

Claudia Mendoza López

Diagnóstico de la Hepatitis E ¿un problema resuelto?

Director/es

Benito Ruesca, Rafael

<http://zaguán.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

DIAGNÓSTICO DE LA HEPATITIS E ¿UN PROBLEMA RESUELTO?

Autor

Claudia Mendoza López

Director/es

Benito Ruesca, Rafael

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina

2021

DIAGNÓSTICO DE LA HEPATITIS E

¿UN PROBLEMA RESUELTO?

Claudia Mendoza López

Memoria para la obtención del Grado de Doctor

Dirigida por el Profesor D. Rafael Benito Ruesca

Departamento de Microbiología,

Pediatría, Radiología y Salud Pública

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

2021



Universidad
Zaragoza



D. RAFAEL BENITO RUESCA, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza y Director de la Tesis Doctoral de Claudia Mendoza López, titulada “DIAGNÓSTICO DE LA HEPATITIS E ¿UN PROBLEMA RESUELTO?”

INFORMA QUE:

La doctoranda ha realizado un trabajo de Tesis Doctoral para la obtención del Grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Zaragoza.

Dicho trabajo ha sido supervisado por mí y considero que reúne las condiciones necesarias para su lectura, ya que trata de un tema de gran actualidad, sobre el que se ha documentado ampliamente, ha utilizado una metodología adecuada y ha obtenido conclusiones de interés práctico.

Zaragoza, 6 de abril de 2021



Fdo: Prof. Rafael Benito Ruesca

AGRADECIMIENTOS:

En especial, mi agradecimiento va dirigido al Profesor Rafael Benito, mi Director y Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, por haber depositado su confianza en mí para esta aventura. Por dedicar su tiempo y conocimientos, estando siempre disponible para cualquier duda y sobre todo, por darme caña. Sin duda, el mejor director que se puede tener. Gracias, también, por enseñarme aragonés para foranos.

Igualmente, a Joaquina Gil por su colaboración en este trabajo, así como, a todos los facultativos del Servicio de Microbiología, que tanto me han ayudado y enseñado, Javier Castillo, Soledad Salvo, Sonia Algarate, Cristina Seral, Elena Sánchez, María José Lavilla, Evangelina Pablo, Antonio Beltrán, Juan Sahagún y Maribel Cameo. En especial a mi tutora, que ha sido para mí un apoyo imprescindible estos años, Asunción Vitoria.

A mis compañeros residentes, con los que he compartido muy buenos momentos durante este periodo y que me han echado una mano con este trabajo. Gracias Lara, Tatiana, Héctor, Ingrid, Alfonso, Amparo y Javier por todas las risas que nos hemos echado.

A todos los técnicos de laboratorio y auxiliares del servicio de Microbiología, a Charo, Dora, Laura, María José, Belén, Miguel, Ana Cris, M^a Luz, M^a Ángeles,

Isabel, Nines, por haberme enseñado, y haber sido un gran apoyo, sobre todo en los primeros momentos, en una ciudad lejos de casa.

A Amanda, Begoña y Pilar, por acompañarnos y endulzarnos las tardes a los residentes.

A todos mis compañeros del servicio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza por acompañarme estos duros meses de pandemia.

A Alba Leyva, con la que he compartido muchas horas pipeteando y haciendo cálculos de diluciones. Me has enseñado y ayudado muchísimo, gracias porque sin tu apoyo no hubiera sido posible. A Teresa, por echarme siempre una mano y por los buenos ratos que hemos pasado.

A Pedro López, Ismael Zafra, Mario Frías, Antonio Rivero Juárez y Antonio Rivero Román. Por dejarme rotar en Córdoba, acogerme y hacerme sentir una más, aprendiendo mucho de vosotros. Mención especial a Pedro, por haber tenido tanta paciencia conmigo.

A mi familia y amigos, que me han acompañado y escuchado en este camino, a mis mañas de adopción y a Marta, por ser mi familia en Zaragoza estos 5 años.

A mis padres, por su entrega, amor y dedicación conmigo, por creer en mí.

A mi padre, por sus explicaciones y vivencias, por enseñarme que con esfuerzo todo es posible. Gracias por transmitirme tu amor a la Microbiología.

A mi madre, por ser mi mejor amiga, además de mi ejemplo en la vida de fuerza y valentía. Gracias por enseñarme a saborear la vida como tú solo sabes.

A mi hermano, por tu ayuda en este trabajo y por estar siempre disponible para mis dudas. Gracias por haberme dado la sobrina más bonita del mundo.

