

Nuevos conceptos sobre el virus de la hepatitis E y su importancia creciente en los países desarrollados

Manuel Rodríguez-Iglesias¹
María T. Pérez-Gracia²

¹Laboratorio Microbiología Hospital Universitario de Puerto Real. Universidad de Cádiz
²Dpto. Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal. Universidad Cardenal Herrera-CEU. Valencia

Correspondencia:
Manuel Rodríguez-Iglesias
Laboratorio Microbiología.
Hospital Universitario de Puerto Real.
Universidad de Cádiz.
Ctra. Nacional IV Km. 665.
11510 Puerto Real (Cádiz)
E-mail:
manuel.rodriguez Iglesias
@uca.es

Resumen

La hepatitis E ha sido considerada desde su primera descripción como una enfermedad de origen con un patrón epidemiológico vinculado al consumo de aguas y alimentos contaminados, de modo similar a la hepatitis A, y con una prevalencia superior en zonas geográficas con condiciones socio-sanitarias deficientes. La introducción de técnicas moleculares han aportado los datos necesarios para demostrar que en los países desarrollados la infección por el virus de la hepatitis E es frecuente, tiene carácter autóctono y un patrón epidemiológico distinto, asociándose al contacto de animales domésticos, especialmente el cerdo. La consideración de la hepatitis E en los países desarrollados como una zoonosis supone un giro conceptual interesante que hace necesario revisar esta entidad clínica desde una perspectiva distinta a la que se venía utilizando.

Palabras clave: Hepatitis E. VHE. Zoonosis. Revisión.

Abstract

The hepatitis E has been considered from his first description as a disease with a epidemiologic pattern related to waste water and contaminated foods, of way similar to the hepatitis A, and with a superior prevalence in geographic zones with deficient socioeconomic conditions. The introduction of molecular techniques has contributed to obtain the data necessary to demonstrate that in the developed countries the infection by the virus of the hepatitis E is frequent, has autochthonous origin and a different epidemiologic pattern, being associated to the domestic animal contacts, specially pigs. The consideration of the hepatitis E in the developed countries as a zoonosis supposes an interesting conceptual turn that it does necessary to review this clinical disease from a perspective different from which came using.

Key words: Hepatitis E. HEV. Zoonosis. Review.

Introducción

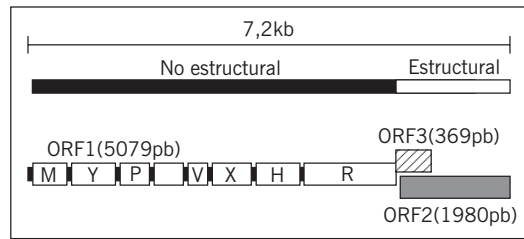
La hepatitis E es una infección vírica definida epidemiológicamente como de transmisión entérica, de

forma similar a como ocurre con la hepatitis A. Este concepto se apoya en los estudios realizados en países donde esta enfermedad se desarrolla en forma de brotes epidémicos, a veces muy importantes, y se relaciona de forma sistemática con la existencia de condiciones higiénico sanitarias deficientes. Los países desarrollados parecían estar al margen de esta infección con la excepción de los casos que, de forma esporádica, se describían en personas procedentes de regiones endémicas. Así, se consideraba como una de tantas enfermedades ligadas a la pobreza de países tropicales y subtropicales. La utilización combinada de técnicas serológicas y moleculares ha permitido comprobar una incidencia y prevalencia muy superiores a las previstas en los países desarrollados, encontrando su justificación en la posible existencia de un reservorio zoonótico entre los animales domésticos. De este modo se ha demostrado la infección del ganado porcino y su posible relación con los casos en humanos. El motivo de esta revisión está fundamentado en describir nuevos avances en el conocimiento del virus y de la enfermedad que pueden tener una trascendencia notable desde el punto de vista epidemiológico y sanitario.

