

Caracterización molecular del virus de hepatitis E en tres casos de falla hepática fulminante en niños de Argentina

María Silvina Munné,¹ Sara Vladimírsky,¹ Lucio Otegui,¹ Leonardo Brajterman,¹ Raúl Castro,¹ Sonia Soto,¹ Rita Moreira,² Mirta Ciocca,³ Miriam Cuarterolo,³ Daniel Buamscha,⁴ Silvina Giannivelli,⁴ Jorge Sasbón,⁴ George Schlauder,⁵ Jorge E González¹

Acta Gastroenterol Latinoam 2006;36:125-130

Resumen

Las cepas de virus de hepatitis E (HEV) encontradas en casos esporádicos humanos y en cerdos en Argentina corresponden al genotipo 3. Se han descrito variantes de este genotipo asociadas a fallas hepáticas fulminantes (FHF) en adultos de Japón e Inglaterra. En Argentina el 30% de las FHF en adultos y en niños es de etiología desconocida. Para estudiar si el HEV podría ser el agente etiológico asociado a FHF en niños se analizaron el suero y/o la materia fecal de 35 niños (edad media 6 años, 20 mujeres, 15 varones) durante 2003 y 2004. El HEV RNA fue detectado por RT-nested PCR con cebadores dirigidos a las regiones ORF 1 y ORF 2. El HEV RNA pudo detectarse en 3 casos. Dos eran varones de 12 años residentes en la provincia de Buenos Aires y el tercero, una niña de 3 años de la provincia de Corrientes. El análisis de las secuencias muestra que las 3 variantes son distintas, pero pertenecen todas al genotipo 3 y están muy relacionadas a las cepas encontradas previamente en casos esporádicos en humanos y en cerdos de Argentina. Estos datos sugieren una posible relación entre FHF y HEV en niños de Argentina e indican la necesidad de considerar la infección con HEV en el diagnóstico diferencial de las FHF. Se necesitan más estudios que demuestren el verdadero impacto de esta infección y el beneficio potencial de una vacuna para HEV, actualmente en fase III.

¹ Laboratorio Nacional de Referencia para Hepatitis Virales. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A.N.L.I.S "C G Malbrán". Buenos Aires. Argentina.

² Laboratorio, ³Unidad de Hígado, ⁴Terapia Intensiva de Transplante Hepático, Hospital de Pediatría "J P Garrahan". Buenos Aires. Argentina.

⁵Abbott Laboratories. Abbott Park. IL USA.

Correspondencia: María Silvina Munné
Jujuy 286. PB1. Buenos Aires, Argentina.
Teléfono: 54-11-43025064. Fax: 54-11-4957 4463
E-mail: smunne@anlis.gov.ar

Summary

Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina

Strains of hepatitis E virus (HEV) isolated from Argentinian patients with sporadic hepatitis, as well as from swine from Argentina, belong to genotype 3. HEV genotype 3 variants have been described associated with acute liver failure (ALF) in adults from Japan and the United Kingdom. In Argentina, 30% of ALF in adults and children are of unknown aetiology. To study if HEV could be an aetiological agent associated with ALF in children, serum and/or fecal samples from 35 children (mean age: 6 years, 20 female, 15 male) were analyzed during 2003 and 2004. HEV RNA was detected by RT-nested PCR with primers designed within ORF 1 and ORF 2 regions. HEV RNA could be detected in three cases. Two were 12-year-old boys from Buenos Aires province and the third was a 3-year-old girl from Corrientes province. Sequence analysis indicates that the three isolates are distinct from each other but all belong to genotype 3, exhibiting a close relationship with swine and human strains from sporadic cases of HEV, previously reported in Argentina. This data suggests a potential link between ALF and HEV in children in Argentina and indicates the need for the determination of HEV status in the differential diagnosis in ALF. Further studies would aid in determining the true impact of this infection in Argentina and the potential benefits of a vaccine against HEV, presently in phase III trials.

