

Duración de la viremia y la excreción fecal del virus en niños con Hepatitis A

María S Munné,¹ María C Cañero Velasco,² Rita Moreiro,⁴ Sara Vladimírsky,¹ Lucio Otegui,¹ Raúl Castro,¹ Leonardo Brajterman,¹ Sonia Soto,¹ Jorge Mutti,² Silvia Nucifora,² Elena Lara,³ Aníbal Sosa,³ Patricia Godoy,² Mirta Ciocca,⁵ Miram Cuarterolo,⁵ Jorge F Quarleri,⁶ Jorge E González¹

Acta Gastroenterol Latinoam 2006;36:182-189

Resumen

La infección por el virus de hepatitis A (HAV) es endémica en Argentina. El uso de técnicas moleculares permitió extender la detección del RNA del HAV en suero y heces en pacientes con diferentes presentaciones clínicas. Comparamos la sensibilidad del protocolo de RT-PCR que usamos con cebadores dirigidos a distintas regiones del genoma, resultando la detección de la región VP3 C terminal la más sensible. Se obtuvieron prospectivamente muestras de suero y materia fecal de 20 niños con hepatitis aguda autolimitada por HAV. El RNA del HAV fue detectado en 18/20 niños en muestras basales y en 19/20 sumando una muestra posterior. El RNA del HAV fue detectable en 9/20 pacientes hasta 30 días en suero; en materia fecal en 2/20 hasta 60 días y en 1/20 hasta 90 días. La secuencia genómica para la región VP1/2A en 8 muestras demostró que todas pertenecían al subgenotipo IA, aunque eran diferentes entre sí. Solo en 1/11 niños con falla hepática fulminante fue posible la detección del RNA del HAV utilizando la región VP3 C terminal y el genotipo fue I. La reciente introducción de la vacunación universal en niños de 1 año de edad en Argentina podría disminuir drásticamente la circulación del virus,

emergiendo nuevas fuentes de infección y permitiendo la introducción de nuevos genotipos. Las técnicas moleculares aplicadas al estudio de la historia natural de la infección y a la vigilancia epidemiológica contribuyen al control y la toma de decisiones eficientes en políticas de Salud Pública.

Summary

Duration of viremia and fecal shedding of the virus in Hepatitis A infected children

Hepatitis A virus (HAV) infection is endemic in Argentina. Molecular tools have allowed HAV RNA detection to be extent to sera and feces from patients with different clinical backgrounds. We compare the sensitivity of the RT-PCR protocol we follow using primers targeting different genomic regions and VP3 C terminal was the most sensitive. Sequential sera and fecal samples were obtained from 20 children with acute self limited Hepatitis A. HAV RNA was detectable in 18/20 children if sera and stool specimens were collected at the onset of symptoms and in 19/20 if a later sample was considered. HAV RNA was detectable in serum from 9/20 patients until day 30 and in feces from 2 patients until day 60 and until day 90 in one. Genomic sequences from VP1/2A region in 8 samples showed they all belong to subgenotype IA although they were different between them. HAV RNA was detectable only in 1/11 sera from children with acute liver failure when VP3 C terminal fragment was searched and it belonged to genotype I. Universal vaccination in one year old children was recently implemented in Argentina and it will dramatically enable the decrease of the viral circulation, making new sources of infection emerge and allowing the introduction of new genotypes. The application of molecular tools to the study of the natural history of infection and to the epidemiologic surveillance may contribute to efficient control and lead to rational decisions in public health policies.

¹ Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. INEI-ANLIS - Dr Carlos G. Malbrán, Ciudad Autónoma de Bs. As. Argentina.

² Unidad de Gastroenterología y Hepatología.

³ Laboratorio Central. Hospital Municipal del Niño de San Justo. San Justo, Provincia de Buenos Aires.

⁴ Laboratorio.

⁵ Unidad de Hígado. Hospital Nacional de Pediatría J. P. Garrahan - Ciudad Autónoma de Bs. As. Argentina.

⁶ Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. UBA. Ciudad Autónoma de Bs. As. Argentina.