El virus

El VHE es un virus ARN, cúbico con simetría icosaédrica, no envuelto y de aproximadamente 32-34 nm de diámetro. El genoma vírico se ha clonado y secuenciado a partir de fragmentos de VHE aislados en pacientes procedentes de diferentes zonas geográficas y muestran un alto grado de conservación genómica, tanto en nucleótidos como en aminoácidos¹⁻⁵. El genoma es ARN monocatenario de polaridad positiva, con un tamaño de 7,2 Kb, y con 3 regiones de lectura abierta (ORFs)¹ (Figura 1). EL ORF1 (5 Kb) está localizado en la región 5', codifica la poliproteína no estructural (nsP) que incluye

Figura 1.
Genoma del virus
de la hepatitis E (VHE)



ORF: fragmento de lectura abierto; M: metiltransferasa; Y: dominio Y; P: proteína similar a la papaína; V: dominio hinge rico en prolina; X: dominio X; H: ARN helicasa; R: ARN-polimerasa ARN -dependiente

Tabla 1.
Genotipos del virus
de la hepatitis E

Genotipo	Grupo	Aislados de referencia
I	1	Burma China/Taiwan1,2,3,4 Pakistán India
II	2	México Nigeria
III	3	Estados Unidos1 Estados Unidos2 Estados Unidos porcina1
	4	Nueva Zelanda porcina1 Italia1
	5	España porcina España1 España2 Grecia1
IV	6	Grecia2
	7	Austria1 Argentina1 Argentina2
IV	8	China/TaiwanCt1
	9	China/TaiwanCs15

una metiltransferasa, una proteasa, una ARN helicasa y una ARN polimerasa-ARN dependiente, junto a otros dominios de función desconocida; el ORF2 (2 Kb) está localizado en la zona 3', codifica la proteína mayor de la cápside vírica (72 Kd) y el ORF3, la más pequeña, que se solapa con los ORF1 y ORF2, codifica una fosfoproteína muy pequeña (123 aa) asociada al citoesqueleto. Los tres ORFs se expresan durante la infección vírica ya que se han encontrado anticuerpos frente a ellos en humanos infectados y en animales experimentalmente infectados^{5,6}. El ARN también contiene regiones cortas que no se traducen (UTRs) en el extremo 5' y 3' de 26 y 68 nucleótidos, respectivamente⁷.

Clasificación y filogenia del VHE

El VHE no ha sido clasificado de forma definitiva en ninguna familia. En un principio y basándose en la similitud morfológica con el agente de Norwalk, se incluyó en la Fam. *Caliciviridae* como un género separado, sin embargo los genomas de ambos virus son diferentes.

El análisis de las regiones de la ARN helicasa (Hel), de la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) y de otros virus ARN de polaridad positiva muestra que el VHE forma un grupo distinto filogenéticamente, más parecido al virus de la rubéola (Fam. *Togaviridae*) que a los miembros de la Fam. *Caliciviridae*. Según las últimas recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía Vírica, el VHE se clasifica en una familia diferente llamada "virus HEV-like"^{8,9}.

Recientes publicaciones han propuesto varias clasificaciones en tipos y subtipos de los aislados del VHE¹⁰. Se han realizado comparaciones filogenéticas y análisis de las secuencias nucleotídicas de las regiones estructurales y no estructurales definiendo al menos 9 grupos diferentes a partir de cepas que son utilizadas como referencia, al haber sido parcial o totalmente secuenciadas¹¹. El grupo 1 está representado por el prototipo aislado en Burma y las cepas relacionadas de Asia y Africa. El grupo 2 incluye al prototipo "mexicano" y varias cepas aisladas en Nigeria. En el grupo 3 se engloban cepas aisladas en Estados Unidos a partir de humanos que se relacionan con aislamientos porcinos. El grupo 4 está formado por cepas aisladas en Italia, similares a cepas porcinas obtenidas en Nueva Zelanda. El grupo 5 lo forman cepas aisladas en Grecia y España, éstas últimas a partir de humanos y de aguas fecales de mataderos, presumiblemente de origen porcino. El grupo 6 contiene otras cepas aisladas en Grecia mientras que el grupo 7 lo incluye cepas procedentes de Argentina y Austria. Los aislamientos de China, Ct 1 y Cs 15, representan los grupos 8 y 9, respectivamente (Tabla 1).

Alternativamente, la distribución de todos estos aislados del VHE podrían definirse en 4 genotipos mayores. El genotipo I corresponde al grupo 1. El genotipo II incluye al grupo 2. El genotipo III englobaría los grupos 3, 4, 5, 6 y 7. Y por último en el genotipo IV estarían los grupos 8 y 9. Los genotipos III, IV y posiblemente el II contendrían aislados con un amplio grado de diversidad mientras que el genotipo I exhibiría muy baja diversidad.

Replicación y Expresión del genoma del VHE

Se ha propuesto un modelo general de replicación y expresión génica del VHE, basado en las similitudes y en la homología de secuencias con otros virus ARN de polaridad positiva perfectamente caracterizados¹².

