



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

***“Circulación del virus de la Hepatitis E  
(HEV) en Salta:  
Detección ambiental y prevalencia  
serológica en humanos”***

**Tesinista:** LUGO, Belén Catalina

Firma: .....

**Directora:** PISANO, María Belén

Firma: .....

Instituto de Virología "J. M. Vanella"  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de Córdoba  
2017

***Circulación del virus de la Hepatitis E (HEV) en Salta:  
Detección ambiental y prevalencia serológica en  
humanos.***

**TRIBUNAL EXAMINADOR**

- **Dra. PARAJE, María Gabriela**

Firma: .....

- **Dra. RIVAROLA, María Angélica**

Firma: .....

- **Dra. VERA, Noelia Soledad**

Firma: .....

**Calificación: .....**

**Fecha: .....**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora Dra. María Belén Pisano y co-directora, sin papeles, Dra. Viviana Ré por formarme, guiarme y ayudarme a superar cada obstáculo, por su apoyo constante y paciencia.

Al Instituto de Virología "J. M. Vanella" y al laboratorio de Hepatitis virales y Arbovirus, incluyendo a todos los profesionales que trabajan allí por abrirme las puertas y siempre hacerme sentir cómoda y una más del equipo.

A mis amigos, por compartir mi pasión y haber transitado conmigo cada paso, en la carrera y fuera de ella, en una ciudad que no era la mía pero que hoy siento mi hogar.

A mi gran familia, por ser mi apoyo, mi fuerza para nunca bajar los brazos y ser la felicidad que me mantiene siempre en pie.

A mi compañero de vida, por haber estado ahí desde el principio, soportándome, apoyándome en cada momento y ayudándome a siempre mirar para adelante.

A ellas, mis hermanas, por ser ese apoyo incondicional, por entenderme y ayudarme, porque sin ustedes mi vida no sería la misma y nunca hubiera llegado donde estoy hoy.

Sobre todo, a mis papás, los grandes pilares de mí vida, porque siempre confiaron en mí, incluso cuando yo misma no lo hacía y nunca dejaron que me diera por vencida. Porque me enseñan cada día que con esfuerzo y dedicación todo es posible.

## INDICE GENERAL

Agradecimientos	i
Índice general	ii
Índice de abreviaturas	iv
Resumen	v
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
a. Clasificación taxonómica	3
b. Estructura viral y organización genómica	4
c. Replicación viral	6
d. Clasificación genotípica	8
e. Epidemiología	10
f. Manifestaciones clínicas	13
g. Curso natural de la infección	15
h. Diagnóstico y detección	16
i. Vigilancia ambiental	17
j. Prevención	18
<b>2. Justificación del estudio</b>	<b>19</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>20</b>
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>21</b>
a. Vigilancia ambiental	
i. Área de estudio y sitios de muestreo	21
ii. Muestras ambientales	23
iii. Concentración de virus a partir de	

muestras de aguas	23
iv. Extracción de ARN viral	24
v. Transcripción reversa	24
vi. Detección de HEV por PCR	24
vii. Extracción y purificación de ADN	
producto de PCR II	25
viii. Análisis de las secuencias y	
genotipificación	26
b. Prevalencia Serológica	
i.Muestras de suero	26
ii.Detección de IgM e IgG-anti HEV	27
iii.Análisis estadístico	27
iv.Declaración de Ética	28
5. Resultados	29
a. Vigilancia ambiental	29
b. Prevalencia serológica	31
6. Discusión	32
7. Conclusión	38
8. Anexos	39
9. Bibliografía	41

## Índice de abreviaturas

➤ Ácido desoxirribonucleico	ADN
➤ Ácido desoxirribonucleico complementario	ADNc
➤ Ácido ribonucleico	ARN
➤ Alanina aminotransferasa	ALT
➤ Desoxinucleótidos trifosfato	dNTP
➤ ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas*
➤ Inmunoglobulina G	Ig G
➤ Inmunoglobulina M	Ig M
➤ Marcos abiertos de lectura	ORFs*
➤ Microlitros	μL
➤ Pares de bases	pb
➤ Proteoglicanos de sulfato Heparina	HSPG, HSC70
➤ Reacción en cadena de la polimerasa	PCR*
➤ Reacción en cadena de la polimerasa anidada	nested-PCR*
➤ Transcripción inversa	RT*
➤ Virus de la hepatitis A	HAV*
➤ Virus de la hepatitis E	HEV*
➤ Virus de la inmunodeficiencia humana	HIV*

\*Según sus siglas en inglés

## RESUMEN

El virus de la hepatitis E (HEV, por sus siglas en inglés) es un agente emergente causante de hepatitis aguda en todo el mundo, zoonótico de transmisión entérica, y la contaminación de matrices acuosas es una posible fuente de infección. En Argentina, se realizaron escasos estudios de detección de HEV en humanos y cerdos en varios puntos del país, habiéndose estudiado y detectado en matrices acuosas sólo en Córdoba. En la provincia de Salta se registraron 2 casos agudos de hepatitis por este virus. Sin embargo, su detección no está incluida en el diagnóstico habitual, por lo que aún se desconocen sus implicancias en la producción de hepatitis y su impacto en la salud en esa región.

El objetivo de este trabajo fue conocer la circulación actual de HEV en el norte de Argentina, particularmente en la ciudad de Salta capital. Para ello, se realizó detección molecular de este virus en muestras de agua del río Arias-Arenales en su recorrido por la ciudad de Salta mediante RT-Nested-PCR (de un fragmento de la región ORF-2 del HEV) durante dos periodos 2009-2010 y 2013-2014; y detección serológica en población general mediante ELISA (determinación de IgG e IgM anti-HEV) durante los años 2015-2016.

El 1,6% (3/189) de las muestras ambientales resultó positivo para la detección de ARN viral. Estas muestras fueron secuenciadas, y los análisis filogenéticos revelaron que pertenecían a HEV genotipo 3, agrupando dentro del clado abchij, subtipo 3c/3i, junto con cepas de Córdoba previamente detectadas en el ambiente. La prevalencia general de IgG anti-HEV fue del 9,1% (13/143). Cuatro muestras fueron positivas para la detección específica de IgM, lo que indicaría infecciones recientes en la región.

Los resultados obtenidos demostraron la circulación del HEV en la ciudad de Salta, Argentina, mostrando por primera vez presencia del material genético viral en muestras ambientales de un importante río de esta ciudad e infecciones en población general. Estos hallazgos destacan la necesidad de prestar especial atención a este virus e incorporar su detección en la rutina del diagnóstico de hepatitis virales en la región.

**Palabras clave:** HEV, muestra ambiental, seroprevalencia, Salta, epidemiología molecular.

## 1. INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis E (HEV), es un importante patógeno de distribución mundial causante de hepatitis de transmisión entérica (Khuroo & Kamili, 2003; Meng, 2011), que infecta tanto al hombre como a animales (primates no-humanos, roedores, aves, bovinos, y principalmente cerdos). El HEV replica en el tracto gastrointestinal del hospedador y es excretado en altas concentraciones en las heces. Ha causado grandes brotes epidémicos en regiones con condiciones higiénico-sanitarias deficientes, principalmente en Asia, siendo la quinta forma de hepatitis viral humana y una de las causas más comunes de hepatitis aguda e ictericia en el mundo (Purcell & Emerson, 2008; Kamar et al., 2012).

El HEV fue descubierto en 1983 por los investigadores de un brote de hepatitis no explicada en los soldados soviéticos en Afganistán (Balayan et al., 1983), después de que un miembro del equipo de investigación ingiriera un extracto fecal del personal militar afectado, desarrollara hepatitis aguda, y pequeñas partículas virales fueran detectadas en sus heces por inmunoelectro microscopía. Posteriormente, el genoma viral fue clonado y secuenciado utilizando muestras de bilis obtenidas de monos infectados experimentalmente (Reyes et al., 1990; Tam et al., 1991). También se desarrolló un inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos contra HEV (Yarborough et al., 1991).

Los análisis filogenéticos de muchas cepas de HEV basadas en genomas virales completos y una gama de regiones subgenómicas del virus llevaron al reconocimiento de 7 genotipos, de los cuales 1, 2 3, 4 y 7 infectan a humanos (Smith et al., 2016); aunque todos pertenecen a un único serotipo (Hoofnagle et al., 2012).

Altas tasas de anticuerpos positivos fueron observadas en muchas especies en mamíferos, particularmente en cerdos (Kamar et al., 2014). La primera cepa animal de HEV, fue identificada y caracterizada en 1997, a partir de cerdos en los Estados Unidos y se clasificó como HEV-3 (Meng et al., 1997). Poco después, se notificaron casos de hepatitis aguda por el HEV-3 en humanos en el mismo país (Schlauder et al., 1998), en Europa (Dalton et al., 2008; Borgen et al., 2008; Wichmann et al., 2008; Colson et al., 2010), en Nueva Zelanda y Australia (Kamar et al., 2012). Posteriormente fue identificada



una cepa de cerdo diferente en Japón (Masuda et al., 2005; Sainokami et al., 2004) y en China (Zhang et al., 2011), que fue reconocida como HEV-4.

HEV es probablemente la causa más común de hepatitis viral aguda en el mundo (Purcell & Emerson, 2008; Hoofnagle et al., 2012; Kamar et al., 2012); también se han descrito infecciones por este virus que incluyen casos de falla hepática aguda, cirrosis y enfermedades hepáticas en estados terminales (Perón et al., 2007; Kamar et al., 2008; Kamar et al., 2011), además de infecciones crónicas que conducen a hepatitis crónica y cirrosis en pacientes inmunocomprometidos infectados con HEV-3 (Kamar et al., 2008).

### a. Clasificación taxonómica

El HEV, actualmente nombrado *Orthohepevirus A*, pertenece al género *Orthohepevirus*, dentro de la familia *Hepeviridae*. Este género incluye, además, las especies *Orthohepevirus B*, que infecta aves; *Orthohepevirus C*, que infecta roedores, soricomorfos y carnívoros; y *Orthohepevirus D*, que infecta murciélagos.

De acuerdo a su variabilidad genética, *Orthohepevirus A*, o HEV, comprende 7 genotipos, nombrados con números del 1 al 7: HEV-1 y HEV-2 se limitan a los seres humanos, mientras que HEV-3, HEV-4 y HEV-7 se encuentran en humanos y una amplia gama de especies animales: HEV-3 en cerdos, jabalíes, ciervos, mangostas, macacos japoneses y conejos; HEV-4 en cerdos, jabalíes y ovejas; HEV-7 en camellos. Por otra parte, HEV-5 y HEV-6 únicamente fueron hallados en jabalíes (Smith et al., 2014; Lee et al., 2015; Debing et al., 2016). A pesar de la existencia de estos genotipos, el HEV presenta un único serotipo (Hoofnagle et al., 2012).

## b. Estructura viral y organización genómica

El HEV es un virus pequeño, no envuelto, de cápside icosaédrica de aproximadamente 32 a 35 nm de diámetro (Bradley et al., 1987) (Figura 1). Su genoma está formado por una hebra simple de ARN con polaridad positiva de una longitud de aproximadamente 7,2 Kb (Reyes et al., 1990), que contiene tres marcos abiertos de lectura (ORFs, de sus siglas en inglés: ORF 1, ORF 2 y ORF 3) parcialmente superpuestos, flanqueados por dos regiones no codificantes 5' y 3' (Tam et al., 1991) (Figura 2).

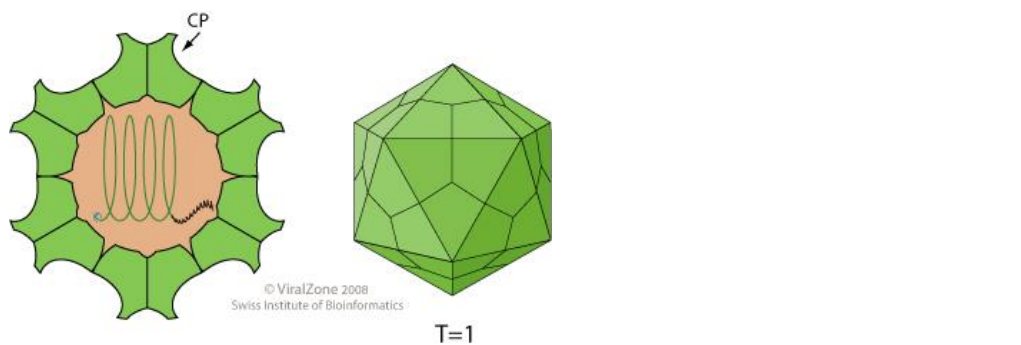


Figura 1. Estructura del HEV (Tomado de SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2008-2017).

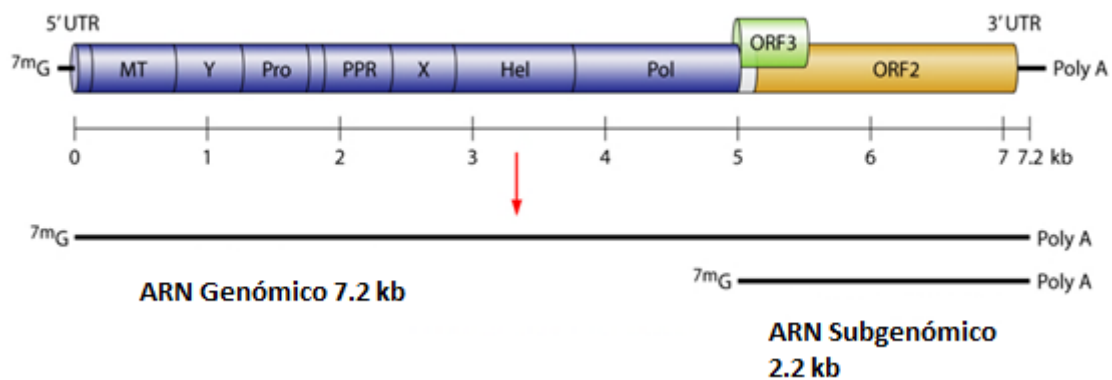


Figura 2. Estructura del genoma ARN del HEV (Adaptado de Kamar et al., 2014). ORF1 marcado en azul, ORF2 en amarillo y ORF3 en verde.

MT: metiltransferasa; Pro: proteasa; Hel: helicasa; Pol: ARN polimerasa; PPR: Región hipervariable; X e Y: regiones de función desconocida.

