

Detección del genotipo 1d del virus de la hepatitis E en pacientes con sospecha de hepatitis viral aguda, Cuba 2013

María Caridad Montalvo-Villalba, Yoandris Castellano- Girones, Marité Bello-Corredor, Licel de los Ángeles Rodríguez-Lay

Departamento de Virología, Subdirección de Microbiología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción. El virus de la hepatitis E (VHE) se transmite, principalmente, por vía fecal-oral y es una de las principales causas de hepatitis viral aguda (HVA) en el mundo. En Cuba, a pesar de que este virus tiene un comportamiento endémico, no se relaciona a este patógeno al presentarse una hepatitis viral de transmisión entérica.

Objetivo. Teniendo en cuenta que el VHE y el virus de la hepatitis A (VHA) comparten rutas de transmisión, nos propusimos estimar la incidencia de ésta infección (VHE), en muestras que se recibieron de todo el país durante el año 2013, cuyo criterio de inclusión fue la indicación médica de IgM anti-VHA.

Materiales y Métodos. Se empleó la RT-PCR específica para el marco abierto de lectura 2 (MAL2), con el propósito de detectar el ARN-VHE en las 422 muestras estudiadas. Los productos amplificados fueron purificados, secuenciados y analizados filogenéticamente con el programa MEGA6.

Resultados. La presencia de ARN-VHE se detectó en 8,53% (36/422) de las muestras estudiadas. El mayor índice de positividad se identificó en la región occidental del país, específicamente en La Habana con 5,45% (23/422). En total se diagnosticaron 5,21% (22/422) muestras positivas

al marcador de IgM VHA; la detección simultánea de marcadores del VHA-VHE fue 13,88% (5/36). Los resultados demuestran una mayor incidencia del VHE con respecto al VHA (8,53% vs 5,21%) y el análisis filogenético mostró la circulación del genotipo 1, subgenotipo 1d del VHE.

Conclusiones. Se corroboró la endemidad del VHE en nuestro país y, por primera vez, se identificó el subgenotipo 1d, variante africana asociada a casos esporádicos y brotes de hepatitis E.

Palabras clave: epidemiología, RT-PCR, VHE, VHA, genotipo.

ABSTRACT

Detection of hepatitis E virus genotype 1d in patients with suspect of acute viral hepatitis in cuba during 2013

Introduction. Hepatitis E virus (HEV) is mainly transmitted by the fecal-oral route and is one of the most important causes of acute viral hepatitis (AVH) around the world. In Cuba, Despite of endemic behavior of HEV in Cuba, its causality is not associated when a picture of enteric acute hepatitis is suspected.

Objective. Taking into account the common transmission route of both HEV and HAV, our aim

Autor para correspondencia: Dra. María Caridad Montalvo-Villalba, Dirección: Autopista Nacional Novia del Mediodía km 61/2 La Lisa. Habana Cuba. E-mail: mcary@ipk.sld.cu

Recibido: el 28 de septiembre de 2015 **Aceptado para publicación:** el 26 de noviembre de 2015

Este documento está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb162724.pdf>

was to estimate the incidence of HEV infection in sera samples received throughout the country during 2013 where the IgM anti-HAV test was required by the Clinician.

Materials and Methods. A specific RT-PCR for open reading frame 2 (ORF2) was used to detect RNA-HEV in 422 sera. The amplified products corresponding to ORF2 were purified, sequenced and phylogenetically analyzed using MEGA6 software program.

Results. RNA-HEV was detected in 8.53% (36/422) of the samples. The highest rate of positivity was identified in the Western region of the country, specifically in Havana 5.45% (23/422). IgM anti-HAV was detected in 5.21% (22/422) and simultaneous detection of both HAV and HEV was found in 13.88% (5/36) of the samples. The results showed a higher incidence of HEV with respect to HAV (8.53% vs 5.21%) and phylogenetic analysis showed the circulation of genotype 1, subgenotype 1d of the HEV.