El proceso sería el siguiente, una vez que el virus penetra en la célula permisiva, el ARN vírico se traduce en el citoplasma de las células infectadas produciendo la poliproteína no estructural (nsP) codificada por el ORF1. Esta poliproteína contiene la replicasa vírica que estaría implicada en la síntesis de intermediarios replicativos de polaridad negativa a partir de la cadena genómica positiva. Estos intermediarios, en analogía con los alphavirus, actúan como molde para la síntesis de copias adicionales de las cadenas genómicas así como de cadenas positivas subgenómicas. Esas cadenas subgenómicas de ARN-VHE pueden ser traducidas en proteínas estructurales en los estadios tardíos de la replicación vírica. Las proteínas estructurales que forman la cápside engloban una copia del genoma vírico para formar una partícula vírica.

En macacos infectados experimentalmente con el VHE, se ha observado la presencia de un VHE genómico (= 7,5 kb) y dos ARNs subgenómicos (3,7 kb y 2 kb)⁷.

Epidemiología

La hepatitis E se ha considerado tradicionalmente, junto a la hepatitis A, como una de las hepatitis de transmisión feco-hídrica. Con este patrón epidemiológico se reconoce en los países en vías de desarrollo, donde puede ocasionar epidemias, a veces muy importantes, relacionadas con el consumo de agua contaminada. Sin embargo, el concepto de la enfermedad en los países templados y desarrollados está cambiando, pasando de ser considerada como una patología importada de regiones endémicas, preferentemente por viajeros a estas regiones, a definirla como una infección que podría tener un reservorio animal y un nivel de incidencia mucho más elevado de lo que pudiera parecer por el número de casos sintomáticos.

La infección por el VHE es endémica en el centro y sudeste de Asia. Varias epidemias de hepatitis E se han producido en Oriente medio, norte y oeste de África y en Norteamérica (México)¹³. En el resto del mundo, la infección por el VHE se considera poco

frecuente y se describe como restringida a personas que han viajado a zonas donde la enfermedad es endémica. Las epidemias de hepatitis E son de larga duración, afectando desde cientos a miles de personas y varían desde brotes agudos a epidemias prolongadas que pueden durar hasta más de 1 año^{14,15}. Durante estas epidemias, la proporción de población afectada varía desde un 1% a un 15%, siendo más frecuente los casos entre adultos (3%-30%) que entre niños (0,25% al 10%)^{15,16}. Estas cifras pueden indicar que los niños presentan con mayor frecuencia infecciones anictéricas y/o subclínicas. En cuanto a sexo, los varones están más frecuentemente afectados. Las epidemias descritas han presentado una alta proporción de mortalidad entre embarazadas (alrededor del 25%)^{17,15}.

La vía fecal-oral es el modelo predominante de transmisión de la infección VHE epidémica. La mayoría de las epidemias ocurridas se han relacionado con el consumo de aguas contaminadas con materia fecal^{15,18,19}. Frecuentemente las epidemias van precedidas de fuertes lluvias e inundaciones que contaminan las fuentes de agua de bebida¹⁸.

Durante las epidemias de hepatitis E, la transmisión de persona a persona del VHE es poco frecuente²⁰⁻²². De hecho, la proporción de casos de hepatitis E en miembros de una misma familia es del 0,7%-2,2%, a diferencia de lo que ocurre con el VHA, que es del 50%-75%. Incluso cuando ocurren múltiples casos entre miembros de una misma familia, casi siempre están relacionados con una fuente común de agua contaminada más que con una diseminación de persona a persona^{18,15}. Las diferencias en los patrones de transmisión del VHA y VHE parece que están relacionados con los diferentes títulos víricos en heces de las personas infectadas y con el reservorio²³.

La hepatitis E esporádica se observa en países donde no se han producido epidemias²⁴⁻²⁸. En estas regiones, la enfermedad representa alrededor del 1% de los casos informados de hepatitis vírica aguda y se asociaban con viajes a zonas endémicas²⁹, aunque cada vez son más frecuentes aquellos casos que no tienen historia de viajes³⁰⁻³⁵.