Correspondencia: María Silvina Munné
Av Velez Sarsfield 563. 1281. Buenos Aires.
Tel./fax: 54-11- 43025064 - E-mail: smunne@anlis.gov.ar

Index (palabras claves): *Hepatitis A, RNA, RT-PCR, viremia, feces.*

El virus de hepatitis A (HAV), uno de los cinco virus hepatotropos primarios, es un virus desnudo, con un genoma RNA de cadena simple y polaridad positiva, clasificado en el género *Hepatovirus* de la familia *Picornaviridae*.¹ El HAV se transmite principalmente por vía fecal-oral. En zonas con patrones de alta endemicidad los niños adquieren la infección en los primeros años de vida y la misma cursa generalmente en forma asintomática. Al mejorar las condiciones sanitarias, como sucede en países con endemicidad intermedia o en transición, un mayor número de individuos permanece susceptible y puede adquirir la infección a una edad más avanzada aumentando paradójicamente el número de casos sintomáticos.

Los primeros estudios en humanos determinaron que la presencia del HAV en suero y su excreción en materia fecal eran muy breves luego de la aparición de los síntomas.² Posteriormente el uso de técnicas moleculares en distintos grupos de individuos infectados con HAV, adultos o niños, han demostrado que el RNA del HAV puede detectarse por más tiempo tanto en suero como en heces, pero se incluyen formas prolongadas, sobre-infecciones en hepatitis crónicas, pacientes con inmunidad disminuida o que han adquirido simultáneamente inmunoglobulinas por inmunoprofilaxis pasiva.³⁻⁸ La sensibilidad de las técnicas moleculares para la detección del RNA del HAV, que no son comerciales, ha demostrado ser muy variable en función de las técnicas de extracción, la región genómica elegida, el protocolo de amplificación y el sistema de detección del fragmento amplificado. Las regiones genómicas que demostraron una mayor sensibilidad frente a un panel de sueros fueron 5' no codificante y VP3/VP1.⁹ Las regiones del genoma que se utilizan por su variabilidad para definir genotipos son: VP3 C terminal, VP1 N terminal, la unión VP1/2A, VP1/2B y VP1 completa.¹⁰

La región VP1/2A permitió originalmente proponer la clasificación del HAV en siete genotipos y se ha utilizado extensamente en la epidemiología molecular de este virus. Los genotipos I, II, III y VII fueron encontrados en humanos y los genotipos IV, V y VI exclusivamente en simios.¹¹ Recientemente se ha confirmado que II y VII serían subgenotipos de un mismo genotipo.¹² Los genotipos I y III po-

seen dos subgenotipos llamados A y B. El genotipo I es el más abundante en el mundo. En Sudamérica el único genotipo detectado hasta el momento es el I, siendo predominante el subgenotipo IA. Se ha detectado subgenotipo IB en Río de Janeiro, Brasil y en un brote con moluscos provenientes de Perú. En Buenos Aires, Argentina y sus alrededores se ha reportado el subgenotipo IA.^{11,13-16}

Argentina es un país que ha ido cambiando de una mayor endemicidad a una endemicidad intermedia según las condiciones socioeconómicas e higiénico-sanitarias del grupo estudiado.¹⁷⁻¹⁹ La vigilancia epidemiológica nacional ha permitido detectar que la infección por el HAV cursaba un ciclo epidémico desde 2002, alcanzando en el año 2004 la máxima notificación de casos (61.845 casos, 170.6 por 100.000 habitantes) al SiNaVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud), (Lic. S. Espetxe. Epidemiología. Informes N° 4 y 5 del Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. www.anlis.gov.ar/inei/virolog/hepatitis).

El HAV fue el agente etiológico del 68% de las fallas hepáticas fulminantes (FHF) y del 20% de los trasplantes pediátricos de Argentina.²⁰ Estos datos ponen de relevancia la importancia en el conocimiento de la historia natural de la infección en el control de esta infección en Salud Pública.

En nuestro trabajo estudiamos en forma prospectiva y simultánea la duración de la viremia y la excreción fecal del HAV en niños con una forma de presentación autolimitada, que es la forma de presentación más frecuente, eligiendo para la RT-PCR utilizada los cebadores con mayor sensibilidad. También buscamos el RNA del HAV en suero en un grupo de niños con falla hepática fulminante.

Materiales y métodos

Determinación de la sensibilidad de la RT-PCR.