Index (palabras claves): Hepatitis E virus, acute liver failure, genotype

La infección por el virus de Hepatitis E (HEV), uno de los 5 virus hepatotropos, se ha detectado re-

cientemente en forma creciente en todo el mundo, más allá de los países considerados previamente como endémicos.¹ El HEV es un virus desnudo con un RNA simple, de polaridad positiva, recientemente clasificado como *Hepevirus*, familia *Hepeviridae*.² Se transmite por vía fecal-oral y su presentación clínica va desde la forma asintomática hasta la falla hepática fulminante (FHF).³ A partir de las secuencias disponibles ha sido clasificado en 4 genotipos principales.⁴ La infección alcanza una mortalidad del 25% en mujeres embarazadas en regiones endémicas³ donde se ha caracterizado al genotipo 1, involucrado en brotes y epidemias a partir de agua contaminada en países de Asia y África.¹ En el norte de India, región donde circula el genotipo 1, la causa de la FHF en un grupo de niños fue la infección con HEV en el 27% de los casos y con HEV y virus de hepatitis A (HAV) en un 11% más.⁵

Los genotipos 3 y 4 se han encontrado no solo en humanos sino también en cerdos, jabalíes y ciervos, los que podrían actuar de reservorio en zonas no endémicas en las cuales la zoonosis podría ser una vía de transmisión.¹ Se ha sugerido que el genotipo 3 sería menos patógeno.⁶ Sin embargo, en Japón y en Inglaterra se lo ha encontrado en casos de FHF en adultos.⁷⁻¹⁰ Variantes del genotipo 3 del HEV han sido encontradas en 2 casos esporádicos de hepatitis aguda en Argentina¹¹ y también en cerdos exhibiendo una secuencia genómica muy relacionada a las humanas.¹²

Argentina es un país endémico para el virus de hepatitis A (HAV),¹³ otro de los virus hepatotropos de transmisión entérica. El HAV es responsable de hasta un 68% de las FHF transplantadas en niños.¹⁴ La prevalencia de anticuerpos anti-HEV encontrada en donantes de sangre de la ciudad de Buenos Aires fue del 1.8%, semejante a la de otros países no endémicos.¹⁵ En Argentina no se realiza habitualmente el diagnóstico diferencial para el HEV en casos de hepatitis aguda y aproximadamente el 30% de las FHF en adultos y niños son de causa indeterminada (Villamil FG, comunicación personal).

Métodos

Para la detección del RNA del HEV se estudiaron muestras obtenidas al ingreso de suero y/o materia fecal de 35 niños derivados al Hospital de Pediatría J P Garrahan ubicado en la ciudad de Buenos Aires, durante los años 2003 y 2004, con diagnóstico de FHF de etiología desconocida (marcadores negativos para

infección aguda para HAV, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, autoinmunidad, sin antecedentes tóxicos). 20 eran mujeres y 15 eran varones, con una edad media de 6 años (rango 1 mes a 15 años) y provenían de distintas localidades distribuidas en 16 de las 24 provincias en que se divide Argentina. Las muestras fueron procesadas cuando se recibían en el Laboratorio Nacional de Referencia para Hepatitis Virales.