A Julián, mi compañero de vida, por acompañarme y animarme en todas mis aventuras, aprendiendo de tu resiliencia y de tu esfuerzo. Por quererme y demostrármelo cada día, siendo mi mayor apoyo en todo momento. Gracias por tu paciencia infinita escuchando mis largas charlas de hepatitis E y Microbiología.

RESUMEN

Introducción:

La hepatitis E (HE) representa actualmente una de las principales causas de hepatitis aguda en el mundo. Este trabajo se ha planteado tras observar el aumento de casos de IgM anti virus hepatitis E (VHE) positivos en los últimos años con una predilección por determinadas zonas geográficas de Aragón.

Objetivos:

Evaluar distintos métodos serológicos comerciales para diagnóstico de la HE, en función de las manifestaciones clínicas, tiempo de evolución y tipo de paciente, entre otros y estimar la situación de la HE en Aragón.

Material y métodos:

Durante los años 2011-2018, en el Hospital Clínico Lozano Blesa, se ha realizado la serología del VHE de todo Aragón. Las muestras con el marcador IgM positivo por DIA.PRO se guardaron a -80°C hasta su análisis.

Se han clasificado los pacientes en base a la sintomatología clínica, marcadores de infección aguda y análisis bioquímico en: hepatitis aguda, infección asintomática/anticuerpos residuales y falsos positivos. Posteriormente, se han realizado 3 técnicas IgM de distintos fabricantes, una técnica IgG, PCR y secuenciación. Además, ha sido posible el desarrollo de una prueba de avidez IgG. En los pacientes con muestras de seguimiento, pudimos analizar la persistencia de positividad de los distintos marcadores.

Resultados:

El diagnóstico de infección por VHE ha aumentado de 0,96% en 2011 a 7,40% en 2018, así como el número de peticiones solicitadas.

La prevalencia de IgG en la zona noroccidental de la provincia de Zaragoza fue de 18,83%, siendo esta la zona donde se concentran la mayoría de los casos diagnosticados de HE.

Existen discordancias entre las técnicas IgM debidas principalmente, a los diferentes antígenos usados en el diseño de las mismas. DIA.PRO ha resultado ser la prueba más sensible, pero con bajo valor predictivo positivo. Índices mayores a 8 y menores a 5 permiten discriminar hepatitis agudas y falsos positivos, respectivamente. La IgM detectada con el equipo de VIRCELL fue la que mejor se asoció con la infección aguda/reciente, avalando su mayor VPP.

Se ha detectado que la IgM puede persistir de manera prolongada, en especial con el equipo de DIA.PRO que llegó a ser mayor a 2,5 años, aunque también se han detectado con las otras técnicas, en el caso de MIKROGEN 2,5 años y WANTAI 1 año, y 7 meses en el caso de VIRCELL, lo que complica la interpretación de la IgM como único marcador de infección aguda.

La PCR fue útil en pacientes con sintomatología de hepatitis aguda en casos de menos de 30 días de evolución. La avidez tuvo una buena correlación en

pacientes con PCR positiva (Índice kappa: 0,88). En las muestras de seguimiento, se comprobó como la avidez aumentaba en un periodo de 8 a 10 semanas.

Se han secuenciado 27 muestras de pacientes con PCR positiva a VHE y se ha comprobado que el genotipo que mayoritariamente circula por Aragón es el 3f, a pesar de que también se han detectado casos con genotipo 3m y 3c.

Se han identificado dos pacientes con Síndrome Parsonage-Turner asociado a infección por VHE.

Conclusiones:

El número de pruebas solicitadas de HE ha aumentado considerablemente en los últimos años, así como, el número de casos positivos en Aragón.

El diagnóstico de la HE sigue siendo un reto, por la corta duración de la viremia en sangre y la variabilidad de las pruebas serológicas. La PCR y la avidez han resultado ser herramientas útiles en el diagnóstico de la HE.

En el análisis por secuenciación, ha demostrado que, en Aragón, el genotipo que circula es principalmente el 3f, el que circula mayoritariamente en Europa, y especialmente en Francia y España.

En pacientes con síntomas neurológicos no asociado a traumatismo es necesario realizar diagnóstico diferencial de VHE

ABSTRACT

Background:

Hepatitis E (HE) currently represents one of the leading causes of acute hepatitis in the world. This work has been raised after observing the increase of cases of positive IgM anti hepatitis E virus (HEV) in recent years, particularly in a certain geographical area of Aragon.

Objectives:

Evaluation of different commercial serological assays for the diagnosis of HE, according to the clinical manifestations, time of evolution and type of patient, among others and to estimate the epidemiological situation of HE in Aragon.