Se estudiaron diluciones seriadas (de 10 a 1.000.000) de un *stock* viral de HAV conteniendo 10⁶ dosis infecciosas/ml (gentileza del Dr R. Purcell del N.I.H de EE.UU.). Se consideró como sensibilidad límite la última dilución en que 5/5 repeticiones fueron todas positivas.²¹

El RNA total se obtuvo a partir de 100 µl de muestra por el método de extracción de tiocianato de guanidina, fenol y cloroformo.²² Fue precipitado con isopropanol, lavado con alcohol 70% y disuelto en 9 µl de agua. La retrotranscripción se llevó a cabo con hexanucleótidos (Invitrogen, Carlsbad, Cali-

fornia, EE.UU.) usando la transcriptasa reversa MMLV (Moloney murine leukemia virus), (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) durante 90 minutos a 37° C en un volumen final de 20 µl. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron cebadores dirigidos a distintas regiones genómicas (tabla 1). Para la región 5' no codificante se ensayaron dos juegos de cebadores, los cebadores internos del segundo juego se diseñaron con el programa Primer3.²⁵ En la segunda vuelta de amplificación (*nested* PCR) se utilizó 2 µl de la primera. El DNA amplificado fue visualizado en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio con luz UV.

Muestras de niños con hepatitis aguda autolimitada.

Se estudiaron en forma seriada muestras de suero y materia fecal de 20 niños (11 mujeres y 9 varones, edad media 6 años, con un rango de 1 a 14 años) inmunocompetentes y previamente sanos que consul-

taron en el Hospital de Niños de San Justo, Provincia de Buenos Aires, por síntomas de hepatitis aguda (ictericia, acolia, coluria) que no requirieron internación. Se obtuvo consentimiento informado y el trabajo contó con la aprobación del Comité de Docencia e Investigación. El diagnóstico de infección aguda por HAV se realizó detectando anticuerpos antiHAV de clase IgM por EIE, que fue en todos los casos positivo, siendo los otros marcadores de infección aguda para HBV, HCV, CMV y EBV negativos. Las transaminasas estaban elevadas en todos los casos en promedio x16 del valor normal (rango x2-x36). El diagnóstico de laboratorio fue confirmado en el Laboratorio Nacional de Referencia para Hepatitis Virales utilizando equipos comerciales disponibles para los marcadores de infección para HAV (Abbott, IL, EE.UU.). Se obtuvieron muestras el día de la aparición de los síntomas, que se consideró la muestra basal y posteriormente a los días 15,

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación del HAV RNA por RT-PCR. Los cebadores externos fueron utilizados para la primera vuelta de amplificación de PCR y los internos en una segunda vuelta de amplificación.

Localización genómica	Nucléotidos (HM 175)	Secuencia	Referencia	Última dilución positiva
VP3 (C terminal)				
Externos	2035-2054	cagcacatcagaaggtgag	23	10 ⁻⁵
	2208-2226	ctccagaatcatctccaac		
VP1/2A				
Externos	2799-2822	attcagattagactgccttgta	10	10 ⁻¹
	3375-3399	agtaaaactccagcatccatttc		
Internos	2897-2920	ctattcagattgcaaattacaat	8	10 ⁻⁴
	3288-3310	aacttcattattcatgctcct		
5' no codificante				
Externos	35-54	tottggaagtcgatgag	24	No detectable
	696-677	agtacctcagaggcaaacac		
Internos	55-74	gggacttgatacctcaccgc	24	10 ⁻²
	677-658	ccacataaggcccaagaa		
Externos	55-74	gggacttgatacctcaccgc	24	10
	677-658	ccacataaggcccaagaa		
Internos	179-201	ctgtttctataagaactca	Este trabajo	10 ⁻⁵
	494-512	tccactggatgagagtcag		

30, 60 y 90. De la materia fecal se estudió el sobrenadante obtenido de la solución al 10% en *buffer* salino clarificada a 7.000 rpm durante 10 minutos. Ningún paciente presentó formas recurrentes (bifásicas) o prolongadas en el seguimiento clínico o de laboratorio.

Muestras de niños con falla hepática fulminante.