Conclusions. This study corroborated the endemicity of HEV and for the first time the subgenotype 1d, the African variant strain associated to outbreak of hepatitis E, is reported in viral hepatitis cases in Cuba.

Key words: Epidemiology, RT-PCR, HEV, HAV, genotype

INTRODUCCIÓN

La hepatitis E, causa más del 50% de los casos de hepatitis viral aguda (HVA) en los países endémicos. El espectro clínico de la infección va, desde formas asintomáticas o subclínicas, hasta cuadros graves y severos, principalmente en mujeres embarazadas (2). La enfermedad es autolimitada en personas inmunocompetentes. En pacientes inmunocomprometidos, la infección puede evolucionar a la cronicidad, por lo que se prescribe el tratamiento con antivirales. Si bien, hay varios candidatos vacunales en fase II y III de ensayos clínicos, no existe una vacuna comercialmente disponible para prevenir la

infección por tanto, la profilaxis está encaminada al mejoramiento de las condiciones higiénico-sanitarias (3).

El virus de la hepatitis E (VHE) es el agente causal de la hepatitis E, y su genoma está formado por una simple cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva (4). El VHE pertenece a la familia *Hepeviridae* y según la clasificación taxonómica reciente de Smith *et al.* se ubica en el género *Orthohepevirus A*, en el que se agrupan los aislamientos humanos y zoonóticos (5).

Epidemiológicamente, la hepatitis E se define como un patógeno de transmisión entérica, siendo el consumo de agua y alimentos contaminados su principal vía de propagación. Además, esta enfermedad se comporta como una zoonosis, siendo el cerdo su principal reservorio (4,6).

Para el diagnóstico de este patógeno se emplean técnicas serológicas, como los ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA. Estos permiten detectar anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) específicos contra el VHE (anti-VHE) de tipo M (IgM), las cuales están presentes en la fase aguda de la enfermedad. La identificación del genoma viral (ARN-VHE) como indicador de replicación, es otro método diagnóstico *per se* y, en algunos laboratorios, se emplea para complementar las pruebas serológicas (7,8).

Aunque existe un solo serotipo viral, la variabilidad genética del VHE es amplia, por lo que los aislamientos se han agrupado en genotipos y subgenotipos. Los genotipos humanos se identifican con números del 1 al 4 y los subgenotipos se definen por letras (a-f) (4,9).

La hepatitis viral es considerada la quinta causa de morbilidad por enfermedades infecciosas en Cuba. Los datos epidemiológicos muestran que, el virus de la hepatitis A (VHA), es endémico en nuestro medio ya que, en estudios previos de prevalencia, se demostró que más del 70% de la población tenía Ac anti-VHA (10). De igual forma, en Cuba se identificó la endemicidad

Detección del genotipo 1d del VHE en Cuba

del VHE; no obstante, la mayoría de las epidemias o brotes de HVA han sido positivos al VHA (11). Durante la vigilancia nacional de las hepatitis virales en los años 2010 al 2012 en el Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales (LNRHV) del Instituto de Medicina Tropical (IPK), se detectó que la positividad a la IgM anti-VHA disminuyó considerablemente con respecto a periodos anteriores (25,36%, 2006-2009 vs 6,15%, 2010-2012). Estos hallazgos se obtuvieron en las muestras de pacientes que se recibieron para ser evaluadas exclusivamente por este marcador, ante la sospecha médica de HVA de transmisión entérica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y, dado que el VHE y el VHA comparten rutas de transmisión, nos propusimos, en este trabajo, estimar la incidencia de la infección por el VHE, empleando métodos moleculares, en todas las muestras recibidas en el año 2013 con indicación médica de IgM anti-VHA. El propósito fue dilucidar la incidencia y el impacto de la hepatitis E en la vigilancia y morbilidad por hepatitis viral en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo para estimar la incidencia de la infección por el VHE en muestras recibidas en el LNRHV, durante el 2013. Estos sueros fueron colectados de todo el país, como parte de la vigilancia nacional de las hepatitis virales. Se incluyeron todas las muestras con indicación clínica de IgM anti-VHA; aunque paralelamente se solicitara la determinación adicional de otro marcador de hepatitis viral. En total se evaluaron 422 muestras de suero procedentes de igual número de pacientes, de las cuales 22 fueron positivas al VHA (IgM anti-VHA+). En algunos casos los médicos de asistencia además de indicar la detección de IgM anti-VHA, solicitaban la determinación de otros marcadores de virus hepatótrofos. Por ende, de las 422 muestras estudiadas, en cinco se indicaba la detección del antígeno de superficie del virus

