrollo de la cronicidad en individuos infectados con VHE [Haagsma EB *et al.*, 2008]. Por tanto, es concebible que la historia natural atípica y los resultados de la hepatitis E crónica podrían estar relacionados con la inmunosupresión, y a su vez con respuestas subóptimas del sistema inmune del hospedador específicas para el VHE, lo cual favorecería la persistencia viral. Es así, que los pacientes coinfectados con VIH-1 con un estado avanzado de la inmunodeficiencia representan otra población en riesgo asociada a enfermedades crónicas causadas por VHE [Keane F *et al.*, 2012; Kenfak-Foguena A *et al.*, 2011]. En resumen, la respuesta inmune adaptativa deteriorada puede ser un motivo potencial para el establecimiento de la infección crónica por este agente [Parvez M, 2013]. Sin embargo, los mecanismos moleculares de la infección persistente por VHE y la gravedad de la enfermedad en individuos inmunocomprometidos hasta ahora no han sido claramente descriptos.

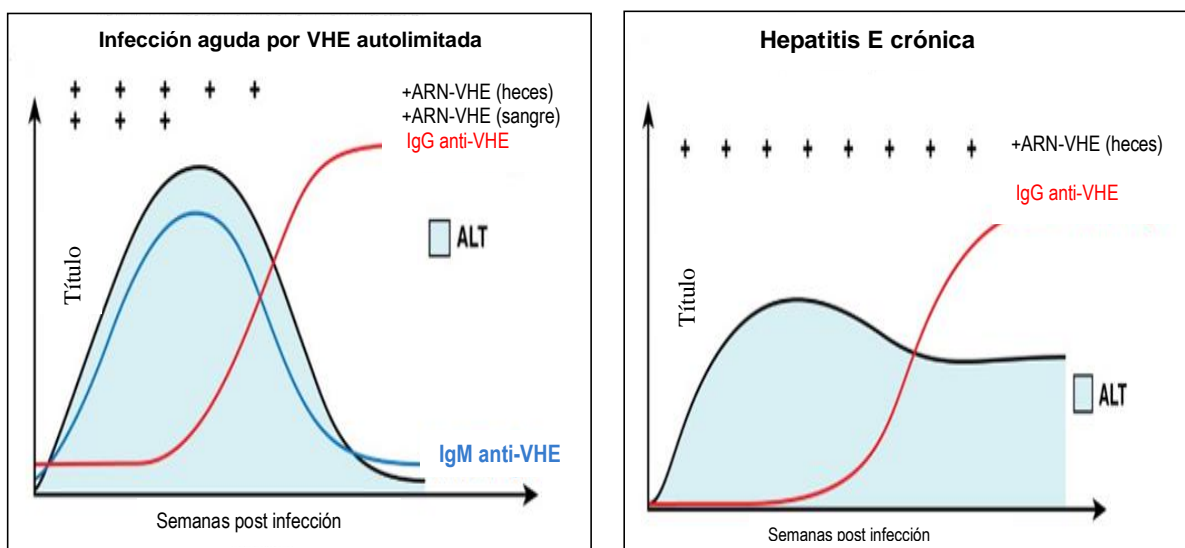


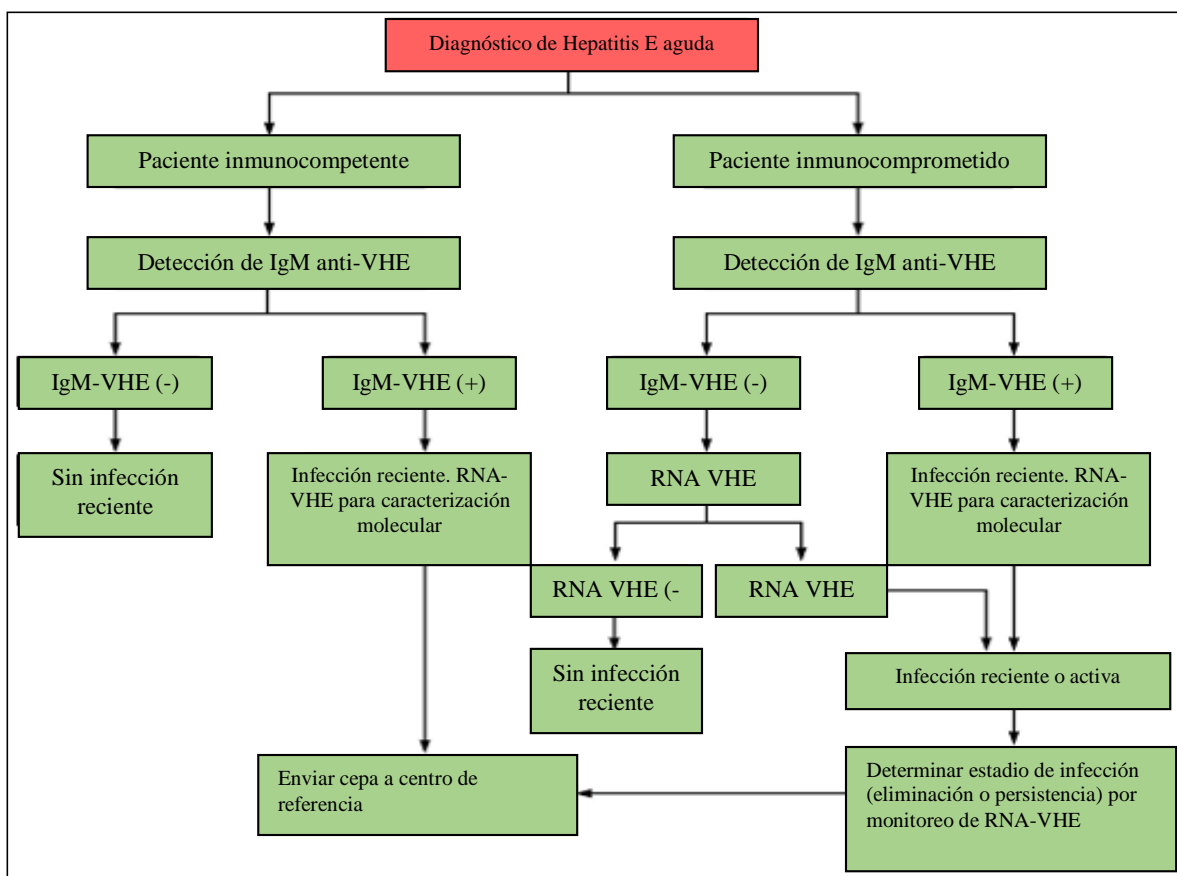
Figura 9I: Curso de la infección crónica por VHE (Adaptado de Wedemeyer H. *et al.*, 2012)

5. *Diagnóstico de la infección por VHE*

La hepatitis E se transmite por vía fecal-oral, siendo el consumo de agua contaminada con excretas humanas la fuente más común de transmisión en países con endemidad para VHE, pero además puede transmitirse por la ingesta de productos derivados de animales infectados, por transfusión de sangre infectada o por transmisión vertical de una embarazada al feto. A diferencia de la hepatitis A, la hepatitis E no se transmite por contacto directo persona a persona, con lo cual la transmisión domiciliaria no sería viable.

El aislamiento de clones moleculares de partes del genoma de VHE por Reyes y colaboradores, generaron las bases para el desarrollo de las primeras técnicas diagnósticas. [Reyes GR *et al*, 1990]. Aunque, a 30 años de su descubrimiento, el diagnóstico adecuado y oportuno de la infección es técnicamente difícil por la falta de un algoritmo diagnóstico aprobado. La consistencia de las pruebas serológicas y cuantificación de la carga viral en términos de sensibilidad y especificidad son los factores limitantes, debido a la diversidad de los antígenos recombinantes de VHE utilizados por los diferentes ensayos comerciales que detectan anticuerpos anti-VHE y las variaciones genéticas que existen entre las diferentes cepas del virus [Khudyakov YuE *et al*, 2011]. El diagnóstico de infección por VHE puede realizarse en forma directa mediante la detección del genoma en sangre u otros fluidos biológicos o en forma indirecta por medio de la detección de los anticuerpos séricos específicos anti-VHE (Figura 10I). La detección de ARN viral en suero es posible a partir de la segunda semana post-infección hasta la semana 12 mientras que en heces el periodo se extiende hasta las 16 semanas mediante la reacción en cadena de la polimerasa con previa transcripción inversa (RT-PCR) en ambos fluidos. Al mismo tiempo que es detectable el genoma viral, el sistema inmune humoral expresa las inmunoglobulinas específicas; la primera respuesta es de anticuerpos tipo IgM anti-VHE, cuya máxima expresión se presenta a las 2 semanas de iniciados los síntomas y persiste en ese valor hasta 8 semanas, declinando luego hasta valores inferiores al valor de corte hacia las 32 semanas. Los niveles de anticuerpos IgG anti-VHE siguen aumentando cuando el paciente sintomático se presenta en la consulta, alcanzan el máximo título hacia las cuatro semanas del inicio de los síntomas (seis semanas post-infección) y permanecen altos por más de un año. Por ende, la presencia de anticuerpos anti-VHE IgM indica una infección aguda mientras que la

presencia de anticuerpos anti-VHE IgG aislado es indicador de infección pasada. Por otro lado, el monitoreo de ARN-VHE es vital para el manejo de las infecciones crónicas por VHE luego



de la reducción de la inmunosupresión o luego de iniciada la terapia antiviral.

Figura 10I: Algoritmo sugerido para el diagnóstico de la infección aguda por el virus de hepatitis E. Adaptado de Kamar N *et al.*, 2014.

6. Inmunopatogenia

El hecho de que tanto la sintomatología de la hepatitis E aguda como la del fallo hepático (FH) agudo coincidan con el ascenso del nivel de anticuerpos y frecuentemente con la declinación de la carga viral, sugieren que los mecanismos patogénicos son mediados en gran medida por el sistema inmune, aunque aún no han sido establecidos, ya que diversos estudios muestran resultados aparentemente contrapuestos. Así, un estudio realizado con pacientes de India documentó un mayor título de anticuerpos IgM e IgG anti-VHE así como también más altos niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 en pacientes con FH (asociado a encefalopatía) que con hepatitis aguda, siendo detectable el ARN viral en los casos de hepatitis aguda pero no en el FH. Este estudio sugiere que el cuadro grave podría asociarse a una respuesta Th1 y Th2 exacerbada. Por el contrario, al menos

otros dos estudios han documentado una asociación entre mayor carga viral y FHF. Ante estas discrepancias, es menester considerar a otros factores virales que podrían contribuir a las mismas, tales como el genotipo o la eventual existencia de variantes del VHE con diferente virulencia. Asimismo, mutaciones genéticas asociadas a cambios en la expresión del receptor de progesterona, la reducida expresión del receptor para dicha hormona, o el factor de bloqueo (de la citotoxicidad de los linfocitos) inducido por progesterona son también responsables de alterar la relación IL-12/IL-10, la cual ha sido indicada como responsable del pronóstico ominoso de la infección por VHE en embarazadas.

También se ha documentado en pacientes de India una correlación entre ciertos polimorfismos nucleotídicos únicos (*single nucleotide polymorphism* o SNP) y haplotipos que regulan la expresión de TNF- α e IFN- γ con la susceptibilidad y el curso evolutivo de la infección por VHE. Se estableció que el genotipo homocigota AA en el locus -308 del promotor del gen de TNF- α (relacionado con un aumento de su producción) se asocia a la susceptibilidad a la infección (subclínica o sintomática), siendo el alelo A -a su vez- más frecuentemente observado en pacientes con FH fatal respecto a los sobrevivientes. También se observó a nivel poblacional una sobre-representación de alelos asociados a una elevada expresión de TNF- α (genotipo CC en el locus -1031 del gen) y de IFN- γ (genotipo +874TT) con la infección sintomática, independientemente del desenlace de la misma. A su vez, en dichos pacientes, los niveles de IFN- γ detectados fueron mayores en quienes padecieron un FH que una hepatitis aguda, aunque continuaron elevándose lentamente en aquellos que sobrevivieron en ambos grupos, pero disminuyeron drásticamente en quienes finalmente fallecieron.

Aún no se ha establecido definitivamente el grado relativo de participación desempeñado respectivamente por los linfocitos T citotóxicos, las NK (CD3⁺CD56⁺) y las NKT (CD3⁺CD56⁺) en la patogenia del daño hepático y en la eliminación viral. Sin embargo, aunque los resultados son controversiales, se ha observado que las células CD56⁺ están presentes en mayor proporción en el hígado de pacientes con hepatitis E aguda que en el de aquellos infectados con otras hepatitis virales. Asimismo, pudo observarse una proporción aumentada de linfocitos T CD8⁺ en el hígado de pacientes con FH por VHE y otros virus, respecto a individuos controles no infectados.

El compromiso neurológico observado en un limitado porcentaje de pacientes se ha asociado a la emergencia de variantes con tropismo neural, tal como lo demuestra la compartimentalización de cuasi-especies del VHE presentes en el suero y el líquido céfalo raquídeo (LCR) de un paciente con hepatitis E crónica que había recibido un trasplante renal.

Hasta el momento, se desconocen los mecanismos patogénicos responsables del daño hepático grave que afecta con mayor frecuencia a las mujeres embarazadas infectadas con VHE durante el tercer (o -en ciertos casos reportados- segundo) trimestre de la gestación. Sin embargo, se supone que la replicación y la expresión del genoma viral se encuentran estimuladas durante el embarazo y que esto responde a dos características de dicho estado: a) la disminución de la inmunidad celular—indicada por un descenso de los linfocitos T CD4⁺ e incremento de los linfocitos T CD8⁺, así como por la presencia de linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (linfocitos T regulatorios) y células NK regulatorias que evitan el rechazo del feto implantado-, y b) los niveles elevados de progesterona y estrógenos en la segunda mitad del embarazo, que -a su vez- pueden ser gatillados por la infección por VHE. El sesgo Th1→Th2 se observa muy frecuentemente. Sin embargo, dicho evento no siempre ha sido responsabilizado de la gravedad del cuadro en embarazadas infectadas, tal como se documentó en gestantes infectadas con VHE en la descripción de una cohorte de Bangladesh, en la que se atribuyó el desenlace al déficit de micronutrientes. A su vez, podrían existir otros factores del hospedador y aún del medio ambiente. Diversas proteínas que difieren significativamente en su expresión al comparar el primer y el tercer trimestre del embarazo han sido involucradas en la respuesta inmune y la inflamación, incluyendo la gelsolina, (proteína de unión a actina, clave en el ensamble y desensamble de los filamentos de actina, y que inhibe la apoptosis mediante la estabilización de las mitocondrias al impedir la liberación de citocromo C, obstruyendo así la amplificación de señales que llevan a la apoptosis celular), el inhibidor de la proteasa plasmática C1, así como diversos subcomponentes relacionados al sistema del complemento. Asimismo, se ha mencionado una asociación entre el fallo hepático agudo en embarazadas infectadas con VHE y la inhibición del factor transcripcional anti-apoptótico NFκB al promoverse la retención citoplasmática de la subunidad constitutiva p65, mediada por la actividad de ORF 2 al disrumpir la ubiquitinación del inhibidor de NFκB (IκBα). Al prolongarse su vida media, IκBα impide la traslocación nuclear de p65. Entre los efectos observados, se ha documentado la disminución de la unión de NFκB al DNA de moléculas del MHC-I y de la transcripción de IL-6 e IL-8, lo que podría sugerir -al menos *in vitro*- mecanismos de evasión del VHE a la respuesta inmune.

7. Epidemiología molecular de la infección por VHE

7.1. Prevalencias

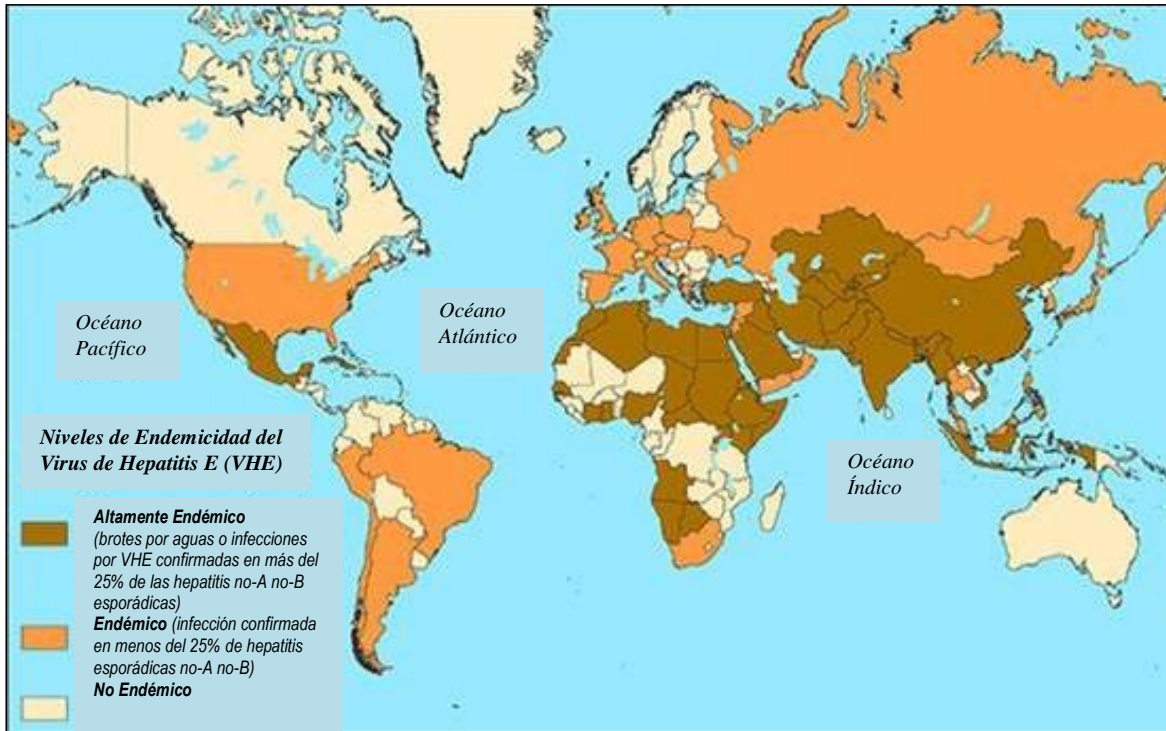
Según la Organización Mundial de la Salud cada año se registran aproximadamente 20 millones de casos de infección por VHE en el mundo [OMS, 2014; OMS 2015a]. Del total, ocurren 57.000 muertes debido a FHF y encefalopatía hepática. Deficiencias en los sistemas de saneamiento, fuertes lluvias o inundaciones parecen contribuir a brotes de VHE en países endémicos de Asia (incluido Medio Oriente), África y Latinoamérica, donde la mayoría de las infecciones ocurren en adultos jóvenes de 15 a 45 años con una prevalencia serológica de hasta el 30% [Song YJ *et al.*, 2014; Clayson E *et al.*, 1997; Kumar S *et al.*, 2013]. Los países desarrollados de Europa, Asia y América del Norte son considerados como regiones no endémicas; ya que los casos esporádicos que ocurren en estos países son por lo general asociados con los viajes a países endémicos [La Rosa G *et al.*, 2011]. Sin embargo, un aumento considerable en casos de infección aguda en pacientes que nunca habían viajado a zonas endémicas durante los últimos años impulsó la realización de nuevos estudios en varios países [Song YJ *et al.*, 2014]. Además, algunos estudios serológicos indican que una parte considerable de las personas en los países desarrollados tienen anticuerpos anti-VHE. En países europeos (Inglaterra, Alemania, Italia y Francia) y asiáticos (Japón, Corea del Sur, Hong Kong, Taiwán y China) se han reportado altas tasas de prevalencias (13 al 53 % y 6 al 43 %, respectivamente) en diversas poblaciones [Faber MS *et al.*, 2012; Ijaz S *et al.*, 2009; Mansuy JM *et al.*, 2011]. Por otra parte, en EEUU se detectó que alrededor del 19 al 21 % de los donantes de sangre tenía anticuerpos específicos para VHE [Xu C *et al.*, 2013]. En la figura 11I se observa la clasificación de los distintos países según los niveles de endemidad para VHE; éstos no serían un fiel registro de la situación actual ya que existe un subdiagnóstico de la enfermedad, principalmente en países en vías de desarrollo.