ORF1 codifica una proteína de 1693 aminoácidos que contiene dominios funcionales presentes en las proteínas no estructurales de otros virus con genoma de ARN de cadena positiva (Koonin et al., 1992). Esos dominios estructurales incluyen una metiltransferasa, una proteasa, una ARN helicasa, una polimerasa dependiente de ARN (Kamar et al., 2014), y una región hipervariable, no codificante, que muestra una diversidad genética sustancial y modula la eficiencia de la replicación del HEV (Pudupakam et al., 2011). Cabe destacar que las diferencias en el tamaño del genoma entre diferentes cepas de HEV se limitan principalmente a esta región (Mirazo et al., 2014).

ORF 2 codifica la proteína de la cápside viral, de 660 aminoácidos, que es responsable del montaje del virión (Yamakawa et al., 1997), la interacción con las células diana (He et al., 2008; Kalia et al., 2009) y la inmunogenicidad (Xing et al., 2011). La proteína codificada por el ORF 2 está constituida por los siguientes dominios: el dominio (S) (aminoácidos 129 a 319), el dominio medio (M) (aminoácidos 320 a 455) y el dominio sobresaliente (P) (aminoácidos 456 a 606) (Meng et al., 2001; Guu et al., 2009; Yamashita et al., 2009; Xing et al., 2010; Tang et al., 2011).

El ORF 3 se superpone parcialmente al ORF 2, codifica una pequeña proteína de 113-114 aminoácidos que está involucrada en la morfogénesis y liberación del virión (Graff et al., 2006; Yamada et al., 2009; Emerson et al., 2010).

### c. Replicación viral

El ciclo de replicación del HEV no es bien conocido debido a la dificultad de la propagación de cultivos celulares. No obstante, se han producido infecciones y replications exitosas en algunas pocas líneas celulares, lo que permitió describir el ciclo de replicación del virus propuesto por varios autores (Chandra et al., 2008; Meng, 2010, y Holla et al., 2013) (Figura 3), como se detalla a continuación:

- a. Las partículas vírales se concentran en la superficie de las células diana a través de proteoglicanos de sulfato heparina (HSPG, HSC70) que actúan como factores de unión.
- b. El HEV se ancla a otro receptor viral, aún desconocido, y entra en la célula mediante endocitosis. En este punto el virión libera la cadena de ARN viral en el citoplasma.
- c. En el citoplasma se produce la traducción del ARN de ORF1 que da lugar a una poliproteína no estructural.
- d. La ARN polimerasa dependiente de ARN sintetiza un intermediario de sentido negativo a partir de la cadena de ARN de sentido positivo.
- e. Este intermediario actúa como molde para la síntesis de copias de ARN viral con sentido positivo, es decir que, por un lado, actúan como plantillas para la síntesis de un ARN subgenómico de 2,2 kb y por otro lado transcribe el genoma de sentido positivo de longitud completa.
- f. El ARN subgenómico de sentido positivo se traduce en las proteínas ORF2 y ORF3 en el citoplasma.
- g. La proteína ORF2 atraviesa el retículo endoplásmico y envasa el ARN genómico para ensamblar nuevos viriones.
- h. Los viriones recién formados son transportados a la membrana celular. La proteína ORF3 también está asociada con endomembranas y puede ayudar en la salida viral.
- i. Las nuevas partículas virales son liberadas y abandonan la célula.

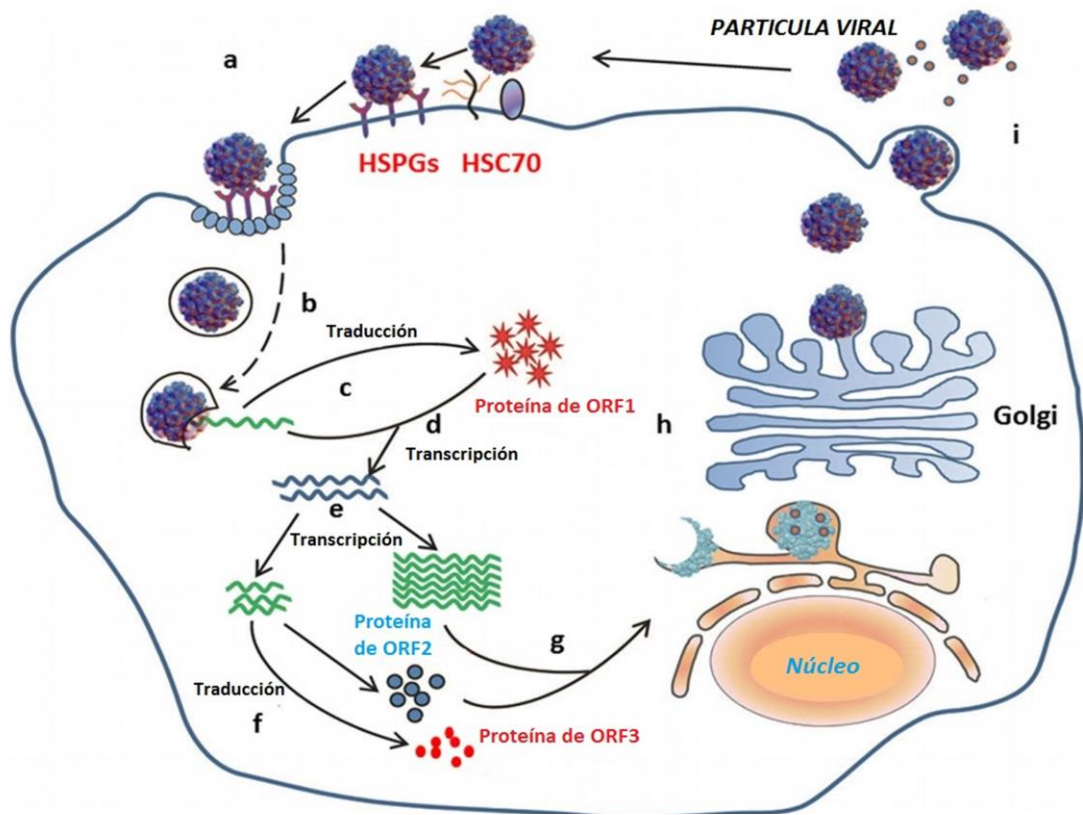


Figura 3. Replicación de HEV (Adaptado de Pérez-Gracia et al., 2014).

#### d. Clasificación genotípica

El HEV está clasificado en 7 genotipos distintos de acuerdo a su variabilidad genética (Figura 4), habiéndose establecido como límite una diferencia en la secuencia aminoacídica de las proteínas codificadas en ORF1 y ORF2 concatenadas de al menos el 8,8% (Smith et al. 2014).

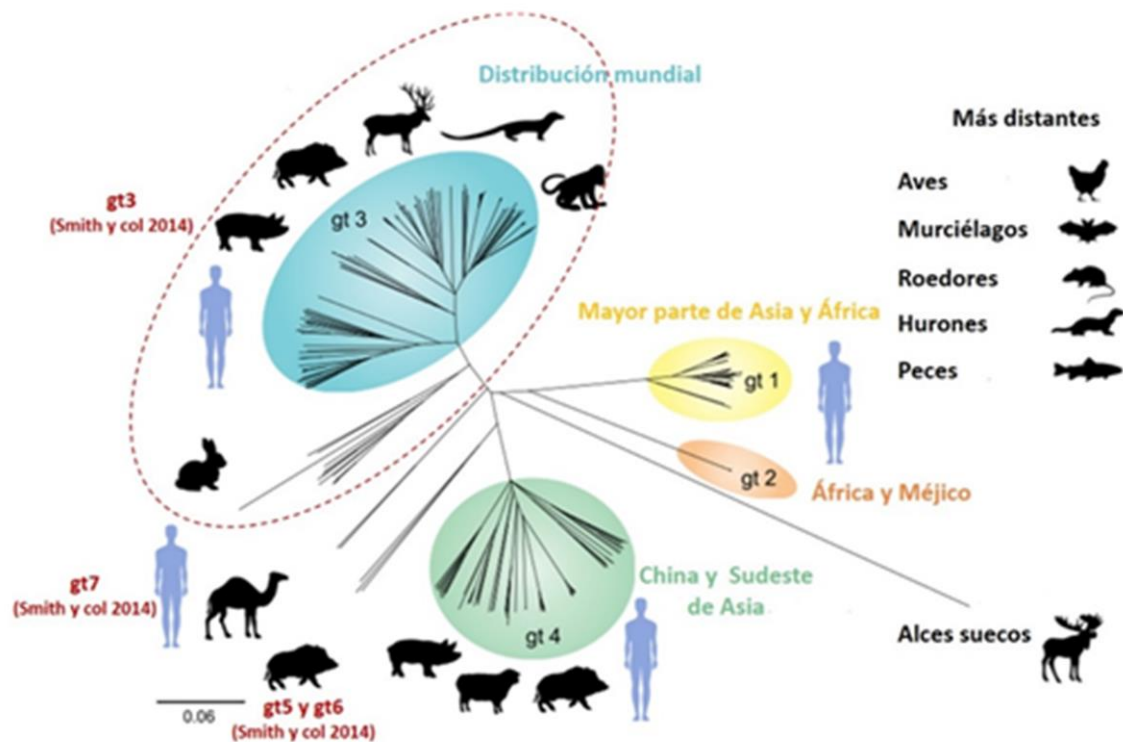


Figura 4. Clasificación Genotípica de HEV (Tomado de Martínez Wassaf, 2017).

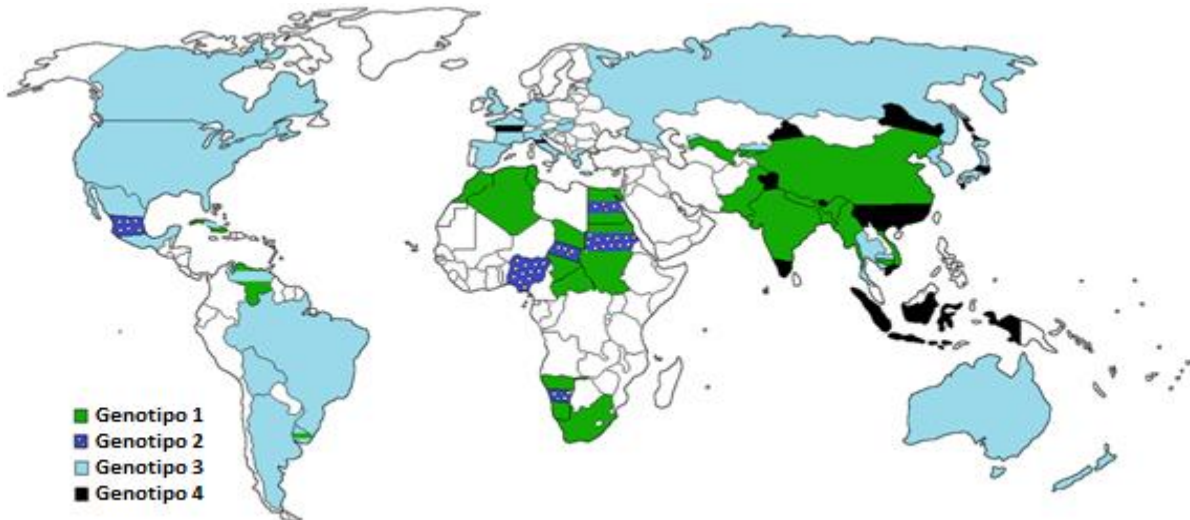
Dentro de algunos genotipos, se describieron varios subtipos (Lu et al., 2006), aunque no existe ningún criterio consensuado para la asignación de los mismos. Así, la distancia nucleotídica existente entre los subtipos de HEV-1 es al menos de 0,12, mientras que para HEV-3 es de entre 0,12 y 0,26. Esta ausencia de criterio (debido a la gran variabilidad genética viral), sumado a inconsistencias en este agrupamiento, algunas cepas han sido clasificadas dentro de un subtipo al secuenciar una región genómica, y dentro de otro al analizar otro fragmento genómico (Smith et al., 2016); y a la falta de secuencias patrón (de referencia) para cada subtipo, han llevado a replantear esta forma de clasificación.

Luego de un extenso análisis incluyendo genomas completos y secuencias parciales, Smith et al. (2016) propuso secuencias de referencia para cada genotipo y subtipo, las cuales han comenzado a ser usadas por algunos grupos de investigación, entre ellos el nuestro. Para HEV-1 y HEV-3 se planteó la clasificación en clados. Dentro de HEV-1 los subtipos 1a, 1b, 1c y 1f forman un clado (1abcf), y los subtipos 1d y 1e forma otro (1de). Dentro de HEV-3, los subtipos 3a, 3b, 3c, 3h, 3i y 3j forman un clado (3abchij) y los subtipos 3e, 3f y 3g forman otro (3efg). Las secuencias de HEV-2 fueron insuficientes para el análisis, y el HEV-4 presenta múltiples niveles de ramificaciones, pero sin presentar grupos claros de nivel superior por lo que se adoptan las designaciones anteriores, de Lu et al., (2006). Para HEV-5, HEV-6 y HEV-7 muy pocas secuencias completas del genoma están actualmente disponibles para cada uno de estos genotipos, por lo que no se ha hecho ninguna asignación de subtipo, excepto para nombrar la primera secuencia de cada genotipo como subtipo “a” (Smith et al., 2016).



### e. Epidemiología

HEV ha sido detectado en casi todas las poblaciones del mundo, pero los genotipos encontrados varían dependiendo de la región (Mirazo et al., 2014) (Figura 5).



**Figura 5. Distribución geográfica de los genotipos de HEV** (Mirazo et al., 2014). HEV-1 y HEV-2 consisten en cepas epidémicas reportadas en Asia, varios países de América Latina, África y México, respectivamente; HEV-3 y HEV-4 comprenden cepas zoonóticas y se han aislado de casos esporádicos de infección viral aguda por HEV y de varios reservorios animales, particularmente cerdos domésticos y salvajes y ciervos; El HEV-3 se distribuye en todo el mundo en seres humanos y cerdos, mientras que HEV-4 se informó en Asia oriental y Europa central.

Se han observado 2 patrones epidemiológicos en las infecciones por este virus de acuerdo al genotipo (Purcell & Emerson, 2008; Teshale et al., 2010; Hoofnagle et al., 2012; Kamar et al., 2012; Pérez-gracia et al., 2014). En áreas de alta endemicidad y generalmente en países en desarrollo, con un saneamiento deficiente, como Asia o África, la infección es causada principalmente por HEV-1 y HEV-2, los cuales son transmitidos por la ruta fecal-oral, a través de aguas contaminadas con el virus, principalmente a través del consumo de agua contaminada con materia fecal. Esta ruta está asociada con inundaciones y lluvias torrenciales que mezclan el agua de consumo con las residuales humanas y de otras especies animales (Pérez-gracia et al., 2014). Esto resulta en casos esporádicos frecuentes y grandes brotes ocasionales (Kamar et al., 2014).