de la hepatitis B (HBsAg), siendo positivas tres de estas. En 96 muestras se indicó el Ac contra el virus de la hepatitis C (anti-VHC), siendo de ellas cuatro positivas a este marcador. Se estudiaron individuos de ambos sexos y diferentes provincias del país; la distribución de las muestras por provincia se relaciona a continuación: 7, Pinar del Río (PR); 276, La Habana (LH); 4, Artemisa (AR); 87, Matanzas (MT); 6, Villa Clara (VC); 11, Sancti Spíritus (SS); 2, Ciego de Ávila (CA); 19, Holguín (HO) y 10 de Santiago de Cuba (SC).
 Detección del ARN-VHE en suero. La extracción del ARN se realizó manualmente, a partir de 200µL de suero, utilizando el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini (Cat. 52906, QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN de la muestra se resuspendió en 30µL de AVE. El mismo proceso de extracción del ácido nucleico se aplicó a los controles negativos y positivos del ensayo. Como controles se emplearon sueros de dos pacientes diagnosticados previamente, como positivos y negativos al ARN-VHE. La transcripción reversa reacción en cadena de la polimerasa (TR-PCR) simple para el MAL2 se realizó en un paso, con el estuche One Step PCR (QIAGEN, Hilden, Alemania). Los cebadores que se emplearon amplificaban la región de la cápside, específicamente los nucleótidos comprendidos desde la posición 6298–6494, según su posición en la cepa de Birmania (Bur82) del VHE. Con este ensayo se amplificó un fragmento de 197 pares de bases (pb) (12).

Para la reacción de secuenciación, se utilizó el estuche GenomeLab DTCS_Quick Start Kit (Beckman Coulter, Ireland, Inc.). La mezcla se preparó en tubos eppendorf de 200µL, en un volumen final de 20µL, que contenía 8µL de DTCS Quick Star Master Mix, cebador para secuencia 2µL (5pmol/µL) y molde de ADN. Este último se dispensó a razón de 2 a 4µL, según la concentración y el tamaño del fragmento a secuenciar. La mezcla se colocó en un termociclador (*Eppendorf Mastercycler*

personal), con el siguiente programa: 40 ciclos de 96°C x 20 seg., 50°C x 20 seg., 60°C x 4 min. Los productos amplificados de la reacción de secuencia fueron precipitados con etanol (Sigma) y luego se resuspendieron en 40µL de solución de carga (formamida); para ser colocados en el secuenciador automático Beckman Coulter (CEQ TM 88000 Genetic Analysis, System Beckman Coulter, EE.UU.).

Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas utilizando el programa ClustalX 2.0 (13). El análisis filogenético se realizó usando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2 parámetro y el método Neighbor Joining para crear el árbol filogenético. Un total de 31 secuencias, correspondientes al MAL2 del VHE, disponibles en el Banco Internacional de genes (GenBank, sitio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), se utilizaron para comparar con las secuencias de la región de la cápside. Para evaluar la similitud de los grupos filogenéticos generados, se realizó un análisis de re-muestreo (*bootstrap*), evaluando estadísticamente 1000 réplicas de los árboles filogenéticos generados por el programa MEGA6 (14).