7.2. Genotipos

El VHE se clasifica en cuatro genotipos (VHE1-VHE4), todos representados en un serotipo [Reyes GR *et al.*, 1990; Figura 12I]. Además, se han descrito múltiples subgenotipos que tienen aún cierta controversia. Los VHE1 y 2 infectan solo humanos, y no se tiene conocimiento sobre un reservorio animal. El VHE1 es frecuente en Asia (incluyendo el Medio Oriente) mientras que el VHE2 se distribuye en países de África y Centroamérica [Purcell RH *et al.*, 2008]. En contraste, VHE3 y VHE4 son zoonóticos e infectan principalmente cerdos (y

algunos otros mamíferos) además de humanos [Purcell RH *et al.*, 2008]. Estos genotipos se limitan principalmente a los países de Asia del Este, Europa y América del Norte y Sur [Ruggeri F *et al.*, 2013].

Figura 11I: Niveles de endemicidad del virus de hepatitis E en diferentes partes del mundo. (Adaptado de CDC, 2015)



Se ha observado que cepas de VHE3 y VHE4 humano y porcino son genéticamente muy similares (99% de identidad de secuencia) en los casos de transmisión zoonótica directa [Lu L *et al.*, 2006; Bouquet J *et al.*, 2011]. El VHE porcino fue aislado y caracterizado genéticamente por primera vez en una granja en EEUU, seguido por otros aislados en algunos países asiáticos y europeos [Meng XJ *et al.*, 1997]. Posteriormente, en Japón, EEUU, Canadá, Nueva Zelanda, Países Bajos, España y Reino Unido se han realizado estudios sobre la prevalencia del VHE en cerdos debido a la comercialización de hígado u otros cortes de este animal [Pavio N *et al.*, 2010]. Dado que los cerdos representan un gran reservorio de VHE en regiones no endémicas, son considerados como una fuente potencial de la infección en estos lugares. Recientemente, una transmisión directa del virus a través del consumo de carne de cerdo contaminada fue reportada en Japón [Pavio N *et al.*, 2010]. Por otra parte, cepas de VHE3 han sido detectadas en jabalíes, ciervos, conejos y ratas en diferentes partes del mundo, incluyendo Europa y América del Norte, mientras que cepas del VHE4 fueron aisladas en jabalíes en Europa y Asia [Ruggeri FM *et al.*, 2013]. Diversos estudios realizados en Europa han apoyado la transmisión del VHE3 a través

de los alimentos, principalmente debido al consumo de carne de jabalí salvaje cruda o mal cocida [Parvez M, 2013].

Además, se han reportado recombinación de genomas de VHE [Wang H *et al.*, 2010]. El análisis filogenético y de recombinación de 134 genomas completos muestra 3 potenciales eventos de recombinación significativos. Estos resultados sugieren que aunque rara, es posible la recombinación entre cepas de VHE humanas y porcinas, y podría así contribuir a la diversidad viral.

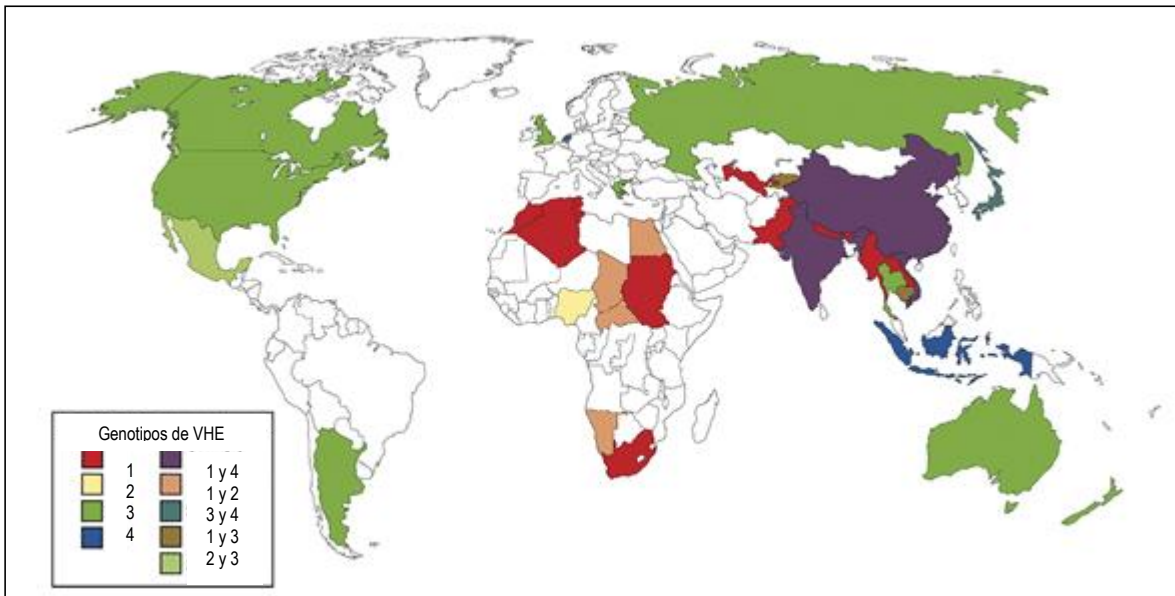


Figura 12I: Distribución geográfica de genotipos de VHE. (Adaptado de Wedemeyer H *et al.*, 2012)

8. Situación de VHE en Latinoamérica y Argentina

La primera evidencia serológica de infección por VHE en Latinoamérica fue documentada en mujeres embarazadas oriundas de Venezuela en el año 1994 [Pujol FH *et al.*, 1994]. Luego, esta infección ha sido detectada en varios países de Centroamérica, Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Perú y Uruguay [Echeverría JM *et al.*, 2013]. En estos países se han observado diferencias en las prevalencias probablemente debido a la diversidad de metodologías utilizadas, ya que los resultados en los estudios pueden variar dependiendo de las diferencias en los criterios de muestreo y en los antígenos utilizados en los ensayos de tamizaje comerciales [Bendall R *et al.*, 2010].

Con tales limitaciones, Latinoamérica presenta una endemicidad moderada para la infección por VHE, donde las tasas de prevalencia en las diferentes poblaciones varían del 1 al 18% [Echeverría JM *et al.*, 2013]. En comunidades originarias de Bolivia (incluyendo la región Amazónica), Chile y Venezuela se reportaron prevalencias que van desde 5 al 41% [Pujol FH *et al.*, 1994; Ibarra H *et al.*, 1997; León P *et al.*, 1999; Echeverría JM *et al.*, 2013]. En Argentina, las prevalencias para anticuerpos anti-VHE observadas en pacientes pediátricos, donantes de sangre e individuos infectados con VIH-1 varían entre 0,15 al 6,6% [Rey JA *et al.*, 1997; Fainboim H *et al.*, 1999]. La prevalencia en donantes de sangre en nuestro país es superior a la reportada en otras áreas no endémicas como Australia (0,4%), Italia (0,95 %) y Holanda (1,81%) [Rey JA *et al.*, 1997], observándose diferencias significativas al comparar las prevalencias de IgG anti-VHE en pacientes VIH-1 reactivos (6,6%) y donantes de sangre (1,8%) [Fainboim H *et al.*, 1999]. Las prevalencias para anticuerpos IgG anti-VHE en un estudio más recientes reflejan valores del 9,5-14,5% en voluntarios de Gran Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 14,8% en trabajadores relacionados a la salud, 16,7% en donantes de sangre y 35,7% en pacientes VIH-1 positivos [Munné MS *et al.*, 2014]. En otro estudio realizado en la provincia de Córdoba sobre una población de 95 pacientes VIH-1 (+) y 83 pacientes hemodializados se determinó una seroprevalencia para anticuerpos IgG-VHE del 8,99 % (16/178); siendo del 8,4% (8/95) en pacientes VIH-1 (+) y del 9.6 % (8/83) en pacientes hemodializados. Con respecto al marcador anticuerpos IgM-VHE, se observó reactividad en 3 pacientes, 2 de ellos VIH-1 (+) y 1 paciente hemodializado. Además, en un paciente VIH-1 (+) con ambos marcadores serológicos de infección (anticuerpos IgM-VHE e IgG-VHE) no reactivos pudo detectarse el genoma de VHE por métodos moleculares. Este trabajo aportó los primeros datos sobre circulación de VHE en individuos adultos inmunosuprimidos de la provincia de Córdoba, y los resultados enfatizan la necesidad de expandir el conocimiento clínico y epidemiológico de VHE en estas poblaciones. [Pisano MB *et al.*; 2015].

A partir de brotes y casos esporádicos de hepatitis E que se produjeron en la región del Caribe, México y Venezuela -a menudo asociados con el virus de hepatitis A- se pudieron aislar cepas VHE1 y VHE3, confirmando la circulación de estos genotipos en Latinoamérica [Echeverría JM *et al.*, 2013]. Además de Venezuela, otros países de América del Sur como Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay han diagnosticado pacientes con infección aguda, logrando amplificar el ARN-VHE en alguno de estos casos [Echeverría JM *et al.*, 2013]. En Argentina, el VHE1 fue detectado en dos viajeros internacionales y el VHE3 en individuos

residentes en el país, al igual que Brasil y Uruguay. Los diferentes aislamientos en Argentina muestran la co-circulación de subgenotipos 3a, 3b, 3i desde el año 2000 en que se realizaron los primeros estudios por biología molecular en nuestro país [Echeverría JM *et al.*, 2013; Munné MS *et al.*, 2006b; Munné MS *et al.*, 2011; Schlauder G *et al.*, 2000].

Sólo en los últimos 10 años se ha estudiado la hepatitis E como enfermedad zoonótica en América Latina. La falta de informes sobre brotes de hepatitis E transmitidas por el agua en las distintas zonas y el acumulado indicio de circulación del VHE3 refuerza la consideración de una zoonosis en la mayoría de los países de la región. Con relación a esto, el VHE3 fue detectado en criaderos de cerdos en cinco provincias de Argentina, con una frecuencia de IgG anti-VHE que va desde el 4 al 58%; este estudio proporcionó la primera evidencia de la circulación de VHE en cerdos de América del Sur [Munné MS *et al.*, 2006a]. El estudio de muestras de materia fecal de cerdos en la localidad de Pergamino, en la provincia de Buenos Aires refuerza la idea de reservorio porcino para la transmisión del virus en Argentina, al encontrarse resultados positivos para ARN-VHE en 51 de 54 muestras estudiadas (94,4%) [Munné MS *et al.*, 2006a]. Más aún, dichas cepas estaban estrechamente relacionadas con algunas cepas aisladas en individuos de Argentina, sugiriendo con esto eventos de transmisión zoonótica [Munné MS *et al.*, 2006b]. Además, también se halló este genotipo en cerdos de Bolivia, Brasil, Chile, Costa Rica y México, confirmando la circulación del VHE en estos animales de diferentes países de Sudamérica [Echeverría JM *et al.*, 2013].

La vigilancia microbiológica del medio ambiente es un tema de importancia en la agenda de la salud pública. El primer reporte ambiental de VHE en Argentina fue realizado en la provincia de Córdoba. En ese estudio se analizaron por técnicas moleculares muestras de aguas residuales y de río, detectándose genoma de VHE en 3 de 48 muestras de aguas residuales y en 1 de 31 muestras de río [Martínez Wassaf MG *et al.*, 2014]. Se demostró así la circulación de VHE durante varios años al encontrar la misma secuencia genómica en muestras tomadas en los años 2007 y 2010. Con respecto a otros países, entre diciembre de 2012 y mayo de 2013 se demostró en el departamento de Antioquía, al noroeste de Colombia, la circulación de VHE3 en muestras de aguas de la fuente principal de abastecimiento del acueducto y en sitios de descarga de agua residual de 9 municipios pertenecientes a dicho departamento. Cabe destacar que Antioquía es el principal productor de ganado porcino en Colombia, y que el genotipo 3 de VHE ha sido reportado previamente en pacientes de Medellín [Báez PA *et al.*, 2015].

9. VHE y Medio ambiente

Los brotes de hepatitis E que ocurren en algunos países subdesarrollados en forma periódica en intervalos cortos de años, están asociados al consumo de agua contaminada con materia fecal, resultado de condiciones sanitarias deficientes. Los brotes suelen ocurrir luego de fuertes lluvias e inundaciones, que crean condiciones favorables para que las excretas y cursos de agua se mezclen. Algo similar ocurre en épocas de baja humedad y altas temperaturas, en las cuales la disminución del caudal de los cursos naturales de agua llevaría a una mayor concentración de contaminantes fecales.

En el sudeste asiático las epidemias recurrentes se han asociado al desecho de excretas humanas a ríos y el uso del agua del mismo para bebida, cocción de alimentos e higiene personal. Estas prácticas proveen de condiciones que favorecen la continua contaminación fecal del agua.

El cuidado del medio ambiente se ha convertido en los últimos años en un tema central de las agendas de instituciones gubernamentales y no gubernamentales a nivel mundial. Argentina y Uruguay monitorean en forma conjunta las costas del Río de la Plata en el marco del proyecto FREPLATA, iniciativa de los gobiernos de sendos países y con aportes de ambos y del fondo mundial para el medio ambiente (Global Environment Facility – GEF) a fin de avanzar hacia la sustentabilidad de los usos y recursos del Río de la Plata y su frente marítimo mediante la ejecución de acciones tendientes a la reducción y prevención de la contaminación de origen terrestre. Entre otras cosas establecen para tal fin niveles guía para determinados parámetros medibles. En la provincia de Buenos Aires, los análisis de calidad de agua se encuentran en el marco de leyes nacionales, como la ley 24.585 de protección ambiental para la actividad minera; provinciales como la ley 5965 de protección a las fuentes de provisión y a los cursos y cuerpos receptores de agua y a la atmósfera; y valores guía establecidos por la autoridad del agua (ADA), dependiente del ministerio de infraestructura de la provincia de Buenos Aires; con el fin de proteger la biota acuática, la biota humana y la calidad del medio ambiente en aguas de consumo y aguas de uso recreativo.

El estudio bacteriológico es un análisis cuyo fin es evaluar la calidad del agua en un río, en especial la cantidad de bacterias pertenecientes al “grupo Coliformes” y dentro de estos a los coliformes fecales. Los coliformes fecales (termotolerantes o termorresistentes) se definen como el grupo de organismos coliformes que pueden fermentar la lactosa a 44,5 °C. Comprenden el género *Escherichia*, y en menor grado, especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* [Easton J, 1998]. Los coliformes termorresistentes distintos de *E. coli* pueden provenir también de aguas

orgánicamente enriquecidas, por ejemplo de efluentes industriales o de materias vegetales y sedimentos en descomposición. La presencia de *E. coli* o de coliformes termotolerantes pueden considerarse como indicio o presunción de contaminación fecal reciente. Como los organismos coliformes termorresistentes se detectan con facilidad, desempeñan una importante función secundaria como indicadores de autodepuración o eliminación de bacterias fecales [OMS, 2008].

Otra forma de medir la contaminación del agua es la determinación de Sólidos Sedimentables (SS). Los SS son la fracción de Sólidos no disueltos que se depositarán en el fondo de un recipiente cónico (Cono de Imhoff) al cabo de 10 minutos o de 2 horas. Son una medida aproximada de la cantidad de fango que se irá depositando a lo largo del curso de agua, y dan idea de la cercanía en el tiempo de una fuente de contaminación.

Los cloruros que se encuentran en el agua natural, proceden de la disolución de suelos y rocas que los contienen y que están en contacto con la misma. Otra fuente de cloruros es la descarga de aguas residuales domésticas, agrícolas e industriales en las aguas superficiales y en tal caso los valores superan ampliamente los citados. La medida de cloruros da idea de la medida de desinfección y por ende viabilidad de los microorganismos.