El segundo patrón, observado a nivel global, está dado por casos esporádicos de infección viral que han sido cada vez más reportados en los últimos años debido a la

mejora de las herramientas de diagnóstico y estrategias de detección (Kamar et al., 2014). La infección es transmitida por virus zoonóticos correspondientes a HEV-3 y HEV-4, en la que se considera al cerdo como un reservorio viral (Hoofnagle et al., 2012), ocurriendo la infección por contacto directo con animales infectados o debido a la ingesta de carne cruda o mal cocida de animales (o productos derivados) que contienen el virus (cerdos, jabalíes, ciervos) (Meng, 2011; Hoofnagle et al., 2012). Sin embargo, en muchos casos de infección por estos genotipos el origen de la misma permanece incierto (Kamar et al., 2012). En este contexto, la infección también puede estar relacionada con el nivel de inmunidad de la población, las condiciones sanitarias, las condiciones de vida y otros factores (Teshale et al., 2010). Investigaciones recientes refuerzan la noción de la existencia de tres vías adicionales de transmisión HEV: transmisión parenteral (Colson et al., 2007), transmisión de humano a humano (Mansuy et al., 2009) y vertical de madre a hijo (transmisión perinatal) (Khuroo et al., 2009), aunque se piensa que estas vías de transmisión son menos frecuentes (Mirazo et al., 2014).

Se han observado diferencias en las prevalencias de acuerdo al patrón epidemiológico: en los países endémicos, HEV es el responsable del 25% de todos los casos de hepatitis aguda no A, no B (Teo et al., 2010), mientras que la prevalencia de inmunoglobulina G (IgG) anti-HEV en individuos adultos oscila entre el 30% y el 40% (Hoofnagle et al., 2012, Mirazo et al., 2014). La gran mayoría de los pacientes sintomáticos de estas áreas son adultos jóvenes, de hasta 40 años. La razón de ello sigue siendo poco clara, aunque puede estar relacionada con una exposición importante al agua contaminada (Pérez-gracia et al., 2014). Además, en esta área el HEV-1 es capaz de producir hepatitis fulminante en mujeres embarazadas (Kamar et al., 2012).

Por otro lado, los países industrializados y no endémicos muestran prevalencias menores, aunque muy variables de un estudio a otro, cuyos valores generalmente no superan el 30%. (Mushahwar, 2008; Hoofnagle et al., 2012; Fearon et al., 2017). En estas áreas la enfermedad es mucho más frecuente en personas de mediana edad y ancianos (individuos de más de 65 años), y los pacientes son en su mayoría varones. No se sabe aún por qué la infección sintomática es más común en esta población, pero puede estar relacionada con la vía de transmisión (Pérez-gracia et al., 2014).

En América, existe evidencia serológica de infección por HEV desde 1994, reportada por primera vez en Venezuela (Pujol et al., 1994), hallándose la mayoría de las tasas en un rango de entre 1% a 10%, no habiéndose detectado diferencias evidentes en las prevalencias de anti-HEV entre diferentes regiones geográficas (Echevarría et al., 2013).

En Argentina se han descripto prevalencias de entre 0,15% y 35,7%, dependiendo de la población estudiada y el kit utilizado (Rey et al., 1997; Fainboim et al., 1999; Munné et al., 2014; Martínez Wassaf et al., 2014). Además, se han reportado casos agudos esporádicos por HEV-3 en varios puntos del país, entre ellos 2 casos de hepatitis aguda en la provincia de Salta (Munné et al., 2011, 2014). Sin embargo, no se conocen datos de seroprevalencia en la población general para esta región, dato que arrojaría información actualizada acerca de la circulación de HEV en esta zona de nuestro territorio.

## f. Manifestaciones clínicas

En la mayoría de los pacientes, el HEV causa una infección autolimitada que dura unas pocas semanas, con un periodo de incubación de 2 a 6 semanas. Durante el curso sintomático se presentan síntomas de hepatitis aguda, que incluyen náuseas, dolor abdominal, vómitos, anorexia, ictericia y hepatomegalia, aunque existe una alta tasa de casos asintomáticos (Kamar et al., 2012). El desarrollo de la enfermedad clínica depende de numerosos factores incluyendo el estado inmunitario y la edad del huésped, el tipo, la cepa y la virulencia del microorganismo, y la vía de infección (Haas et al., 1993).

Se han reportado casos de hepatitis fulminante en mujeres embarazadas asociados al HEV-1 (Kamar et al., 2012). En el embarazo, el número de casos de enfermedad severa y la mortalidad es muy alta, alrededor del 15-20%, y las complicaciones comunes son el aborto (Aggarwal, 2013), el parto prematuro, la muerte de la madre y el feto, o del bebé después del nacimiento (Hussaini et al., 1997; Navaneethan et al., 2008).

En determinados casos la infección por HEV puede progresar en una infección crónica, definida por persistencia de ARN viral en suero o heces durante más de 6 meses, muchas veces en asociación con niveles aumentados de enzimas hepáticas (Pérez-gracia et al., 2014). El genotipo implicado en la infección crónica por HEV es HEV-3 (Kamar et al., 2012; Murali et al., 2015), ocurriendo los casos principalmente en pacientes inmunocomprometidos (pacientes con trasplantes de órganos sólidos, linfoma, virus de la inmunodeficiencia humana, pacientes hematológicos, inmunodeficiencias primarias y aquellos bajo tratamiento con corticosteroides e inmunosupresores) (Hoerning et al., 2012). Las características clínicas de la hepatitis en los pacientes crónicos suelen ser indetectables. La detección de inmunoglobulinas G e inmunoglobulinas M (IgG e IgM) anti-HEV en la sangre puede dar resultados negativos debido a la inmunosupresión y sólo la detección de ARN del HEV confirma el diagnóstico de hepatitis E crónica. Esta incapacidad para eliminar el HEV después de una infección aguda se asocia con el grado de inmunosupresión, el recuento de leucocitos y el recuento de células T, características que pueden considerarse un factor de riesgo para la progresión a la cronicidad (Dalton et al., 2009; Mateos-Lindemann et al., 2012; Mateos-Lindemann et al., 2014).

En pacientes con enfermedad hepática pre-existente las manifestaciones clínicas iniciales en una infección por cualquier genotipo son similares a la hepatitis aguda, pero pueden presentarse complicaciones por la descompensación de la enfermedad hepática crónica, la aparición de ascitis y la encefalopatía hepática (Pérez-Gracia et al., 2014).

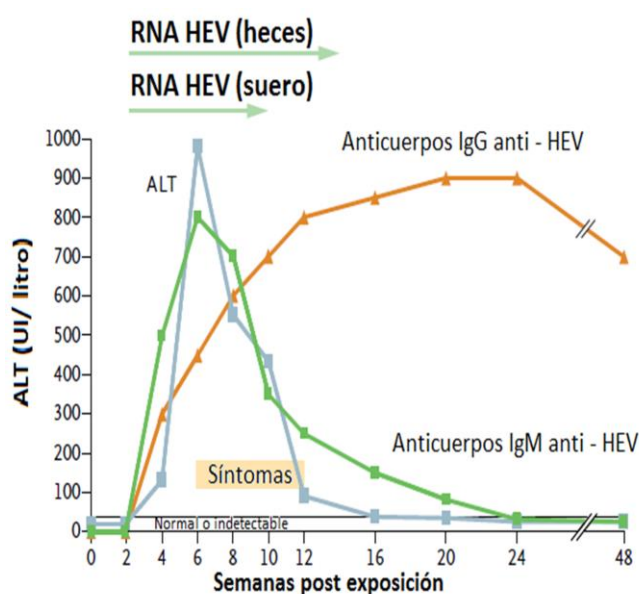
El consumo de alcohol se considera un factor de riesgo importante ya que favorece a los síntomas clínicos y está relacionado con la gravedad de la hepatitis (Dalton et al., 2011). El riesgo de una mala evolución en ausencia de trasplante hepático es muy alto, con una mortalidad cercana al 70% en pacientes infectados con HEV-1 (Kumar Acharya et al., 2007). En los pacientes con cirrosis subyacente, la histología hepática de la hepatitis E generalmente no es específica y puede ser confundida con hepatitis alcohólica (Dalton et al., 2008)

### g. Curso natural de la infección

Al igual que en otras formas de hepatitis viral, la viremia surge durante el período de incubación de la hepatitis E, y los anticuerpos (tanto IgG como IgM) aparecen justo antes de elevaciones de los niveles séricos de aminotransferasa y de la aparición de los síntomas (Kamar et al., 2012) (Figura 6). Los síntomas suelen durar de cuatro a seis semanas, pero pueden permanecer más de 100 días en algunos casos (Blood Advisory Committee, 2012). Los valores de las enzimas hepáticas alcanzan un pico unas seis semanas después de la exposición antes de disminuir hacia niveles normales en la semana 10 (Dalton et al., 2008).

En el curso serológico típico de una infección por HEV, la IgM anti-HEV aparece durante la fase aguda de la infección (Favorov et al., 1992), muestra un aumento inicial y permanece detectable durante 3 a 12 meses hasta disminuir a niveles basales (Purcell & Emerson, 2008; Dalton et al., 2008; Kamar et al., 2012). Los anticuerpos IgG anti-HEV son detectables poco después de la aparición de la IgM anti-HEV y persiste durante años, si no durante toda la vida (Hoofnagle et al., 2012).

La recuperación está marcada por la eliminación viral, un aumento en los títulos de IgG y una disminución en los niveles de IgM. El HEV también está presente en las heces, generalmente durante el período de incubación, durante la infección activa y en la parte inicial del período de recuperación (Hoofnagle et al., 2012).



**Figura 6. Cinética de la infección por HEV**  
(Adaptado de Hoofnagle et al., 2012).

El ARN del HEV se hace detectable en heces y suero durante el período de incubación, con la aparición posterior de los anticuerpos IgM e IgG anti-HEV. El nivel de anticuerpos IgM alcanza un pico temprano y se vuelve indetectable durante la recuperación, mientras que el nivel del anticuerpo IgG continúa aumentando y persiste a largo plazo. Los síntomas clínicos (fatiga, náuseas e ictericia) comienzan poco después de elevaciones en los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT). El ARN viral desaparece del suero con la recuperación, mientras que en las heces persiste por más tiempo.

## **h. Diagnóstico y detección**

Existen tanto métodos directos como indirectos para el diagnóstico y detección de HEV. La infección por HEV suele diagnosticarse mediante la detección de anticuerpos anti-HEV específicos (IgM e IgG) (Hoofnagle et al., 2012). El aumento de los niveles de IgM es indicativo de infección aguda, mientras que los niveles de IgG están relacionados con una exposición previa al HEV (Pérez-gracia et al., 2014).

El rendimiento de los distintos ensayos serológicos disponibles no es óptimo, y se observan valores muy variables dependiendo del ensayo comercial empleado (Bendall et al., 2010; Rossi-Tamisier et al., 2013). En la actualidad, los inmunoensayos comercialmente disponibles para la detección de anticuerpos anti-HEV específicos difieren drásticamente en su sensibilidad y especificidad, lo que puede explicar en parte las discrepancias en la seroprevalencia del HEV observada en diferentes estudios (Slot et al., 2013).

Por otro lado, ensayos que detecten presencia del material genético viral en muestras biológicas tales como heces, suero y biopsia hepática son utilizados para la detección e identificación del HEV (Mirazo et al., 2014). Estos ensayos incluyen: la transcripción inversa seguida de PCR (RT-PCR), RT-PCR en tiempo real, y RT-LAMP (por su sigla en inglés: reverse transcription loop-mediated isothermal amplification), todos ellos diseñados y optimizados para detectar los cuatro genotipos de HEV más prevalentes en humanos (1 al 4) (Huang et al. 2002, Jothikumar et al., 2006; Gyarmati et al., 2007; Lan et al., 2009;).

La detección de ARN viral en muestras biológicas puede identificar con precisión la infección activa y ayudar a confirmar los hallazgos serológicos (Huang et al., 2010). Desafortunadamente, en muchos casos no es posible realizarla debido a que la muestra es tomada en un momento en el que la viremia y/o la excreción viral en materia fecal ya ha ocurrido (Mirazo et al., 2014).

## **i. Vigilancia ambiental**

De forma natural, los ecosistemas acuáticos, contienen cantidades variables de virus que constituyen universalmente su comunidad microbiana (Berg et al., 1989; Maranger & Bird, 1995). Sin embargo, en las zonas cercanas a núcleos poblacionales, adicionalmente el medio acuático recibe aportes de grandes concentraciones de virus excretados por el hombre y animales a través de las heces y la orina de individuos infectados, incluso sin que presenten signos de enfermedad aparentes (Melnick, 1984). Estos pueden sobrevivir durante varios meses en el medio, pueden resistir los procesos de tratamiento convencionales del agua, incluso la cloración con un nivel de supervivencia superior al de las bacterias, constituyendo un riesgo potencial de nuevas infecciones (World Health Organization, 1979).

El agua, por lo tanto, constituye una vía de transmisión de los virus en el medio ambiente de diversas formas, directa o indirectamente, a través de la ingestión de agua contaminada o de vegetales que se han regado con aguas insuficientemente tratadas o que se han cultivado en terrenos abonados con lodos de depuradora que contenían virus infecciosos, o por ingestión de carne cruda o poco cocida, proveniente de animales que hayan crecido en zonas que reciben aporte de aguas residuales o por el contacto con aerosoles generados a partir de aguas contaminadas (Melnick et al., 1978), e incluso pueden ser transmitidos por actividades recreativas en aguas contaminadas (Bosch, 1998, Martínez Wassaf et al. 2014).