Se utilizó el paquete estadístico NCSS 2000 PASS 2000 para estimar los porcentajes de prevalencia del ARN-VHE en las muestras estudiadas, con un intervalo de confianza (IC) del 95%. La asociación entre la positividad al ARN-VHE con las variables demográficas y clínica-epidemiológicas, se analizaron empleando estadígrafos descriptivos como frecuencias relativas.

Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética del IPK. Las muestras clínicas fueron tomadas del banco de sueros de la vigilancia y el diagnóstico de las hepatitis virales, correspondiente al año 2013. Los datos sociodemográficos y clínicos que se recogen en los modelos de solicitud de diagnóstico serológico fueron indexados en una base de datos. Los resultados que se obtuvieron de la positividad al

marcador de infección del VHE, se enviaron a los centros de salud de donde procedían las muestras; para que los pacientes fueran informados de la implicación clínica de su estatus al ARN-VHE en el periodo estudiado.

RESULTADOS

Del total de muestras analizadas se detectó una frecuencia relativa de ARN-VHE de 8,53% (36/422) que osciló entre 5,74-11,31%. Al estimar la positividad al VHE por provincias con respecto al total de casos estudiados, se obtuvo por orden de frecuencia un mayor porcentaje de ARN-VHE en la provincia de La Habana, con 5,45% (23/422), seguida por Matanzas con 1,66% (7/422). En Holguín, Pinar del Río, Sancti Spiritus, Santiago de Cuba y Villa Clara la incidencia osciló entre 0,24% y 0,47%. En Artemisa y Ciego de Ávila no se detectaron casos. Al estratificar la incidencia de la hepatitis E según los casos recibidos por provincias (**Figura 1**), el mayor porcentaje se detectó en la provincia de Santiago de Cuba con 20,00% (2/10), Villa Clara 16,67% (1/6) y Pinar del Río 14,28% (1/7). En el resto de las provincias, la frecuencia al marcador de replicación del VHE osciló de 5,26% a 9,09%.

Al analizar la asociación del marcador molecular del VHE con otros marcadores virales (IgM VHA, HBsAg y anti-VHC), se

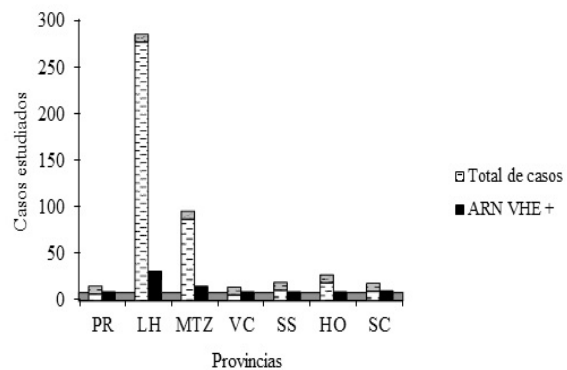


Figura 1. Comportamiento de la positividad al ARN-VHE según los casos recibidos por provincia, 2013

realizar la caracterización genotípica (15, 16). Sin embargo, el ARN-VHE tiene un valor limitado para el diagnóstico de la infección aguda, ya que la viremia que se describe en la historia natural de la enfermedad es transitoria (1-4 semanas) (17).

La prevalencia del VHE que se obtuvo (8,53%) no difiere de otros estudios realizados en Cuba donde se utilizaron marcadores serológicos (anti-VHE), para evaluar la exposición al VHE. En población abierta se encontró una prevalencia de anti-VHE que fluctuó de 5,3% a 10% (10, 18). Estos valores son relativamente similares a los límites inferiores y superiores del IC 95% (5,74-11,31%), obtenido en este estudio. Por el contrario, en una encuesta serológica realizada en un grupo de riesgo, compuesto por trabajadores de granjas porcinas de la provincia de Artemisa, se obtuvieron valores de prevalencia superiores de anti-VHE (35,8%) (19).