Se analizaron sueros obtenidos al ingreso de 11 pacientes (9 mujeres y 2 varones, edad media 4 años, rango 1 a 9 años) derivados al Hospital Garrahan con diagnóstico de FHF por HAV (2 eran del año 2000 y 9 fueron obtenidos entre febrero y julio de 2003) sin antecedentes de ingestión de tóxicos ni otros marcadores de infección aguda para HBV, HCV, CMV y EBV. El diagnóstico de infección aguda por HAV (anticuerpos IgM antiHAV positivo, MEIA IMX, Abbott, IL, EE.UU.) fue confirmado en el Laboratorio Nacional de Referencia con equipos comerciales disponibles.

Determinación del genotipo.

Los productos de PCR positivos fueron purificados en columnas (Quiaquick PCR purification, QUIAGEN, Hilden, Alemania) y secuenciados en

ambos sentidos usando Big Dye terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE, Applied Biosystems, EE.UU.). Las secuencias nucleotídicas se determinaron con un secuenciador automático ABI 377 DNA Sequencer (PE, Applied Biosystems, EE.UU.). Las secuencias se analizaron con el programa BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) y se compararon con secuencias del GenBank y de la base de datos del Laboratorio Nacional de Referencia.

Resultados

Los resultados de la sensibilidad para cada región genómica estudiada se resumen en la tabla 1.

La RT-PCR con cebadores dirigidos a la región VP3 C terminal fue la de mayor sensibilidad con una única vuelta de amplificación, siendo elegida para la determinación de la duración de la viremia y de la excreción fecal para el HAV. (Figura 1)

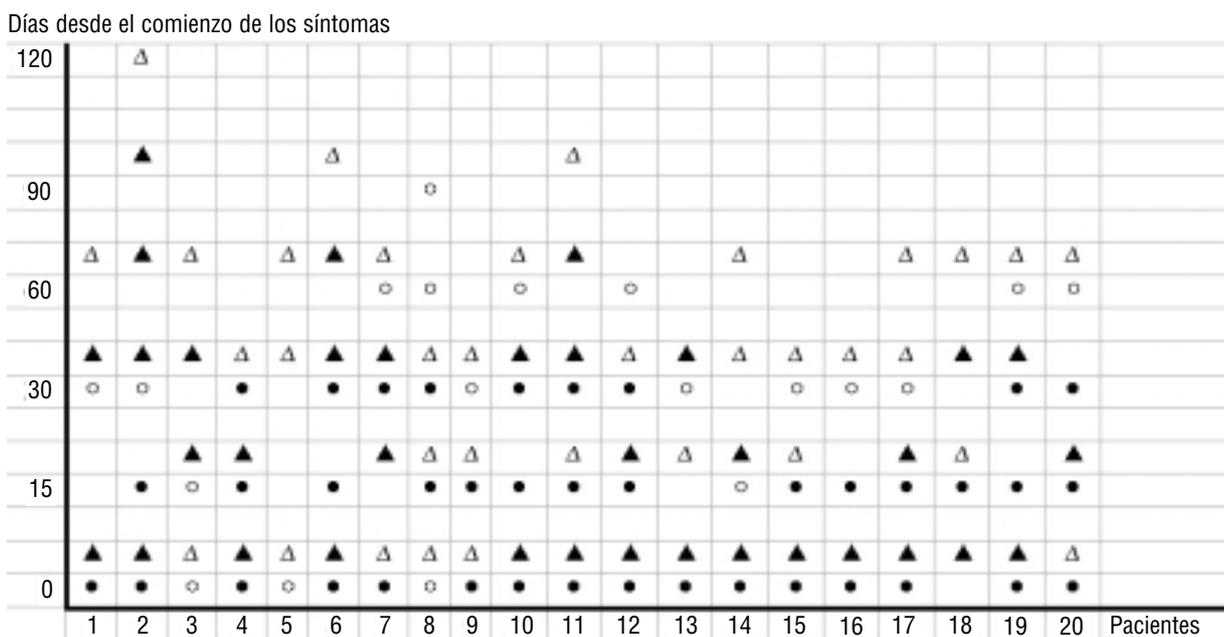
En solo un paciente no fue posible detectar el RNA del HAV ni en suero ni en materia fecal.

Dos pacientes tuvieron el RNA del HAV detectable solo en suero y uno solo en heces.