El análisis molecular a partir de muestras acuosas ambientales es una herramienta de importancia para determinar la epidemiología de los diferentes virus que circulan en una comunidad determinada, y aporta evidencias de gran ayuda para la vigilancia ambiental (Kokkinos et al., 2011; Prado et al., 2012). En Argentina, se ha reportado detección de varios agentes virales [rotavirus, virus de la hepatitis A (HAV, por su sigla en inglés), norovirus, adenovirus] en muestras ambientales de origen hídrico en Buenos Aires, Córdoba y Salta (Yanes et al., 2014; Barril et al., 2010; Poma et al., 2012). Sin embargo, HEV sólo ha sido reportado en matrices acuosas de Córdoba, en aguas recreacionales (río Suquía y Embalse San Roque) y residuales de esta provincia (Martínez Wassaf et al., 2014; Paván et al., 2016), y aún no ha sido reportado en alimentos en nuestro país.



## j. Prevención

La prevención en áreas endémicas se basa en la implementación de medidas higiénicas y sanitarias adecuadas para evitar la transmisión fecal-oral, como el tratamiento de aguas residuales y la prevención del consumo de alimentos crudos. Esto es especialmente importante en mujeres embarazadas en el tercer trimestre del embarazo, debido al mal pronóstico de la infección en esta población (Pérez-gracia et al., 2014).

Por otra parte, en las regiones no endémicas, donde la transmisión ocurriría principalmente por el consumo de productos contaminados con el virus, las recomendaciones incluyen, además, cocción completa de la carne, principalmente la de cerdo (calentamiento a 71 °C durante al menos 20 minutos) (Barnaud et al., 2012). Con el tratamiento adecuado y buenas condiciones sanitarias e higiénicas, los brotes de hepatitis E son poco probables (Pérez-gracia et al., 2014).

Se han reportado varios casos de transmisión de HEV a través de transfusiones de sangre (Boxall et al., 2006; Matsubayashi et al., 2008, Vollmer et al. 2016), por lo que esta vía también debe ser tomada en cuenta a la hora del diagnóstico y la prevención.

Hasta la fecha, se han desarrollado dos tipos de vacunas recombinantes de HEV. La primera, desarrollada por Reino Unido y EE. UU, fue probada en varones nepalíes (n = 1900) con alta seguridad y niveles de eficacia después de tres dosis. La segunda vacuna se probó en más de 12000 participantes chinos, y demostró una eficacia muy alta, de alrededor del 94% al 100% (intervalo de confianza del 95%). Esta vacuna, conocida como HEV239, fue autorizada en la República Popular de China en diciembre de 2011 y está aprobada para grupos de alto riesgo (Mirazo et al., 2014). Ambas vacunas basaron su desarrollo en el HEV-1. En una de ellas, se observó que también presentaba alta eficacia para HEV-4, demostrando protección cruzada (Hoofnagle et al., 2012). Sin embargo, su eficacia en la prevención de la infección por HEV en áreas no endémicas (donde predominan otros genotipos) es un tema de debate y necesita ser investigado. Los desarrollos futuros, incluidos otros genotipos, en particular el HEV-3, permitirán la prevención de la infección crónica por HEV y podrían considerarse como una medida de inmunoprofilaxis en receptores pre-transplantados (Mirazo et al., 2014).

---

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Si bien la hepatitis E es considerada una enfermedad zoonótica, principalmente en países no endémicos (Meng et al., 2011), existen estudios en los que no se ha logrado dilucidar esta vía de transmisión en determinados casos clínicos, donde la contaminación de matrices acuosas podría constituir el nexo epidemiológico que confirme las fuentes de infección (Van den Berg et al., 2005).

El agua es un recurso indispensable y su uso expone a la población a numerosos agentes microbiológicos, algunos de ellos patógenos, que ingresan a ella a través de diferentes vías, tales como los afluentes industriales, las aguas residuales tratadas y sin tratar, el agua de lluvia y el escurrimiento de estiércol de animales, además de la eliminación de residuos sólidos por parte de las industrias y los hogares (Van den Berg et al., 2005).

En Argentina, se reportó la detección de varios agentes virales en estudios previos (Yanes et al., 2014; Barril et al., 2010; Poma et al., 2012), mostrando una correlación entre virus detectados en aguas y casos clínicos. Sin embargo, HEV sólo ha sido reportado en matrices acuosas de Córdoba (Martínez Wassaf et al., 2014), pero se desconoce la circulación del HEV en el resto del país. La tecnología molecular es una herramienta importante y útil para monitorear y determinar la circulación viral en una población, y puede ser usada para tal fin (Barril et al., 2006; Kokkinos et al., 2011; Prado et al., 2012).

Por otro lado, los ensayos para la detección de IgM e IgG anti-HEV fueron aprobados hace pocos años en Argentina, por lo que los estudios de diagnóstico y seroepidemiológicos de este virus son escasos. La disponibilidad de diagnóstico serológico permitió realizar estudios que permitieron determinar una prevalencia de anticuerpos IgG anti-HEV de 4,4 % y de 9,5% en individuos sanos de Córdoba y Buenos Aires, respectivamente (Martínez Wassaf et al., 2014; Munné et al., 2014). Sin embargo, no se cuenta con información acerca de la prevalencia del virus en otras regiones, incluyendo Salta.

Con este trabajo se pretende aportar resultados que amplíen el conocimiento acerca de HEV en el país, que enriquezcan los escasos datos virológicos existentes en la zona y provean evidencias de su circulación en la población de Salta.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Determinar la circulación del virus de la hepatitis E (HEV) en Salta, Argentina, mediante la detección serológica en humanos y molecular en muestras ambientales.

#### **Objetivos específicos**

1. Detectar ARN de HEV en muestras de agua del Río Arias-Arenales de la provincia de Salta durante dos periodos 2009-2010 y 2013-2014.
2. Identificar el genotipo de las secuencias de HEV detectadas y compararlos con las amplificadas en el resto del país.
3. Detectar la presencia de anticuerpos Ig G e Ig M específicos contra HEV en suero de individuos de la población general de la ciudad de Salta, durante los años 2015- 2016.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### a. Vigilancia ambiental

#### i. Área de estudio y sitios de muestreo

El río Arias-Arenales pertenece a la cuenca Juramento-Salado, en la provincia de Salta, al noroeste de Argentina (Figura 7). Este sistema hídrico drena gran parte del Valle de Lerma y de las serranías que lo conforman. El río Arias nace en la confluencia de los ríos Peñaloza y San Lorenzo, y se dirige con dirección sureste hasta las serranías que limitan el sector este del Valle de Lerma. Se une con el río Arenales y, luego de recibir al río Ancho, continúa hacia el sur con el nombre de río Arias, atravesando la ciudad de Salta en su recorrido, hasta desembocar en el embalse Cabra Corral ubicado al sur, proporcionando energía hidroeléctrica y agua para diferentes usos en localidades de la zona (Figura 7) (Paoli et al. 2011, Poma et al. 2012).

Este río está sujeto a fluctuaciones estacionales en el flujo de agua: flujo muy alto durante la estación lluviosa en el verano (noviembre a abril) y muy bajo durante la estación seca en el invierno (mayo a octubre). En su origen se extiende de oeste a este a través de una zona semi-rural donde los usos principales son el abastecimiento de agua, el riego agrícola, actividades recreativas y mantenimiento del ganado (Poma et al., 2012).

Al cruzar la ciudad (12,5 km), el río recibe el impacto de sitios de alta y baja polución: aguas pluviales, aguas residuales ilegales, efluentes industriales y la eliminación ilegal de residuos sólidos en las zonas más pobres de Salta (que se desarrollaron a través de los años sin planificación) (Poma et al., 2012).

Once puntos (P) a lo largo del paso del río por la ciudad fueron identificados como críticos (Figura 7) y de los cuales se tomaron las muestras. Cinco puntos estuvieron directamente situados en el río, mientras que los otros 6 correspondieron a canales de descarga directa en el río:

- P1 y P2 fueron seleccionados como controles de baja polución en los ríos Arias y Arenales respectivamente, antes de su entrada a la ciudad.
- P3, P7, P8 y P9 son fuentes de agua pluviales que desembocan en el río.

- P4 está en el arroyo Isasmendi, en la confluencia con el río Arias, donde se encuentra una planta empacadora de res.
- P5 es un punto de descarga importante de aguas residuales no tratadas.
- P6 es un punto ubicado en un área recreacional llamada Parque Los Sauces, con mesas, asadores y un lugar de juegos para niños.
- P10 y P11 son puntos ubicados aguas arriba (P10) y aguas abajo (P11) de la planta de tratamientos de líquidos cloacales y vertedero municipal.



**Figura 7. Sitio de estudio.(-24.8001989,-65.4439798) Tomada de Google maps, 2017. A.** Ubicación de la provincia de Salta y de la Ciudad Capital de Salta. **B.** Imagen satelital de la ciudad de Salta, en la que se muestra la localización de los ríos estudiados y los 11 puntos de muestreo (P1 al P11).

## **ii. Muestras ambientales**

Las muestras de agua fueron colectadas mensualmente en los 11 puntos mencionados durante febrero de 2009 a febrero de 2010 (n=117) y en 4 puntos (P6, P7, P8 y P10) entre abril de 2013 y diciembre de 2014 (n=72). Las muestras fueron colectadas por personal del Instituto de Investigaciones para la Industria Química-CONICET (INIQUI-CONICET) de la Universidad Nacional de Salta, de la ciudad de Salta. Se colectaron 20 l de agua en bidones estériles, que fueron trasladadas al laboratorio de esa institución y se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta que fueron concentradas.

## **iii. Concentración de virus a partir de muestras de aguas**

La carga viral en aguas ambientales puede ser suficiente para producir infección, pero demasiado bajo para alcanzar el límite de detección de los métodos utilizados, por lo que se requiere una etapa de concentración.

Las muestras utilizadas en este estudio fueron concentradas por personal del INIQUI-CONICET (Salta), mediante ultracentrifugación a partir de los 20 L colectados, para obtener 50 mL finales (factor de concentración=400), siguiendo protocolos previamente descritos (Poma et al., 2012), brevemente las muestras de agua de 20 L se filtraron a través de dos tamices de acero inoxidable (74 y 37 µm) para retirar los sólidos y se introdujeron en el depósito de alimentación. A partir de ahí, se bombeó el agua (usando una bomba peristáltica Apema BS6D) a través de la unidad de ultrafiltración con un corte de membrana de 50.000 MW (Microza AHP 1010, Pall Life Sciences, East Hills, NY) hasta que el volumen se redujo a aproximadamente 30 ml. Se llevaron a cabo dos etapas de elución con glicina / NaOH 0,05 M (pH 7,0) y Tween 80 al 0,1% para recuperar el material unido al tubo con el fin de aumentar la recuperación. Una vez concentradas, una alícuota de cada muestra fue cedida por el INIQUI-CONICET al Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” de la UNC para su procesamiento para detección de HEV.

#### iv. Extracción de ARN viral

Cada muestra de agua concentrada fue sometida a extracción de ARN mediante el kit comercial QIAamp® Viral RNA, Qiagen (GmbH, Alemania), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se partió de 140 µL de muestra, a la que se sometió a sucesivos pasos de lisis (ruptura de células y desnaturalización de proteínas), centrifugación, pasaje por columna de sílica gel y lavado, para finalmente eluir 60 µL.

#### v. Transcripción reversa

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se mezclaron 10 µL del ARN extraído a partir de cada muestra, previa incubación por 10 min a 65 °C, con 10 µL de mezcla de reacción (volumen final 20 µL) conteniendo:

- 1 µL de dNTPs (10mM).
- 4 µL de buffer 5X (ImPROM-II™-Promega).
- 1 µL de *random hexamer primers* (Promega, 2,5mM).
- 0,5 µL de *RNAse OUT* (Invitrogen, 40UI/µL).
- 0,1 µL de agua mili-Q.
- 1 µL de enzima Transcriptasa Reversa (ImPROM-II™-Promega, 200UI/µL).
- 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM).

Los parámetros de reacción fueron: 60 minutos a 42 °C, 10 minutos a 65 °C. El ADNc obtenido fue almacenado a -20 °C.

#### vi. Detección de HEV por PCR

Para la amplificación del genoma de HEV se utilizó el protocolo de Nested-PCR previamente descrito para la detección de los 4 genotipos principales de HEV (HEV-1, HEV-2, HEV-3 y HEV-4) dirigido para la amplificación parcial del ORF-2 (Huang et al., 2002). Las proporciones de reactivos utilizados para el primer y el segundo ciclo de PCR, se encuentran en las Tablas 1 y 2 respectivamente.

**Tabla 1.** Reactivos utilizados en el primer ciclo de PCR para amplificación de ORF2 de HEV.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Agua	<b>29,75 <math>\mu</math>L</b>
Buffer GoTaq (Promega) 5X	<b>10 <math>\mu</math>L</b>
dNTPs (10mM)	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
Primer sense (10 $\mu$ M)	<b>2 <math>\mu</math>L</b>
Primer antisense (10 $\mu$ M)	<b>2 <math>\mu</math>L</b>
GoTaq (Promega)	<b>0,25 <math>\mu</math>L</b>
<b>ADNc (muestra)</b>	<b>5 <math>\mu</math>L</b>
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>L</b>

**Tabla 2.** Reactivos utilizados en el segundo ciclo de PCR para amplificación de ORF2 de HEV.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Agua	<b>32,75 <math>\mu</math>L</b>
Buffer GoTaq (Promega) 5X	<b>10 <math>\mu</math>L</b>
dNTPs 10mM	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
Primer sense	<b>2 <math>\mu</math>L</b>
Primer antisense	<b>2 <math>\mu</math>L</b>
GoTaq (Promega)	<b>0,25 <math>\mu</math>L</b>
<b>Producto de PCR I</b>	<b>2 <math>\mu</math>L</b>
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>L</b>

Las condiciones de amplificación para ambas PCR fueron: 94 °C por 5 minutos, 39 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 45 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Los productos amplificados fueron corridos mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con Gel Red (Biotium). El fragmento esperado de 348 pb se visualizó mediante el uso de un transiluminador UVP Benchtop UV Transilluminator Biodoct - It™.

#### **vii. Extracción y purificación de ADN producto de PCR II**

Las bandas correspondientes al producto de PCR esperado fueron purificadas a partir del gel de agarosa empleando el Kit QIAquick Gel Extracción Kit (Qiagen, Valencia, California, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, a partir de 100  $\mu$ L de producto amplificado presente en el gel de agarosa se realizaron sucesivos



pasos de disolución, centrifugación, pasaje por sílica gel y lavado, para finalmente eluir 50 µL.

### **viii. Análisis de las secuencias y genotipificación**

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en ambas direcciones mediante el servicio de secuenciación automática de MacroGen Inc., Corea.