Recientes datos sugieren que la hepatitis E puede ser una zoonosis³⁶. En países industrializados, donde la hepatitis E no es endémica, se ha detectado una población con anticuerpos anti-VHE^{35,37,38}. Esto ha conducido a hipotetizar que deben existir uno o varios reservorios animales para el VHE³⁹. El aislamiento del virus de la hepatitis E en ganado porcino de Estados Unidos y su estrecha relación genética con otras cepas aisladas en humanos de la misma región^{40,41} permiten continuar con esta hipótesis. En

España, Pina *et al.*⁴² han realizado la identificación genética de nuevos aislados del VHE a partir de suero de pacientes y de muestras de aguas residuales procedentes de mataderos. Los dos aislados VHE procedentes de humanos mostraron entre sí una identidad del 93,4% en la secuencia nucleotídica comparándose 304 pb de la región ORF2 y un 92,7% de identidad en 371 pb de la región ORF1. La cepa obtenida de muestras de aguas contaminadas con materia fecal en un matadero donde se sacrificaban preferentemente cerdos presentaba una homología del 92,1% y del 94% en la región ORF2 con los dos aislamientos humanos. Esta cepa porcina española presenta una homología en la región ORF2 del 85,5% con las cepas porcinas de EE.UU. Asimismo en este mismo estudio encontraron anticuerpos frente al VHE en el 25% de los sueros porcinos estudiados.

Otros estudios han detectado anticuerpos frente al VHE en cerdos procedentes de países en vías de desarrollo como Nepal^{43,44} y Tailandia⁴⁵ y en países industrializados como EEUU⁴⁰, Canadá, Corea¹¹, Taiwan⁴⁶, Australia⁴⁷ y Nueva Zelanda⁴⁸. También se ha realizado la detección de anti-VHE en otros animales como ratas⁴⁹⁻⁵¹, perros, ovejas, cabras y vacas⁵². Estos datos serológicos sugieren que ciertas especies animales están expuestas al VHE (o un agente relacionado) aunque no se conozcan en profundidad los detalles epidemiológicos de la infección.

La explicación a la variabilidad genética detectada en el VHE puede deberse a que este virus sea de origen animal. Una hipótesis que se baraja sería que los animales domésticos o de granja posean sus propias variantes de VHE genéticamente distintas y que son enzoóticas en cada una de las especies animales dentro de la misma zona geográfica. Ocasionalmente, estos VHE animales pueden infectar al hombre por el contacto con animales infectados y causar casos esporádicos de hepatitis E aguda, ya que son virus que no están tan bien adaptados a la replicación en el hombre como las variantes endémicas o epidémicas. Si esta hipótesis es correcta, las áreas geográficas y las especies animales a partir de las cuales el virus proviene, determinarán el genotipo presente en los casos esporádicos de hepatitis E aguda. Esto será importante para comprobar si hay diferencias fundamentales en el rango del huésped o patogenicidad entre las variantes de VHE humanas que circulan de forma epidémica o endémica y las variantes animales enzoóticas.

Se ha demostrado experimentalmente que el VHE puede atravesar la barrera de la especie. Así se han infectado primates con el VHE porcino, y cerdos, corderos y ratas con el VHE humano^{41,53,54}. Los cer-

dos inoculados con el aislado VHE humano americano rápidamente fueron virémicos y seroconvirtieron, sugiriendo que esta variante está perfectamente adaptada en el cerdo y quizás su origen sea realmente porcino.

Todos estos estudios demostrando que el VHE es capaz de atravesar la barrera interespecie suscita un importante problema en Salud Pública, en el que se ven implicados aquellas personas que trabajan con cerdos y que presentarían un alto riesgo de padecer la infección por el VHE. Se han publicado diferentes estudios en los que se demuestra una elevada prevalencia de anti-VHE en personas que tenían una exposición ocupacional con cerdos⁵⁵⁻⁵⁷.

La utilización de tejidos y órganos animales como xenotrasplante, si se confirma la posibilidad de que el VHE se transmita del cerdo al hombre, puede ser un problema a tener en cuenta y se debería considerar a este virus como un agente xenogénico potencial⁵⁸.

Diagnóstico de laboratorio

Las pruebas de laboratorio utilizadas para el diagnóstico de la infección por VHE incluyen técnicas moleculares e inmunomicroscopía electrónica que detectan el virus en heces y/o suero, y pruebas serológicas para la identificación de anticuerpos anti-VHE de clase IgM e IgG.