El RNA de la muestra fue extraído con fenol-cloroformo¹⁶ a partir de suero (50 µl a 200 µl, según la disponibilidad) o 200 µl de una dilución al 10% de materia fecal en *buffer* salino. El cDNA se obtuvo por retrotranscripción con hexámeros (*Invitrogen*) y MMLV (*Invitrogen*), y se amplificó por PCR con cebadores degenerados dirigidos a las regiones ORF 1 y ORF 2 del genoma como ya ha sido descrito previamente.¹¹ Se incluyeron suficientes controles negativos y se siguieron las precauciones recomendadas para evitar contaminaciones.¹⁷ Como control positivo se usó la cepa Meng de cerdo de Estados Unidos (gentileza Dr R Purcell del NIH, Estados Unidos) que corresponde al genotipo 3, aunque diferente a las variantes encontradas en Argentina. El producto de 145 pb correspondiente al fragmento de la región ORF 2 fue purificado con columna (*Quiagen*) y se secuenció en ambos sentidos en secuenciador automático ABI Prism 377 DNA Sequencer (*Applied Biosystems*). Para analizar las secuencias se usó el programa *Bioedit* (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit). Los alineamientos se realizaron con *Clustal X*.¹⁸ El árbol filogenético se construyó con el método de *Neighbor-Joining* y la robustez de mismo se demostró con valores de remuestreo (*bootstrap*) determinados sobre 1.000 réplicas. Se utilizaron programas del paquete Phylip (*Neighbor*, *Seqboot*, *Consense*), (Felsenstein J, *Department of Genetics University of Washington*, Seattle). Los árboles se visualizaron con *Treeview*.¹⁹ Se consideraron significativos valores de *bootstrap* >70%.

Los números de acceso al *GenBank* de las secuencias utilizadas para el árbol son: **B1:** M73218, **M1:** M74506; **T1:** AJ272108; **S15:** AF082094; **H3:** AF082087, **US1:** AF060668, **swUS1:** AF082843; **Ar2:** AF264012, **Ar1:** AF264011, **EFHFArg12.10:** AY548058; **EFHFArg10.7:** AY924958; **EFHFArg13.14:** DQ469375; **swArg:** AY286304.

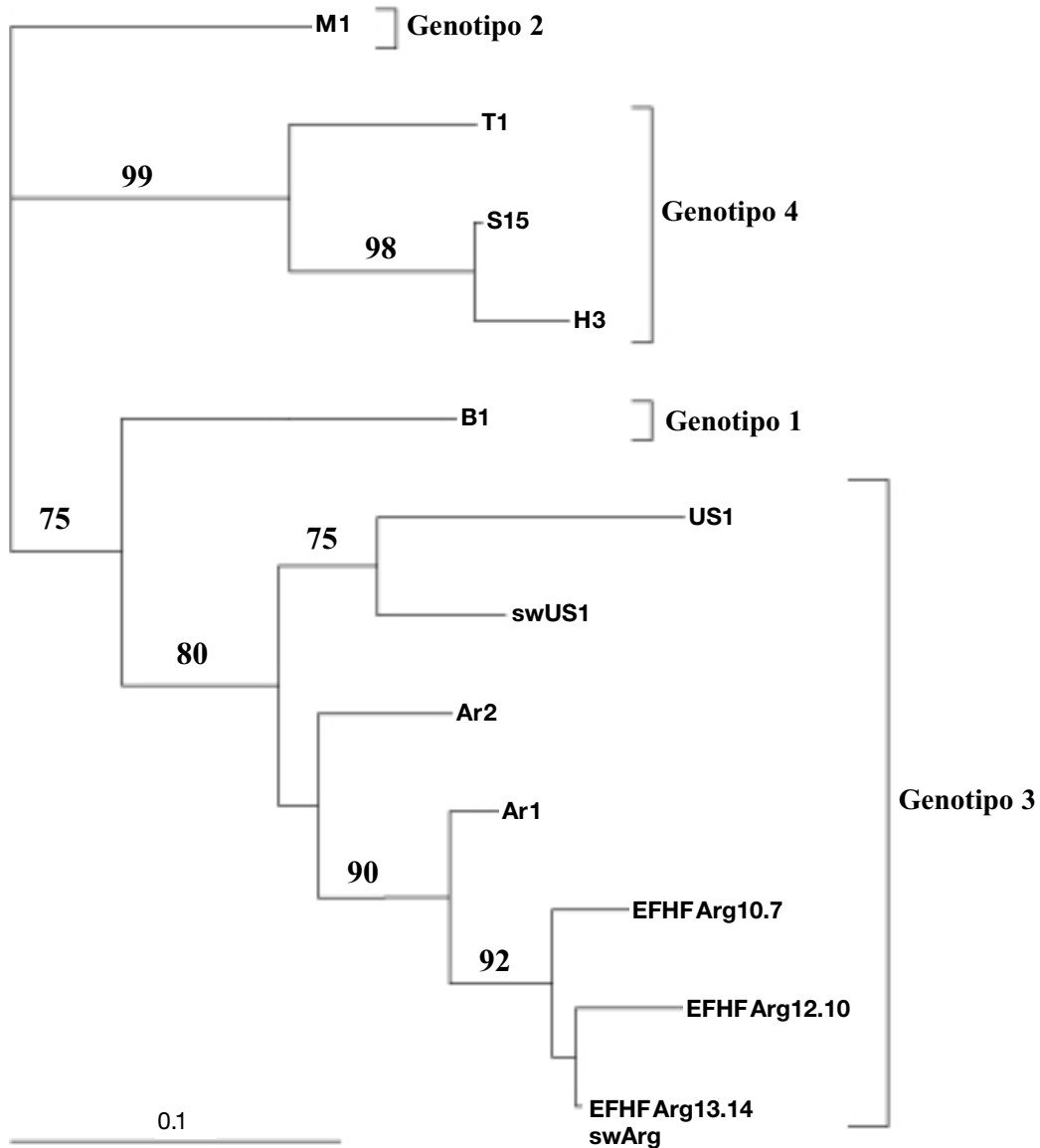
En los casos en los que el HEV RNA fue detectable, se hizo la determinación de anticuerpos anti-HEV de clase IgG con un equipo de ELISA comercial (*Abbott*) según instrucciones del fabricante.