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el software MEGA v6.0 (Tamura et al., 2013). Las secuencias fueron editadas y alineadas junto a secuencias de HEV de referencia para cada genotipo (Smith et al. 2016), más aquellas secuencias argentinas previamente publicadas (Martínez Wassaf et al., 2014) u obtenidas por nuestro laboratorio. Todas las secuencias utilizadas se encuentran en la base de datos de GenBank (Anexos).

Para identificar el genotipo infectante, se construyó un dendograma con el método Neighbor-joining, tal como se reportó previamente por el grupo de trabajo del Laboratorio de Hepatitis Virales del InViV (Martinez Wassaf et al, 2014). Como extragrupo se utilizó una secuencia de HEV aviar (nro. Acceso GenBank: AY535004). Los valores de bootstrap se determinaron con 1000 réplicas. Se generó un árbol consenso y los valores de bootstrap mayores del 50% proporcionaron evidencia significativa para el agrupamiento filogenético.

Las secuencias de nucleótidos analizadas en este trabajo se depositaron en el GenBank bajo los Números de Acceso: KX812463 y KY511413.

### **b. Prevalencia serológica**

#### **i. Muestras de suero**

Se realizó un estudio retrospectivo (observacional descriptivo), anónimo, no vinculante utilizando 143 muestras de suero almacenadas en la seroteca del laboratorio del primer nivel de detección del Ministerio de Salud de la ciudad de Salta, previamente obtenidas de personas que concurrieron a centros de salud cercanos al río Arias-Arenales de la ciudad de Salta para un control de rutina durante el año 2015 y hasta julio

de 2016, las cuales fueron seleccionadas al azar. En todas las muestras se contó con el dato del sexo, mientras que para 103 muestras se conocía la edad.

## ii. Detección de IgM e IgG-anti HEV

El análisis serológico fue realizado mediante la técnica de ELISA Sandwich utilizando kits comerciales disponibles para detección de IgG e IgM específicos contra HEV (Dia.Pro, Milán, Italia) y fueron llevados a cabo en un equipo automatizado de ELISA. Los antígenos utilizados en las placas corresponden a determinantes antigénicos conservados e inmunodominantes derivados de las regiones de ORF-2 y ORF-3 de los 4 genotipos (HEV-1, HEV-2, HEV-3 y HEV-4). Los anticuerpos policlonales que reconocen los anticuerpos específicos (IgG o IgM) presentes en las muestras se encontraban marcados con la enzima peroxidasa (HRP).

El valor de corte se calculó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y en base al valor de densidad óptica del control negativo. Los resultados se interpretaron como la razón entre el valor de la muestra y el valor de corte de la reacción en términos de absorbancia. Muestras con un cociente menor a 0,9 fueron consideradas negativas, entre 0,9 y 1,1 como resultados indeterminados, y por encima de 1,1 fueron resultados positivos. El límite de detección del kit fue calculado sobre el reactivo de referencia internacional para anticuerpos anti-HEV aportados por NIBSC/WHO con código N°95/584 y corresponde a 10 UI/ml. La especificidad diagnóstica (probabilidad del ensayo de detectar negativos en ausencia del analito reactivo) es mayor o igual al 98 % y la sensibilidad diagnóstica (probabilidad del ensayo de detectar positivos en presencia del analito reactivo) es mayor o igual al 98 %.

## iii. Análisis estadístico

Los valores de prevalencia fueron expresados como porcentajes. Para evaluar la asociación entre sexo y edad y la IgG anti-HEV, se utilizaron pruebas independientes t o chi-cuadrado. Se calcularon intervalos de confianza (IC) del 95%. La significación estadística se definió en  $p < 0,05$ .

Se utilizó el programa estadístico InfoStat v2016 (grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, <http://www.infostat.com.ar>) (Di Rienzo et al., 2016).

#### **iv. Declaración de ética**

Este estudio fue diseñado como un estudio observacional descriptivo retrospectivo a partir de muestras presentes en la seroteca del laboratorio del primer nivel de detección del Ministerio de Salud de la ciudad de Salta; los datos con los que se contaba fueron el número de muestra, la fecha del muestreo, la edad del paciente (años), el sexo y el barrio. Las muestras se procesaron en conformidad con el Ministerio de Salud de la ciudad de Salta.

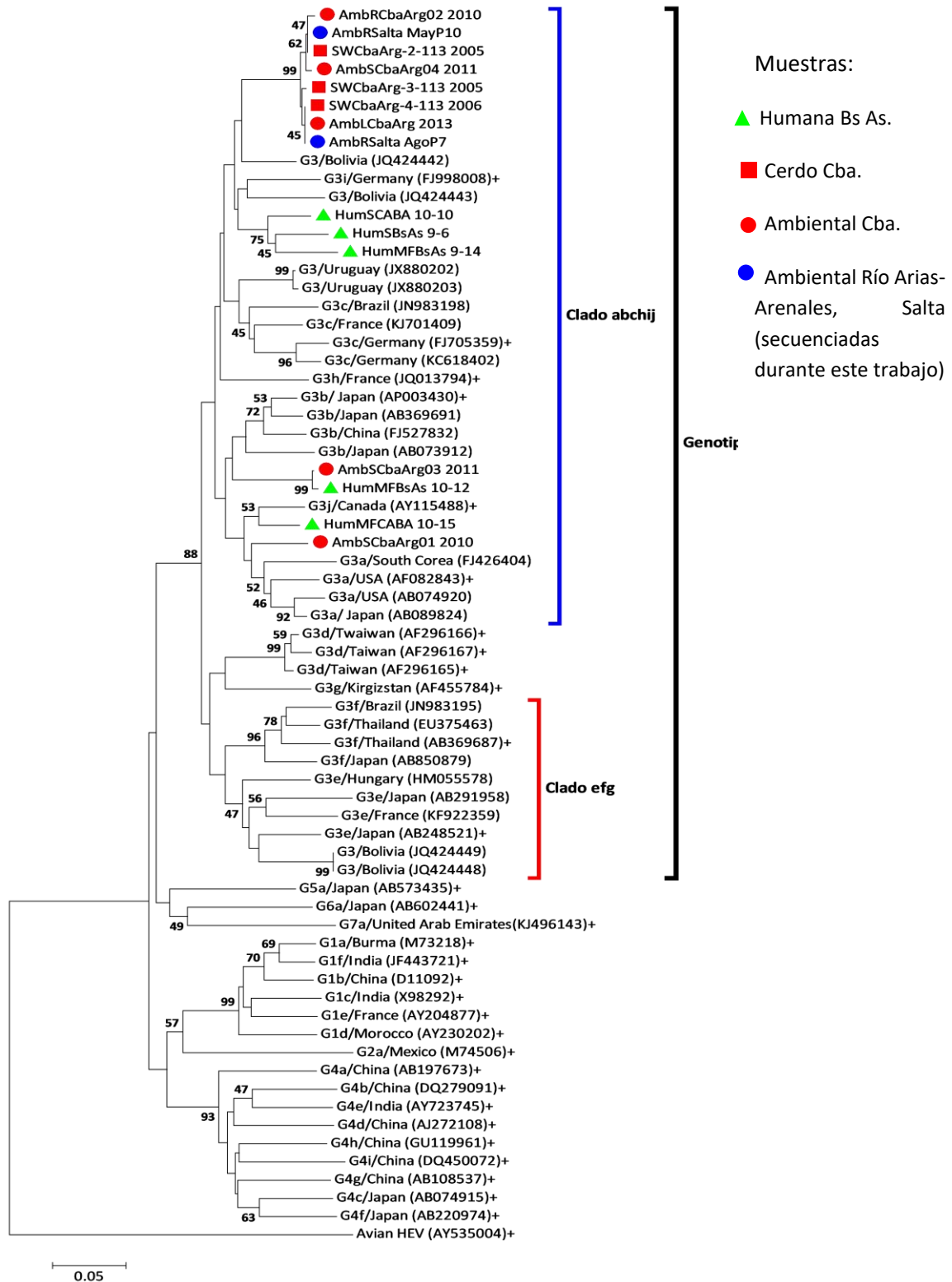
## 5. RESULTADOS

### a. Vigilancia ambiental

Del total de muestras analizadas, se detectó ARN de HEV en el 1,59% de las muestras (3/189). Al analizar los dos períodos estudiados, este porcentaje de positividad fue similar. En la primera tanda de muestras (2009), se detectaron dos muestras positivas (2/117; 1,71%) en junio y agosto, correspondientes a los puntos P7 y P8 respectivamente, ambos de baja polución. En el segundo grupo de muestras (2013-2014) se detectó una muestra positiva (1/72; 1,39%) obtenida en mayo del 2013, correspondiente al P10, de alta polución (Tabla 3). Dos muestras pudieron ser secuenciadas. El análisis filogenético mostró agrupamiento de las mismas dentro del genotipo 3 (HEV-3), clado 3abchij, subtipo 3c/3i (Figura 8).

**Tabla 3. Muestras positivas para la detección de ARN-HEV obtenidas del río Arias-Arenales de Salta.**

Muestra	Fecha	Punto de muestreo	% positividad por período de muestreo	Secuenciada	Número de Acceso GenBank
AmbRSalta_Jun8	Junio 2009	P8	1,71% (2/117)	No*	-
AmbRSalta_Ago7	Agosto 2009	P7		Si	KX812463
AmbRSalta_May10	Mayo 2013	P10	1,38% (1/72)	Si	KY511413



**Figura 8. Dendograma** construido utilizando el método de *Neighbor-Joining* con secuencias de HEV correspondientes al fragmento ORF2, de 237 nucleotidos (software Mega 6) (Anexos). Cada secuencia se identifica por el número de acceso de GenBank, el país de origen y su respectivo genotipo. Se incluyeron secuencias de referencia propuestas para cada subtipo e indicadas con + (Smith et al., 2016). Se incluyó un HEV aviar como grupo externo. Los valores de bootstrap se indican para los nodos principales como un porcentaje de los datos obtenidos a partir de 1000 réplicas (bar: 0,1 sustituciones por sitio).

### b. Prevalencia serológica

Se analizaron 143 muestras, de las cuales 13 fueron positivas, lo que arrojó una prevalencia general de IgG anti-HEV del 9,09%. De estas 143 muestras, 91 correspondieron a mujeres y 52 a hombres (relación mujer-hombre: 1,75:1), resultando positivas 7 y 6 muestras respectivamente, lo que se traduce en prevalencias de 7,69% en mujeres y 11,54% en hombres. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,4933$ ).

Del total de muestras analizadas, en 103 se contaba con el dato de la edad, las cuales fueron divididas en 4 grupos etarios para su análisis, como se muestra en la Tabla 4. Si bien se determinó que no existe diferencia significativa entre las prevalencias de HEV en estos grupos etarios ( $p>0,05$ ), se observó una tendencia de aumento de este valor con la edad (Tabla 4).

Se detectó IgM anti-HEV en el 31% de las muestras IgG anti-HEV [+] (4/13; relación de hombres y mujeres de 1,17:1) evidenciando infecciones recientes. No se encontró diferencias significativas entre sexo y grupo etario respecto a la presencia de anticuerpos IgM anti-HEV. Sin embargo, todas las muestras IgM [+], correspondieron a adultos mayores de 46 años, por lo que debería ampliarse el número de muestras para corroborar si existen diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 4: Prevalencia de Ig G anti-HEV según características demográficas.**

	Ig G+](%)(n)	Ig G [-] (%) (n)	p valor
<b>Edad</b>			
≤16	4,3% [1/23]	95,7% [22/23]	
17-30	0% [0/18]	100% [18/18]	
31-45	7,4% [2/27]	92,6% [25/27]	
≥46	25% [9/36]	75% [27/36]	>0,05
<b>Sexo</b>			
M	7.69% [7/91]	92.31% [84/91]	
H	11.54% [6/52]	88.46% [46/52]	>0,4933

M: Mujeres; H: Hombres.

## 6. Discusión

Durante este estudio se detectó por primera vez en la provincia de Salta, circulación ambiental de HEV en un curso de agua, como así también la presencia de anticuerpos anti-HEV en la población general, mostrando una correlación entre virus detectado en el ambiente y evidencia de infección en humanos.

En Argentina, se ha reportado detección de varios agentes virales (rotavirus, HAV, norovirus, adenovirus) en muestras ambientales de origen hídrico en Buenos Aires, Córdoba y Salta (Barril et al., 2010; Poma et al., 2012; Yanes et al., 2014). Sin embargo, existe escasa información acerca de la circulación ambiental de HEV en matrices acuosas y solo se ha descrito la detección de este virus en cursos de agua de la provincia de Córdoba (Martínez Wassaf et al., 2014; Paván et al., 2016). El hallazgo de HEV en muestras ambientales pertenecientes al río Arias Arenales de la ciudad de Salta, posiciona a un nuevo recurso hídrico de nuestro país como un posible reservorio viral y fuente de HEV a la población expuesta. Sin embargo, el porcentaje de positividad obtenido en estas muestras ambientales (1,59%) fue menor que el reportado en Córdoba (3,20%, Martínez Wassaf et al., 2014), lo que podría deberse a una menor circulación viral, producto de una menor polución del río de Salta respecto al de Córdoba. La ciudad de Salta presenta una tasa demográfica inferior a la de Córdoba (probablemente con menor número de asentamientos poblacionales en la ribera del río), lo que conlleva a un menor número de descargas cloacales e industriales en el mismo. La frecuencia de detección de HEV en los 2 períodos estudiados en Salta (2009 y 2013) fue similar, lo que reflejaría que este virus circula de manera continua en esa ciudad. Por otra parte, estos resultados muestran que el río Arias Arenales presenta una polución difusa, sin una fuente de contaminación puntual, ya que se detectó HEV tanto en puntos de muestreo de baja contaminación (P7 y P8) como puntos de contaminación alta (P10). Todas las detecciones fueron realizadas esporádicamente durante la estación seca, en meses de bajas temperaturas (otoño e invierno), lo que se correlaciona con lo hallado para Norovirus (NoV), otro virus entérico, que comparte la misma vía de transmisión (Poma et al., 2012). Esto podría estar relacionado a una mejor conservación de los virus en los meses fríos y al menor efecto de dilución que el río presenta en ésta época (en meses de mayor temperatura, cuando las precipitaciones aumentan, el efecto

de dilución aumenta, disminuyendo las chances de detección viral) (Cann et al., 2013). Sin embargo, existen reportes en los que se describe mayor detección viral en estación lluviosa, lo cual es atribuido a que el río arrastra más polución de las superficies cuando aumenta su caudal (Maurer et al., 2015; Vieira et al., 2016), por lo que su detección en meses cálidos no debe ser subestimada.