Material and methods:

During the years 2011-2018, in the Clinical Lozano Blesa Hospital, HE serology was performed for all the population of Aragon. Samples determined as positive HE IgM by DIA.PRO were stored at -80°C for further analysis.

Patients have been classified on the basis of clinical symptoms, acute infection markers and biochemical analysis in the following groups: acute hepatitis, asymptomatic infection/residual antibodies and false positives. Subsequently, three IgM techniques were performed from different manufacturers, one IgG technique, PCR and sequencing for samples PCR positive. In addition, it has

been possible to develop an IgG avidity test. In patients with follow-up samples, we were able to analyze the persistence of positivity of the different markers.

Results:

The diagnosis of HEV infection increased from 0.96% in 2011 to 7.40% in 2018, as well as the number of requests.

The IgG prevalence in the north-western area of the province of Zaragoza was 18.83%, this area concentrates most of the cases diagnosed with HE.

There are discrepancies between the IgM assays due mainly to the different antigens used in the design of the kits. DIA.PRO proved to be the most sensitive test, but with low positive predictive value. Rates greater than 8 and less than 5 allow for discrimination between acute and false positive hepatitis, respectively.

The IgM detected with VIRCELL assay was best associated with the acute/recent infection, endorsing its higher PPV. It has been detected that IgM can persist for a long time, however its detection vary among the different assays, as the DIA.PRO and MIKROGEN kits are able to detect it after 2.5 years, but WANTAI kit only detected by after 1 year, and 7 months for VIRCELL kit, which complicates the interpretation of IgM as the only marker of acute infection.

PCR was useful in acute hepatitis diagnosis in patients with less than 30 days of evolution. Avidity had a good correlation in patients with positive PCR (kappa index: 0.88). In the follow-up samples, the avidity increased in a period of 8 to 10 weeks.

Twenty-seven samples were sequenced from patients with positive PCR and it was found that the genotype that mostly circulates in Aragon is 3f, although cases with 3m and 3c genotype have also been detected.

Two patients with Parsonage-Turner syndrome associated with HEV infection have been identified.

Conclusions:

The number of tests requested for HE has increased considerably in recent years, as well as, the number of positive cases in Aragon.

The diagnosis of HE remains a challenge, due to the short duration of viremia in blood and the variability of serological tests. PCR and avidity have proved to be useful tools in the diagnosis of HE.

Sequencing analysis showed that, in Aragon, the genotype circulating is mainly 3f, which circulates mostly in Europe, and especially in France and in Spain.

In patients with neurological symptoms not associated with trauma, differential diagnosis of HEV is necessary.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Características del virus.....	4
1.2. Taxonomía	6
1.3. Genotipos.....	7
1.4. Cultivo	9
1.5. Epidemiología.....	11
1.6. Patogenia	17
1.7. Clínica de la hepatitis E	19
1.8. Diagnóstico	23
1.9. Tratamiento	29
1.10. Profilaxis	31
1.11. Hepatitis E y síndrome de Parsonage-Turner	32
2. Objetivos	35
3. Material y métodos.....	39
3.1. Pacientes	41
3.1.1. Grupo 1: pacientes con sospecha de hepatitis E	42
3.1.2. Grupo 2: 106 pacientes del grupo 1 con IgM positiva con EIA (DIA.PRO) analizadas con CLIA (VIRCELL)	43
3.1.3. Grupo 3: pacientes del grupo 2 clasificados de hepatitis aguda con EIA (DIA.PRO) y analizados por IC	43
3.1.4. Grupo 4	44
3.1.4.1. Grupo 4a: donantes del Banco de Sangre del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa	44
3.1.4.2. Grupo 4b: plasmas del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada	44
3.1.5. Grupo 5: pacientes del medio rural	45
3.1.6. Grupo 6: pacientes con IgM negativa frente a VHA	45
3.1.7. Grupo 7: seguimiento de pacientes IgM anti-VHE positivos.....	46
3.1.8. Grupo 8: estudio comparativo en pacientes del grupo 2	46
3.1.9. Grupo 9: análisis molecular, secuenciación y análisis filogenético ..	46