Resultados

El HEV RNA fue encontrado en tres niños, 2 varones de 12 años residentes en el gran Buenos Aires y 1 niña de 3 años de Corrientes. En un caso pudo amplificarse la región ORF 1 y ORF 2 en suero y en los otros dos, solo la región ORF 2 en materia fecal. En las muestras de materia fecal fue posible repetir el procedimiento desde el inicio en muestras inde-

pendientes para confirmar el resultado. En los tres casos, las secuencias de un fragmento de 98 bases de la región ORF2 (se excluyeron del análisis las secuencias de los cebadores) demostraron que los aislamientos correspondían al genotipo 3 y que presentaban una elevada similitud con las variantes de formas agudas en adultos y de cerdo descritas en Argentina. (figura 1) Estas secuencias nucleotídicas

Figura 1. Árbol filogenético de un fragmento de 98 bases correspondiente a la región ORF2 del genoma del HEV que muestra la relación entre los tres casos de falla hepática fulminante en niños de Argentina (EFHFArg 10.7, EFHFArg 12.10 y EFHFArg 13.14) con las variantes de genotipo 3 encontradas en cerdos de Argentina (swArg) y en los casos esporádicos agudos de Argentina (Ar1 y Ar2). También se incluyen en el análisis variantes del genotipo 3 encontradas en cerdo de Estados Unidos (swUS1) y en un caso esporádico de ese país (US1), genotipo1 (B1), genotipo 2 (M1) y genotipo 4 (T1, S15 y H3). Se muestran los valores de bootstrap > 70%.



presentaron una similitud del 90% al 100% con la cepa de cerdo SwArg y el caso esporádico agudo Ar1, siendo de 80% o más con variantes de Estados Unidos correspondientes también al genotipo 3, mientras que fue alrededor del 70% con cepas de los genotipos 1, 2 y 4.

La detección de anticuerpos anti-HEV IgG fue negativa en los tres casos.

Discusión

La detección y caracterización parcial del RNA del HEV en estos tres casos no relacionados entre sí y detectados en distintos momentos del período estudiado, indicaría que este virus podría ser el agente etiológico involucrado.

Dos de los niños residían en la provincia de Buenos Aires (Pcia Bs As), uno en la localidad de San Martín y otro en Quilmes. Se han publicado antecedentes que evidencian la circulación de este virus en esta provincia. Un estudio de prevalencia de marcadores serológicos para la infección con virus hepatotropos en pacientes infectados con virus de la inmunodeficiencia humana demostró que en promedio 6.6% de los mismos tenía anti-HEV IgG detectable,²⁰ alcanzando el 12% en el subgrupo del Hospital Posadas, ubicado en la Pcia Bs As (González J, comunicación personal).