El ARN del VHE se detecta en heces mediante RT-PCR⁵⁹⁻⁶¹, una semana antes del inicio de la enfermedad y persiste durante 2 semanas más tarde⁶² aunque en algunos casos se ha detectado 52 días después del inicio de la enfermedad⁶³. El ARN-VHE se ha encontrado en suero en todos los pacientes en las primeras 2 semanas después del inicio de la enfermedad⁶⁴ siendo el rango de positividad de 4 a 16 semanas^{63,65}.

La detección de partículas víricas en heces por inmunomicroscopía electrónica es muy laboriosa y poco sensible por lo que no se utiliza en el diagnóstico rutinario por su baja rentabilidad^{66,67}. El Ag-VHE se ha detectado en tejido hepático sólo en estudios experimentales en primates⁶⁸. El diagnóstico serológico de la infección por VHE suele realizarse mediante ensayo de inmunoenzima (EIA)^{69,70,71}. Los antígenos utilizados en estos ensayos son proteínas recombinantes o péptidos sintéticos del VHE que se corresponden con epítomos inmunodominantes de proteínas estructurales del VHE (ORF2 y ORF3) correspondientes a las cepas, Burma y México⁷².

Durante la infección aguda por el VHE, los anticuerpos de clase IgM preceden a las IgG por unos pocos días, aparecen en el inicio de la enfermedad clínica y van disminuyendo hasta desaparecer transcurridos 4-5 meses. La respuesta IgG aparece después de las IgM y su título se va incrementando desde la fase aguda hasta la fase de convalecencia, permaneciendo elevadas desde 1 a 4 años y medio después de la fase aguda de la enfermedad^{73,74}. Por ello la determinación de los anticuerpos de clase IgM es útil para el diagnóstico de infección aguda, mientras que la presencia de IgG indica infección por el VHE, pero no implica que ésta sea reciente.

En países desarrollados de Europa y Norteamérica, el 1%-5% de la población presenta anticuerpos anti-VHE^{74,32,75,76}. Esta prevalencia es elevada cuando se compara con la baja tasa de incidencia de hepatitis E en estas zonas. Sin embargo, un estudio reciente en el que se utilizaban dos pruebas serológicas diferentes para estimar la prevalencia de anti-VHE, se observó una concordancia entre estas dos pruebas de sólo un 27%³⁷. Por tanto, no está claro si la seroreactividad en áreas no endémicas refleja infecciones VHE subclínicas y/o anictéricas, reacción cruzada con otros agentes, falsos positivos, o una combinación de todos estos factores. Es posible también que esa elevada prevalencia de anti-VHE entre individuos sanos en los EEUU se relacione con una infección subclínica por la variante VHE porcina.

Diversos métodos de EIAs utilizados en el diagnóstico de rutina han sido comparados utilizando un panel de muestras séricas codificadas⁷⁷. Este estudio ha demostrado que la sensibilidad variaba enormemente (entre 17% y 100%) y la concordancia entre las muestras que eran positivas variaba desde el 0% al 89% (media del 32%). Los antígenos utilizados eran péptidos sintéticos o proteínas recombinantes del VHE que diferían en longitud, en la parte del genoma que las codifica y la variante cadena de VHE con la que se corresponde. Este estudio concluye indicando que los EIA para la detección de anti-VHE son válidos cuando se aplican en pacientes con hepatitis aguda, sobre todo en áreas endémicas, mientras que la utilización de estas pruebas en estudios de seroprevalencia es cuestionable.

Conclusiones

En los últimos años se han generado importantes avances en el conocimiento de la infección por el virus de la hepatitis E que han permitido abrir nuevas perspectivas en el concepto de la enfermedad y

que deben repercutir sobre los mecanismos de prevención y control. Frente a la hepatitis E de naturaleza endémica, ligada en ciertos países a condiciones de insalubridad y pobreza, se abre la necesidad de delimitar el hallazgo que supone encontrar esta infección en países caracterizados por su alto nivel de desarrollo social y sanitario. La detección de un reservorio zoonótico en animales estrechamente relacionados con el hombre, especialmente ganado porcino, precisa definir la importancia del mismo en la epidemiología de la enfermedad. Los avances en las tecnologías moleculares permiten estudiar filogenéticamente las características genotípicas de las cepas aisladas, permitiendo su comparación según su procedencia geográfica y el huésped del cual ha sido obtenida. De este modo podemos observar como las cepas pueden mantener una agrupación geográfica bastante definida, no siendo tan discriminativa la especie del huésped. Por ejemplo, las cepas de VHE aisladas en Estados Unidos son muy semejantes entre sí, al margen de haber sido aisladas en humanos o en cerdos y, de forma aún más interesante, existe una mayor frecuencia de aislamiento en humanos relacionados con cerdos. Esta posibilidad de traspasar la frontera de especie por parte del virus implica el reconocimiento de la hepatitis E como una zoonosis de interés sanitario evidente.