Adicionalmente, se sabe que la contaminación del agua deriva a diversos modos de transmisión: ingestión de agua contaminada, ingestión de vegetales contaminados con aguas insuficientemente tratadas o cultivados en terrenos abonados con lodos que contenían virus infecciosos, ingestión de carne cruda o poco cocida, proveniente de animales que hayan crecido en zonas que reciben aporte de aguas residuales o por contacto con aerosoles generados a partir de aguas contaminadas y por actividades recreativas en aguas contaminadas (Melnick et al., 1978; Bosch, 1998; Rodríguez-Lázaro et al., 2016). Así, el río Arias Arenales es utilizado para riego de cultivos como el tabaco, hortalizas de hojas y, en menor proporción, frutales de carozo, como así también es fuente de agua potable sobre los diferentes afluentes que conforman el cauce principal (Paoli et al., 2011). Por otro lado, también se conoce que algunos sectores dominados por esta red de riego han sido urbanizados o están ocupados por pequeñas fincas de uso recreacional. El punto de muestreo 6 (P6) es un sitio recreacional con asadores a donde los habitantes locales suelen asistir para hacer actividades al aire libre, lo que demuestra que este río, además, es usado con fines recreativos en la ciudad, pudiendo estar las personas en contacto directo con sus aguas. Todas estas actividades podrían ser fuente de transmisión del HEV, generando un escenario favorable para las infecciones de origen hídrico.

Los resultados demuestran una vez más la importancia de la vigilancia ambiental como una herramienta muy útil para conocer y caracterizar la circulación viral en una población, y contribuir a su prevención (Bosch, 1998). Sin embargo, hasta ahora los estándares y legislación que rigen el tratamiento de aguas incluyen únicamente al estudio y eliminación de bacterias, a pesar de que la presencia y persistencia de los virus en agua parece comportarse de manera independiente, por lo que éstos no siempre son efectivamente eliminados con los tratamientos convencionales (Rodríguez-Lázaro et al., 2016). Es entonces inseguro confiar en estándares bacteriológicos para evaluar la



calidad virológica de cualquier tipo de agua. Existen informes sobre brotes de enfermedades virales relacionados con el agua potable que cumplen con las normas bacteriológicas, tanto de HEV como de otros virus (HAV, rotavirus, enterovirus) (Hejkal et al., 1982; Bosch et al., 1991; Chen et al., 2016), lo que ha sido explicado por una mayor resistencia de los virus a la degradación en el ambiente, comparado con las bacterias (Wyn-Jones et al., 2011). Por otra parte, en el río Suquía y en el Embalse San Roque de la provincia de Córdoba dicha situación ha sido demostrada, donde varios virus entéricos han sido detectados en puntos de muestreo con parámetros bacterianos apropiados (Paván et al., 2014; Paván et al., 2016). Si bien en el presente estudio no se realizaron pruebas de detección de bacterias, por lo que no se conoce si ocurre esta situación (presencia de virus en muestras aptas bacteriológicamente), los resultados del mismo apoyan el monitoreo de la contaminación viral en matrices hídricas y la implementación de medidas de prevención, tales como el control de las descargas residuales sin tratamiento y/o clandestinas, la ejecución de actividades o campañas educativas y de información a la población, el control de alimentos obtenidos de campos cercanos al curso de agua, etc.

Los análisis filogenéticos basados en la detección del ORF-2 mostraron que las secuencias amplificadas agruparon con HEV-3, dentro del clado abchij, junto a secuencias previamente detectadas en nuestro país, provenientes de Córdoba (ambientales y de cerdos) y Buenos Aires (humanas). Las muestras de Salta se ubicaron dentro del subtipo 3c/3i, formando un grupo definido con las secuencias de Córdoba (Martínez Wassaf et al., 2014), indicando la circulación de cepas muy similares, relacionadas unas con otras, a lo largo de una amplia región geográfica. Éstas últimas, habían sido clasificadas como subtipo 3c (Martínez Wassaf et al., 2014), pero en nuestro análisis el grupo de secuencias Córdoba-Salta se ubicó más cercano al subtipo 3i. Ambos subtipos están estrechamente relacionados, y este comportamiento (inconsistencias en la clasificación subtípica) ha sido observado en estudios previos (Oliveira-Filho et al., 2013; Smith et al., 2016), posiblemente debido a que el fragmento analizado es acotado, sumado a la gran variabilidad genética dentro del HEV-3. Es por esto que recientemente se ha realizado una revisión de la clasificación de los subtipos, en la cual se los agrupó en clados (Smith et al., 2016). Dentro de HEV-3, se describieron 2 clados: los subtipos

3a, 3b, 3c, 3h, 3i y 3j forman un clado (3abchij) y los subtipos 3e, 3f y 3g forman otro (3efg). Las secuencias de Salta, agruparon en el clado HEV-3 abchij.

En muchas áreas geográficas, estudios filogenéticos han demostrado que las cepas de HEV que circulan en cerdos y seres humanos están estrechamente emparentadas (Norder et al., 2009; Fu et al., 2010). Si bien en este estudio no se realizó detección de HEV en cerdos, las secuencias de Salta agruparon, además de con las secuencias ambientales previamente reportadas, con secuencias aisladas de cerdos de la provincia de Córdoba, lo que indica estrecha relación entre cepas ambientales, de humanos y cerdos, a través de varios años y en amplias regiones geográficas a lo largo del país. Esto aporta más evidencia a la hipótesis de transmisión zoonótica del HEV-3. Recientemente un estudio evaluó dos posibles fuentes de infección por HEV: por un lado, se examinaron muestras de agua y sedimentos de un río, y por otro, productos derivados de cerdo de la misma área. Se detectó el virus únicamente en las muestras de alimentos, sugiriendo que los mismos podrían ser la fuente de infección en esa región (Heldt et al., 2016). Dichos antecedentes, sumados a nuestros hallazgos, motivan a enfocar las investigaciones en la búsqueda de virus en cerdos y/o alimentos derivados en el Noroeste argentino, a fin de dilucidar su rol en la transmisión del HEV.

La ejecución de estudios serológicos de detección de IgG en la población general para distintos agentes infecciosos es una herramienta de utilidad que permite evidenciar de manera indirecta la presencia de microorganismos que circulan en una determinada región, contribuyendo así a mejorar y actualizar el conocimiento epidemiológico. El presente trabajo revela la presencia de anticuerpos IgG anti-HEV en población general de la ciudad de Salta, complementando los resultados de detección ambiental de este virus en la región.

La seroprevalencia obtenida (9,09%) fue similar a la hallada en Buenos Aires (9,5%) (Munné et al., 2014) pero mayor a la encontrada en la población de Córdoba (4,4%) ( $p=0,035$ ) (Martínez Wassaf et al., 2014), utilizando el mismo kit diagnóstico, en poblaciones equivalentes. Estas diferencias en las seroprevalencias en las distintas áreas pueden deberse a las diferencias en las condiciones sanitarias, a los distintos usos del río (recreativos, riego, suministro de agua potable), como así también a las diferencias en el número de muestras analizadas (n de Córdoba fue mayor). Además, en Salta y

Buenos Aires, donde las tasas de prevalencia son más altas, se han registrado previamente casos agudos de hepatitis E (Munné et al., 2011; Munné et al., 2014), lo que no se ha evidenciado aún en Córdoba.

Durante este estudio, a pesar de no haberse hallado diferencia significativa entre las prevalencias de IgG anti-HEV obtenidas en los distintos grupos etarios, se observó una tendencia de aumento del valor de prevalencia de este marcador con la edad, lo que concuerda con estudios previos realizados en Argentina (Córdoba) (Martínez Wassaf et al. 2014) y otras partes del mundo (Carrilho et al., 2005; Montalvo Villalba et al., 2010; Fierro et al., 2016). Esto podría explicarse debido a la exposición acumulada al HEV a lo largo del tiempo (Martínez Wassaf et al., 2014). Los bajos niveles de detección de anticuerpos anti-HEV en individuos menores de 46 años sugieren la susceptibilidad a la infección por este virus en este sector de la población.

Hasta la ejecución de este estudio, sólo existía el reporte de 2 casos clínicos de hepatitis E en Salta, investigados de manera retrospectiva, correspondientes a un niño co-infectado con el HAV que presentó falla hepática fulminante en el año 2004 (Munné et al., 2011), y a una mujer infectada con HIV, en el 2013 (Munné et al., 2014). Estos antecedentes y los hallazgos de IgG anti-HEV, sumado a la detección de IgM específica para el mismo, indicativa de infecciones recientes, muestran que una porción de la población general sufrió infecciones subclínicas, y que otra porción pudo haber presentado signos y síntomas, pero no fue diagnosticada. Este sub-diagnóstico, frecuente en varias regiones de nuestro país, se debe a un gran desconocimiento del virus y su circulación, a un alto índice de casos asintomáticos y a la falta de acceso al diagnóstico de rutina especializado. En este sentido, la infección subclínica por HEV puede contribuir a la perpetuación del virus, ya que promueve su circulación en la comunidad y su mantenimiento a lo largo de los años generando un escenario favorable para la presentación de casos clínicos en individuos susceptibles (Martínez Wassaf et al., 2014). Nuestros resultados ponen en evidencia la circulación del HEV autóctono en Salta, por lo que el diagnóstico clínico especializado debería ser considerado. En este punto es necesario resaltar que la epidemiología de las hepatitis virales ha cambiado en varias partes del mundo desde que se introdujeron los programas de inmunización contra la hepatitis A y la hepatitis B, y la incidencia de

infecciones agudas causadas por estos virus ha disminuido (Harvala et al., 2014). En Argentina, tras la aplicación de la vacunación universal contra el HAV en el año 2006, el número de casos de hepatitis A ha disminuido drásticamente, presentando una reducción del 88% con respecto al periodo de pre-vacunación (Vacchino, 2008). Mientras, el HEV ha sido reconocido mundialmente como una causa cada vez más importante de hepatitis aguda. En Reino Unido, por ejemplo, se observó una frecuencia de hepatitis E aguda de 6,1%, que fue 31 veces superior a la de hepatitis A (0,2%) y 7 veces mayor que la de hepatitis B (0,7%), lo que apoyó la introducción de la prueba de detección de HEV en los diagnósticos de rutina en Europa (Harvala et al., 2014). Además, en los últimos años se ha reportado a este virus como agente productor de hepatitis crónicas en individuos inmunosuprimidos (Dalton et al., 2009; Mateos-Lindemann et al., 2012, 2014; Pérez-Gracia et al., 2014), lo que refuerza aún más la introducción de este virus al algoritmo diagnóstico de las hepatitis virales en nuestro medio.

## **7. Conclusión**

Los resultados ambientales, sumados a los hallazgos serológicos, demuestran que el HEV circula en Salta, Argentina, y que la contaminación del agua podría representar una potencial vía de transmisión para la población susceptible local. De esta manera, se alerta a los sistemas locales de atención de la salud con el fin de incluir la detección del HEV en el algoritmo de diagnóstico de la hepatitis viral. La incorporación reciente de kits serológicos y la tecnología molecular optimizada, permitirá investigaciones adicionales que profundicen en el conocimiento de este virus en la región.

## 8. Anexos

**Tabla 5. Secuencias de HEV correspondientes al fragmento ORF2 utilizadas para la elaboración del dendograma.**

(\*) Secuencias de referencia de Smith et al. (2016) propuestas para cada subtipo.

(\*) Secuencias halladas en el presente estudio.

(\*\*) Secuencias no publicadas.

N° acceso GenBank	Secuencia	Genotipo	Origen
KY511413*	Ambiental	HEV-3	Salta
KX812463*	Ambiental	HEV-3	Salta
KF751218	Ambiental	HEV-3	Córdoba
KF751219	Ambiental	HEV-3	Córdoba
KF7512120	Ambiental	HEV-3	Córdoba
KF7512121	Ambiental	HEV-3	Córdoba
AmbLCbaArg 2013**	Ambiental	HEV-3	Córdoba
SWCbaArg-3-113 2005**	Cerdo	HEV-3	Córdoba
SWCbaArg-4-113 2006**	Cerdo	HEV-3	Córdoba
SWCbaArg-2-113 2005**	Cerdo	HEV-3	Córdoba
HumSCABA 10-10**	Humana	HEV-3	Buenos Aires
HumSBsAs 9-6**	Humana	HEV-3	Buenos Aires
HumMFBsAs 9-14**	Humana	HEV-3	Buenos Aires
HumMFBsAs 10-12**	Humana	HEV-3	Buenos Aires
HumMFCABA 10-15**	Humana	HEV-3	Buenos Aires
JQ424442	Cerdo	HEV-3	Bolivia
FJ998008*	Cerdo	HEV-3	Alemania
JQ424443	Cerdo	HEV-3	Bolivia
JX880202	Humana	HEV-3	Uruguay
JX880203	Humana	HEV-3	Uruguay
JN983198	Cerdo	HEV-3	Brasil
KJ701409	Humana	HEV-3	Francia
FJ705359*	Jabalí	HEV-3	Alemania
KC618402	Humana	HEV-3	Alemania
JQ013794*	Humana	HEV-3	Francia
AP003430*	Humana	HEV-3	Japón
AB369691	Humana	HEV-3	Japón
FJ527832	Cerdo	HEV-3	China
AB073912	Cerdo	HEV-3	Japón
AY115488*	Cerdo	HEV-3	Canadá
FJ426404	Cerdo	HEV-3	Corea del Sur