Además, en un estudio de prevalencia de anticuerpos anti-HEV en cerdos de distintas localidades de Argentina se encontró que la mayor prevalencia correspondía a Carmen de Patagones, Pcia Bs As, alcanzando un 58%.²¹ La cepa de cerdo descrita en Argentina fue encontrada en el único criadero de cerdos estudiado, ubicado en Pergamino, Pcia Bs As.¹² El tercer caso en que se detectó el RNA del HEV provenía de la provincia de Corrientes. Como antecedente debe mencionarse un trabajo realizado en esa provincia que demostró que en un grupo de 40 pacientes con hepatitis aguda de etiología indeterminada, el 78% presentaba anticuerpos totales anti-HEV frente a 0% del grupo control con hepatopatía de etiología conocida.²²

Las secuencias caracterizadas en los tres casos presentan la mayor homología con la cepa de cerdo descrita en Argentina,¹² y se exhiben muy relacionadas a Ar1, variante encontrada en un caso esporádico agudo en Argentina.¹¹ Aunque también pertenecen al genotipo 3, las secuencias encontradas en Argentina forman un grupo distinto al que vincula

la variante encontrada en un caso esporádico agudo en Estados Unidos²³ con la cepa de cerdo encontrada en ese país.²⁴ Si bien el tamaño del fragmento permite asignar el genotipo y observar grupos monofiléticos entre variantes relacionadas,^{25,26} creemos que es pequeño y se disponen de muy pocas secuencias de HEV en Argentina, identificadas en humanos o en cerdos, para inferir otras conclusiones.

Estos resultados indican la necesidad de mejorar y profundizar el interrogatorio epidemiológico considerando la zoonosis como una posible fuente de adquisición. La infección a partir de alimentos fue el factor de riesgo identificado en el 78% de un grupo con hepatitis aguda por HEV estudiado en Japón,²⁷ donde la ingestión de carne o vísceras crudas o poco cocidas de cerdo, jabalí o ciervo han demostrado ser la fuente de infección.²⁸⁻³¹ En otros casos se ha sospechado la adquisición por la ingestión de mariscos,³² por contacto con cerdos,^{33,34} animales salvajes³⁵ o domésticos.³⁶

En Argentina no se dispone de equipos comerciales de detección de anti-HEV IgM. Sin embargo, se ha demostrado que en zonas no endémicas el anti-HEV IgM sería detectable en el 50% de los casos³⁷ y en zonas endémicas en el 79%.³⁸

La ausencia de anticuerpos anti-HEV IgG podría deberse a distintas causas. En zonas endémicas se ha demostrado que los niños montan una respuesta anti-HEV IgG mucho más débil que los adultos,^{3,39} pero aún en adultos los anticuerpos anti-HEV IgG también pueden perderse rápidamente luego de la infección aguda, incluso no ser nunca detectables en pacientes sintomáticos o asintomáticos.³⁷⁻⁴⁰

En un estudio multicéntrico realizado en Argentina en 104 pacientes con diagnóstico de hepatitis aguda de etiología no determinada estudiados en hospitales pediátricos y de adultos de la ciudad de Buenos Aires y del Gran Buenos Aires, se observó que los anticuerpos anti-HEV totales eran positivos en el 10,6%. En los casos que se presentaron con FHF, el anti-HEV fue positivo en 3/8 adultos y fue no detectable en los 3 casos pediátricos.⁴¹

Por otro lado, las técnicas disponibles han demostrado limitaciones en la detección de anti-HEV IgG. La comparación de distintas técnicas de detección de anti-HEV demostró un amplio rango de sensibilidad y una pobre concordancia frente al mismo panel de sueros.⁴²

Los equipos comerciales utilizan antígenos deriva-

dos de cepas de países endémicos correspondientes a los genotipos 1 ó 2. Si bien se ha demostrado reacción cruzada, la detección de anti-HEV con antígenos derivados del genotipo 3 podría ser más sensible.⁴³

Creemos que en nuestro país se debe realizar y mejorar el diagnóstico de la hepatitis E, aún con las dificultades que el mismo ofrece.