Los índices de prevalencia del VHE varían según el patrón endémico de cada región. En zonas endémicas de China, Asia Sudoriental y Central, África y México se reportaron índices de infección por el VHE que van del 7,6% a 20,2%, siendo los adultos jóvenes los más afectados (20). En regiones no endémicas como Rumania, la incidencia anual de hepatitis E fue de 0,35%, en Alemania con 2,1% y en Francia 0,9% (21, 22). En un estudio similar realizado en España en población abierta no se detectaron los marcadores de infección del VHE (23). Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el VHE tiene un comportamiento endémico en nuestro medio, lo que coincide con los datos epidemiológicos del virus publicados en Cuba (10, 18). Otro hallazgo importante, es que se confirma que los métodos serológicos y moleculares, pueden ser utilizados indistintamente para estimar la prevalencia del VHE, ya que los resultados obtenidos no discrepan de otras investigaciones las que se emplearon técnicas serológicas (11, 18).

Los resultados por provincia fueron similares a lo referido por Montalvo (24), que

obtuvo un mayor índice global de positividad al VHE en las provincias de La Habana (12,2%) y Matanzas (8,1%) en el período de 1998 al 2005 (18). La diferencia de la prevalencia del VHE obtenida por provincias, pudiera estar dada por la calidad en la vigilancia de las hepatitis virales que se realiza en cada territorio. Esto es debido a que las provincias con mayor prevalencia del VHE según el total de muestras estudiadas (n=422), tienen el mayor número de muestras enviadas para la detección de IgM anti-VHA. Existen otras causas que no se deben descartar como los factores sociodemográficos o la densidad poblacional; donde la provincia de La Habana ocupa el primer lugar del país con 2932,3 habitantes/km². Otras variables que pudieran influir en los índices de incidencia de la enfermedad por regiones son: las condiciones de urbanización, las fuentes de abasto de agua potable y la disposición de albañales. En este último caso cabe resaltar que cuando no se desarrollan en correspondencia con el número de habitantes, ocurre un aumento en las enfermedades de transmisión fecal-oral (25).

En China, país de alta prevalencia del VHE, la detección de los marcadores de infección del virus fluctuó de 1,6% en la región central del país a 13,9% en Jilin, ciudad ubicada al norte, lo que corrobora las diferencias de incidencias de la enfermedad en un país endémico (26, 27). Aunque se desconoce la prevalencia de esta infección en las 14 provincias de Cuba, los datos obtenidos ponen en evidencia que el VHE circula en todo el país.

En el estudio se detectaron embarazadas positivas al ARN-VHE, las que tuvieron una evolución clínica satisfactoria. La literatura reporta que hasta un 25% de las gestantes, generalmente en el tercer trimestre de embarazo desarrollan formas graves de hepatitis, una vez que se infectan con el VHE (28). No obstante, existen opiniones contradictorias que plantean que en determinadas zonas geográficas el curso de la hepatitis E no difiere entre las mujeres embarazadas de las que no lo están. Por lo que,

Detección del genotipo 1d del VHE en Cuba

se restringe esta alta tasa de mortalidad a algunos países endémicos de Asia y África, haciendo alusión a factores inmunogenéticos (29).

El hallazgo de ARN-VHE en pacientes pediátricos coincide con otros estudios que avalan la exposición al virus en estos grupos etarios, siendo esta característica epidemiológica propia de los países endémicos (11, 18). Con respecto a los niños, en América Latina (Argentina), Munne *et al.* detectaron que el VHE fue el agente etiológico de fallo hepático agudo en infantes (30). En la India un estudio similar realizado en Calcuta arrojó que la hepatitis E fue diagnosticada en el 46,6% de los casos graves y fatales de niños, admitidos en la atención terciaria (31).

Con relación a la detección del VHE como causa de formas graves de HVA en Cuba, este resultado concuerda con lo reportado en países endémicos. En la India, país hiperendémico al VHE, se describieron altas tasas de incidencia de fallo hepático fulminante por esta enfermedad (32). Según algunos autores, factores relacionados con la virulencia de las cepas circulantes del VHE y las características genéticas de la población, podrían justificar las diferencias en la evolución a formas graves y complicadas de hepatitis viral ocasionadas por este virus (33).