En los próximos años será preciso estudiar en profundidad la capacidad adaptativa del virus al hombre y su potencial transmisibilidad desde el reservorio animal. Los métodos de prevención de la enfermedad no deben quedar limitados a un incremento en las medidas de control sanitario de aguas y se tendrán que instaurar acciones específicas sobre el reservorio animal. La vacunación podría ser una medida eficaz en el control de esta enfermedad pero sería necesario que los ensayos experimentales tuvieran resultado positivo.

Bibliografía

1. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, *et al.* Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185:120-31.
2. Huang CC, Nguyen D, Fernandez J, Yun KY, Fry KE, Bradley DW, *et al.* Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 1992;191:550-58.
3. Tsarev SA, Emerson SU, Reyes GR, Tsareva TS, Legters LJ, Malik IA *et al.* Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:559-63.

4. Aye TT, Uchida T, Ma XZ, Iida F, Shikata T, Zhuang H, *et al.* Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res* 1992;20:3512.
5. Panda SK, Nanda SK, Zafrullah M, Ansari IH, Ozdener MH, Jameel S. An Indian strain of hepatitis E virus (HEV): cloning, sequence, and expression of structural region and antibody responses in sera from individuals from an area of high-level HEV endemicity. *J Clin Microbiol* 1995;33:2653-59.
6. Khudyakov YE, Favorov MO, Khudyakova NS, Cong ME, Holloway BP, Padhye N, *et al.* Artificial mosaic protein containing antigenic epitopes of hepatitis E virus. *J Virol* 1994;68:7067-74.
7. Tam AW, White R, Reed E, Short M, Zhang Y, Fuerst TR, *et al.* In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo- infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 1996;215:1-9.
8. Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, *et al.* Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000;181Suppl2:S322-S30.
9. Berke T, Matson DO. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* 2000;145:1421-36.
10. Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 2001;65:282-92.
11. Wang YC, Zhang HY, Xia NS, Peng G, Lan HY, Zhuang H, *et al.* Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol* 2002;67:516-21.
12. Reyes GR, Huang CC, Tam AW, Purdy MA. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch Virol Suppl* 1993;7:15-25.
13. Krawczynski K. Hepatitis E. *Hepatology* 1993;17:932-41.
14. Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, Uchida T, *et al.* Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 1997;71:7207-13.
15. Naik SR, Aggarwal R, Salunke PN, Mehrotra NN. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull World Health Organ* 1992;70:597-604.
16. Tsege E, Hansson BG, Krawczynski K, Nordenfelt E. Acute sporadic viral hepatitis in Ethiopia: causes, risk factors, and effects on pregnancy. *Clin Infect Dis* 1992;14:961-65.
17. Kumar RM, Uduman S, Rana S, Kochiyil JK, Usmani A, Thomas L. Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;100:9-15.
18. Bile K, Isse A, Mohamud O, Allebeck P, Nilsson L, Norder H, *et al.* Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:466-74.
19. Rab MA, Bile MK, Mubarak MM, Asghar H, Sami Z, Siddiqi S, *et al.* Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan: a common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:151-57.
20. Aggarwal R, Naik SR. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J Hepatol* 1994;21:718-23.
21. Arankalle VA, Chadha MS, Mehendale SM, Tungatkar SP. Epidemic hepatitis E: serological evidence for lack of intrafamilial spread. *Indian J Gastroenterol* 2000;19:24-8.
22. Singh V, Singh V, Raje M, Nain CK, Singh K. Routes of transmission in the hepatitis E epidemic of Saharanpur. *Trop Gastroenterol* 1998;19:107-09.
23. Murhekar MV, Sehgal SC, Murhekar KM, Padbhidri SP, Chitambar SD, Arankalle VA. Changing scenario of hepatitis A virus and hepatitis E virus exposure among the primitive tribes of Andaman and Nicobar Islands, India over the 10-year period 1989-99. *J Viral Hepat* 2002;9:315-21.
24. Coursaget P, Depril N, Yenen OS, Cavuslu S, Badur S. Hepatitis E virus infection in Turkey. *Lancet* 1993;342:810-11.
25. el Zimaity DM, Hyams KC, Imam IZ, Watts DM, Bassily S, Naffea EK, *et al.* Acute sporadic hepatitis E in an Egyptian pediatric population. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:372-76.
26. Lok AS, Kwan WK, Moeckli R, Yarbough PO, Chan RT, Reyes GR, *et al.* Seroepidemiological survey of hepatitis E in Hong Kong by recombinant-based enzyme immunoassays. *Lancet* 1992;340:1205-08.
27. Goldsmith R, Yarbough PO, Reyes GR, Fry KE, Gabor KA, Kamel M, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children. *Lancet* 1992;339:328-31.
28. Pillot J, Lazizi Y, Diallo Y, Leguenno B. Frequent sporadic hepatitis E in west Africa evidenced by characterization of a virus-associated antigen in the stool. *J Hepatol* 1992;15:420-21.
29. Skaug K, Hagen IJ, von der LB. Three cases of acute hepatitis E virus infection imported into Norway. *Scand J Infect Dis* 1994;26:137-39.
30. Heath TC, Burrow JN, Currie BJ, Bowden FJ, Fisher DA, Demediuk BH, *et al.* Locally acquired hepatitis E in the Northern Territory of Australia. *Med J Aust* 1995;162:318-19.
31. Sallie R, Silva AE, Purdy M, Smith H, McCaustland K, Tibbs C, *et al.* Hepatitis C and E in non-A non-B fulminant hepatic failure: a polymerase chain reaction and serological study. *J Hepatol* 1994;20:580-88.