Si bien la detección del RNA del HEV es considerada el *gold standard*⁴⁴ permitiendo hacer el diagnóstico de esta infección con marcadores serológicos negativos,^{37,38,40} no es una herramienta que pueda utilizarse de rutina en el diagnóstico diferencial de presentaciones agudas en Argentina. Su detección también tiene limitaciones debido a la duración de la viremia, la baja excreción fecal y la labilidad del genoma.^{3,45} Los marcadores serológicos también presentan limitaciones, pero existen técnicas comerciales cuya utilidad no ha sido probada en Argentina. Se está estudiando una vacuna en fase III en países considerados tradicionalmente endémicos,⁶ pero en nuestro país aún desconocemos el verdadero impacto de esta infección y el rol de los cerdos u otros animales como potenciales reservorios en la transmisión del HEV.

Agradecimientos:

Se agradece al Dr Jorge F Quarleri la revisión crítica de este manuscrito, sus comentarios y sugerencias, y al Dr R Purcell (NIH de Estados Unidos) por el envío de controles positivos para la detección del RNA del HEV.

Referencias

- Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 2006;16:5-36.
- Emerson SU, Anderson D, Arankalle A, Meng XJ, Purdy M, Schlauder GG and Tsarev SA. Hepatitis E. In: *Virus Taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/ Academic Press, UK;2005:851-855.
- Aggarwal R, Krawczynski K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:9-20.
- Schlauder, G.G. & Mushahwar I. K. Genetic Heterogeneity of Hepatitis E Virus. *J Med Virol* 2001;65: 282-292.
- Poddar U, Thapa BR, Prasad A, Sharma AK, Singh K. Natural history and risk factors in fulminant hepatic failure. *Arch Dis Child* 2002;87:54-56.
- Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 2003;13:145-154.
- Suzuki K, Aikawa T, Okamoto H. Fulminant hepatitis E in Japan. *N Engl J Med* 2002;347:1456.
- Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, Takahashi K, Mishiro S. A case report: two patients with fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan. *Hepatol Res* 2003;25:213-218.
- Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Miyakawa H, Miyakawa Y, Maekubo H, Mishiro S. Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan. *Intervirology* 2003;46:308-318.
- Ijaz S, Arnold E, Banks M, Bendall RP, Cramp ME, Cunningham R, Dalton HR, Harrison TJ, Hill SF, Macfarlane L, Meigh RE, Shafi S, Sheppard MJ, Smithson J, Wilson MP, Teo CG. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis* 2005;192:1166-1172.
- Schlauder GG, Frider B, Sookoian S, Castano GC, Mushahwar IK. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J Infect Dis* 2000;182:294-297.
- Munné M, Vladimirov S, Otegui L, Brajterman L, Castro R, Soto S, Guarnera E, Molina V, Monfellano MG, Schlauder J, González. Caracterización de una nueva cepa de Virus de hepatitis E de cerdo en Argentina estrechamente relacionada a variantes humanas. [Abstract]. *Gastroenterología y Hepatología* 2004;27 (Suppl 2):9.
- 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.
- Cuarterolo M, Ciocca M, López S, Cervio G, Rojas L, Bianco G, Speranza A, Sasbón J, De Dávila MT, Questa H, Lipsich J, Bes D, Fernandez C, Dip M, Ayarzabal 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.
- Rey JA, Findor JA, Daruich JR, Velasco CC, IgartuaEB, Schmee E, & Kohan AI. Prevalence of IgG anti-HEV in Buenos Aires, a nonendemic area for hepatitis E. *J Travel Med* 1997;4:100-101.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
- Kwok, S. & Higuchi, R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-238.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876-4882.
- Page, R. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996;12:357-358.
- Fainboim H, González J, Fassio E, Martínez A, Otegui L, Eposito M, Cahn P, Marino R, Landeira G, Suaya G, Gancedo E, Castro R, Brajterman L, Laplume H. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat* 1999;6:53-57.