La determinación de surfactantes aniónicos (detergentes) se denomina SAAM, es decir, Sustancias Activas al Azul de Metileno, un colorante catiónico azul. Los detergentes remueven la suciedad por su capacidad de unirse a las sustancias no polares (de aspecto graso) y englobarlas en agregados que el agua puede arrastrar. Por su capacidad de alterar la tensión superficial del agua también se les conoce como tensioactivos. La molécula de azul de metileno tiene afinidad por compuestos tensioactivos y puede usarse para cuantificarlos. Además de la espuma que este genera, el mismo puede alterar el paisaje y un exceso de detergentes en la descarga de aguas resulta tóxico para la fauna que entra en contacto con él (por ejemplo, los insectos que se posan sobre la superficie). Los detergentes tipo sulfonato transfieren este colorante azul de metileno desde la solución acuosa a un líquido orgánico inmiscible.

10. Medidas de prevención

La Organización Mundial de la Salud tiene las siguientes recomendaciones para prevenir la infección por VHE:

- Lavarse siempre las manos con agua y jabón después de ir al baño, cambiar los pañales y antes de preparar la comida o comer.
- Evitar tomar agua y bebidas con hielo de origen desconocido.
- No comer mariscos, frutas o vegetales que no estén cocinados o no han sido pelados o preparados en forma higiénica.
- El riesgo de transmisión alimentaria del VHE se puede reducir por cocción de la carne, porque VHE puede ser inactivado por temperaturas superiores a 70 ° C durante 20 minutos. La mejor manera de prevenir la transmisión del VHE es evitar el consumo de carne cruda.
- Mantener prácticas sexuales seguras.
- No se debe donar sangre ni órganos o tejidos en períodos de viremia. Tampoco compartir artículos personales que puedan tener sangre como cepillos de dientes, artículos dentales, cortaúñas o navajas de afeitarse.

Al presente, está desarrollada en China una vacuna para el VHE1 que contaría con una eficacia cercana al 100%.

11. Otros marcadores de infección viral

11.1. Virus de Hepatitis A (VHA)

Este virus pertenece a la familia de los *Picornaviridae*, y el género *Hepatovirus*. Tiene una forma icosaédrica no capsulada de aproximadamente 28 nm de diámetro y su genoma es ARN lineal de sentido positivo con una longitud total de 7,5 kb que se traduce en una única poliproteína que puede causar una infección. La poliproteína es cortada en diversos puntos produciendo proteínas capsulares VP1, VP2, VP3 y VP4, así como proteínas no estructurales. En su extremo 5' tiene unida covalentemente una proteína, la VPg, que hace las funciones de la *cap* 5' de genomas eucarióticos protegiendo al genoma por ese extremo. Su extremo 3' por el contrario tiene una zona poliadenilada (poliA) que también hace funciones de protección además de permitir su traducción por la maquinaria de la célula hospedadora [Trinks J, 2014].

El VHA es muy resistente a altas temperaturas, ácidos y álcalis, penetra por vía oral o parenteral. Es eliminado por heces de enfermos durante semanas o meses y sólo está presente en el plasma durante cuatro semanas. No es un virus citopático y el daño celular se produce por respuesta inmune mediada por células, mientras que los anticuerpos circulantes limitan la

diseminación del virus. La infección por VHA tiene una fase de replicación en el hepatocito y una fase citopática (in “vitro”) donde causa alteración en la arquitectura del lobulillo hepático y proliferación del mesénquima y de los conductos biliares que se debe a la destrucción de los hepatocitos por los linfocitos T citotóxicos.

Según la OMS, cada año se registran aproximadamente 1,4 millones de casos de infección por virus de hepatitis A en todo el mundo [OMS, 2014], afectando principalmente a niños entre 5-15 años. Existe un alto porcentaje de infecciones asintomáticas y sólo un 10% de hepatitis aguda de rápida evolución y de buen pronóstico, con pocas complicaciones clínicas. El porcentaje de hepatitis fulminante es muy bajo y la crónica es nula. El periodo de incubación suele ser de 2-6 semanas y los anticuerpos anti-VHA aparecen al principio de los síntomas y persisten durante toda la vida. La detección de IgM indica infección reciente y de IgG infección tardía. Los síntomas son similares a los de otras hepatitis agudas virales: ictericia, fatigabilidad, náuseas, dolor en hipocondrio derecho, fiebre baja, nauseas, diarrea y hepatomegalia. El diagnóstico de la infección se realiza mediante la determinación de anticuerpos séricos frente al VHA (IgG e IgM) por ELISA, los anticuerpos IgM aparecen al inicio de la enfermedad clínica y disminuyen hasta desaparecer transcurridos 3 meses (*infección aguda*) mientras que la respuesta IgG aparece después de la IgM y su nivel se va incrementando desde la fase aguda hasta la de convalecencia, pudiendo permanecer elevados toda la vida (*infección pasada*). Otra prueba es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) que detecta el ARN viral. La hepatitis A es una enfermedad autolimitada, frecuentemente asintomática, que no requiere tratamiento.

11.2. Virus de Hepatitis B (VHB)

Este virus pertenece a la familia *Hepadnaviridae* con un genoma de ADN parcialmente bicatenario de aproximadamente 3.2 kb de longitud. Este contiene cuatro marcos abiertos de lectura principales y yuxtapuestos entre sí: 1) el de la nucleocápside o core, que codifica las proteínas preCore y Core; 2) el de la envoltura, que codifica las proteínas de envoltura L-HBsAg, M-HBsAg y HBsAg; 3) el de X, que codifica la proteína X; y 4) el de Polimerasa, que codifica la polimerasa viral. Dentro de la envoltura, el L-HBsAg está involucrado en el ingreso al hepatocito mientras que la región denominada determinante “a” del HBsAg es blanco de anticuerpos neutralizantes. Este último antígeno es el mayor componente de la envoltura y regula la

secreción. La existencia de cepas de VHB con mutaciones en los antígenos virales tiene importantes implicaciones clínicas y terapéuticas [Mathet VL *et al.*, 2014].

Según la OMS, más de 2.000 millones de personas en el mundo estuvieron en contacto con el virus y aproximadamente entre 240 y 360 millones tienen infección crónica (definido como detección de HBsAg por al menos seis meses). Además, producen actualmente más de 780 000 personas muertas por año [OMS, 2009; OMS, 2015b].

La infección por VHB se produce a partir de sangre del enfermo o portador, y en menor medida semen u otros fluidos o secreciones corporales. La principal vía de transmisión es la exposición percutánea y de mucosas a fluidos corporales infectados. Son también frecuentes la vía parenteral, mediante transfusiones de sangre, hemoderivados, compartir agujas entre usuarios de drogas inyectables, hemodiálisis, tatuajes, acupuntura; la vía sexual o vertical (generalmente perinatal, con 5-10% de neonatos infectados intrauterinamente); y la vía indirecta por objetos inanimados debido a la viabilidad viral que se conserva en superficies ambientales por períodos iguales o mayores a siete días [Mathet VL *et al.*, 2014]. La transmisión perinatal puede representar más de una tercera parte de las infecciones crónicas en zonas de baja endemicidad, aunque en esos entornos las principales vías de contagio son la transmisión sexual y el uso de agujas contaminadas, especialmente entre los consumidores de drogas por vía parental.

Existe un amplio rango de tasas de prevalencias en distintas áreas geográficas. Las áreas con baja prevalencia (0,1-2%) son: Oeste de Europa, Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda. En los países del Mediterráneo, Japón, Asia central y partes de Sudamérica, la prevalencia alcanza niveles medios (2-8%); mientras que en el Sudeste de Asia, China y partes de África, la prevalencia es elevada (>8%) [Rantala M *et al.*, 2008]. El HBV se clasifica en 8 genotipos (A-H) y múltiples subgenotipos con diferente distribución mundial y pronóstico clínico.

Luego de un período de incubación de 4 a 6 semanas, la infección aguda puede seguirse de una rápida eliminación viral debido a una respuesta inmune adecuada por producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes que le confieren inmunidad protectora, o puede persistir en el individuo como una infección crónica. El VHB puede ser detectable luego de 4 semanas post-infección, los síntomas son inespecíficos; varían entre ictericia, fatiga, náusea, vómitos y dolor abdominal. Más del 90% de los adultos infectados con este virus se recuperarán en un plazo de 6 meses mientras que en el resto de los casos puede causar una infección crónica

y dar lugar a cirrosis o hepatocarcinoma celular. Sin embargo, entre un 80-90% de los lactantes y 30-50% de niños infectados presentan riesgo de desarrollar infecciones crónicas. [Mathet VL *et al.*, 2014]. El diagnóstico de la infección aguda se caracteriza por la presencia del HBsAg y anticuerpos IgM anti-HBc. En la fase inicial de la infección los pacientes también son seropositivos para el HBeAg mientras que la infección crónica se caracteriza por la persistencia (más de 6 meses) del HBsAg (con o sin concurrencia de HBeAg). La presencia del HBeAg indica replicación viral y, por ende, alto riesgo de contagio.

Uno de los grandes logros de la investigación sobre VHB fue permitir el desarrollo de una vacuna recombinante, que utiliza levaduras como vectores de expresión. En Argentina, en 1992 la ley nacional 24151 declaró la obligatoriedad de vacunación contra VHB en todos los trabajadores de la salud; el 1 de noviembre del año 2000 se incorporó al calendario nacional de vacunación, por resolución 940/00, la inmunización activa de todos los recién nacidos; en marzo de 2003 se incluyó a los preadolescentes al cumplir los 11 años; y en agosto de 2012 se incorporó la vacunación universal, incorporándose así a los adultos mayores de 20 años no vacunados. El esquema consiste en tres dosis, aplicándose una dosis al recién nacido dentro de las primeras doce horas de vida y luego como parte de la vacuna quintuple celular o pentavalente a los 2, 4 y 6 meses de vida. En adultos el esquema es de 3 dosis, a los 0-1 y 6 meses [Min de Salud de la Nación, 2014]. Las personas con infección crónica por VHB que requieren tratamiento antiviral son tratadas con análogos de nucleósidos/nucleótidos, los cuales pueden retardar la progresión de la cirrosis, reducir la incidencia del carcinoma hepatocelular y mejorar la supervivencia a largo plazo.

11.3. Virus de Hepatitis C (VHC)

La Hepatitis C es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente al hígado y es causada por el VHC, virus pequeño con envoltura y con una sola cadena de ARN. Pertenece a la familia *Flaviviridae* y se transmite a través de la sangre humana y sus derivados. La eficacia de la transmisión parenteral ha quedado demostrada por la alta tasa de seropositividad para VHC entre receptores de sangre y sus derivados, usuarios de drogas, personal de salud y pacientes hemodializados. Además, el VHC se puede transmitir aunque menos frecuentemente por vía sexual, y de madre a hijo [Minassian ML *et al.*, 2014].

En todo el mundo hay entre 130 y 150 millones de personas infectadas con el VHC. De ellos, 300.000 a 500.000 personas mueren anualmente por enfermedades hepáticas relacionadas

con la hepatitis C. Las regiones más afectadas son Asia central y oriental y el norte de África. Además, la incidencia de este virus puede concentrarse en algunas poblaciones de alto riesgo como usuarios de drogas inyectables. Existen seis genotipos del VHC, cuya distribución varía en cada región.

La infección con el VHC se diagnostica por la detección de anticuerpos anti-VHC mediante un ELISA. Si el examen es reactivo se debe realizar una prueba de confirmación para su diagnóstico final. Esta enfermedad puede ser tanto aguda como crónica. Por lo general, la infección aguda es asintomática y son inusuales las hepatitis fulminantes [Minassian ML *et al.*, 2014]. Aproximadamente un 15-45% de las personas infectadas eliminan el virus espontáneamente en un plazo de seis meses, sin necesidad de tratamiento alguno. El restante 55-85% de las personas desarrollarán infección crónica. De esas personas, el 15-30% correrán el riesgo de desarrollar cirrosis o cáncer de hígado.

El tratamiento con antivirales logra buenos resultados en el 50-90% de los casos y ha mostrado eficacia para limitar el desarrollo de cirrosis y cáncer de hígado. Recientemente se han desarrollado nuevos antivirales de acción directa combinados con interferón. El grado de daño hepático y el genotipo viral se utilizan para determinar la orientación del tratamiento y evolución de la enfermedad [Krasniansky D, 2014].

11.4. Virus de Hepatitis D (VHD)

El virus de hepatitis D posee un genoma RNA de bajo peso molecular que utiliza las proteínas de envoltura de VHB para formar el virión, por lo cual la infección por VHD solo puede ocurrir en presencia de VHB. Si la infección se produce en forma conjunta se denomina co-infección, si infecta a organismos que estén cursando una hepatitis B (sea en etapa aguda o crónica) se denomina sobreinfección.

EL virión de VHD es una pequeña partícula esférica de 36 nm de diámetro, que en la capa externa presenta las tres proteínas de envoltura de VHB junto con lípidos de la célula hospedadora; en el interior la nucleocápside posee una hebra simple de RNA circular de 1700 nucleótidos de longitud y 200 moléculas de antígeno de hepatitis D (HD_{Ag}) formando las denominadas ribonucleoproteínas [Bichko VV *et al.*, 1996; Dingle K *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 1993].

En los casos de coinfección VHB-VHD se ve incrementado el riesgo de desarrollar hepatitis fulminante; en los casos de sobreinfección VHB-VHD se agravan las manifestaciones

clínicas preexistentes, presentándose mayor incidencia de hepatocarcinoma y cirrosis [Yamaguchi *et al*, 2002; Wedemeyer H *et al.*, 2010].

De los 350-400 millones de infectados crónicos por VHB en el mundo, alrededor de 15-20 millones presentan evidencia serológica de haber estado expuestos a VHD [Farci P, 2003].

El diagnóstico se realiza mediante la detección de anticuerpos IgM anti-VHD e IgG anti-VHD mediante técnicas comerciales de ELISA. El HDAg no es detectable luego de dos semanas post infección, razón por la cual no se utiliza en el algoritmo diagnóstico. La detección de RNA viral por rt-PCR, rt-nPCR y/o real time PCR son métodos de diagnóstico alternativos, especialmente útiles cuando los Acs anti-VHD no pueden ser detectados. Es siempre importante la genotipificación viral debido a que los distintos genotipos presentan diferentes manifestaciones clínicas.

El tratamiento con interferón alfa pegilado (PEG-INF- α 2b) es efectivo en la eliminación del ARN del VHD.

11.5. Virus de inmunodeficiencia Humana (VIH)

En 1981 el Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés *Center for Disease Control*) de Estados Unidos notificaba la aparición de neumonías por *Pneumocystis jirovecii* y de una forma diseminada de Sarcoma de Kaposi entre jóvenes homosexuales masculinos de EEUU, en quienes se observaba una disfunción irreversible y progresiva de la inmunidad celular; y los datos epidemiológicos acumulados indicaban que se trataba de una enfermedad infectocontagiosa con características epidémicas y de probable etiología viral, que se conoció desde ese entonces como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [Gómez Carrillo M, 2014].

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, VIH-1 es un virus ARN envuelto en una estructura lipídica y monocatenario, identificado en 1984 como agente causal del SIDA [Barré-Sinoussi F *et al.*, 1983; Broder S *et al.*, 1984]. Pertenece al género *Lentivirus*, dentro de la familia *Retroviridae* [ICTV, 2014]. Se transmite principalmente por vía sexual, a través de semen y secreciones cérvico vaginales; por vía parenteral, a través de sangre infectada y hemoderivados, trasplante de órganos, maniobras con instrumentos punzocortantes; y por vía vertical, es decir, la transmisión durante la gestación, parto o lactancia [Weber T *et al.*, 1992; Gómez Carrillo M, 2014].

Según el Resumen Global de la Epidemia de SIDA del año 2013, aproximadamente 35 millones de personas en el mundo viven con VIH, de las cuales el 90,8% (31,8 millones) son adultos, 45,7% (16 millones) son mujeres, y 9,1% (3,2 millones) son niños menores de 15 años. De acuerdo con este informe, en 2013 se infectaron con este virus 2,1 millones de personas, hubo un total de 1,5 millones de muertes por SIDA en 2013, siendo de ellas 1,3 millones adultos y 190.000 niños menores de 15 años [OMS, 2013].

Por su parte, el Boletín N° 32 sobre VIH-SIDA y ETS (enfermedades de transmisión sexual) del Ministerio de Salud de Argentina, reportó que en nuestro país conviven alrededor de 126 mil personas con este virus, de las cuales el 30% no conoce su situación; además, que se infectan alrededor de 6.000 personas cada año -de las cuales el 90% de las mujeres y de los varones lo hacen durante una relación sexual desprotegida- y que fallecen 1.400 personas por SIDA. Además, que se siguen produciendo infecciones por transmisión vertical detectándose un 3,9 % entre 2012 y 2014 [Min Sal, 2015].

Los primeros ensayos de ELISA, en 1985, detectaban los anticuerpos anti-VIH a los 40 días de la infección. En 1987 se introdujeron las técnicas de segunda generación que incorporaban como antígenos proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, y estos nuevos antígenos permitieron detectar anticuerpos frente a todos los subtipos M, y los grupos N y O, y frente a VIH-2, un virus muy relacionado con el VIH-1 e identificado inicialmente en África Occidental. Luego se consiguió incrementar la sensibilidad en la detección a 33-35 días post-infección. En 1994 las técnicas de ELISA adquirieron el formato “sándwich”, se denominaron ELISA de tercera generación, logrando detectar anticuerpos de clase IgG e IgM, y acortando con ello el intervalo entre la exposición al virus y la aparición de marcadores serológicos (período ventana) a 22 días. Estas técnicas se han modificado utilizando sustratos fluorescentes (ELFA) o formatos de quimioluminiscencia (CMIA/ChLIA), lo que permite la automatización, el procesamiento de un gran número de muestras, la reducción de manipulación y de los costos. Debido al riesgo residual de transmisión de VIH por sangre con serología negativa, se introdujo en algunos países la determinación del Ag p24 del VIH en los bancos de sangre, que en Argentina es recomendada desde 1997 por la Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología (AAHI) y es obligatoria desde 2013 por resolución del Ministerio de Salud. Esto se implementó con el objetivo de detectar la presencia del Ag p24 durante el periodo de ventana inmunológica, reduciéndola de 25 a 16 días, y favorecer así la detección anticipada de la infección por VIH en los donantes de sangre. A principio de los años 2000 se introdujeron las técnicas de cuarta

generación que permiten la detección simultánea de anticuerpos anti-VIH-1 y 2 y antígeno p24 del VIH-1, reduciéndose el período ventana a 13-15 días, es decir, casi aproximándose a la detección de ARN del VIH [Banks AA of B., 2012; Canna F *et al.*, 2003].