32. Zanetti AR, Dawson GJ. Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E *J Med Virol* 1994;42:318-20.
33. Tassopoulos NC, Krawczynski K, Hatzakis A, Katsoulidou A, Delladetsima I, Koutelou MG, *et al.* Case report: role of hepatitis E virus in the etiology of community-acquired non-A, non-B hepatitis in Greece. *J Med Virol* 1994;42:124-28.
34. Chapman BA, Burt MJ, Wilkinson ID, Schousboe MI. Community acquired viral hepatitis in New Zealand: a case of sporadic hepatitis E virus infection. *Aust N Z J Med* 1993;23:722-23.
35. McCrudden R, O'Connell S, Farrant T, Beaton S, Iredale JP, Fine D. Sporadic acute hepatitis E in the united kingdom: an underdiagnosed phenomenon? *Gut* 2000; 46:732-33.
36. Skidmore S. Overview of Hepatitis E Virus. *Curr Infect Dis Rep* 2002;4:118-23.
37. Mast EE, Kuramoto IK, Favorov MO, Schoening VR, Burkholder BT, Shapiro CN, *et al.* Prevalence of and risk factors for antibody to hepatitis E virus seroreactivity among blood donors in Northern California. *J Infect Dis* 1997;176:34-40.
38. Thomas DL, Yarbough PO, Vlahov D, Tsarev SA, Nelson KE, Saah AJ, *et al.* Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J Clin Microbiol* 1997;35:1244-47.
39. Piper-Jenks N, Horowitz HW, Schwartz E. Risk of hepatitis E infection to travelers. *J Travel Med* 2000;7:194-9.
40. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, *et al.* A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9860-65.
41. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, *et al.* Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 1998;72:9714-21.
42. Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 2000;33:826-33.
43. Clayson ET, Innis BL, Myint KS, Narupiti S, Vaughn DW, Giri S, *et al.* Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 1995;53:228-32.
44. Meng XJ, Dea S, Engle RE, Friendship R, Lyoo YS, Sirinarumit T, *et al.* Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* 1999;59:297-302.
45. Hsieh SY, Meng XJ, Wu YH, Liu ST, Tam AW, Lin DY, *et al.* Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 1999;37: 3828-34.
46. Wu JC, Chen CM, Chiang TY, Sheen IJ, Chen JY, Tsai WH, *et al.* Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J Med Virol* 2000; 60:166-71.
47. Chandler JD, Riddell MA, Li F, Love RJ, Anderson DA. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol* 1999;68:95-105.
48. Garkavenko O, Obriadina A, Meng J, Anderson DA, Benard HJ, Schroeder BA, *et al.* Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* 2001;65:525-29.
49. Kabrane-Lazizi Y, Fine JB, Elm J, Glass GE, Higa H, Diwan A, *et al.* Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:331-5.
50. Haqshenas G, Huang FF, Fenaux M, Guenette DK, Pierson FW, Larsen CT, *et al.* The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J Gen Virol* 2002;83:2201-09.
51. Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* 2001;82: 2449-62.
52. Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM, Gandhe SS, Chobe LP, Rautmare SS, *et al.* Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat* 2001;8:223-7.
53. Usmanov RK, Balaian MS, Dvoynikova OV, Alymbaeva DB, Zamiatina NA, Kazachkov I, *et al.* An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus. *Vopr Virusol* 1994;39:165-8.
54. Maneerat Y, Clayson ET, Myint KS, Young GD, Innis BL. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol* 1996;48:121-8.
55. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A, *et al.* Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 2001;184:1594-7.
56. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 2002;40:117-22.
57. Withers MR, Correa MT, Morrow M, Stebbins ME, Seriwatana J, Webster WD, *et al.* Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:384-8.
58. Yoo D, Giulivi A. Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can J Vet Res* 2000;64:193-203.