21. Munné M, Vladimirov S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, Guarnera E, Molina V, Monfellano M, Schlauder G, González J. "Swine HEV in Argentina". [Abstract]. 11th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. Australia, 2003;157 WD1-04.
22. Vilar JH, Tejada R, Lanari Zubiaur F, Cerdan J. Hepatitis agudas de etiología no determinada y su relación con anti-HEV. [Abstract]. Archivos Argentinos de Enfermedades del Aparato Digestivo 1996;10:58.
23. Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, Kwo P W, Knigge, MF, Smalley DL, Desai SM, & Mushahwar, I K. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolate from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 1998;79:447-456.
24. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9860-9865.
25. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martin M, Bofill-Mas S, Girones R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 2003;9:448-454.
26. Buti M, Clemente-Casares P, Jardi R, Formiga-Cruz M, Schaper M, Valdes A, Rodríguez-Frias F, Esteban R, Girones R. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol* 2004;41:126-131.
27. Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* 2005;76:341-349.
28. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 2003;84:2351-2357.
29. Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 2003;188:944.
30. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362:371-373.
31. Tamada Y, Yano K, Yatsuhashi H, Inoue O, Mawatari F, Ishibashi H. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 2004;40:869-870.
32. Koizumi Y, Isoda N, Sato Y, Iwaki T, Ono K, Ido K, Sugano K, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis e virus while traveling in Vietnam. *J Clin Microbiol* 2004;42:3883-3885.
33. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A, Culver D, Iarovoi P, Robertson BH, Margolis HS. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 2001;184:1594-1597.
34. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, Emerson SU, Purcell RH. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 2002;40:117-122.
35. Karetnyi YV, Gilchrist MJ, Naides SJ. Hepatitis E virus infection prevalence among selected populations in Iowa. *J Clin Virol* 1999;14:51-55.
36. Kuno A, Ido K, Isoda N, Satoh Y, Ono K, Satoh S, Inamori H, Sugano K, Kanai N, Nishizawa T, Okamoto H. Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatol Res* 2003;26:237-242.
37. Lin CC, Wu JC, Chang TT, Chang WY, Yu ML, Tam AW, Wang SC, Huang YH, Chang FY, Lee SD. Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J Clin Microbiol* 2000;38:3915-3918.
38. Clayson ET, Myint KS, Snitbhan R, Vaughn DW, Innis BL, Chan L, Cheung P, Shrestha MP. Viremia, fecal shedding, IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis* 1995;172:927-933.
39. Mathur P, Arora NK, Panda SK, Kapoor SK, Jaikhani BL, Irshad M. Sero-epidemiology of hepatitis E virus (HEV) in urban and rural children of North India. *Indian Pediatr* 2001;38:461-475.
40. Mansuy JM, Peron JM, Bureau C, Alric L, Vinel JP, Izopet J. Immunologically silent autochthonous acute hepatitis E virus infection in France. *J Clin Microbiol* 2004;42:912-913.
41. González J, Alonso A, Fainboim H, Ramonet M, Ciocca M, Schroder T, Velazco C, Mendéz N, Marchesini N, Carchio E, Esposto M. Hepatitis E and acute hepatitis in Argentina. [Abstract]. *Hepatology* 1994;19:681 A121.
42. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 1998;27:857-861.
43. Olsen B, Axelsson-Olsson D, Thelin A, Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis* 2006;38:55-58.
44. Anderson D, Ming G. Current status of HEV diagnosis and newer developments. [Abstract]. Symposium of Hepatitis E Virus. Epidemiology, Virology and Control of an Emerging Pathogen. India, 2005:23.
45. Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 2005;192:930-933.