---

AF082843*	Cerdo	HEV-3	USA
AB074920	Humana	HEV-3	USA
AB089824	Humana	HEV-3	Japón
AF296166*	Cerdo	HEV-3	Taiwán
AF296167*	Cerdo	HEV-3	Taiwán
AF296165*	Cerdo	HEV-3	Taiwán
AF455784*	Cerdo	HEV-3	Kirguizistán
JN983195	Cerdo	HEV-3	Brasil
EU375463	Cerdo	HEV-3	Tailandia
AB369687*	Humana	HEV-3	Tailandia
AB850879	Humana	HEV-3	Japón
HM055578	Cerdo	HEV-3	Hungría
AB291958	Humana	HEV-3	Japón
KF922359	Humana	HEV-3	Francia
AB248521*	Cerdo	HEV-3	Japón
JQ424449	Humana	HEV-3	Bolivia
JQ424448	Humana	HEV-3	Bolivia
AB573435*	Jabalí	HEV-5	Japón
AB602441*	Jabalí	HEV-6	Japón
KJ496143*	Camello	HEV-7	Emiratos árabes
M73218*	Humana	HEV-1	Birmania
JF443721*	Humana	HEV-1	India
D11092*	Humana	HEV-1	China
X98292*	Humana	HEV-1	India
AY204877*	Humana	HEV-1	Francia
AY230202*	Humana	HEV-1	Marruecos
M74506*	Humana	HEV-2	México
AB197673*	Humana	HEV-4	China
DQ279091*	Cerdo	HEV-4	China
AY723745*	Cerdo	HEV-4	India
AJ272108*	Humana	HEV-4	China
GU119961*	Cerdo	HEV-4	China
DQ450072*	Cerdo	HEV-4	China
AB108537*	Humana	HEV-4	China
AB074915*	Humana	HEV-4	Japón
AB220974*	Humana	HEV-4	Japón
AY535004*	Aviar		

---

---

## 9. Bibliografía

- Aggarwal, R. (2013). Hepatitis E: Clinical presentation in disease-endemic areas and diagnosis. *Semin Liver Dis* 33, 30–40.
- Balayan, M.S., Andjaparidze, A.G., Savinskaya, S.S., Ketiladze, E.S., Braginsky, D.M., Savinov, A.P., & Poleschuk, V.F. (1983). Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20, 23–31.
- Barril, P.A., Giordano, M.O., Isa, M.B., Masachessi, G., Ferreyra, L.J., & Castello, A.A. (2010). Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *J Med Virol* 82(7), 1277–1281.
- Bendall, R., Ellis V., Ijaz, S., Ali, R., & Dalton, H. (2010). A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of antiHEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol* 82(5), 799–805.
- Berg, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G., & Hending M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340, 467-468.
- Blood Advisory Committee, (2012). Topic I: Hepatitis E virus (HEV) and blood transfusion safety. 104th Meeting; 20 Sep 2012 Rockville.
- Bouquet, J., Tesse, S., Lunazzi, A., Eloit, M., Rose, N., Nicand, E., & Pavio, N. (2011). Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008–2009. *Emerg Infect Dis* 17, 2018–2025.
- Borgen, K., Herremans, T., Duizer, E., Vennema, H., Rutjes, S., Bosman, A., de Roda Husman, A.M., & Koopmans, M. (2008). Non-travel related hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004-2006. *BMC Infect Dis* 8:61.
- Bosch, A., Lucena, F., Díez, J.M., Gajardo, R., Blasi, M., & Jofre, J. (1991). Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *J Amer Water Works Assoc* 83, 80–83.
- Bosch, A., (1998). Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Internat Microbiol* 1,191–196
- Bradley, D.W., Krawczynski, K., Cook, E.H., McCaustland, Jr, K.A., Humphrey, C.D., Spelbring, J.E, Myint, H., & Maynard, J.E. (1987). Enterically transmitted non-A,non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm virus like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 17, 6277–6281.
- Cann, K. F., Thomas, D. R., Salmon, R. L., Wyn-Jones, A. P. & Kay, D. (2013). Systematic review – extreme water-related weather events and waterborne disease. *Epidemiol Inf* 141, 671–686.



- Carrilho, F.J., Clemente, C.M., & Silva, L.C. (2005). Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. *Gastroenterol Hepatol* 28(3), 118–125.
- Chandra, V., Kar-Roy, A., Kumari, S., Mayor, S., & Jameel, S. (2008). The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response. *J Virol* 82, 7100–7110.
- Chen, Y.J., Cao, N.X., Xie, R.H., Ding, C.X., Chen, E.F., Zhu, H.P., Sun, J.M., Shang, X.P., Wang, X.X., & Miao, Z.P. (2016). Epidemiological investigation of a tap water-mediated hepatitis E virus genotype 4 outbreak in Zhejiang Province, China. *Epidemiol Infect* 22, 1-13.
- Colson, P., Coze, C., Gallian, P., Henry, M., De Micco, P., & Tamalet C. (2007). Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis* 13(4), 648–649.
- Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D., & Gerolami, R. (2010). Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 202, 825-34.
- Cukor & Blacklow, (1984). Human viral gastroenteritis. *Microbiol Rev* 48, 157–179.
- Dalton, H.R., Bendall, R., Ijaz, S., & Banks, M. (2008). Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* 8, 698–709.
- Dalton, H.R., Stableforth, W., Thuraiajah, P., Hazeldine, S., Remnarace, R., Usama, W., Farrington, L., Hamad, N., Sieberhagen, C., Ellis, V., Mitchell, J., Hussaini, S.H., Banks, M., Ijaz, S., & Bendall, R.P. (2008). Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20, 784-90.
- Dalton, H.R., Bendall, R.P., Keane, F.E., Tedder, R.S., & Ijaz, S. (2009). Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 361, 1025–1027.
- Dalton, H.R., Bendall, R.P., Rashid, M., Ellis, V., Ali, R., Ramnarace, R., Stableforth, W., Headdon, W., Abbott, R., McLaughlin, C., Froment, E., Hall, K.J., Michell, N.P., Thatcher, P., & Henley, W.E. (2011). Host risk factors and autochthonous hepatitis E infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23, 1200–1205.
- Debing, Y., Moradpour, D., Neyts, J. & Gouttenoire, J. (2016). Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *J Hepatol*
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2016). InfoStat 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

- Echevarría, J.M., González, J.E., Lewis-Ximenez, L.L., Dos Santos, D.R., Munné, M.S., Pinto, M.A., Pujol, F.H., & Rodríguez-Lay, L.A. (2013). Hepatitis E virus in Latin America: a review. *J Med Virol* 85, 1037-1045.
- Emerson, S.U., Nguyen, H.T., Torian, U., Burke, D., Engle, R., & Purcell R.H. (2010). Release of genotype 1 hepatitis E virus from cultured hepatoma and polarized intestinal cells depends on open reading frame 3 protein and requires an intact PXXP motif. *J Virol* 84, 9059–9069.
- Fainboim, H., González, J., Fassio, E., Martínez, A., Otegui, L., Eposto, M., Cahn, P., Marino, R., Landeira, G., Suaya, G., Gancedo, E., Castro, R., Brajterman, L., & Laplumé, H. (1999). Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat* 6, 53-57.
- Favorov, M.O., Fields, H.A., Purdy, M.A., Yashina, T.L., Aleksandrov, A.G., Alter, M.J., Yarasheva, D.M., Bradley, D.W., & Margolis, H.S. (1992). Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol* 36(4),246–250.
- Fearon, M.A., O'Brien, S.F., Delage, G., Scalia, V., Bernier, F., Bigham, M., Weger, S., Prabhu, S., & Andonov, A. (2017). Hepatitis E in Canadian blood donors. *Transfusion* 57(6), 1420-1425.
- Fierro, N.A., Realpe, M., Meraz-Medina, T., Roman, S., & Panduro, A. (2016). Hepatitis E virus: An ancient hidden enemy in Latin America. *World J Gastroenterol* 22(7), 2271–2283.
- Fu, H., Li, L., Zhu, Y., Wang, L., Geng, J., Chang, Y., Xue, C., Du, G., Li, Y., & Zhuang, H. (2010). Hepatitis E virus infection among animals and humans in Xinjiang, China: possibility of swine to human transmission of sporadic hepatitis E in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 82, 961–966.
- Google. (s.f.). [Mapa de Salta, Argentina en Google maps]. Recuperado el 24 de marzo 2017, de: <https://www.google.com.ar/maps/@-24.8001989,-65.4439798,13085m/data=!3m1!1e3>
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., & Emerson, S.U. (2006). A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* 80, 5919–5926.
- Guu, T.S., Liu, Z., Ye, Q., Mata, D.A., Li, K., Yin, C., Zhang, J., & Tao Y.J. (2009). Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci US A* 106, 12992–12997.
- Gyarmati, P., Mohammed, N., Norder, H., Blomberg, J., Belák, S., & Widén, F. (2007). Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J Virol Methods* 146(1–2), 226–235.

- Halac, U., Beland, K., Lapierre, P., Patey, N., Ward, P., Brassard, J., Houde, A., & Alvarez, F., (2012). Cirrhosis due to chronic hepatitis E infection in a child post-bonemarrow transplant. *J Pediatr* 160, 871–874.
- Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P., & Stig, R. (1993). Risk assessment of viruses in drinking water. *Risk Analysis* 13, 545–552.
- He, S., Miao, J., Zheng, Z., Wu, T., Xie, M., Tang, M., Zhang, J., Ng, M.H., & Xia, N. (2008). Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. *J Gen Virol* 89, 245–249.
- Heldt, F.H., Staggmeier, R., Gularte, J.S., Demoliner, M., Henzel, A. and Spilki, F.R. (2016). Hepatitis E Virus in Surface Water, Sediments, and Pork Products Marketed in Southern Brazil. *Food Environ Virol* 8 (3), 200-205.
- Hejkal, T.W., Keswick, B., LaBelle, R.L., Gerba, C.P., Sanchez, Y., Dreesman, G., Hafkin, B., & Melnick, J.L. (1982). Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. *J Amer Water Works Assoc* 150, 318–321.
- Hoerning, A., Hegen, B., Wingen, A.M., Cetiner, M., Lainka, E., Kathemann, S., Fiedler, M., Timm, J., Wenzel, J.J., Hoyer, P.F., & Gerner, P. (2012). Prevalence of hepatitis E virus infection in pediatric solid organ transplant recipients – a single-center experience. *Pediatr Transplant* 16, 742–747
- Holla, R.P., Ahmad, I., Ahmad, Z., & Jameel, S. (2013). Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* 33, 3–14.
- Hoofnagle, J.H., Nelson, K.E., & Purcell, R.H. (2012). Hepatitis E. *N Engl J Med* 367, 1237-1244.
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Schommer, S.K., Pierson, F.W., Toth, T.E., & Meng, X.J. (2002). Detection by Reverse Transcription-PCR and Genetic Characterization of Field Isolates of Swine Hepatitis E Virus from Pigs in Different Geographic Regions of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1326–1332.
- Huang, S., Zhang, X., Jiang, H., Yan, Q., Ai, X., Wang, Y., Cai, J., Jiang, L., Wu, T., Wang, Z., Guan, L., Shih, J.W., Ng, M.H., Zhu, F., Zhang, J., & Xia, N. (2010). Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One* 5(10), e13560.
- Hussaini, S.H., Skidmore, S.J., Richardson, P., Sherratt, L.M., Cooper, B.T., & O’Grady, J.G. (1997). Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J Viral Hepat* 4, 51–54.
- Ibarra, H., Riedemann, S., Reinhardt, G., Frieck, P., Siegel, F., Toledo, C., Calvo, M., & Froösner, G. (1997). Prevalence of hepatitis E virus antibodies in blood donors and other population groups in southern Chile. *Rev Med Chil* 125, 275–278.

- Izopet, J., Dubois, M., Bertagnoli, S., Lhomme, S., Marchandeu, S., Boucher, S., Kamar, N., Abravanel, F., & Guerin, J.L. (2012). Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg Infect Dis* 18, 1274–1281.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., & Hill, V.R. (2006). A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131(1):65–71.
- Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S.A., Sehgal, D., & Jameel, S. (2009). Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol* 83, 12714–12724.
- Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J.M., Ouezzani, L., Peron, J.M., Guitard, J., Cointault, O., Esposito, L., Abravanel, F., Danjoux, M., Durand, D., Vinel, J.P., Izopet, J., & Rostaing, L. (2008). Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 358, 811–817
- Kamar, N., Garrouste, C., Haagsma, E.B., Garrigue, V., Pischke, S., Chauvet, C., Dumortier, J., Cannesson, A., Cassuto-Viguiet, E., Thervet, E., Conti, F., Lebray, P., Dalton, H.R., Santella, R., Kanaan, N., Essig, M., Mousson, C., Radenne, S., Roque-Afonso, A.M., Izopet, J., & Rostaing, L. (2011). Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* 140, 1481-1489.
- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.S., Ijaz, S., Izopet, J. (2012). Hepatitis E. *Lancet* 379, 2477-2488.
- Kamar, N., Dalton, H.R, Abravanel, F., & Izopet, J. (2014). Hepatitis E Virus Infection. *J Clin Microbiol Reviews* 27, 116 –138.
- Khuroo, M.S. (1980). 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* 68, 818-824.
- Khuroo, M.S. & Kamili S. (2003). Etiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat* 10, 61-69.
- Khuroo, M.S. & Kamili, S. (2009). Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat* 16(7), 519–523.
- Kokkinos, P., Ziros, P., Meri, D., Filippidou, S., Kolla, S., Galanis, A., & Vantarakis, A. (2011). Environmental surveillance. An additional/alternative approach for virological surveillance in Greece. *Int J Environ Res Public Health* 8(6), 1914–1922.

- Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R., & Bradley, D.W. (1992). 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* 89, 8259–8263.
- Kumar Acharya, S., Kumar Sharma, P., Singh, R., Kumar Mohanty, S., Madan, K., Kumar Jha, J., & Kumar Panda, S., (2007). Hepatitis E virus (HEV) infection in patients with cirrhosis is associated with rapid decompensation and death. *J Hepatol* 46, 387–394.
- Lamarca Vitral, C., Da Silva-Nunes, M., Alves Pinto, M., Mendes de Oliveira, J., Coimbra Gaspar, A.M., Costa Pereira, R.C., & Urbano Ferreira, M. (2014). Hepatitis A and E seroprevalence and associated risk factors: a community-based cross-sectional survey in rural Amazonia. *Bio Med Center Infectious Diseases* 14, 458-467
- Lan, X., Yang, B., Li, B.Y., Yin, X.P., Li, X.R., & Liu, J.X. (2009). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 47(7),2304–2306.
- Legrand-Abravanel, F., Mansuy, J.M., Dubois, M., Kamar, N., Peron, J.M., Rostaing, L., e Izopet J. (2009). Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg Infect Dis* 15, 110–114.
- León, P., Venegas, E., Bengoechea, L., Rojas, E., López, J.A., Elola, C., & Echevarría, J.M. (1999). Prevalence of infections by hepatitis B, C, D and E viruses in Bolivia. *Rev Panam Salud Publica* 5, 144–151
- Li, T.C., Yamakawa, Y., Suzuki, K., Tatsumi, M., Razak, M.A., Uchida, T., Takeda, N., & Miyamura, T. (1997). Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 71, 7207–7213.
- Lu, L., Li, C., & Hagedorn, C.H. (2006). Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 16, 5–36.
- Mansuy, J.M., Huynh, A., Abravanel, F., Recher, C., Peron, J.M., e Izopet, J. (2009). Molecular evidence of patient-to-patient transmission of hepatitis E virus in a hematology ward. *Clin Infect Dis* 48(3), 373–374.
- Maranger, R., & Bird, D. (1995). Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Mar Ecol Prog Ser* 121, 217-226.
- Martínez Wassaf, M.G., Pisano, M.B., Barril, P.A., Elbarcha, O.C., Pinto, M.A., Mendes de Oliveira, J.6., DiGiusto, P., Nates, S.V., & Ré V.E. (2014). First detection of Hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. *J Clin Virol* 61, 334-339.
- Martínez Wassaf, M.G. (2017). Tesis Doctoral: Estudio de la circulación del virus de la hepatitis E (HEV) en Córdoba, Argentina: aspectos epidemiológicos, zoonóticos y ambientales. Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina.