Las técnicas de detección y confirmación de anticuerpos específicos del VIH-1 que se utilizan más frecuentemente para el diagnóstico son el ELISA (mayor sensibilidad) y el WB (más específico) respectivamente. La metodología de LIA como método confirmatorio ha quedado prácticamente en desuso. Estas técnicas pueden incorporar antígenos de envoltura de VIH-2, lo que permite diagnosticar este tipo vírico [Canna F *et al.*, 2003].

La utilización de las pruebas NAT (del inglés *Nucleic Acid Testing*, detección de ácidos nucleicos), basadas en ensayos de PCR, que detectan el ARN del VIH-1 (y reemplaza la detección de Ag p24) junto a la búsqueda de anticuerpos anti-VIH, disminuyeron el período de ventana para la detección del virus, siendo actualmente de 9 días mediante el uso de estas pruebas de biología molecular [Banks AA of B., 2012]. Su utilización para el tamizaje de donantes de sangre en Argentina fue recomendado en 2012 por la AAHI [AAHI; 2012], y puede ser utilizado para reemplazar la detección del Ag p24 [Min de Salud; 2013].

La principal herramienta para frenar la diseminación de VIH es conocer los mecanismos de transmisión, promocionando entre otras cosas el uso de preservativo en la población general. No existe aún vacuna ni cura para esta pandemia, aunque los tratamientos con nuevas drogas ha aumentado la expectativa y calidad de vida de las personas seroreactivas para VIH en los últimos años.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

En base a los antecedentes hasta aquí expuestos en esta tesis se plantea como objetivo general estimar la prevalencia de infección por VHE e identificar los genotipos, así como evaluar la eventual co-circulación de VHE con otros marcadores de infección viral, en diferentes poblaciones y/o nichos de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la prevalencia serológica del VHE en muestras de plasmas de pacientes embarazadas y pacientes con hepatograma alterado del Hospital Interzonal Especializado de Agudos y Crónicos “San Juan de Dios” de la Plata.
2. Evaluar la presencia de ARN-VHE en las muestras de plasmas de ambas poblaciones.
3. Caracterizar los genotipos de VHE a partir de los casos positivos detectados.
4. Evaluar la presencia de otros marcadores de infección virales en los casos anticuerpos anti-VHE reactivos y anti-VHE no reactivos.
5. Evaluar la presencia de ARN-VHE en muestras de aguas y desechos cloacales de distintos puntos del curso del río Samborombón y afluentes.

III. METODOLOGÍA

1. Poblaciones estudiadas

1.1. *Pacientes embarazadas (PE)*

Se realizó un estudio prospectivo en un total de 82 mujeres embarazadas que concurrieron durante el período octubre 2014 a marzo 2015 al Hospital Interzonal Especializado de Agudos y Crónicos (HIEAyC) “San Juan de Dios” de la Plata para realizarse sus controles gestacionales. Se consideró para el análisis epidemiológico una única muestra por paciente.

1.2. *Pacientes con Hepatograma alterado (PHA)*

Se realizó un estudio prospectivo que incluyó un total de 7 pacientes, 4 internados y 3 ambulatorios, que presentaron un hepatograma alterado, definido como elevación de alguna de las transaminasas en 1,5 veces el límite superior normal, en al menos dos oportunidades separadas en un intervalo de tiempo mayor o igual a un mes, que fueron observados en el área de hepatología - servicio de Clínica médica del HIEAyC “San Juan de Dios” de La Plata durante el período octubre 2014 – marzo 2015.

1.3. *Criterios de inclusión y exclusión*

Se utilizaron muestras de individuos entre 18 y 60 años de edad que concurrieron o estaban internados en el HIEAyC “San Juan de Dios” de La Plata y que firmaron el correspondiente consentimiento informado. Fueron excluidas aquellas muestras de individuos que no cumplieron con los criterios de inclusión mencionados.

1.4. *Consideraciones éticas*

Este proyecto y sus Anexos I (encuesta epidemiológica) y II (consentimiento informado) fueron evaluados y aceptados por el Comité de Bioética de la Fundación Huésped sito en la calle Ángel Peluffo 3932, C1202ABB, Ciudad de Autónoma de Buenos Aires. Se incluyeron muestras de individuos que fueron invitados a participar voluntariamente, a quienes se les informó verbalmente sobre los alcances y relevancia a través de la lectura de un consentimiento informado. Luego se realizó una encuesta que constó de datos poblacionales y epidemiológicos. Las muestras de sangre extraídas se ingresaron según el código establecido por la Ley de Sida de Argentina, formado por la inicial F o M según el sexo, seguido de las dos primeras iniciales del primer nombre, las dos primeras iniciales del primer apellido, y la fecha de nacimiento. Se

mantuvo la confidencialidad de toda la información de este estudio según pautas de la legislación nacional e internacional vigente. El nombre de los pacientes no fue almacenado en ningún registro ni revelado en ninguna publicación o presentación de los resultados del estudio. Se siguieron estrictamente las pautas éticas internacionales relacionadas con los estudios epidemiológicos y clínicos.

1.5. *Obtención de muestras y procesamiento*

Se realizó un muestreo por conveniencia. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa, luego el plasma se separó por centrifugación y se realizaron dos alícuotas. Una fue utilizada para la detección de los diferentes marcadores serológicos de infección viral y otros estudios que se realizaron en el laboratorio de Virología del HIEAyC “San Juan de Dios” de La Plata. La segunda alícuota fue conservada a -70°C hasta su posterior procesamiento molecular en el Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS). En la figura 3M se muestran las zonas de residencia de las pacientes embarazadas del partido de La Plata estudiadas.

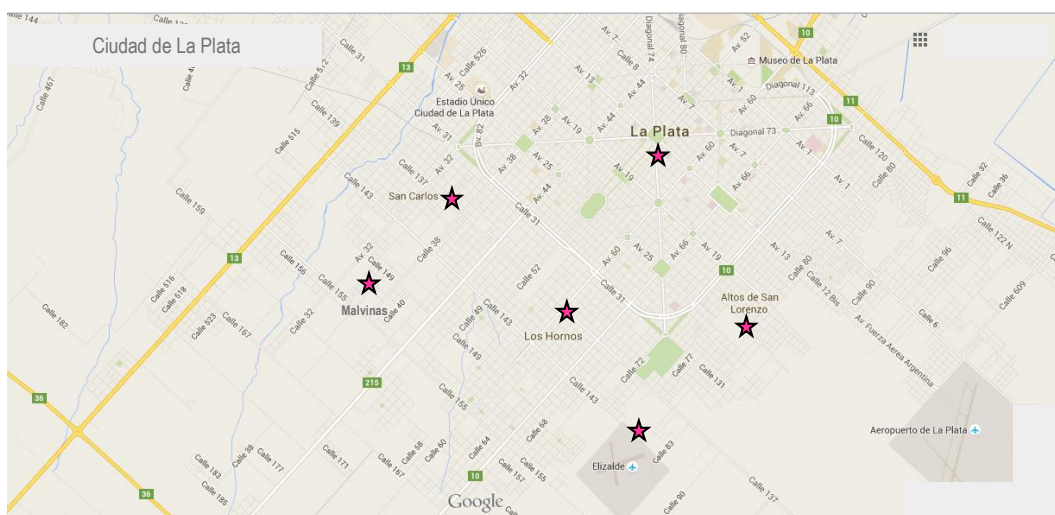


Figura 3M. Lugares de Residencia de las pacientes embarazadas estudiadas

2. Muestras de aguas analizadas

Se estudiaron un total de 55 muestras de agua del cauce del Río Samborombón (sus afluentes, efluentes cloacales y aguas subterráneas) y del cauce del Arroyo San Francisco, Arroyo

Las Piedras, canal Yapeyú y efluentes cloacales, obtenidas durante el período Junio-Diciembre 2013.

Respecto del plan de muestreo, la dirección de Hidráulica realizó convenios con los municipios a través de los cuales se convinieron los planes de muestreo como contralor adicional a los que podían realizar la autoridad del agua y la OPDS, quienes acudían ante denuncias puntuales. De esta manera trataban de mantener su municipio con aguas superficiales dentro de los parámetros aconsejados por los niveles guía y las plantas de tratamiento de líquidos cloacales dentro de los parámetros estipulados por ley. Se mantenían reuniones de acuerdo entre la dirección de hidráulica y los municipios donde se mostraba el recorrido del río y sus afluentes, el municipio planteaba que afluentes podrían ser fuente de contaminaciones de acuerdo a las industrias que ellos conocían, y se elegían así puntos de muestreo de fácil acceso (Rutas, puentes, caminos de tierra). Se propuso tomar muestras de agua superficial antes de la desembocadura del afluente, en el afluente y aguas abajo. De esa manera se podía comparar como variaba el grado de contaminación en la rama principal. Generalmente la dirección de hidráulica proponía más puntos de toma de muestra que los que el municipio finalmente aceptaba, y cierta cantidad de parámetros a medir de los cuales por razones económicas se convenían cuáles eran los principales.

Los municipios de Brandsen, Almirante Brown y San Vicente consideraron conveniente estimar la calidad del agua superficial de sus ríos y detectar el origen de algún tipo de contaminación, ya sea de plantas de tratamiento de líquidos cloacales del mismo municipio o de industrias particulares. De la estadística surgida de esos estudios el municipio podía actuar en consecuencia. La dirección de hidráulica trabajó también con Cañuelas, Rio Azul, Tapalque, San Antonio de Areco, Rio Matanza-riachuelo, en todos sus afluentes y toda su trayectoria (desde comienzo a desembocadura), y el río Salado, a partir de convenios realizados con la Universidad de Buenos Aires (UBA).

Para estudiar la presencia de ARN de VHE se eligieron las localidades que recibían vertidos de tratamiento de líquidos cloacales, y que se estaban trabajando en el momento de desarrollo de la presente tesis.

En algunos arroyos como los de Almirante Brown había asentamientos humanos a la vera de los mismos, por lo que a partir de los valores de los parámetros estudiados se dedujo que estos arroyos recibían efluentes cloacales difusos (es decir, aquellos que son vertidos a las aguas

superficiales en forma individual a partir de cada vivienda y sin tratamiento previo). En el municipio de Alte. Brown hay muchos barrios con viviendas multifamiliares que tienen obligación de poseer una planta de tratamiento de residuos cloacales particular. El municipio eligió ciertos barrios y acompañó a quien tomaba las muestras, pues no pude ingresar sin la debida autorización. En cuanto al municipio de Brandsen se pidieron estudios de aguas de napas, que se realizó a través de pozos ubicados dentro del predio de la planta de tratamiento de residuos cloacales municipal y dentro del predio de la planta de reciclaje de residuos sólidos urbanos con el fin de controlar posibles fugas o emisiones de las piletas de las plantas de tratamiento, contaminación por lluvia que arrastran los lixiviados, entre otros.

2.1. *Obtención de muestras y procesamiento*

Las muestras de aguas superficiales, subterráneas y de efluentes de plantas de tratamientos cloacales fueron brindadas gentilmente para este trabajo de tesis por el Departamento Laboratorio DiPSOH (Dirección Provincial de Saneamiento y Obras Hidráulicas - Subsecretaría de Obras Públicas – Ministerio de Infraestructura de la Prov. de Bs. As). Las mismas se tomaron superficialmente en forma manual y puntual según norma IRAM 29012 en el marco de los convenios establecidos entre los municipios participantes y el departamento Laboratorio DiPSOH por personal de dicho laboratorio según la metodología utilizada habitualmente para control de aguas en dicha institución. Brevemente: se tomaron 60 ml en un contenedor estéril comercial. En cada caso se señaló sitio, día y hora de extracción. Durante el traslado al laboratorio todas las muestras se mantuvieron refrigeradas y almacenadas en oscuridad. Se tomaron 1,5 ml de agua y se centrifugaron a 14.000 rpm para su concentración, el pellet se conservó luego en nitrógeno líquido hasta su procesamiento en el INBIRS. En la Tabla 1M a continuación se detallan los lugares y localidades de extracción.

Tabla 1M. Muestras de aguas recolectadas en este estudio.

LUGAR DE EXTRACCIÓN	LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD
A. San Francisco y Ruta 4	Alte. Brown	34°49'02,7" S	58°21'33,2" W
A. San Francisco y Av. San Martín	Alte. Brown	34°46'55,9" S	58°20'23,2" W
A. San Francisco y Av. Donato Álvarez	Alte. Brown	34°46'04,0" S	58°19'35,4" W
A. Las Piedras y J.B. Justo	Alte. Brown	34°51'19,5" S	58°21'08,2" W
A. Las Piedras y Fontana	Alte. Brown	34°50'06,9" S	58°19'32,6" W
Canal Yapeyú y República Argentina	Alte. Brown	34°51'47,6" S	58°21'29,1" W
PTLC barrio P ^I	Alte. Brown	35°03'12,9" S	58°08'15,5" W
PTLC barrio V ^{II}	Alte. Brown	34°51'25,9" S	58°22'21,5" W
A° Las Piedras y Cevallos	Alte. Brown	34°50'26,0" S	58°18'53,9" W
PTLC barrio T ^{III}	Alte. Brown	34°50'40,3" S	58°22'16,5" W
Laguna San Vicente en Muelle pescadores	San Vicente	35°00'54,4" S	58°25'14,4" W
A° S. Vicente y Pedro Quiroga	San Vicente	35°00'28,4" S	58°24'32,4" W
A° S. Vicente y Ruta 6	San Vicente	35°01'57,8" S	58°23'22,8" W
Canal II e Intendente Madero	San Vicente	34°59'19,6" S	58°21'42,9" W
Canal II y Ruta 6	San Vicente	35°01'41,4" S	58°21'33,6" W
A° Manantiales y Ruta 210	San Vicente	35°02'33,7" S	58°19'37,7" W
A° Samborombón chico y puente Camino Domselar	San Vicente	35°05'09,8" S	58°17'48,3" W
A° El portugués (brazo este) y Ruta 6	San Vicente	35°03'32,0" S	58°27'08,3" W
A° El portugués (brazo oeste) y Ruta 6	San Vicente	35°03'46,8" S	58°28'10,8" W
Samborombón (brazo norte) y ruta 16	San Vicente	35°06'18,9" S	58°31'12,0" W

Tabla 1M. Muestras de aguas recolectadas en este estudio (*Continuación*).

Samborombón (brazo sur) y ruta 16	San Vicente	35°09'02,2" S	58°32'17,9" W
Samborombón (antes de unión con El portugués) y Camino de tierra	San Vicente	35°08'12,2" S	58°25'14,6" W
A° Samborombón y puente "Once bocas"	San Vicente	35°07'52,1" S	58°23'08,3" W
B° Acacias y Samborombón chico	Brandsen	35°06'16,9" S	58°17'22,6" W
Ruta 215 y Samborombón Chico	Brandsen	35°09'36,9" S	58°15'22,4" W
Ruta 215 y Samborombón	Brandsen	35°10'49,4" S	58°18'44,5" W
Ruta 29 y Samborombón	Brandsen	35°13'29,1" S	58°12'15,8" W
Ruta 2 y Samborombón	Brandsen	35°19'53,1" S	58°02'58,1" W
Efluente PDLC ^{IV}	Brandsen	35°09'56,2" S	58°14'45,9" W
Agua pozo PDLC ^V	Brandsen	35°09'57,2" S	58°14'47,3" W
Agua pozo PRRSU ^{VI}	Brandsen	35°07'19,9" S	58°14'29,7" W

^I PTLC barrio P: Efluente cloacal; Planta de tratamiento de líquidos cloacales en barrio P; ^{II} PTLC barrio V: Efluente cloacal; Planta de tratamiento de líquidos cloacales en barrio V; ^{III} PTLC barrio T: Efluente cloacal; Planta de tratamiento de líquidos cloacales en complejo habitacional barrio T; ^{IV} Efluente PDLC: Efluente cloacal; planta de tratamiento de desechos líquidos cloacales; ^V Agua Pozo PDLC: Agua subterránea en planta de Desechos Líquidos Cloacales; ^{VI} Agua pozo PRRSU: Agua subterránea en Planta de Reciclado de Residuos Sólidos Urbanos

A continuación se observan en las figuras 4M, 5M, 6M, y 7M imágenes digitales de los arroyos antes mencionados y la ubicación geográfica de los puntos de muestreo.

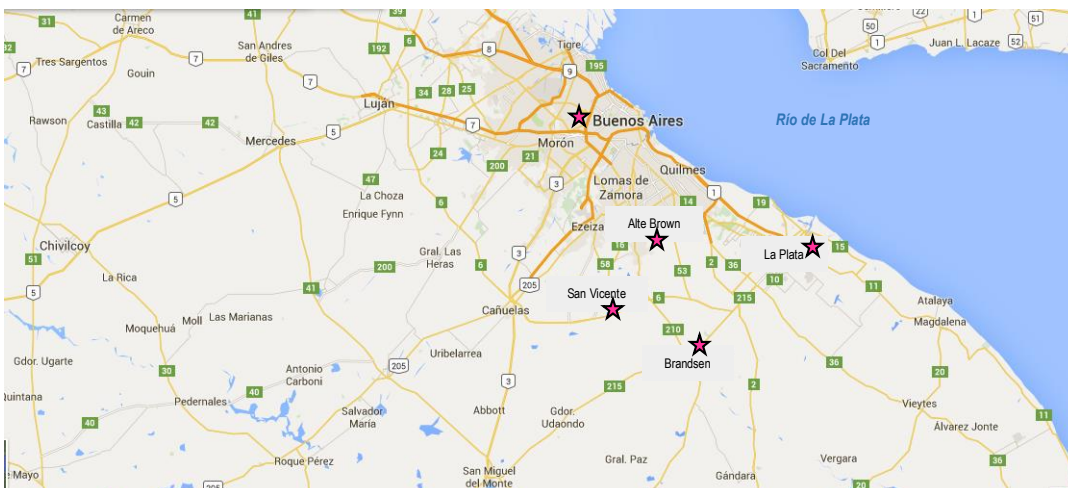


Figura 4M: Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de aguas en la provincia de Buenos Aires y su relación geográfica con la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de La Plata.