59. Chobe LP, Chadha MS, Banerjee K, Arankalle VA. Detection of HEV RNA in faeces, by RT-PCR during the epidemics of hepatitis E in India (1976-1995). *J Viral Hepat* 1997;4:129-33.
60. Aggarwal R, McCaustland KA. Hepatitis E virus RNA detection in serum and feces specimens with the use of microspin columns. *J Virol Methods* 1998;74:209-13.
61. McCaustland KA, Bi S, Purdy MA, Bradley DW. Application of two RNA extraction methods prior to amplification of hepatitis E virus nucleic acid by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991;35:331-42.
62. Ticehurst J, Popkin TJ, Bryan JP, Innis BL, Duncan JF, Ahmed A, *et al.* Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis in Pakistan: serologic responses and pattern of virus excretion. *J Med Virol* 1992;36:84-92.
63. Nanda SK, Ansari IH, Acharya SK, Jameel S, Panda SK. Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 1995;108:225-30.
64. Clayson ET, Myint KS, Snitbhan R, Vaughn DW, Innis BL, Chan L, *et al.* Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J Infect Dis* 1995;172:927-33.
65. Chauhan A, Jameel S, Dilawari JB, Chawla YK, Kaur U, Ganguly NK. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 1993;341:149-50.
66. Humphrey CD, Cook EH, Jr., Bradley DW. Identification of enterically transmitted hepatitis virus particles by solid phase immune electron microscopy. *J Virol Methods* 1990;29:177-88.
67. Krawczynski K, Aggarwal R, Kamili S. Hepatitis E. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14:669-87.
68. Longer CF, Denny SL, Caudill JD, Miele TA, Asher LV, Myint KS, *et al.* Experimental hepatitis E: pathogenesis in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J Infect Dis* 1993;168:602-9.
69. Saeed AA, al Rasheed A, Olewicz G, Yarbough PO. ELISA for diagnosis of acute sporadic hepatitis E. *Lancet* 1992;339:882.
70. Anderson DA, Li F, Riddell M, Howard T, Seow HF, Torresi J, *et al.* ELISA for IgG-class antibody to hepatitis E virus based on a highly conserved, conformational epitope expressed in *Escherichia coli*. *J Virol Methods* 1999;81:131-42.
71. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Kapikian AZ, Ticehurst J, London W, *et al.* ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading frame-2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. *J Infect Dis* 1993;168:369-78.
72. Favorov MO, Khudyakov YE, Mast EE, Yashina TL, Shapiro CN, Khudyakova NS, *et al.* IgM and IgG antibodies to hepatitis E virus (HEV) detected by an enzyme immunoassay based on an HEV-specific artificial recombinant mosaic protein. *J Med Virol* 1996;50:50-58.
73. Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, Yashina TL, Aleksandrov AG, Alter MJ, *et al.* Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol* 1992;36:246-50.
74. Dawson GJ, Chau KH, Cabal CM, Yarbough PO, Reyes GR, Mushahwar IK. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J Virol Methods* 1992;38:175-86.
75. Moaven L, Van Asten M, Crofts N, Locarnini SA. Seroepidemiology of hepatitis E in selected Australian populations. *J Med Virol* 1995;45:326-30.
76. Karenyi YV, Favorov MO, Khudyakova NS, Weiss P, Bar-Shani S, Handsher R *et al.* Serological evidence for hepatitis E virus infection in Israel. *J Med Virol* 1995;45:316-20.
77. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 1998;27:857-61.