Otro aspecto a considerar son las personas seropositivas al VIH, ya que cuando se infectan con el VHE necesitan un seguimiento virológico sistemático y tratamiento antiviral, para prevenir la aparición de hepatitis crónica y cirrosis hepática. Estos cuadros clínicos también suelen presentarse en los sujetos que tienen cierto grado de compromiso inmunológico (34).

Los resultados de la co-detección de los marcadores del VHA-VHE fue mayor que lo reportado por Rodríguez *et al.* (13,88% vs. 10,3%) en población abierta (11). Al comparar con otras zonas endémicas para ambos virus encontramos un 6% y 20% de co-infecciones VHA-VHE en Bangladesh y Singapur respectivamente (35, 36). Como han referido otros autores, los hallazgos

confirman que ambos virus comparten vías similares de transmisión (36), y que a pesar de la baja circulación del VHA en el periodo estudiado, todavía continúan co-circulando el VHA y el VHE.

No se observaron co-infecciones del VHE-VHB o VHE-VHC, a diferencia de Egipto, que es una zona de alta prevalencia de los VHB, VHC y VHE. En este país se reportó una incidencia de co-infecciones VHE-VHB de 56,7% y 52,0% de VHE-VHC (37), lo que sugiere que el diagnóstico de estas co-infecciones depende de la prevalencia existente para estos virus de transmisión parenteral en cada área geográfica.

El análisis filogenético de las muestras secuenciadas arrojó que estas se agruparon en el genotipo 1, específicamente en el subgenotipo 1d, estrechamente relacionadas con los aislamientos de África, identificados en Argelia y Marruecos. La distancia nucleotídica con los aislamientos del VHE del genotipo 1, subgenotipo 1a, que circularon en población cubana en el 2005 fue de 0,13-0,15 (38). El VHE identificado en este estudio estuvo estrechamente relacionado con una cepa marroquí (Morocco; AY230202) y la distancia de nucleótidos entre ellas fue 0,09.

Estos resultados sugieren la circulación de una nueva variante del VHE en el país, que pudo ser introducida por la colaboración e intercambio que existe con el continente africano. Las cepas que pertenecen al subgenotipo 1d, ocasionan brotes y casos esporádicos de HVA en los países endémicos.

Hasta la fecha, en Cuba se han identificado dos genotipos del VHE, genotipo 1 en población abierta y genotipo 3 en un grupo de riesgo; y también tres subgenotipos 1a, 1d, 3a (19, 38), lo que sugiere que se debe establecer una vigilancia molecular del virus en nuestro medio. Dado que los fenómenos de recombinación de MAL intergenotipo, podrían eventualmente dar lugar a una nueva variante del virus con un cuadro clínico-epidemiológico diferente (39).

El análisis integral de los resultados, nos permitió apreciar que del total de muestras recibidas (n=422) para identificar la presencia del marcador de infección del VHA, solo 22 (5,21%) fueron positivas a IgM anti-VHA; siendo esta cifra menor que la prevalencia detectada del ARN-VHE (8,53%). Los resultados confirman la baja circulación del VHA, con respecto a los datos anteriores obtenidos de la vigilancia de HVA en Cuba (40).

Hay que destacar que, ante la sospecha de HVA de transmisión entérica solo en el 16,35% (69/422) de las muestras, se indicó simultáneamente la determinación de IgM anti-VHA y ARN-VHE. En las 353 muestras restantes (83,64%), en las que solo se indicaba IgM anti-VHA fue donde se obtuvo el mayor número de casos positivos al ARN-VHE. Esto demuestra que se piensa poco en este patógeno (VHE), cuando se sospecha HVA de transmisión entérica.

Por tanto, los médicos de asistencia deben tener en cuenta la determinación de marcadores serológicos y/o moleculares de los VHA y VHE, para clasificar los brotes o casos esporádicos de HVA que epidemiológicamente sugieran una vía de contaminación fecal-oral. Esto puede contribuir a identificar las co-infecciones y tomar las medidas adecuadas para la prevención y control de estos agentes patógenos. Finalmente, podemos concluir que la vigilancia activa del VHE que se llevó a cabo con este estudio, puso en evidencia la nueva variante del virus circulante en Cuba.