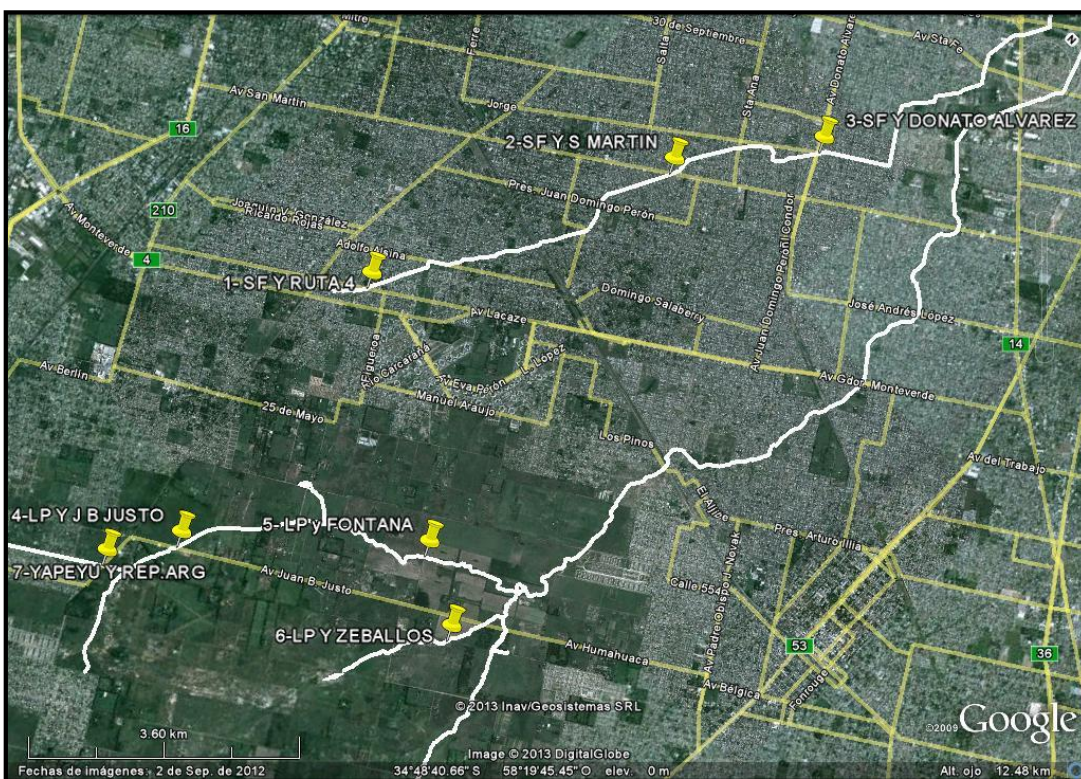


Figura 5M: Alte. Brown. Muestras de agua extraídas de A° San Francisco, A° Las Piedras, Canal Yapeyú y efluentes cloacales provenientes de Plantas de Tratamiento.

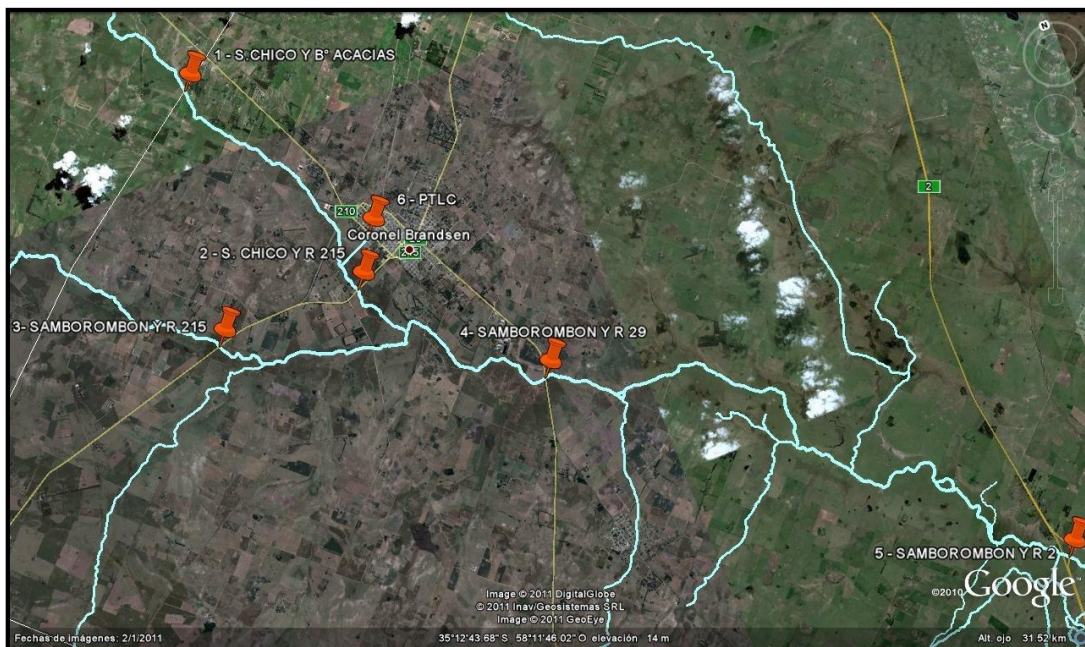


Figura 6M: Brandsen. Muestras de agua extraídas de los Ríos Samborombón, Samborombón Chico, efluente cloacal proveniente de la Planta de Tratamiento Municipal y agua de pozos existentes en el predio de la misma y en el perteneciente a la Planta de Reciclado de Residuos Sólidos Urbanos.

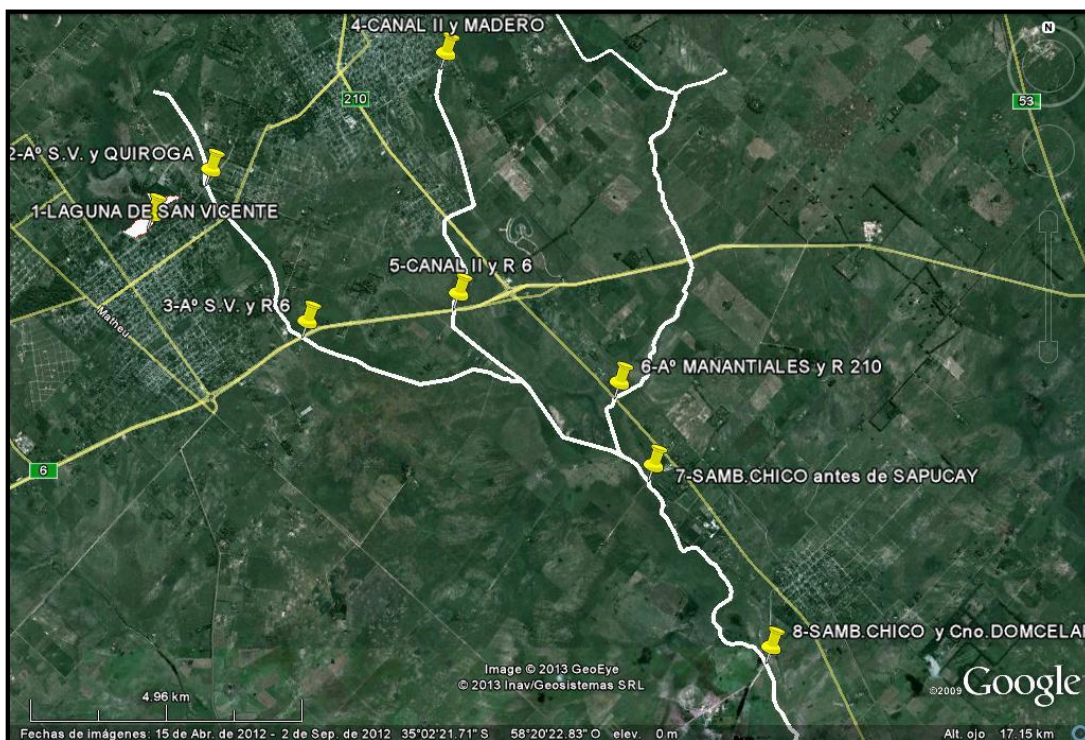


Figura 7M: San Vicente. Muestras de agua extraídas de A° El Portugués y A° Samborombón

3. Metodología empleada para el estudio del virus de Hepatitis E

3.1. Diagnóstico serológico de infección por VHE

El diagnóstico se realizó en el laboratorio de Virología del HIEAyC “San Juan de Dios” de La Plata en PE y PHA. Para la detección de marcadores serológicos de infección se utilizaron los siguientes equipos de inmunoensayo (ELISA) comerciales:

- **VHE IgM:** equipo HEV IgM para la detección de Ac tipo IgM (Dia.Pro SRL, Milano, Italia)
- **VHE IgG:** equipo HEV IgG para la detección de Ac tipo IgG (Dia.Pro SRL, Milano, Italia)

3.2. Diagnóstico molecular de VHE

El diagnóstico molecular se realizó sobre el total de muestras de plasma (PE y PHA) y de aguas.

3.2.1. Extracción del ARN

En la extracción de ARN se utilizó un método comercial mediante la utilización del equipo QIAamp RNA blood kit (Qiagen, Suiza) en el cual se procesaron 200 µl de plasma según el protocolo descrito por el fabricante. El ARN se conservó a -80 °C hasta su posterior utilización.

3.2.2. Transcripción inversa

Se obtuvo el ADN copia (ADNc) por medio de retrotranscripción utilizando hexámeros al azar como cebadores y la enzima SuperScript III (Invitrogen) según protocolo del fabricante. Esta técnica fue puesta a punto para este trabajo. El ADNc se conservó a -20°C hasta su amplificación.

Protocolo obtención ADNc:

Reactivo	Volumen por muestra
H ₂ O libre de nucleasas	6 µl
Random Primers	1 µl
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen)	0,5 µl
2x PCR Master Mix (Invitrogen)	12,5 µl
Vol. Total	20 µl
RNA	5 µl

Condiciones de ciclado: Transcripción reversa: 50°C, 30 min.
 Activación del Inhibidor de Taq: 95°C, 2 min.
 Amplificación (45 ciclos): 95°C, 15 seg.
 55°C, 35 seg.

3.2.3. Amplificación de la región parcial del ORF1 y ORF2

Se amplificó por PCR anidada con cebadores específicos para las regiones parciales del ORF1 y ORF2 del genoma del VHE. Se incluyeron un control positivo -que nos brindó amablemente el Prof. Paul K.S. Chan- y los controles negativos correspondientes, según las normas de Kwok & Higuchi [Kwok & Higuchi, 1989]. Las determinaciones se hicieron por triplicado a partir de tres extracciones de ADN independientes.

En primera instancia se realizó la amplificación de una región parcial del ORF2 del VHE mediante la utilización del protocolo descrito previamente por Wang et al [Wang et al., 1999]. Los cebadores del ORF2 que hibridan en la zona ubicada entre las posiciones nucleotídicas 6298-6321 / 6494-6470 generan un producto de 197 pb en el primer round y 145 pb en el segundo round.

Cebadores utilizados:

1° Round:

ConsORF2-S1 (primer sentido - ORF2): 5' GACAGAATTRATTTCGTCGGCTGG 3'

ConsORF2-a1 (primer anti sentido - ORF2): 5' CTGTGTCRTGYTGGTTRTCATAATC 3'

2° Round:

ConsORF2-S2 (primer sentido - ORF2): 5' GTYGTCTCRGCCAATGGCGAGC 3'

ConsORF2-a2 (primer anti sentido - ORF2): 5' GTTCRTGYTGGTTRTCATAATCCTG 3'

Mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen por muestra	Conc. Final
Buffer (MgCl ₂ 25 mM)	5 µl	1X
MgCl ₂ (50 mM)	0,25 µl	2 mM
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	
Primer Sentido (10 mM)	0,5 µl	
Primer anti sentido (10 mM)	0,5 µl	
Taq polimerasa	0,5 µl	
H ₂ O	15,25 µl	
Vol. final	22,5 µl	
ADNc	2,5 µl	

Condiciones de ciclado ORF2 y ORF1 - 1° Round

Desnaturalización:	94 °C, 5 min.
Amplificación (35 ciclos)	
Desnaturalización	94 °C, 1 min.
Annealing	55 °C, 1 min.
Extensión:	72°C, 1 min.
Incubación:	72°C, 7 min.

Condiciones de ciclado ORF1 - 2° Round

Desnaturalización:	94 °C, 5 min.
Amplificación (35 ciclos)	
Desnaturalización	94 °C, 1 min.
Annealing	51 °C, 1 min.
Extensión:	72°C, 1 min.
Incubación:	72°C, 7 min.

Condiciones de ciclado ORF2 - 2° Round

Desnaturalización:	94 °C, 5 min.
Amplificación (35 ciclos)	
Desnaturalización	94 °C, 1 min.
Annealing	57 °C, 1 min.
Extensión:	72°C, 1 min.
Incubación:	72°C, 7 min.

Luego, a todas las muestras se les realizó además la amplificación de la región parcial del ORF1 según el protocolo descrito por Wang et al. [Wang et al., 1999]. Los cebadores del ORF1 que hibridan en la zona ubicada entre las posiciones nucleotídicas 56-79 y 473-451 generan un producto de 418 pb en el primer round y 281 pb en el segundo round.

Cebadores utilizados:

1° Round:

HE5-1 (primer sentido - ORF1): 5' TCGATGCCATGGAGGCC 3'

HEVORF1-1as (primer anti sentido - ORF1): 5' GGCCAT*TGCCCTCCGCAACATC 3'

2° Round:

HE5-2 (primer sentido – ORF1): 5' GCCYTKGCGAATGCTGTGG 3'

HEVORF1-2as (primer anti sentido – ORF1): 5' ACCATCAAAGCAGTAAGTCCG 3'

Todas las reacciones de PCR descritas en esta tesis se realizaron en un ciclador térmico *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Alemania). Se sembraron los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Se realizó la corrida electroforética a 100 V durante 30 min.

4. Detección de marcadores serológicos de los virus de Hepatitis A, B, C, D, y Virus de Inmunodeficiencia humana

Se realizó la detección de diferentes marcadores serológicos de infección viral en ambas poblaciones de pacientes antes mencionadas en el H.I.E.A. y C. “San Juan de Dios” de La Plata, Laboratorio de Virología, por el maestrando.

4.1. Detección de anticuerpos anti-VHA

- **HAV-M** (anticuerpos IgM anti-VHA). Equipo HAVAb-IgM Architect system para la detección de Ac tipo IgM (Abbott, Wiesbaden, Alemania).
- **HAV-G** (anticuerpos IgG anti-VHA). Equipo HAVAb-IgG Architect system para la detección de Ac tipo IgG (Abbott, Wiesbaden, Alemania).

58

4.2. Detección de VHB: antígeno de superficie (HBsAg) y anticuerpos anti-core (HBcAc)

- **HBsAg**: Equipo HBsAg Architect system (Abbott, Sligo, Irlanda).
- **Anti-HBc**: Equipo Anti-HBc II Architect system (Abbott, Wiesbaden, Alemania).

4.3. Detección de anticuerpos totales anti-VHC

- **VHC**: Equipos Anti-HCV Architect system (Abbott, Wiesbaden, Alemania); HCV Ab (Diapro, Sesto San Giovanni, Italia) e ImmunoComb II HCV (Orgenics, Yavne, Israel).

4.4. Detección de anticuerpos totales anti-VHD

- **Anti-HDV**: equipo Anti-HDV (Abbott, Wiesbaden, Alemania) sobre nuestras reactivas para HBsAg y/o anti-HBc.

4.5. *Detección de VIH*

- **VIH:** Ag p24 y Ac del virus VIH mediante el equipo HIV Ag/Ab Combo Architect system (Abbott, Wiesbaden, Alemania.)

5. **Análisis de marcadores hepáticos**

5.1. *Niveles de transaminasas*

Se determinaron los niveles de las transaminasas aspartato aminotransferasa (**AST**) y alanino aminotransferasa (**ALT**) en todas las muestras séricas mediante el método cinético UV AA Línea Líquida Wiener lab con los reactivos comerciales GOT (AST) UV AA Línea Líquida (Wiener, Rosario, Argentina) y GPT (ALT) UV AA Línea Líquida (Wiener, Rosario, Argentina) respectivamente. El procesamiento se realizó en el H.I.E.A. y C. “San Juan de Dios” de La Plata, Laboratorio Central y Laboratorio de Guardia, por los profesionales de dichos sectores y por el maestrando.

5.2. *Niveles de fosfatasa alcalina*

Se determinaron los niveles de fosfatasa alcalina (**FAL**) en todas las muestras séricas mediante el método cinético optimizado (DGKC e SSCC) a 405 nm mediante el reactivo comercial ALP 405 AA Línea Líquida Wiener lab (Wiener, Rosario, Argentina).

5.3. *Niveles de bilirrubina total y directa*

Se determinaron los niveles de bilirrubina total (**BbT**) y bilirrubina directa (**BbD**) en todas las muestras séricas mediante el método DPD AA Línea Líquida Wiener lab con los reactivos comerciales Bilirrubina Total AA Línea Líquida (Wiener, Rosario, Argentina) y Bilirrubina Directa AA Línea Líquida (Wiener, Rosario, Argentina) respectivamente.