El RNA del HAV pudo ser detectado en 18/20 ni-

Figura 1. HAV RNA detectado por RT-PCR con cebadores dirigidos a la región VP3 C terminal en muestras secuenciales de 20 niños con hepatitis A aguda autolimitada.

● HAV RNA positivo en suero. ○ HAV RNA negativo en suero. ▲ HAV RNA positivo en materia fecal. △ HAV RNA negativo en materia fecal.



ños (90%) cuando se dispuso de suero y materia fecal en el momento de la presentación de los síntomas y en 19/20 niños (95%) cuando se incluyó una muestra posterior.

Pudimos detectar la viremia hasta los 30 días luego de la aparición de los síntomas en 9 niños y la excreción fecal llegó a los 60 días en dos pacientes y a los 90 días solo en uno.

Ocho muestras de este grupo de 20 pacientes del Hospital de Niños de San Justo fueron amplificadas y secuenciadas para la región VP1/2A que es la región más utilizada para la caracterización molecular. Todas fueron subgenotipo IA. Todas fueron distintas entre sí, aunque los niños vivían en el área del Hospital y la fecha de la infección variaba en pocos meses, revelando una elevada heterogeneidad genómica y la co-circulación de variantes.

Solo una de las 11 muestras de pacientes con FHF del Hospital Garrahan incluidas en este trabajo fue positiva para la región VP3 C terminal. Todas fueron negativas para la región VP1/2A. Si bien la región VP3 C terminal ha sido poco utilizada en la caracterización molecular, su variabilidad genética permite la caracterización a nivel de genotipo.²³ El análisis de la secuencia determinó que correspondía al genotipo I (Acceso al GenBank: AY 548059). Las escasas secuencias disponibles para esta región genómica no permiten extender el análisis molecular.

Discusión

No hay reportes en la literatura de antecedentes de trabajos que estudien simultáneamente viremia y excreción fecal en forma prospectiva en niños con hepatitis A con esta presentación autolimitada.

La excreción fecal podría durar más en niños que en adultos²⁶ y, como muestran nuestros resultados, la detección del RNA del HAV en niños con una presentación clínica autolimitada puede extenderse hasta 30 días en suero y hasta 60-90 días en materia fecal con un patrón que es individual en cada uno de los pacientes estudiados.

Disponer tanto del suero como de la materia fecal simultáneamente, permitió detectar el RNA del HAV en el 90 ó el 95% de los niños según se consideren únicamente muestras basales o se agregue una muestra posterior a los 15d.

Un estudio de la excreción fecal en 67 pacientes de India, incluyendo 59 niños, contaba en la mayoría de los casos con muestras únicas. El 50% de los pacientes tenía una muestra dentro de la primera semana de la presentación de los síntomas, siendo el

RNA del HAV positivo solo en 36.6% de ellos. En 4/10 materias fecales el RNA del HAV fue positivo entre las 4 y 5 semanas y en 0/8 a partir de la semana 6, sin discriminar a qué grupo, adultos o niños, pertenecían.²⁷ Los autores reconocen la limitación de carecer de muestras secuenciales para determinar el patrón de eliminación que podría haber sido intermitente o demorado como se había encontrado previamente²⁶ y que también hemos observado en algunos niños de nuestro trabajo.

Recientemente en un brote en niños en Tailandia el RNA del HAV fue detectable en el 34.3% de las muestras de suero al momento del diagnóstico con anticuerpos IgM antiHAV positivos. El RNA del HAV en materia fecal no fue detectado más allá de las 3 semanas luego de la presentación de los síntomas.²⁸

Desde hace décadas se ha determinado que el daño hepático sería inmunomediado,²⁹ pero los mecanismos subyacentes en la infección por HAV son desconocidos.³⁰ En pacientes adultos la severidad de la infección estaría asociada a la edad y a enfermedades hepáticas crónicas, así como también a la ingesta de acetaminofeno.³¹⁻³³ Existen escasos trabajos que analizan la contribución de factores virales y los resultados son contradictorios. Mientras que un grupo de Francia encuentra que la FHF estaría asociada a una menor carga viral y a la presencia de un genotipo distinto de IA,³³ en Japón encuentran que no estaría relacionado al genotipo, siendo en todos los casos IA, sino que podría deberse a diferencias en las sustituciones nucleotídicas en distintas regiones del genoma o a un mayor nivel de replicación del virus.^{24,34-6} Por otra parte, el genotipo VII (ahora IIB) se aisló originariamente en uno de dos casos de FHF relacionados epidemiológicamente en África.³⁷ Todos estos trabajos se han realizado en adultos.