REFERENCIAS

- Ahmad I, Holla RP, Jameel S.** Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2011 Oct; 161(1): 47-58.
- Pavio N, Meng XJ, Renou C.** Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res.* 2010 Nov-Dec; 41(6): 46.
- Teshale EH & Hu DJ.** Hepatitis E: Epidemiology and prevention. *World J Hepatol.* 2012 Dec; 3(12): 285-91.
- Purcell RH & Emerson SU.** Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol.* 2008 Mar; 48(3): 494-503.
- Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, et al.** Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014 Oct; 95(Pt 10): 2223-32.
- Emerson SU & Purcell RH.** Hepatitis E virus. *Rev Med Virol.* 2003 Mar; 13(3): 145-54.
- Khudyakov Y & Kamili S.** Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011 Oct; 161(1): 84-92.
- Aggarwal R & Jameel S.** Hepatitis E. *Hepatology.* 2011 Dec; 54(6): 2218-26.
- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al.** Hepatitis E. *Lancet.* 2012 Jun; 379(9835): 2477-88.
- Quintana A, Sanchez L, Larralde O, Anderson D.** Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in residents of a district in Havana, Cuba. *J Med Virol.* 2005 May; 76(1): 69-70.
- Rodriguez Lay L de L, Quintana A, Villalba MC, Lemos G, Corredor MB, Moreno AG, et al.** Dual infection with hepatitis A and E viruses in outbreaks and in sporadic clinical cases: Cuba 1998-2003. *J Med Virol.* 2008 May; 80(5): 798-802.
- Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK.** Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol.* 1999 Mar; 57(3): 243-51.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chena R, McGettigan PA, MacWilliam H, et al.** Clustal W and Clustal X versions 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23(2947-2948).
- Tamura K, Stecher G, Patersson D, Filipinski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013 Dec; 30(2725-2729).
- Romano L, Paladini S, Tagliacarne C, Canuti M, Bianchi S, Zanetti AR.** Hepatitis E in Italy: A long-term prospective study. *J Hepatol.* 2011 Jan; 54(1): 34-40.
- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al.** Hepatitis E. *Lancet.* 2012 Jun; 379(9835): 2477-88
- Panda SK, Thakral D, Rehman S.** Hepatitis E virus. *Rev Med Virol.* 2007 May-Jun; 17(3): 151-80.
- Villalba MC, Guan M, Perez A, Corredor MB, Frometa SS, Moreno AG, et al.** Seroprevalence of antibodies to hepatitis E virus in two large communities in Havana, Cuba. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010 Dec; 104(12): 772-6.
- de la Caridad Montalvo Villalba M, Owot JC, Correia B, Corredor MB, Flaquet PP, Frometa**