6. **Análisis de aguas**

Se realizaron en el Departamento Laboratorio Área Aguas, de la Dirección Provincial de Saneamiento y Obras Hidráulicas, Ministerio de Infraestructura de la Provincia de Buenos Aires, por la Lic. en Cs. Bioquímicas María C. Digirónimo, responsable de dicho laboratorio.

6.1. *Análisis bacteriológico*

Se determinó la presencia de bacterias coliformes totales y fecales como indicador de contaminación de aguas por excretas, según normas SM 9221 B y SM 9221 C respectivamente.

6.2. *Sólidos sedimentables*

Se determinó la fracción de sólidos no disueltos como medida aproximada de cercanía

en el tiempo de una fuente de contaminación. Se procedió según metodología SM 2540 F. Si bien no hay valores guía para cuerpos de agua superficial, se ha citado la Resolución 336/03 del ADA, que determina el máximo permitido para descarga de efluentes en: $SS_{10\text{ Minutos}} = 0\text{ ml/l}$; $SS_{2\text{ horas}} < 1\text{ ml/l}$.

6.3. Cloruros y detergentes aniónicos

Se determinó la cantidad de cloruros de las muestras como marcador de descarga de aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas en aguas superficiales, según normas SM 4500-Cl B. La determinación de surfactante aniónicos (detergentes) como Sustancias Activas al Azul de Metileno (SAAM) se realizó según normas SM 5540-Surfactantes.

7. Análisis de datos

Todos los datos de los voluntarios incluidos en el estudio de corte transversal fueron incorporados en una base de datos utilizando una planilla Excel. Se estimó la prevalencia de infección por hepatitis E en el grupo de Pacientes con Hepatograma Alterado y de Mujeres Embarazadas y para cada valor de prevalencia se calculó su correspondiente intervalo de confianza del 95% utilizando el programa EPIDAT 4.1.

IV. RESULTADOS

1. Poblaciones estudiadas

1.1. Datos demográficos de las poblaciones estudiadas

A continuación se detallan los datos demográficos (edad, sexo y lugar de residencia) del total (N = 89) de muestras estudiadas para ambas poblaciones, PE (N=82) y PHA (N=7) en la tabla 1Ra y b.

Tabla 1Ra. Datos demográficos de PE

PE	Edades			Lugar de Residencia
	< 20 años	20-30 años	>30 años	
n= 61	18	34	9	B° Los Hornos
n= 1	0	0	1	B° San Carlos
n= 5	1	4	0	B° Altos de San Lorenzo
n= 11	2	6	3	B° Elizalde
n= 3	1	2	0	Casco Urbano
n= 1	0	1	0	B° Malvinas
N=82	22	47	13	Totales

62

Tabla 1Rb. Datos demográficos de PHA

PHA N=7	Sexo	Edad	Lugar de Residencia
Paciente a	M	38	Azul
Paciente b	M	43	San Miguel del Monte
Paciente c	M	44	Fcio. Varela
Paciente d	F	48	La Plata
Paciente e	M	56	La Granja (partido de La Plata)
Paciente f	F	73	La Plata
Paciente g	M	50	9 de julio

1.2. Diagnóstico serológico de infección por VHE

Al total de las muestras analizadas se les realizó la detección de ambos marcadores serológicos (anticuerpos IgM-VHE e IgG-VHE) para la infección por VHE, registrándose una prevalencia total del 6,7% (6/89; 95% IC: 0,97-12,51). Para el marcador anticuerpos IgM-VHE, que evidencia posible infección aguda por VHE, se observó una prevalencia del 3,4% (3/89; 95% IC: 0,70-9,53) mientras que para los anticuerpos IgG-VHE que marcan infección pasada se detectó una prevalencia del 4,5% (4/89; 95% IC: 1,23-11,10).

Con respecto al marcador anticuerpos IgM-VHE en cada población se detectó una prevalencia del 2,4% (2/82; 95% IC: 0,29-8,53) y del 14,3% (1/7; 95% IC: 0,36-57,87) en pacientes embarazadas (PE) y pacientes con hepatograma alterado (PHA), respectivamente. Por otro lado, los anticuerpos IgG-VHE documentaron una prevalencia del 2,4% (2/82; 95% IC: 0,29-8,53) en PE con respecto a PHA que mostraron una prevalencia del 28,6% (2/7; 95% IC: 3,66-70,58).

No se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para anticuerpos IgM-VHE pero sí se observó una diferencia significativamente mayor para anticuerpos IgG-VHE en PHA con respecto a PE ($p > 0,05$) entre ambas poblaciones. En la Tabla 2R se observan las prevalencias totales y discriminadas por población.

Tabla 2R. Prevalencias serológicas de ambos marcadores para la infección de VHE.

Poblaciones	N	Acs IgM (%)	Acs IgG (%)	Acs total (%)
PE	82	2 (2,4)	2 (2,4)	4 (4,9)
PHA	7	1 (14,3)	2 (28,6)	2 (28,6)
Total	89	3 (3,4)	4 (4,5)	6 (6,7)

Acs: anticuerpos; PE: mujeres embarazadas; PHA: pacientes con hepatograma alterado.

1.3. Detección de otros marcadores serológicos de infección viral

A todas las muestras analizadas para VHE (reactivas y no reactivas) se les estudió la presencia de otros marcadores serológicos para las hepatitis A, B, C, D y VIH. Del total, 79,8% (71/89; 95% IC: 70,87-88,68) presentaron algún marcador serológico reactivo para los virus antes mencionados. La presencia del marcador serológico anticuerpos IgG-VHA para el VHA se detectó en el 78,6% (70/89, 95% IC: 69,58-87,72) del total de las muestras mientras que el VHB mostró una prevalencia del 3,4 % (3/89; 95% IC: 0,70-9,53). Se observó una prevalencia

total del 1,1% (1/89; 95% IC: 0,02-6,1) para anticuerpos anti-VHC y una prevalencia el 2,2 % (2/89; 95% IC: 0,27-7,9) para infección por VIH (Tabla 3R).

Tabla 3R. Presencia de marcadores de otras infecciones virales en el total de las muestras

<i>Muestras</i>	<i>N</i>	<i>VHA</i> [#]	<i>VHB</i> [*]	<i>VHC</i>	<i>VHD</i>	<i>VHE</i>	<i>VIH</i>	
Anticuerpos anti-VHE	PE	82	65 (79,3)	1 ⁽¹⁾ (1,2)	0	0	4 (4,9)	0
	PHA	7	5 (71,4)	2 ⁽²⁾ (28,6)	1 (14,3)	0	2 (28,6)	2 (28,6)
Reactivos y no Reactivos	Total	89	70 (78,6)	3 (3,4)	1 (1,1)	0	6 (6,7)	2 (2,2)

*HBsAg y HBcAc # IgG anti-VHA

(1) Anticuerpos anti-HBc reactivos (2) HBsAg y anticuerpos anti-HBc reactivos

Se ha detectado la presencia de otros marcadores serológicos de infección viral en el 83,3% (5/6; 95% IC: 35,87-99,58) de las muestras que resultaron reactivas para algún marcador de infección por VHE (Tabla 4R). De las 5 muestras reactivas para otro marcador viral el 100% presentó reactividad para Acs IgG anti-VHA; el 16,7% (1/6; 95% IC: 0,42-64,12) con VHB (antígeno de superficie y/o anticuerpos anti-core), y el 16,7% (1/6; 95% IC: 0,42-64,12) con VIH.

64

Tabla 4R. Presencia de otros marcadores serológicos de infección viral en las muestras anti-VHE reactivas

<i>Muestras</i>	<i>N</i>	<i>MSIV</i> ^{&}	<i>VHA</i> [#]	<i>VHB</i> [*]	<i>VH C</i>	<i>VH D</i>	<i>VIH</i>
Anticuerpos anti-VHE Reactivos	PE	4	3/4 (75,0)	3/3 (100)	0	0	0
	PHA	2	2/2 (100)	2/2 (100)	1/2 ⁽¹⁾ (50,0)	0	0
Total	6	5/6 (83,3)	5/6 (83,3)	1/6 (16,7)	0	0	1/6 (16,7)

*medido como antígeno de superficie y anticuerpos anti-core (HBsAg y HBcAc respectivamente)

medido como anticuerpos tipo IgG anti-VHA (IgG-VHA)

(1) reactividad de HBsAg y HBcAc & marcador serológico de infección viral

Todas las muestras de PE mostraron valores de enzimas y metabolitos hepáticos dentro de los niveles de referencia esperados. Los pacientes con hepatograma alterado, definidos como pacientes con elevación de alguna de las transaminasas en 1,5 veces el límite superior normal en al menos dos oportunidades separadas en un intervalo de tiempo mayor o igual a un mes, arrojaron los valores que se indican en la tabla 5R.

Tabla 5R. Resultados de hepatogramas de muestras reactivas para VHE

<i>Muestras</i>	<i>N</i>	<i>TGO</i> (UI/L)	<i>TGP</i> (UI/L)	<i>FAL</i> (UI/L)	<i>BbD</i> (mg/L)	<i>BbT</i> (mg/L)	
anti-VHE Reactivas	PE	4	18,6 (13-25)	20,5 (11-41)	166,3 (152-192)	0,52 (0,51-0,53)	0,85 (0,80 – 0,92)
	PHA	2	75,5 (74-77)	38,5 (37-40)	334,5 (320-349)	1,81 (1,6-2,02)	3,08 (2,1-4,06)
	Total	6					

2. Muestras de aguas analizadas

Del total de muestras de aguas (superficiales, subterráneas y efluentes cloacales) en el 78,2% (43/55; 95% IC: 66,40-90,00) se detectó un recuentos de bacterias coliformes fecales superior a los límites establecidos por la Secretaria de Recursos Hídricos-Usos II Aguas de uso recreativo, que estipula con un valor inferior al $<200 \text{ NMP}/100 \text{ ml}$. Con respecto a las muestras de aguas superficiales se observó que el 85,4% (35/41; 95% IC: 73,32-97,40) de las mismas presentaban un recuento de bacterias coliformes fecales superiores a los límites permitidos. El 100% de las muestras provenientes de efluentes de plantas de tratamiento de residuos cloacales (8/8; 95% IC: 63,04 -97,40) mostró un recuentos de bacterias coliformes fecales superiores a los límites establecidos, a diferencia de las muestras de agua subterráneas en las cuales no se detectaron estas bacterias.

En el análisis de sólidos sedimentables se observó que el 24,5% (12/49; 95% IC: 11,42-37,55) de las muestras de aguas presentaban valores superiores a los límites establecidos por Ley Prov. 5965 Res. 336/03, que indica deben estar ausentes a los 10 min y ser inferiores a 1 mg/l a las 2 hs. para descargas a Conducto Pluvial o Cuerpos de agua superficiales. No hay niveles guía para este parámetro. Entre las muestras de aguas superficiales se detectó que un 24,4% (10/41) tenían valores superiores a los límites, y entre las muestras de efluentes de plantas de tratamientos cloacales el porcentaje fue de 87,5% (7/8; 95% IC: 47,35-99,68).

Los valores de cloruros mostraron cifras superiores a los límites establecidos en el 14,3% del total de muestras analizadas. Las muestras de aguas subterráneas y de efluentes de plantas de tratamiento de desechos cloacales no mostraron niveles superiores a los valores guía, y el 21,4% (6/28) de las aguas superficiales arrojaron valores superiores a los establecidos.

Con respecto a la detección de sustancias activas al azul de metileno (SAAM), se obtuvieron valores superiores a los límites permitidos por la resolución *Res. 336/03 (ADA - Valor máximo permitido para descargas de efluentes a cuerpos de agua superficiales o conducto pluvial: < 2,0 mg/l)* en el 38,9 % de las muestras (14/36), correspondiendo al 25% (7/28) de las muestras de aguas superficiales; y el 87,5% (7/8) de las muestras de efluentes de tratamientos cloacales.

Tabla 6R. Valores de bacterias coliformes totales, sólidos sedimentables, cloruros y detergentes aniónicos que superan el límite permitido en muestras de aguas.

	N	coliformes fecales	sólidos sedimentables	Cloruros	SAAM
Aguas superficiales	41	35/41 (85,4 %)	10/41 (24,4 %)	6/28 (21,4 %)	7/28 (25%)
Aguas subterráneas	6	0/6 (0%)	n.c.	0/6 (0%)	n.c.
Efluentes cloacales	8	8/8 (100%)	7/8 (87,5 %)	0/8 (0%)	7/8 (87,5 %)
Totales	55	43/55 (78,2%)	17/49 (34,7 %)	6/42 (14,3%)	14/36 (38,9 %)

n.c.: no corresponde realizar el análisis

3. Diagnóstico molecular de VHE

Con respecto al diagnóstico molecular se realizó sobre el total de muestras (144) de plasma y de aguas. No se pudieron obtener resultados positivos, ya que ninguna de las muestras analizadas amplificó para las regiones parciales del ORF 1 y 2 del VHE. En todos los ensayos se incluyó un control positivo y un control negativo por corrida, y se realizó el control de actina correspondiente en cada muestra de suero. En las muestras de agua como control de inhibición se realizó la amplificación de la muestra con el agregado del control positivo; la detección de amplicón en el contaminado y la no detección en la muestra sin contaminar permitieron validar la corrida.

V. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado, ocurren 57.000 muertes por año en el mundo por FHF y encefalopatía hepática por VHE. Esta infección puede presentarse en áreas con alta (más del 25%), intermedia (menos del 25%) o baja prevalencia (casos esporádicos) donde la mayoría de las infecciones ocurren en adultos jóvenes. Estudios en varios países latinoamericanos como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Perú y Uruguay, entre otros, han detectado marcadores serológicos del VHE en diferentes poblaciones [Echeverría JM *et al.*, 2013]. En estos países se han observado diferencias en las prevalencias probablemente debido a la diversidad de metodologías utilizadas, ya que los resultados en los estudios pueden variar dependiendo de las diferencias en los criterios de muestreo, en las poblaciones estudiadas y en los antígenos utilizados en los ensayos comerciales [Bendall R *et al.*, 2010]. Con tales limitaciones, igualmente se estima que Latinoamérica presenta una endemicidad intermedia para la infección por VHE, donde las tasas de prevalencia varían del 1 al 18% [Echeverría JM *et al.*, 2013].

Argentina es considerada un país con endemicidad baja para la infección por VHE. Los datos de seroprevalencia para anticuerpos IgG anti-VHE difieren según las diferentes poblaciones estudiadas. Se han observado en los años '90, prevalencias para este marcador que variaban entre 0,15 al 6,6% en pacientes pediátricos, donantes de sangre e individuos infectados con VIH-1 (+) [Rey JA *et al.*, 1997; Fainboim H *et al.*, 1999]. Sin embargo, estudios más recientes, reflejan cifras de prevalencias mayores para anticuerpos IgG anti-VHE que oscilan entre un 9,5 al 35,7% en voluntarios de Gran Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires, siendo del 14,8% (4/27) en trabajadores relacionados a la salud, 16,7% (4/24) en donantes de sangre y 35,7% (10/28) en pacientes VIH-1 (+) [Munné MS *et al.*, 2014]. Un reporte de la provincia de Córdoba publicado durante el 2015, muestra una prevalencia para este anticuerpo del 8,4 al 9,6 % en pacientes VIH (+) y hemodializados, respectivamente [Pisano MB *et al.*, 2015]. Y un dato relevante es la infección en un paciente VIH-1 (+) con ambos marcadores serológicos de infección por VHE no reactivos en el cual se pudo detectar el genoma de VHE por métodos moleculares [Pisano MB *et al.*, 2015], evento que resalta la importancia de realizar la detección serológica y molecular en forma conjunta.

El profesional veterinario y todas las personas afectadas a la actividad, se ven expuestas cotidianamente a enfermedades zoonóticas. Existen más de 150 registradas en todo el mundo y muchas de ellas existentes en nuestro país. Sin embargo, sólo son reconocidas un 10% de ellas en la Argentina (Álvarez T *et al.*, 2000). Esta exposición se puede transformar rápidamente en el

desarrollo de una enfermedad zoonótica si no se usan los medios de protección adecuados y se realizan prácticas de trabajo seguro. Las enfermedades profesionales rurales con riesgo biológico reconocidas en la Argentina son: sustancias sensibilizantes de vías respiratorias y pulmón, brucelosis, carbunco, tuberculosis, histoplasmosis, psitacosis, hidatidosis, leptospirosis, fiebre hemorrágica (virus Junín), leishmaniasis, paludismo, fiebre amarilla. Entre las enfermedades que afectan a los cerdos y cuya aparición, existencia o sospecha debe denunciarse de manera obligatoria en Argentina según SENASA se encuentran: fiebre aftosa, peste porcina clásica, enfermedad vesicular del cerdo, peste porcina africana, gastroenteritis transmisible del cerdo, encefalomielitis por enterovirus, síndrome disgenésico y respiratorio porcino, carbunco bacteridiano, enfermedad de Aujeszky, equinococosis, hidatidosis, leptospirosis, rinitis atrófica del cerdo, cisticercosis porcina, brucelosis porcina y triquinelosis. Nuestro país posee un marco normativo mediambiental a nivel nacional mediante la constitución nacional, art 41; la Ley 25675 “Ley General del Ambiente”; Ley 25688 “régimen de gestión ambiental de aguas”; Ley 24051 “régimen de desechos peligrosos” y decreto reglamentario 831/93; y a nivel provincial Ley N° 11723 del Ambiente, Ley N° 10510 que regula el funcionamiento de los establecimientos dedicados a la cría, acopio y/o comercialización de porcinos y decreto reglamentario N° 4933/89, Ley N° 5965 “protección a las fuentes de provisión y a los cursos y cuerpos receptores de agua y a la atmósfera” y su resolución N° 236/03 “límites de descarga admisibles”. La ampliación de estudios sobre VHE en éste ámbito podría resultar en la recomendación de medidas específicas sanitarias al respecto.