No existen estudios publicados en niños con FHF que involucren características virales.

En este trabajo 10/11 pacientes del grupo con FHF por HAV tenían viremia indetectable con la RT-PCR de mayor sensibilidad. En el trabajo de Rezende y col, se sugiere que el daño hepático observado en 10 hígados explantados con necrosis masiva se debería a la excesiva respuesta inmune que correlaciona con la ausencia del RNA del HAV o una baja carga viral.³³ El único subgenotipo reportado en Argentina hasta el momento es el IA y la única secuencia obtenida en nuestro trabajo en este subgrupo de pacientes corresponde también a ese genotipo. En este caso el genotipo no estaría asociado a esta for-

ma de presentación, en concordancia a lo hallado por Fujiwara y col.³⁵ Nuestros resultados impulsan a continuar con el estudio de factores virológicos asociados a la FHF.

Una de las limitaciones en la comparación de resultados por técnicas moleculares del RNA del HAV es el uso de técnicas no comerciales con una estandarización que es propia a cada laboratorio y que han demostrado un amplio rango de sensibilidad.⁹ Además, la materia fecal podría contener inhibidores de las técnicas de amplificación enzimática.^{5,27}

La duración de la excreción fecal en niños, principales reservorios de la infección en zonas de alta endemicidad con patrones de transmisión fecal-oral, tiene relevancia en el control y prevención entre los contactos de casos aislados y en situaciones de brotes. La excreción fecal es independiente de los niveles de transaminasas y se ha demostrado en niños que partículas completas del HAV –detectadas por inmunomicroscopia electrónica (IME)- son excretadas al menos hasta la segunda semana posterior a la aparición de los síntomas; siendo una muestra con partículas completas por IME infectiva al ser inoculada en macaco Rhesus.²⁷

En pacientes adultos el uso de técnicas moleculares de gran sensibilidad, como la RT-PCR en tiempo real, ha prolongado la detección de la viremia del HAV en donantes de sangre hasta 60 días, sumando evidencia a la necesidad de detectar el RNA del HAV para evitar el riesgo de infección a través de transfusiones o el uso de hemoderivados.³⁸ La utilización de esta tecnología todavía no es generalizada.

En nuestro laboratorio la RT-PCR con cebadores dirigidos a la región genómica VP3 C terminal ha demostrado tener una alta sensibilidad con solo una vuelta de amplificación y menores costos.

La detección del RNA del HAV por RT-PCR ha permitido el diagnóstico de la infección en el período de ventana de la misma cuando los anticuerpos IgM antiHAV son todavía negativos.³⁹ La detección del RNA del HAV y su caracterización posibilitaron la determinación de la fuente de brotes a partir de alimentos o agua contaminados^{15,40-42} y detectar patrones de circulación en grupos con distintos factores de riesgo de adquirir la infección.⁴³

La estabilidad del HAV y el uso de técnicas de detección muy sensibles permiten usar este virus para indicar contaminaciones fecales en el medio ambiente.⁴⁴

La región VP3 C terminal nos ha permitido determinar la presencia de HAV en aguas contaminadas

urbanas en Buenos Aires (Cisterna y col, manuscrito en preparación).

La introducción de la vacunación universal para HAV en niños de un año de edad en Argentina desde junio de 2005 podría disminuir drásticamente la circulación del virus como se ha observado en los Estados Unidos y en Israel.^{45,46} Dentro de este marco, el ingreso y la co-circulación de nuevos genotipos se ha observado en países de baja endemicidad.^{43,47,48}

Las técnicas moleculares para la detección del RNA del HAV y su caracterización molecular podrían ser herramientas valiosas en un programa de vigilancia activa de esta infección como se ha implementado en Israel, luego del inicio de un programa de vacunación universal en niños de 2 años de edad.

Resumiendo, el uso de técnicas moleculares permite la descripción más precisa de la historia natural de esta enfermedad que la descrita en los años setenta cuando todavía no se disponía de ellas y se basaba en las escasas evidencias clínicas que ocurren en niños y en técnicas de IME para la detección del virus en materia fecal. Estas técnicas también son indispensables para la vigilancia epidemiológica.