- Masuda, J., Yano, K., Tamada, Y., Takii, Y., Ito, M., Omagari, K., & Kohno, S. (2005). Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepato Res* 31, 178-183.
- Mateos-Lindemann, M.L., Gonzalez-Galdámez, A., Bordallo-Cardona, M., & Pérez Gracia, M.T. (2012). Are HIV-infected patients a high-risk population for hepatitis E virus infection in Spain? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30, 582–583.
- Mateos-Lindemann, M.L., Díez-Aguilar, M., Galdamez, A.L., Galán, J.C., Moreno, A., y Pérez-Gracia, M.T. (2014). Patients infected with HIV are at high-risk for hepatitis E virus infection in Spain. *J Med Virol* 86, 71–74.
- Maurer, C. P., Simonetti, A. B., Staggemeier, R., Rigotto, C., Heinzemann, L. S., & Spilki, F. R. (2015). Adenovirus, enterovirus and thermotolerant coliforms in recreational waters from Lake Guaíba beaches, Porto Alegre, Brazil. *Journal of Water and Health* 13(4), 1123-1129.
- Melnick J.L., Gerba C.P., & Wallis C. (1978). Viruses in water. *Bull WHO* 56, 499-508
- Melnick, J.L. (1984). Viruses in the water environment: a review. *Monogr Virol* 15, 1-16.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., & Emerson, S.U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9860-9865.
- Meng, X.J., Dai, X., Chang, J.C., Lopareva, E., Pillot, J., Fields, H.A., & Khudyakov, Y.E. (2001). Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 288, 203–211.
- Meng, X.J., (2010). Recent advances in hepatitis E virus. *J Viral Hepat* 3, 153–161.
- Meng, X.J. (2011). From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* 161, 23-30.
- Mirazo, S., Mainardi, V., Ramos, N., Gerona, S., Rocca, A., & Arbiza, J. (2014). Indigenous hepatitis E virus genotype 1 infection, Uruguay. *Emerg Infect Dis* 20, 171–173.
- Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., & Arbiza, J. (2013). Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res* 173, 364–370
- Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S., & Arbiza J. (2014). Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 5, 45–59.
- Munné, M.S., Altabert, N.R., Vladimirovsky, S.N., Moreira, R., Mares, L.O., Soto, S.S., Brajterman, L.S., Castro, R.E., & González, J.E. (2011). Identifications of polyphyletic variants in acute hepatitis suggest an underdiagnosed circulation of hepatitis E virus in Argentina. *J Clin Virol* 52, 138-141.

- Munné, M.S., Altabert, N.R., Otegui, M.L.O., Vladimirov, S.N., Moreira, R., Espul, M.P., Espul, C., Manzur, A., Soto, S.S., Brajterman, L.S., & González, J.E. (2014). Updating the knowledge of hepatitis E: new variants and higher prevalence of anti-HEV in Argentina. *Ann Hepatol* 13(5), 496-502.
- Murali, A.R., Kotwal, V., & Chawla, S. (2015). Chronic hepatitis E: A brief review. *World J Hepatol* 7 (19), 2194-2201.
- Mushahwar, I.K. (2008). Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 80(4), 646–658.
- Navaneethan, U., Al Mohajer, M., & Shata, M.T., (2008). Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int* 28, 1190–1199.
- Norder, H., Sundqvist, L., Magnusson, L., Ostergaard Breum, S., Lofdahl, M., Larsen, L.E., Hjulsager, C.K., Magnius, L., Bottiger, B.E., & Widen, F. (2009). Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Euro Surveill* 14, 19211.
- Oliveira-Filho, E.F., Konig, M., & Thiel, H.J. (2013). Genetic variability of HEV isolates: inconsistencies of current classification. *Vet Microbiol* 165, 148–154.
- Paoli, H., Elena, H., Mosciaro, J., Ledesma, F., & Noé, Y. (2011). Caracterización de las cuencas hídricas de las provincias de Salta y Jujuy. INTA EEA Salta, Argentina.
- Pavan, J.V., Barril, P.A., Martínez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Ferreyra, L.J., Isa, M.B., Ibarra, G., Welter, A., Martinez Wassaf, M.G., Ré, V., & Nates, S.V. (2014). Modelling microbiological quality dynamics of Suquía River in Córdoba, Argentina. En: Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: current status and trends". A. Méndez-Vilas ed. Academic Publishers. Pp.547-551.
- Pavan, J.V., Masachessi, G., Mateos, C.A., Barril, P.A., Martínez, L.C., Giordano, M.O., Ferreyra, L.J., Isa, M.B., Welter, A., Martinez Wassaf, M.G., Ré V., & Nates, S.V. (2016). Towards the selection of the best discriminating parameters of microbial water quality: A case study of an urban recreational water resource involving a dam-rivers complex in Córdoba, Argentina. En: Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms. A. Méndez-Vilas ed. Publisher: Brown Walker Press. Boca Raton Florida, EEUU. Pp. 140-144.
- Pérez-Gracia, M.T., Suay, B., & Mateos-Lindemann, M.L. (2012). Hepatitis E: current status. *Rev Med Virol* 23, 384–398.
- Péron, J.M., Bureau, C., Poirson, H., Mansuy, J.M., Alric, L., Selves, J., Dupuis, E., Izopet, J., & Vinel, J.P. (2007). Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France:

- description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J Viral Hepat* 14, 298-303.
- Poma, H.R., Gutiérrez Cacciabue, D., Garcé, B., Gonzo, E.E., & Rajal, V.B. (2012). Towards a rational strategy for monitorin of microbiological quality of ambient wáter. *J Sci Tot Env* 433, 98-109.
- Prado, T., Fumian, T.M, Miagostovich, M.P., & Gaspar, A.M.C. (2012). Monitoring the hepatitisA virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop MedHyg* 106(2), 104–109.
- Pudupakam, R.S., Kenney, S.P., Córdoba, L., Huang, Y.W., Dryman, B.A., Leroith, T., Pierson, F.W., & Meng, X.J. (2011). Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis E virus reveals its involve-ment in the efficiency of viral RNA replication. *J Virol* 85(19):10031–10040.
- Purdy, M.A. & Khudyakov, Y.E. (2011). The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Res* 161, 31–39
- Pujol, F.H., Favorov, M.O., Marcano, T., Esté, J.A., Magris, M., Liprandi, F., Khudyakov, Y.E., Khudyakova, N.S., & Fields, H.A. (1994). Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. *J Med Virol* 42, 234-236.
- Purcell, R.H. & Emerson, S.U. (2008). Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 48, 494–503.
- Rajal, V.B., McSwain, B.S., Thompson, D.E., Leutenegger, C.M., Kildare, B.J., y Wuertz, S. (2007). Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res* 41, 1411–22.
- Rey, J.A., Findor, J.A., Daruich, J.R., Velazco, C.C., Igartua, E.B., Schmee, E., & Kohan, A.I. (1997). Prevalence of IgG anti-HEV in Buenos Aires, a non-endemic area for hepatitis E. *J Travel Med* 4, 100-101.
- Reyes, G.R., Purdy, M.A., Kim, J.P., Luk, K.C., Young, L.M., Fry, K.E., y Bradley, D.W. (1990). Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247, 1335–1339
- Rossi-Tamisier, M., Moal, V., Gerolami, R., y Colson, P. (2013). Discrepancy between anti-hepatitis E virus immunoglobulin G prevalence assessed by two assays in kidney and liver transplant recipients. *J Clin Virol* 56(1), 62–64.
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., Ruggeri, F.M., Sellwood, J., Nasser, A., Sao, M., Nascimento, J., D’Agostino, M., Santos, R., Saiz, J.C., Rzezutka, A., Bosch, A., Girones, R., Carducci, A.L., Muscillo, M., Kovac, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, K.H., Husman,



- A.M., Hernández, M., & van der Poel, W.H.M. (2016). Review Article: Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev* 36, 786–814.
- Sainokami, S., Abe, K., Kumagai, I., Miyasaka, A., Endo, R., Takikawa, Y., Suzuki, K., Mizuo, H., Sugai, Y., Akahane, Y., Koizumi, Y., Yajima, Y., & Okamoto, H. (2004). Epidemiological and clinical study of sporadic acute hepatitis E caused by indigenous strains of hepatitis E virus in Japan compared with acute hepatitis A. *J Gastroenterol* 39, 640-648.
- Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Erker, J.C., Kwo, P.Y., Knigge, M.F., Smalley, D.L., Rosenblatt, J.E., Desai, S.M., & Mushahwar, I.K. (1998). The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 79, 447-456.
- SIB Swiss Institute of Bioinformatics (2008-2017). Viral zone, Switzerland. [http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/41.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/41.html)
- Smith, D.B., Purdy, M.A., y Simmonds P. (2013). Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J. Virol.* 87, 4161–4169.
- Smith, D.B., Simmonds, P., International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, Jameel, S., Emerson, S.U., Harrison, T.J., Meng, X.J., Okamoto, H., Van der Poel, W.H., & Purdy, M.A. (2014). Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol* 95 (10), 2223-2232.
- Smith, D.B., Simmonds, P., Izopet, J., Oliveira-Filho, E.F., Ulrich, R.G., Johne, R., Koenig, M., Jameel, S., Harrison, T.J., Meng, X., Okamoto, H., Van der Poel, W.H.M., y Purdy, M.A. (2016). Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol* 97, 537–542.
- Tam, A.W., Smith, M.M., Guerra, M.E., Huang, C.C., Bradley, D.W., Fry, K.E., y Reyes, G.R. (1991). Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185, 120–131.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.
- Tang, X., Yang, C., Gu, Y., Song, C., Zhang, X., Wang, Y., Zhang, J., Hew, C.L., Li, S., Xia, N., & Sivaraman, J. (2011). Structural basis for the neutralization and genotype specificity of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 10266–10271.
- Teo, C.G. (2009). Hepatitis E. In: Brunette GW, Kozarsky P, Magill AJ, Shliml DR, Whatley AD, editors. CDC Health Information for International Travel 2010. St Louis, MO: Mosby; 335–337.
- Teshale, E.H., Hu, D.J., & Holmberg, S.D. (2010). The two faces of hepatitis E virus. *Clin Infect Dis* 51, 328–334.

- Van den Berg, H., Lodder, W., van der Poel, W., Vennema, H., & de Roda Husman, A.M. (2005). Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res Microbiol* 156, 532–540.
- Vieira, C.B., de Abreu Correa, A., de Jesus, M.S., Luz, S.L., Wyn-Jones, P., Kay, D., Vargha, M., & Miagostovich, M.P. (2016). Viruses Surveillance Under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. *Food Environ Virol* 8(1), 57-69.
- Vollmer, T., Diekmann, J., Eberhardt, M., Knabbe, C., & Dreier, J. (2016). Hepatitis E in blood donors: investigation of the natural course of asymptomatic infection, Germany, 2011. *Euro Surveill* 21(35), 30332.
- Wang, Y., Ling, R., Erker, J.C., Zhang, H., Li, H., Desai, S., Mushahwar, I.K., & Harrison, T.J. (1999). A divergent genotype of HEV in chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 8, 169-177.
- Wichmann, O.1, Schimanski, S., Koch, J., Kohler, M., Rothe, C., Plentz, A., Jilg, W., & Stark, K. (2008). Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis* 198, 1732-1741.
- Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D’Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Höller, C., de Roda Husman A.M., Kay, D., Kozyra, I., López-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M.S., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk, R., & Wyer, M. (2011). Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res* 45, 1025–1038.
- Wong, D.C., Purcell, R.H., Sreenivasan, M.A., Prasad, S.R., & Pavri, K.M. (1980). Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for non-A, non-B hepatitis virus an etiology. *Lancet* 2, 876-879.
- World Health Organization (1979). Report of WHO Scientific Group. Human viruses in water, wastewater and soil. Technical Report series nº 639. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Xing, L., Li, T.C., Mayazaki, N., Simon, M.N., Wall, J.S., Moore, M., Wang, C.Y., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T., & Cheng, R.H. (2010). Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J Biol Chem* 285, 33175–33183.
- Xing, L., Wang, J.C., Li, T.C., Yasutomi, Y., Lara, J., Khudyakov, Y., Schofield, D., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Takeda, N., Miyamura, T., & Cheng, R.H. (2011). Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J Virol* 85, 1117–1124.
- Yamada, K., Takahashi, M., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Nagashima, S., Tanaka, T., & Okamoto, H. (2009). ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 90, 1880–1891.

- Yamashita, T., Mori, Y., Miyazaki, N., Cheng, R.H., Yoshimura, M., Unno, H., Shima, R., Moriishi, K., Tsukihara, T., Li, T.C., Takeda, N., Miyamura, T., & Matsuura, Y. (2009). Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 12986–12991.
- Yanez, L.A., Lucero, N.S., Barril, P.A., Díaz Mdel, P., Tenaglia, M.M., Spinsanti, L.I., Nates, S.V., Isa, M.B., & Ré V.E. (2014). Evidence of Hepatitis A virus circulation in central Argentina: Seroprevalence and environmental surveillance. *J Clin Virol* 59, 38– 43.
- Yarbough, P.O., Tam, A.W., Fry, K.E., Krawczynski, K., McCaustland, K.A., Bradley, D.W., & Reyes, G.R. (1991). Hepatitis E virus: identification of type common epitopes. *J Virol* 65, 5790–5797
- Zhang, S., Wang, J., Yuan, Q., Ge, S., Zhang, J., Xia, N., & Tian, D. (2011). Clinical characteristics and risk factors of sporadic hepatitis E in central China. *Virol J* 8, 152.