Pacientes embarazadas (PE)

La primera evidencia serológica de infección por VHE en mujeres embarazadas de América del Sur se observó en Venezuela en el año 1994 con una prevalencia del 1,6% [Pujol FH *et al*, 1994]. La importancia de estudiar esta infección en poblaciones de mujeres embarazadas se debe a que la falla hepática por hepatitis fulminante (FHF) causada por el VHE es mucho más frecuente durante el tercer trimestre de gestación, y alcanza una mortalidad que va desde el 25% al 30%. Además, se han descripto reportes de abortos y las muertes neonatales se ven acrecentadas con esta infección [Khuroo MS *et al.*, 1995; Labrique A *et al.*, 2010]. Una explicación posible a esta FHF se debería a ciertos cambios hormonales e inmunológicos en las mujeres embarazadas infectadas por VHE que favorecerían el desarrollo de la misma. Un estudio reciente ha

documentado que la replicación del VHE se aceleraría mediante la supresión de los receptores estrogénicos y de INF-1 por factores séricos solubles en plasma de mujeres cursando particularmente el tercer trimestre de gestación [Bi Y *et al*, 2015].

Hasta el momento no se han reportado casos de FHF causada por la infección del VHE en pacientes embarazadas de Latinoamérica, probablemente debido a que el diagnóstico no se realiza de rutina y la infección podría pasar inadvertida al no sospecharse [Echeverría JM *et al*, 2013].

En nuestro país, no existen estudios sobre prevalencias de anticuerpos IgM e IgG anti-VHE en pacientes embarazadas. Por ende, este es el primer estudio en esta población en la cual registramos prevalencias del 2,4% para anticuerpos IgM-VHE y 2,4% para anticuerpos IgG-VHE, con una prevalencia total 4,9% para ambos marcadores de infección. Esta reactividad permite confirmar la circulación viral en la ciudad de La Plata.

En las muestras reactivas para anticuerpos anti-VHE, se ha detectado la presencia de Acs IgG anti-VHA en el 75% de los casos. Es muy probable que ambos virus hayan infectado a las mujeres en diferentes momentos de su vida, pero es importante destacar que ambos comparten las mismas vías de transmisión, y probablemente las principales fuentes de infección sean el consumo de aguas o alimentos contaminados. La falta de agua potable de red y de sistema de cloacas en los barrios en que habitan las pacientes estudiadas podría ser un factor de riesgo.

En cuanto a los parámetros bioquímicos en este grupo con marcadores reactivos para anticuerpos anti-VHE, no se han observado síntomas clínicos ni alteraciones en las transaminasas hepáticas. Estos registros en cuanto a características clínicas de infección han sido asociados en nuestro país a la detección del genotipo 3 del VHE, debido a que esta cepa se presenta con infecciones asintomáticas o de síntomas leves [Munné MS *et al*, 2006a; Munné MS *et al*, 2006b; Munné MS *et al*, 2011]. Por otro lado, es importante recalcar que este genotipo ha sido asociado a infección crónica por el VHE en América del Norte y Europa en pacientes inmunosuprimidos con trasplante de órgano sólido e individuos VIH (+) con un estado avanzado de inmunodeficiencia. Estudios futuros que incluyan otras poblaciones de mujeres embarazadas y poblaciones de riesgo podrán determinar la importancia de este genotipo en nuestro país.

Pacientes con hepatograma alterado (PHA)

Con respecto a la población de PHA, se incluyó a individuos que se presentaron a la consulta médica con manifestaciones clínicas de hepatitis aguda, en el período de estudio. Durante el mismo se detectó un caso de hepatitis aguda por VHE con anticuerpos reactivos IgM e IgG anti-VHE, y con aumento de marcadores hepáticos en ausencia de marcadores de infección aguda por otros virus hepatotropos, de características autoinmunes y de orígenes medicamentosos. Cabe recordar que generalmente no se realiza el diagnóstico para este virus en forma rutinaria, por lo cual, es necesario la toma de conciencia de este tipo de casos ya que grafica la importancia de considerar la sospecha de infección por VHE como causa de hepatitis aguda.

Por otro lado se ha documentado un caso de hepatitis aguda por VHB con infección pasada por VHE (IgG-VHE reactiva), con aumento de transaminasas debida a la infección aguda en curso. De todos modos, no conocemos la fecha de primoinfección por VHE; por lo cual no se puede confirmar que el paciente haya presentado alteración de su hepatograma en dos oportunidades diferentes o haya sido simultáneamente, al menos un período. Y el conocimiento de una hepatitis pasada es relevante para la evaluación de su estado clínico y anatómo-patológico del hígado. Es nuevamente importante recalcar que el 71,4% de esta población presentó reactividad para VHA, resultado que muestra la importancia de controlar las vías de transmisión que comparten ambos virus, como el consumo de aguas o alimentos contaminados. El número de pacientes estudiados no permite un análisis estadístico respecto a fuentes puntuales de infección, así como la gran distribución geográfica de procedencia. Estudios recientes, muestran que con la implementación de la vacuna del VHA en el calendario ha disminuido los casos de esta infección en forma considerable, por lo cual sería importante ahora tener en cuenta la infección por VHE para la implementación futura del diagnóstico del mismo en forma rutinaria, al menos en poblaciones vulnerables como embarazadas e inmunosuprimidos.

En relación al diagnóstico molecular, en este estudio no se detectó el ARN del VHE en ninguna de las poblaciones. Sin embargo esta situación era factible, si consideramos la corta viremia que presenta esta infección, la frecuente presentación asintomática y la accesibilidad a una consulta médica apropiada en pacientes con manifestaciones clínicas debido a la falta de sospecha frecuente. Además, debemos considerar que en caso de sintomatología y sospecha de VHE, las determinaciones bioquímicas apropiadas para el diagnóstico muchas veces no se logran

o tardan tiempo. Todos estos son factores determinantes para no llegar a detectar molecularmente este virus.

Muestras de aguas

Esta tesis es el primer reporte sobre la investigación de VHE en aguas de la provincia de Buenos Aires. Los recuentos de coliformes fecales obtenidos, principalmente en aguas superficiales y muestras de efluentes cloacales, con valores que superan los límites establecidos en el 85,4% y 100 % respectivamente, refuerza la necesidad de la vigilancia sostenida de VHE en el medio ambiente.

Los datos aquí aportados pueden ser un primer eslabón para la toma de decisiones en relación a la posterior vigilancia ambiental. Las aguas subterráneas de pozos que se encuentran próximos a plantas de desechos cloacales y los efluentes de plantas de tratamientos cloacales, así como las aguas superficiales de ríos, arroyos y canales que componen el cauce del río Samborombón -curso de agua que atraviesa las zonas de mayor densidad poblacional de la provincia de Buenos Aires-, permiten conocer la situación actual y disponer así de los primeros registros de la provincia sobre la situación ambiental en cuanto a VHE.

- ***Temperatura***

La labilidad del virus podría ser un factor decisivo en la detección molecular, situación reportada también por otros autores. La estabilidad del virus en el medio ambiente es baja, siendo como regla general la vida media de la mayoría de los virus de segundos a 60°C, minutos a 37°C, horas a 4°C, días a -20°C, meses a -70°C y años a -196°C. En el caso de VHE, el tratamiento a 71° C durante 20 minutos logra inactivarlo [Carballal G, 2014]. Es también interesante mencionar que se ha descrito la disminución del título viral determinado por PCR anidada al 1% del valor inicial en muestras de agua sembradas con VHE e incubadas a 20°C durante 1 mes, y su caída a valores no detectables luego de 2 meses de incubación [Pina S *et al*, 1998]. Dicho estudio realizado en España obtuvo una única muestra VHE positiva en cuatro años de muestreo, lo que conduciría a pensar no solo en la labilidad viral, sino en la presencia intermitente del virus en concentraciones que permitan su detección; y en la posibilidad de que las aguas de bebida sean un reservorio ambiental del virus, contaminando además las formas de vida acuática y permitiendo la infección alimentaria por VHE.

La temperatura media durante la obtención de las muestras de agua en el período junio-noviembre 2013 fue de 12,1 °C (5,45 -25,56) (datos no mostrados). La obtención de muestras durante los meses de junio a noviembre en el curso del río Samborombón, afluentes y efluentes, permitiría desestimar la influencia de la temperatura ambiental en la estabilidad viral, no así el efecto de las lluvias y otros factores meteorológico-ambientales.

- ***Sensibilidad***

Es posible que las muestras ambientales no posean partículas virales o que el nivel de contaminación por VHE esté por debajo de la capacidad de detección de los métodos de concentración usados en este estudio. El bajo número de partículas virales en las muestras de aguas ha sido planteado también como limitante a la sensibilidad de la técnica por un grupo de investigadores de la provincia de Córdoba, quienes plantean además que la detección del genoma de VHE en aguas sugeriría un reservorio ambiental del virus [Martínez Wassaf MG *et al*, 2014]. Para poder concluir que no hay VHE en las muestras de agua se necesitarían procesar un mayor número de muestras recolectadas durante todas las condiciones ambientales y meteorológicas de nuestra región.

73

- ***Detergentes y compuestos clorados***

Se estudió además la presencia de detergentes aniónicos y cloruros en las muestras de agua. Los compuestos clorados ejercen su acción desinfectante por medio de la liberación de cloro, que en presencia de agua se combina para dar ácido hipocloroso (HClO), fuerte agente oxidante a pH ácido o neutro. El HClO ejerce su acción mediante la oxidación de los grupos sulfhidrilo a disulfuro, inactivando así a las enzimas que los poseen. Es capaz de destruir a los virus envueltos y algunos virus desnudos, y su estabilidad máxima se presenta a pH=8, inactivándose por la presencia de materia orgánica. Los niveles de cloruros detectados en las muestras presentan un valor medio de 296,2 mg/l (20-1.625,3).

Los detergentes aniónicos no afectan a los virus carentes de envoltura, condición que les permite ser infectivos por vía digestiva. Su análisis se realizó en el contexto de una mejor caracterización de la matriz de la muestra ambiental estudiada.

VI. CONCLUSIÓN

En base a los antecedentes previamente descriptos podemos concluir que sería relevante considerar nuevas estrategias relacionadas a la infección por VHE en nuestro país que incluyan:

1. La incorporación de la detección de VHE al algoritmo diagnóstico de sospecha de infecciones hepáticas en pacientes con hepatograma alterado y en mujeres embarazadas, más si tenemos en cuenta que la incorporación de la vacuna contra VHA al calendario oficial en el año 2005, posibilitaría un nuevo nicho de circulación para VHE.

2. El análisis periódico de las aguas de la provincia de Buenos Aires, tanto de consumo como así también las recreacionales, vigilando las posibles fuentes de infección. Igualmente importante es el análisis de aguas residuales, permitiendo localizar focos de virocupria y previniendo contaminaciones e infecciones.

3. La implementación de un sistema de vigilancia que permita el control de las posibles fuentes de infección y la aplicación de estrategias de prevención.

VII. ANEXOS

FECHA ACTUAL:
 HOSPITAL / CENTRO:
 CODIGO DEL LABORATORIO DE ORIGEN:

ANEXO I

Estudio epidemiológico molecular y variabilidad génica del virus de Hepatitis E (HEV) en diferentes nichos de la provincia de Buenos Aires, Argentina

1. Datos Personales

1.1. Apellido: _____ 1.2. Nombre: _____
 1.3. Fecha de Nacimiento: _____ 1.4. Edad: _____
 1.5. Estado civil actual: 1. Soltero/a 2. Casado/a 3. Viudo/a 4. Concubino/a 5. Otro:

2. Lugar de Nacimiento

2.1. Ciudad: _____ 2.2. Provincia: _____ 2.3. País: _____

3. Lugar de Residencia

3.1 En que barrio vive?
 3.2 ¿Alguna vez vivió en otro lugar? SI NO
 En caso afirmativo Ciudad: _____ Provincia: _____ Por cuanto tiempo: _____

4. Nivel de estudios– Situación laboral

4.1. Estudios primarios completo SI NO 4.2. Estudios secundarios completo SI NO
 4.3. Estudios terciarios completo SI NO 4.4. Estudios universitarios completo SI NO Cuál?
 4.5. Tiene empleo actualmente? SI NO

5. Características habitacionales de la vivienda

5.1. Tiene agua potable de red? SI NO 5.2. Tiene agua potable de napa? SI NO
 5.3. Tiene sistema de cloacas? SI NO 5.4. Tiene pozo ciego? SI NO
 5.5. Tiene baño dentro de su vivienda? SI NO 5.6. Cuantas personas comparten el baño?
 5.7. Tiene animales en los alrededores de su vivienda? (gallinas, cerdos, caballos, etc) SI NO Cuáles?

6. Antecedentes de maternidad

6.1. Número total de hijos: _____ 6.2. Indique sus edades: _____
 6.3. Número de hijos que amamantó: _____ 6.4. Indique sus edades: _____
 6.5. Número de hijos en edad escolar _____ 6.6. Numero de hijos que concurren a jardín/escuela:
 6.7. Número de hijos que concurren a comedores/hogares de día, etc:

7. Antecedentes de Riesgo

7.1. Tuvo o tiene alguna ETS: SI NO ¿Cuáles?: _____
 7.2. ¿Cuándo tuvo la enfermedad?
 7.3. ¿Usa drogas no recetadas? SI NO ¿Cuáles?
 7.4. ¿Comparte material de inyección? (aguja, jeringa, tapita) SI NO
 7.5. ¿Ha recibido transfusiones de sangre? SI NO
 En caso afirmativo: Cuándo? _____ Donde? _____ Causa? _____

8. Co-infecciones

8.1. ¿Alguna vez ha tenido un resultado positivo para alguna de estas infecciones? (HIV, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, otras) SI NO
 8.2. Cuáles? _____ 8.3. Cuándo? _____ 8.4. ¿Recibió tratamiento? SI NO

1

FECHA ACTUAL:
HOSPITAL / CENTRO:
CODIGO DEL LABORATORIO DE ORIGEN:

9. Datos Personales de la Pareja

9.1. Apellido: 9.2. Nombre:
9.3. Fecha de Nacimiento: 9.4. Edad:
9.5. Lugar de nacimiento: Ciudad: Provincia: País:
9.6. Nivel de estudios completos alcanzado: 1.Ninguno 2.Primario 3.Secundario 4.Terciario 5.Universitario

10. Residencia actual y previa de la Pareja

10.1. Ciudad: 10.2. País: 10.3. Por cuánto tiempo:
10.4. ¿Alguna vez residió en otro lugar? SI NO
En caso afirmativo: Ciudad: País: Por cuánto tiempo:

11. Antecedentes de Riesgo de la Pareja

11.1. Usa drogas no recetadas? SI NO ¿Cuáles?
11.2. Comparte material de inyección? ? (aguja, jeringa, tapita) SI NO
11.3. Ha recibido transfusiones de sangre? SI NO
En caso afirmativo: Fecha: Lugar: Causa:

12. Coinfecciones de la pareja

12.1. ¿Alguna vez ha tenido un resultado positivo para alguna de estas infecciones? (HIV, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, otras) SI NO
En caso afirmativo Indique: Cuáles?: Cuándo?: ¿Recibió tratamiento? SI NO

13. Observaciones o antecedentes clínicos (ictericia, hepatitis, elevación de enzimas hepáticas, etc)

13.1. En el paciente:
13.2. En algún familiar:

14. Conocimientos previos

14.1. Ha recibido información sobre hepatitis previamente? SI NO
14.2. Está vacunado contra HBV? SI NO
14.3. Está vacunado contra HAV? SI NO

15. Otros comentarios relevantes

ANEXO II FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio epidemiológico molecular y variabilidad génica del virus de Hepatitis E (HEV) en diferentes nichos de la provincia de Buenos Aires, Argentina Organismos Participantes: Laboratorio de Virología del HIEAyC "San Juan de Dios" de La Plata. Calles 27 y 70. CP: 1900. La Plata – Buenos Aires – Argentina (TE: 0221-4575454 interno 134) y Grupo HTLV-1/2. Instituto de Investigaciones Biomédicas para Retrovirus y Sida (INBIRS), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Por la presente lo invitamos a participar en un estudio de investigación. A los efectos de decidir si desea o no participar en el mismo, Usted tiene derecho a saber cuál es el objetivo de este estudio, cómo se selecciona a los pacientes, qué procedimientos se emplearán, cuáles son los posibles beneficios y riesgos y qué es lo que se espera de Usted como participante de una investigación. Este proceso se denomina "**consentimiento informado**". El presente formulario de consentimiento le proporcionará información sobre esta investigación que le explicará el médico a cargo del estudio. Se le solicitará que lea atentamente este formulario de consentimiento y que le pregunte al médico o personal del estudio todo aquello que no comprenda. Cuando haya comprendido la información y haya decidido participar, se le solicitará que firme y feche este consentimiento y se le entregará una copia del mismo.

Objetivo del estudio

Estamos realizando este estudio para obtener información que pueda ayudar a la prevención de la hepatitis viral E y de ser posible -y en la medida de disponibilidad de recurso- de la detección de virus de Hepatitis A, B, C, Citomegalovirus, Epstein-Barr virus, así como también del HIV-1 y HTLV. Este estudio nos va a permitir tener una mejor comprensión de la diseminación de todos los agentes mencionados en grupos de personas de la provincia de Buenos Aires y nos permitirá conocer los comportamientos de mayor riesgo que llevan a estas poblaciones a infectarse con alguno de estos patógenos. Permitirá además, obtener conocimientos sobre la situación de los distintos tipos de virus circulantes en la Argentina.

Procedimientos

Si usted acepta participar en este estudio, se le harán varias preguntas acerca de datos personales, su salud y comportamiento relacionados con su conducta, a través de un cuestionario que le ocuparán 15 minutos. Se le proporcionará información y consejo acerca de los patógenos, sus mecanismos de infección y forma de prevención. Extraeremos de una vena de su brazo 10 ml de sangre. La muestra de sangre será analizada en nuestro laboratorio y parte será enviada al Instituto de Investigaciones Biomédicas para Retrovirus y Sida (INBIRS), de la Facultad de Medicina de Buenos Aires donde se realizarán pruebas adicionales y análisis moleculares.