Los datos hallados son relevantes para incrementar la eficiencia en el control de la infección en brotes y/o la toma de decisiones de medidas higiénico-sanitarias en Políticas de Salud.

Referencias

1. Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. In Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 4a ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.p799-840.
2. Dienstag JL, Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Fecal shedding of hepatitis-A antigen. *Lancet* 1975;1:765-767.
3. Sjogren MH, Tanno H, Fay O, Sileoni S, Cohen BD, Burke DS, Feighny RJ. Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann Intern Med* 1987;106:221-226.
4. Rosenblum LS, Villarino ME, Nainan OV, Melish ME, Hadler SC, Pinsky PP, Jarvis WR, Ott CE, Margolis HS. Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants. *J Infect Dis* 1991;164: 476-482.
5. Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Kurokawa K, Iino S. Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. *Hepatology* 1996;24: 10-13.

6. Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Imazeki F, Saisho H, Miki M, Omata M. Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *Hepatology* 1997;26:1634-1639.
7. Polish LB, Robertson BH, Khanna B, Krawczynski K, Spelbring J, Olson F, Shapiro CN. Excretion of hepatitis A virus (HAV) in adults: comparison of immunologic and molecular detection methods and relationship between HAV positivity and infectivity in tamarins. *J Clin Microbiol* 1999;37:3615-3617.
8. Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 2000;182:12-17.
9. Saldanha J. Sensitivity of PCR assays for the determination of hepatitis A virus RNA in plasma pools. A collaborative study. *Vox Sang* 1999;76:163-165.
10. Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:63-79.
11. Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, Ishizu T, Moritsugu Y, Lemon S. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992;73:1365-1377.
12. Lu L, Ching KZ, de Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, Robertson BH. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate) *J Gen Virol* 2004;85:2943-2952.
13. Costa-Mattioli M, Ferre V, Monpoeho S, García L, Colina R, Billaud S, Vega I, Perez-Bercoff R, Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *J Gen Virol* 2001;82:2647-2652.
14. Mbayed VA, Sookoian S, Alfonso V, Campos RH. Genetic characterization of hepatitis A virus isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Med Virol* 2002;68:168-174.
15. Sanchez G, Pinto RM, Vanaclocha H, Bosch A. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J Clin Microbiol* 2002;40:4148-4155.
16. de Paula VS, Lu L, Niel C, Gaspar AM, Robertson BH. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol* 2004;73:378-383.
17. González J, Fay O, Canero-Velasco MC, Fernández E, Carchio E, Moreiro R, Weller C, Taborda M, Mutti J, Degastano S, Flores I, Auvieux C, Cavo M, Sosa A, Nucifora S, Marchesini N, Castro R, Cisaruk E. Hepatitis A virus infection in children in Argentina: a pilot study. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1997;27:331-334.
18. Tapia-Conyer R, Santos JI, Cavalcanti AM, Urdaneta E, Rivera L, Manterola A, Potin M, Ruttiman R, Tanaka Kido J. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:825-829.
19. Foussal MD, Picon C, Sorrentino A. Hepatitis A in childhood. The tip of an infectious disease iceberg. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2002;32:101-105.
20. Cuarterolo M, Ciocca M, López S, Cervio G, Rojas L, Bianco G, Speranza A, Sasbon J, De Dávila MT, Questa H, Lipsich J, Bes D, Fernández C, Dip M, Ayarzal V, Tau C, Vaiani E, Del Pino M, Oleastro M, Delgado N, Delfino V, Bravo E, Norton E, Imventarza O. Evolution of children one year post liver transplant. *Medicina (B Aires)* 2005;65:402-408.
21. Grimm AC, Fout GS. Development of a molecular method to identify hepatitis E virus in water. *J Virol Methods* 2002; 101:175-188.
22. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
23. Jansen RW, Siegl G, Lemon SM. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 2867-2871.
24. Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Saisho H, Saotome N, Suzuki K, Okita K, Kiyosawa K, Omata M. Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA: strains from fulminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions. *Gut* 2002;51:82-88.
25. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2000.p.365-386.
26. Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Ticehurst JR, Purcell RH. Fecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* 1986;154:231-237.
27. Chitambar SD, Joshi MS, Sreenivasan MA, Arankalle VA. Fecal shedding of hepatitis A virus in Indian patients with hepatitis A and in experimentally infected Rhesus monkey. *Hepatol Res* 2001;19:237-246.
28. Poovorawan Y, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradamee P, Chutsirimongkol S, Tangkijvanich P. Clinical features and molecular characterization of hepatitis A virus outbreak in a child care center in Thailand. *J Clin Virol* 2005;32:24-28.
29. Vallbracht A, Gabriel P, Maier K, Hartmann F, Steinhardt HJ, Muller C, Wolf A, Manncke KH, Flehmig B. Cell-mediated cytotoxicity in hepatitis A virus infection. *Hepatology* 1986;6:1308-1314.
30. Martin A, Lemon S. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* 2006;43 (Suppl 1):164-172.
31. Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, Redfield RR, Fields ML, Kelley PW. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Am J Epidemiol* 1985;122:226-233.
32. Vento S. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2000; 7(Suppl 1):7-8.
33. Rezende G, Roque-Afonso AM, Samuel D, Gigou M, Nicand E, Ferre V, Dussaix E, Bismuth H, Feray C. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology* 2003;38:613-618.
34. Fujiwara K, Yokosuka O, Fukai K, Imazeki F, Saisho H, Omata M. Analysis of full-length hepatitis A virus genome in sera from patients with fulminant and self-limited acute type A hepatitis. *J Hepatol* 2001;35:112-119.
35. Fujiwara K, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Saotome N, Suzuki K, Okita K, Tanaka E, Omata M. Analysis of the ge-