Detección del genotipo 1d del VHE en Cuba

- SS, *et al.* Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Cuba. *Infect Genet Evol.* 2013 Mar; 14(3):35-9.
20. **Ippagunta SK, Naik S, Sharma B, Aggarwal R.** Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J Med Virol.* 2007 Dec; 79(12): 1827-31.
 21. **Xu F, Pan Y, Baloch AR, Tian L, Wang M, Na W, et al.** Hepatitis E virus genotype 4 in yak, northwestern China. *Emerg Infect Dis.* 2014 Dec; 20(12): 2182-4.
 22. **Juhl D, Baylis SA, Blumel J, Gorg S, Hennig H.** Seroprevalence and incidence of hepatitis E virus infection in German blood donors. *Transfusion.* 2014 Jan; 54(1):49-56.
 23. **Galiana C, Fernandez-Barredo S, Perez-Gracia MT.** Prevalence of hepatitis E virus (HEV) and risk factors in pig workers and blood donors. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 Nov; 28(9):602-7.
 24. **Villalba-Montalvo MC.** Evidencias serológicas y moleculares de la circulación del virus de la hepatitis E en Cuba. Mayo 2011. Tesis doctoral, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Departamento de Virología disponible en: tesis.repo.sld.cu/306/1/mariac_montalvo.pdf
 25. **Toole MJ, Claridge F, Anderson DA, Zhuang H, Morgan C, Otto B, et al.** Hepatitis E virus infection as a marker for contaminated community drinking water sources in Tibetan villages. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Feb; 74(2): 250-4.
 26. **Zhu G, Qu Y, Jin N, Sun Z, Liu T, Lee H, et al.** Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E virus in Jilin, China. *Infection.* 2008 Mar; 36(2): 140-6.
 27. **Zhang W, Yang S, Ren L, Shen Q, Cui L, Fan K, et al.** Hepatitis E virus infection in central China reveals no evidence of cross-species transmission between human and swine in this area. *PLoS One.* 2009 Dec; 4(12): e8156.
 28. **Stoszek SK, Abdel-Hamid M, Saleh DA, El Kafrawy S, Narooz S, Hawash Y, et al.** High prevalence of hepatitis E antibodies in pregnant Egyptian women. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Feb; 100(2): 95-101.
 29. **Beniwal M, Kumar A, Kar P, Jilani N, Sharma JB.** Prevalence and severity of acute viral hepatitis and fulminant hepatitis during pregnancy: A prospective study from north india. *Indian J Med Microbiol.* 2003 Jul-Sep; 21(3): 184-5.
 30. **Munne MS, Vladimirsky S, Otegui L, Brajterman L, Castro R, Soto S, et al.** Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2006 Sep; 36(3): 125-30.
 31. **Samanta T & Ganguly S.** Aetiology, clinical profile and prognostic indicators for children with acute liver failure admitted in a teaching hospital in Kolkata. *Trop Gastroenterol.* 2007 Jul-Sep; 28(3): 135-9.
 32. **Mahtab MA, Rahman S, Khan M, Mamun AA, Afroz S.** Etiology of fulminant hepatic failure: experience from a tertiary hospital in Bangladesh. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2008 Apr; 7(2): 161-4.
 33. **Meng XJ.** Recent advances in Hepatitis E virus. *J Viral Hepat.* 2009 Mar; 17(3): 153-61.
 34. **Keane F, Gompels M, Bendall R, Drayton R, Jennings L, Black J, et al.** Hepatitis E virus coinfection in patients with HIV infection. *HIV Med.* 2012 Jan; 13(1): 83-8.
 35. **Chow WC, Lee AS, Lim GK, Cheong WK, Chong R, Tan CK, et al.** Acute viral hepatitis E: clinical and serologic studies in Singapore. *J Clin Gastroenterol.* 1997 Jun; 24(4): 235-8.
 36. **Alam S, Azam G, Mustafa G, Azad AK, Haque I, Gani S, et al.** Natural course of fulminant hepatic failure: the scenario in Bangladesh and the differences from the west. *Saudi J Gastroenterol.* 2009 Oct-Dec; 15(4): 229-33.
 37. **Zaki Mel S, Salama OS, Mansour FA, Hossein S.** Hepatitis E virus coinfection with hepatotropic viruses in Egyptian children. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008 Jun; 41(3): 254-8.
 38. **Villalba M de L, Lay L de L, Chandra V, Corredor MB, Frometa SS, Moreno AG, et al.** Hepatitis E virus genotype 1, Cuba. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug; 14(8): 1320-2.
 39. **Fan J.** Open reading frame structure analysis as a novel genotyping tool for hepatitis E virus and the subsequent discovery of an inter-genotype recombinant. *J Gen Virol.* 2009 Jun; 90(Pt 6): 1353-8.
 40. **Aguiar P.** Comportamiento Epidemiológico de la Hepatitis A en Cuba. *Reporte Técnico Vigilancia.* 2004; 9(3): 1-7.