Riesgos/malestar

Usted podría llegar a padecer dolor suave y malestar en el momento de la extracción y ocasionalmente podría aparecer un moretón en el sitio de inserción de la aguja. Rara vez, algunas personas también pueden experimentar una breve sensación de mareo durante la extracción sanguínea, desmayo o infección en el sitio de la extracción. Se tomarán las precauciones necesarias para minimizar estas dificultades. Algunas de las preguntas personales o íntimas acerca de su comportamiento sexual o uso de drogas pueden resultarle molestas, pero son muy importantes para la interpretación de los resultados de este proyecto. **Beneficios** Su participación no le brindará beneficios directos, pero le permitirá a usted conocer si está o no infectado con alguno de los patógenos estudiados y le proporcionará la oportunidad de ser aconsejado e informado acerca de la mejor forma de prevención para estas infecciones. En el caso de estar infectado con alguno de ellos, tendrá acceso a seguimiento adecuado por especialistas de este mismo hospital para tomar las medidas adecuadas a su estado.

Alternativa

Su participación es **absolutamente voluntaria**. Usted puede decidir no participar en el estudio y su decisión de participar o no, no afectará en modo alguno la disponibilidad o calidad de su actual o futura atención médica.

Confidencialidad

Los datos obtenidos en esta investigación serán mantenidos confidencialmente y no se darán a nadie que no esté participando en este estudio. Su nombre no será divulgado en ninguna presentación o publicación del estudio. Los registros médicos que lo identifican a usted y el formulario de consentimiento firmado por usted, serán inspeccionados por el INBIRS o su representante y podrán ser inspeccionados por las autoridades regulatorias y el Comité de Docencia Institucional/Comité Externo de Ética. La confidencialidad de sus datos personales será protegida en la medida permitida por las leyes y disposiciones vigentes. Es imposible garantizar la confidencialidad absoluta. Los resultados de este estudio de investigación podrán ser presentados en conferencias o publicaciones, pero en ningún caso se revelará su identidad.

Consentimiento del paciente

. He leído las declaraciones y demás información detallada en este formulario de consentimiento.
. Todas mis preguntas concernientes al estudio: "**Estudio epidemiológico molecular y variabilidad génica del virus de Hepatitis E (HEV) en diferentes nichos de la provincia de Buenos Aires, Argentina**" me fueron contestadas.

- Entiendo que puedo rehusarme a participar en este estudio de investigación.
- Entiendo que no recibiré pago alguno por participar en este estudio.
- Autorizo el acceso a mis registros médicos al INBIRS o su representante, y al Comité de Docencia Institucional/Comité Independiente de Ética.
- Entiendo que recibiré una copia de éste formulario de consentimiento firmado y fechado.
- Con la firma de este formulario no renuncio a ninguno de mis derechos legales como participante de un estudio de investigación.
- Acepto participar en el estudio titulado: **“Estudio epidemiológico molecular y variabilidad génica del virus de Hepatitis E (HEV) en diferentes nichos de Argentina”** y consiento en permitir que se mantenga almacenada una porción de mi muestra de sangre para que, eventualmente sea utilizada en estudios posteriores, como por ejemplo, determinar si existe asociación entre determinados genes (HLA) y la posibilidad de adquirir alguna de las infecciones o la detección de otros agentes infecciosos.

Usted podrá consultar a los Investigadores Coordinadores sobre las enfermedades por cualquier pregunta que llegara a tener respecto a esta investigación. Médico del estudio: César A. Crespi – Servicio de Hepatología – HIEAyC San Juan de Dios de La Plata Tel (0221) 457-5454 (int 270). Bioqu: Regina Ercole – Laboratorio de Virología – HIEAyC San Juan de Dios de La Plata Tel (0221) 457-5454 (int 134). **Dra. Mirna M. Biglione.** Instituto de Investigaciones Biomédicas para Retrovirus y Sida (INBIRS), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires Teléfono No: (011) 45083689 (Int: 125)

Si acepta participar en este estudio, solicitamos firmar sobre la línea (o avise al testigo que firme por Usted).

Nombre del paciente (en letra imprenta)	Firma del paciente	Fecha
--	--------------------	-------

Nombre del padre/madre/tutor (si correspondiese)	Firma del padre/madre/tutor	Fecha
---	-----------------------------	-------

Nombre del testigo	Firma del testigo	Fecha
--------------------	-------------------	-------

Nombre del investigador	Firma del investigador	Fecha
-------------------------	------------------------	-------

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AAHI. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. Documento de consenso 02-2012. Ciudad Autónoma de Buenos Aires; pág. 7. <http://www.aahi.org.ar/>
- Alvarez T, et al. Riesgos ocupacionales de los profesionales veterinarios y trabajadores rurales con animales Aplicación y enseñanza. 2000. Catedra de Epidemiología y Salud Publica, Facultad de Cs. Veterinarias, La Pampa.
- Amhad I, et al. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Research* 2011; 161(1):47– 58.
- Báez PA, et al. Evidencia de la circulación del virus de la hepatitis A y del virus de la hepatitis E en muestras ambientales en el departamento de Antioquía, Colombia. XI Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 2015. Trabajo 0382. <http://www.cav2015.com.ar/>
- Balayan MS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983; 20(1):23-31. (DOI:10.1159/000149370)
- Banks AA of B. Detección para agentes específicos. In: Hillyer JDRBJGTHCD, editor. Manual Técnico Traducción al español del Technical Manual , American Association of Blood Banks. 17a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología; 2012. p. 1167.
- Barré-Sinoussi F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220(4599):868–71.
- Bendall R, et al. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol* 2010; 82(5):799–805.
- Bi Y, et al. Pregnancy serum facilitates hepatitis E virus replication in vitro. *J Gen Virol* 2015; 96(5):1055-1061.
- Bichko VV, et al. Epitopes exposed on hepatitis delta virus ribonucleoproteins. *J Virol* 1996; 70(9):5807-11.
- Bose PD, et al. High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: association with hepatitis E-related poor pregnancy outcome. *J Hepatol* 2011; 54(6):1107–1113.
- Bouquet J, et al. Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008–2009. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(11):2018–2025.
- Broder S, Gallo RC. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N Engl J Med* 1984; 311(20):1292–7.

- Canna F, et al. Screening de HIV en bancos de sangre. Evaluación de los equipos de cuarta generación. *Med (B Aires)* 2003; 63(6): 685-691.
- Carballal G. Introducción al estudio de la virología humana. *Virología Médica*, 4ta ed, 2014. Buenos Aires: Corpus. Capítulo 1, pág 45.
- CDC. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis—East Africa. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1987; 36(16):241-4.
- CDC, Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, EEUU. Hepatitis E FAQs for Health Professionals. 2015. <http://www.cdc.gov/hepatitis/hev/hevfaq.htm>
- Chandra V, et al. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* 2008; 33(4):451-64.
- Clayson E, et al. Rates of hepatitis E virus infection and disease among adolescents and adults in Kathmandu, Nepal. *J Infect Dis* 1997; 176(3): 763-6.
- Dingle K, et al. Electrophoretic analysis of the ribonucleoproteins of hepatitis delta virus. *J Virol Methods* 1998; 75(2):199-204.
- Easton, J. The development of a risk Assessment methodology to evaluate the adverse human health effect of pathogens found in sewage contaminated waters. Environmental Health Engineering Program. 1998. University of Alabama. Birmingham.
- Echevarría JM, et al. Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. *J Med Virol* 2013; 85(6):1037-45.
- Emerson SU, et al. Hepatitis E. *Field's Virology*, 5ta ed, 2006. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Pág 3047-58.
- Faber MS, et al. Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(10):1654-7.
- Fainboim H, 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.
- Farci P. Delta hepatitis: an update. *J Hepatol* 2003; 39 (Suppl. 1), S212-S219.
- Gérolami R, et al. Hepatitis E virus as an emerging cause of chronic liver disease in organ transplant recipients. *J Hepatol* 2009; 50(3): 622–4.
- Gómez Carrillo M. Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Virología Médica*, 4ta ed, 2014. Buenos Aires: Corpus. Capítulo 22.1, págs 360-6.

- Graff J, *et al.* The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J Virol* 2005; 79(11):6680–89.
- Graff J, *et al.* A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* 2006; 80(12):5919–26.
- Gurley ES, *et al.* Estimating the burden of maternal and neonatal deaths associated with jaundice in Bangladesh: possible role of hepatitis E infection. *Am J Public Health* 2012; 102(12):2248-54.
- Haagsma EB, *et al.* Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2008; 14(4): 547–53.
- Ibarra H, *et al.* Prevalence of hepatitis E virus antibody in blood donors and other population groups in Southern Chile. *Rev Med Chil* 1997; 125(3):257–8.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2014. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Ijaz S, *et al.* Indigenous hepatitis E virus infection in England: more common than it seems. *J Clin Virol* 2009; 44(4):272-6.
- Brunori J, *et al.* Buenas Prácticas Pecuarias para la producción y comercialización porcina familiar. 2012. Argentina: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación, FAO, INTA. Capítulo IX, pág 188.
- Jilani N, *et al.* Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(5):676–82.
- Kamar N, *et al.* Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* 2011a; 140:1481-9.
- Kamar N, *et al.* Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplant* 2012; 93(6):617–23.
- Kamar N, *et al.* Hepatitis E virus infection. *Clin Microb Rev* 2014; 27(1):116-38.
- Keane FE, *et al.* Hepatitis E virus coinfection in patients with HIV infection. *HIV Med* 2012; 13(1):83–8.
- Kenfak-Foguena A, *et al.* Hepatitis E virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(6):1074–8.

- Khudyakov YuE, et al. Immunodominant antigenic regions in a structural protein of the hepatitis E virus. *Virology* 1994; 198(1): 390–3.
- Khudyakov YuE, et al. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res* 2011; 161(1):84–92.
- Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B Hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 1980; 68(6):818-24.
- Khuroo MS, *et al.* Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med* 1981; 70(2):252-5.
- Khuroo MS, *et al.* Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 1995; 345(8956):1025–6.
- Koonin EV, et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(17):8259–63.
- Krasniansky D. Antivirales de acción directa combinados con interferón: una efectiva estrategia contra el HCV. *Content Medicine*, 2014. XVIII Congreso Argentino de Hepatología.
- Krugman, S. The ABC's of Viral Hepatitis. The Gordon Wilson lectures. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1992; 103:145–56.
- Kumar S, *et al.* Hepatitis E virus: the current scenario. *Int J Infect Dis* 2013; 17:e228-33.
- La Rosa G, *et al.* Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of travel-related and autochthonous cases. *J Gen Virol* 2011; 92:1617-26.
- Labrique A, *et al.* The global impact of hepatitis E: new horizons for an emerging virus. *Emerging Infections* 9; 2010. Washington: ASM Press . Págs 53-93.
- le Coutre P, *et al.* Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut* 2009; 58(5): 699–702.
- León P, *et al.* Prevalencia de las infecciones producidas por los virus de la hepatitis B, C, D y E en distintas poblaciones de Bolivia. *Rev Panam Salud Publ* 1999; 5(3):144–51.
- Lu L, *et al.* Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 2006; 16: 5–36.
- Mansuy JM, *et al.* Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(12):2309-12.
- Martinez Wassaf MG, *et al.* First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: environmental and serological survey. *J Clin Virol* 2014; 61(3):334-9.

- Mathet VL, *et al.* Virus Hepatitis B. *Virología Médica*, 4ta ed, 2014. Buenos Aires: Corpus. Capítulo 24.3, págs 450-91.
- Meng XJ, *et al.* A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(18):9860–5.
- Minassian ML, *et al.* Hepatitis C. *Virología Médica*, 4ta ed, 2014. Buenos Aires: Corpus. Capítulo 24.5, págs 504-29.
- Ministerio de Salud de la Nación; Boletín sobre el VIH-SIDA e ITS en la Argentina. 2013. Pág 112. http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000297cnt-2013-11-28_boletin-epidemiologico-30.pdf
- Ministerio de Salud de la Nación; Calendario Nacional de Vacunación 2014. <http://www.msal.gov.ar/index.php/programas-y-planos/184-calendario-nacional-de-vacunacion-2014>
- Ministerio de Salud de la Nación; Boletín sobre el VIH-SIDA e ITS en la Argentina [Internet]. Diciembre 2015. Boletín n°32. http://www.msal.gob.ar/sida/images/stories/4-publicaciones/pdf/2015-11-18_boletin-VIH-2015.pdf
- Munné MS, *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* 2006a; 78(12):1579–83.
- Munné MS, *et al.* Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2006b; 36(3):125–30.
- Munné MS, *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.
- Munné MS, *et al.* Updating the knowledge of hepatitis E: new variants and higher prevalence of anti-HEV in Argentina. *Ann Hepatol* 2014; 13(5):496-502.
- OMS. WHO position paper, Hepatitis B vaccines. *Weekly epidemiological record*, no. 40, 2 october 2009; 84(40): 405-420. <http://www.who.int/wer/2009/wer8440.pdf?ua=1>
- OMS. Global Summary of the AIDS epidemic, 2013 [Internet]. Geneva, Switzerland; 2013. http://www.who.int/hiv/data/epi_core_dec2014.png?ua=1
- OMS. Campaña día mundial hepatitis. 2014. <http://www.who.int/campaigns/hepatitis-day/2014/hepatitis-a-e.pdf>

- OMS. Nota Descriptiva Nº 280 - Hepatitis E. 2015a. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/es/>
- OMS. Nota Descriptiva Nº 204 - Hepatitis B. 2015b <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/>
- Panda SK, et al. An Indian strain of hepatitis E virus (HEV): cloning, sequence, and expression of structural region and antibody responses in sera from individuals from an area of high-level HEV endemicity. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10):2653-9.
- Panda SK, Varma SP. Hepatitis E: Molecular Virology and Pathogenesis. *J Clin Exp Hepatol* 2013; 3(2):114-24. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jceh.2013.05.001>
- Parvez M. Chronic Hepatitis E Infection: Risks and Controls. *Intervirology* 2013; 56(4):213-6.
- Pina S, et al. 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(11):4485-8.
- Pisano MB, *et al.* Evidencias de infección del virus de la hepatitis E (HEV) en individuos inmunosuprimidos de Córdoba, Argentina. XI Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 2015. Trabajo 0206. <http://www.cav2015.com.ar/>
- Pischke S, *et al.* Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2010; 16(1): 74–82.
- Prabhu SB, *et al.* Study of cellular immune response against hepatitis E virus (HEV). *J Viral Hepat* 2011; 18(8):587–94.
- Pujol FH, *et al.* Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. *J Med Virol* 1994; 42(3):234–6.
- Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 2008; 48(3):494–503.
- Purdy MA, et al. Hepatitis E virus: a non-enveloped member of the ‘alpha-like’ RNA virus supergroup. *Semin Virol* 1993; 4(5):319–26.
- Rantala M, Van de Laar MJ. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe – a review. *Euro Surveill* 2008; 13(21):194-201.
- Rayis DA, *et al.* An outbreak of hepatitis E and high maternal mortality at Port Sudan, Eastern Sudan. *Pathog Glob Health* 2013; 107(2):66-8.
- Rey JA, *et al.* Prevalence of IgG anti-HEV in Buenos Aires, a non-endemic area for hepatitis E. *J Travel Med* 1997; 4(2):100–1.

- Reyes GR, *et al.* Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247(4948):1335-9.
- Reyes GR, *et al.* Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch Virol Suppl* 1993; 7:15–25.
- Robbins SL, *et al.* 2003. *Manual de Patología Estructural y Funcional*. McGraw-Hill-Interamericana Editores (6ta Edición)
- Ruggeri FM, *et al.* Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol* 2013; 36(4):331-44.
- Ryu WS, *et al.* Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J Virol* 1993; 67(6):3281-7.
- Salam GD, *et al.* Serum tumor necrosis factor-alpha level in hepatitis E virus-related acute viral hepatitis and fulminant hepatic failure in pregnant women. *Hepatol Res* 2013; 43(8):826–35.
- Schlauder GG, *et al.* Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J Infect Dis* 2000; 182(1):294-7.
- Song YJ, *et al.* Hepatitis E virus infections in humans and animals. *Clin Exp Vaccine Res* 2014; 3(1):29-36.
- Takahashi M, *et al.* Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol* 2008; 153(9):1703–13.
- Ticehurst J, *et al.* Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis in Pakistan: serologic responses and pattern of virus excretion. *J Med Virol* 1992; 36(2):84-92.
- Trinks J, Oubiña JR. Hepatitis A. *Virología Médica*, 4ta ed, 2014. Buenos Aires: Corpus. Capítulo 24.2, págs 441-9.
- Trinks J, Oubiña JR. Hepatitis E. *Virología Médica*, 4ta ed, 2014. Buenos Aires: Corpus. Capítulo 24.6, págs 530-4.
- Viswanathan, R. Epidemiology. *Indian J Med Res* 1957; 45(1):1-29.
- Wang H, *et al.* Recombination analysis reveals a double recombination event in hepatitis E virus. *Virol J* 2010; 7:129-34.
- Weber T, *et al.* Human retroviruses. *Baillieres Clin Haematol* 1992; 5(2):273–314.
- Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(1):31-40.

- Wedemeyer H, *et al.* Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* 2012; 142(6):1388-97.
- Wong DC, *et al.* Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 1980; 316(8200):876-9.
- Xu C, *et al.* An assessment of hepatitis E virus (HEV) in US blood donors and recipients: no detectable HEV RNA in 1939 donors tested and no evidence for HEV transmission to 362 prospectively followed recipients. *Transfusion* 2013; 53(10 0 2):2505-11.
- Yamada K, *et al.* Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *J Gen Virol* 2009; 90(2):457–62.
- Yamaguchi Y, *et al.* HIV and hepatitis delta virus: evolution takes different paths to relieve blocks in transcriptional elongation. *Microbes Infect* 2002; 4(11):1169-75.
- Zuckerman A, *et al.* Principles and practice of clinical virology, 6th ed., 2009. Wiley - Blackwell; p. 273-329.