- notype-determining region of hepatitis A viral RNA in relation to disease severities. *Hepatol Res* 2003;25:124-134.
36. Fujiwara K, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Miki M, Omata M. Do high levels of viral replication contribute to fulminant hepatitis A? *Liver Int* 2005;25:194-195.
 37. Ching KZ, Nakano T, Chapman LE, Demby A, Robertson BH. Genetic characterization of wild-type genotype VII hepatitis A virus. *J Gen Virol* 2002;83:53-60.
 38. Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Nicand E, Aleman MH, Billaudel S, Ferre V. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J Viral Hepat* 2002;9:101-106.
 39. De Paula VS, Villar LM, Morais LM, Lewis-Ximenez LL, Niel C, Gaspar AM. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. *J Clin Virol* 2004;29:254-259.
 40. Niu MT, Polish LB, Robertson BH, Khanna BK, Woodruff BA, Shapiro CN, Miller MA, Smith JD, Gedrose JK, Alter MJ. Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries. *J Infect Dis* 1992;166:518-524.
 41. De Serres G, Cromeans TL, Levesque B, Brassard N, Barthe C, Dionne M, Prud'homme H, Paradis D, Shapiro CN, Nainan OV, Margolis HS. Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *J Infect Dis* 1999;179:37-43.
 42. Dentinger CM, Bower WA, Nainan OV, Cotter SM, Myers G, Dubusky LM, Fowler S, Salehi ED, Bell BP. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *J Infect Dis* 2001;183:1273-1276.
 43. Nainan OV, Armstrong GL, Han XH, Williams I, Bell BP, Margolis HS. Hepatitis A molecular epidemiology in the United States, 1996-1997: sources of infection and implications of vaccination policy. *J Infect Dis* 2005;191:957-963.
 44. Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schroter-Bobsin U, Hohne M, Roske I, Schreier E. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virol* 2005;150:929-947.
 45. Wasley A, Samandari T, Bell BP. Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination. *JAMA* 2005;294:194-201.
 46. Dagan R, Leventhal A, Anis E, Slater P, Ashur Y, Shouval D. Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *JAMA* 2005;294:202-210.
 47. Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Schvoerer C, Besse B, Aleman MH, Billaudel S, Cristina J, Ferre V. Genetic analysis of hepatitis A virus outbreak in France confirms the co-circulation of subgenotypes Ia, Ib and reveals a new genetic lineage. *J Med Virol* 2001;65:233-240.
 48. Pina S, Buti M, Jardi R, Clemente-Casares P, Jofre J, Girones R. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 2001;82:2955-2963.