3.1.10. Grupo 10: estudio de avidez de IgG a VHE	47
3.1.11. Grupo 11: pacientes con síndrome de Parsonage-Turner y VHE	47
3.2. Marcadores analizados	51
3.2.1. Anti-VHE IgM	51
3.2.2. Anti-VHE IgG	51
3.2.3. Avidez de IgG	51
3.2.4. PCR a VHE	52
3.2.5. Secuenciación	52
3.3. Técnicas utilizadas	52
3.3.1. EIA anti-VHE IgM, DIA.PRO	52
3.3.2. CLIA anti-VHE IgM VIRCLIA, VIRCELL S.L.	55
3.3.3. CLIA anti-VHE IgG VIRCLIA, VIRCELL S.L.	58
3.3.4. Inmunocromatografía IgM VHE HEVTOP®, ALL.DIAG	60
3.3.5. EIA de captura anti-IgM VHE, WANTAI	62
3.3.6. EIA IgM indirecto recomowell hev, MIKROGEN DIAGNOSTIC.....	63
3.3.7. CLIA avidez anti-VHE IgG virCLIA®, VIRCELL S.L.	66
3.3.8. PCR a tiempo real cuantitativa para VHE	74
3.3.9. Genotipado y análisis filogenético	79
3.3.9.1. Genotipado	79
3.3.9.2. Análisis filogenético.....	87
3.3.10. Pruebas para descartar otros virus hepatotropos	88
3.4. Análisis estadístico	89
4. Resultados	91
4.1. Resultados del grupo 1: pacientes con sospecha de hepatitis E	93
4.2. Resultados del grupo 2: 106 pacientes del grupo 1 con IgM positiva con EIA (DIA.PRO) analizadas con CLIA (VIRCELL).....	101
4.3. Resultados del grupo 3: pacientes del grupo 1 clasificados de hepatitis aguda con EIA (DIA.PRO) y analizados por IC	105
4.4. Resultados del grupo 4	105

4.4.1. Grupo 4a: donantes del Banco de Sangre del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.....	105
4.4.2. Grupo 4b: plasmas del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada	106
4.5. Resultados del grupo 5: pacientes del medio rural	106
4.6. Resultados del grupo 6: pacientes con IgM negativa frente a VHA.....	109
4.7. Resultados del grupo 7: seguimiento de pacientes IgM anti-VHE positivos	109
4.8. Resultados del grupo 8: estudio comparativo en los pacientes del grupo 2	115
4.9. Resultados del grupo 9: análisis molecular, secuenciación y análisis filogenético.	120
4.9.1. Análisis molecular	120
4.9.2. Secuenciación	121
4.9.3. Análisis filogenético	123
4.10. Resultados del grupo 10: estudio de avidez IgG a VHE	127
4.11. Resultados del grupo 11: pacientes con síndrome de Parsonage-Turner y VHE	128
5. Discusión	131
6. Conclusiones	165
7. Bibliografía	169
8. Anexos	213

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica del VHE	4
Figura 2. Estructura del genoma del VHE.....	5
Figura 3. Variedad de huéspedes según genotipos.....	8
Figura 4. Distribución mundial por genotipos en humanos y cerdos.....	9
Figura 5. Niveles de endemidad de VHE	15
Figura 6. Distribución mundial por genotipos VHE.....	16
Figura 7. Seroprevalencia de anticuerpos IgG Anti-VHE	17
Figura 8. Dinámica de marcadores serológicos y virológicos	21
Figura 9. Dinámica de marcadores en hepatitis aguda vs crónica.....	22
Figura 10. Placa micrométodo (DIA.PRO).....	54
Figura 11. Pocillos de reacción CLIA (VIRCELL)	56
Figura 12. Procesador CLIA automático VirClia® Plus (VIRCELL)	57
Figura 13. IC IgM HEVTOP® (ALL.DIAG)	61
Figura 14. Optimización de la dilución de suero y conjugado en tablero de ajedrez	68
Figura 15. Optimización de la dilución de suero y conjugado, representación gráfica en forma de curvas.	69
Figura 16. Analizador ELISA Thunderbolt	71
Figura 17. Área bajo la curva ROC del ensayo de avidez IgG	72
Figura 18. Diagrama de dispersión de valores de avidez IgG	73
Figura 19. Sistema automatizado de extracción QIAcube (QIAgen)	75
Figura 20. Termociclador CFX Connect Real Time PCR System (Bio-Rad)....	78
Figura 21. Termociclador Labcycler (SensoQuest)	80
Figura 22. Procedimiento secuenciación automática Sanger	85
Figura 23. Analizador de inmunoensayos Architect i4000	89
Figura 24. Distribución por comarcas de casos del grupo 1 IgM positivos a VHE en Aragón	100

Figura 25. Distribución por comarcas de casos IgG positivos del grupo 5 en Aragón	108
Figura 26. Avidez en pacientes con hepatitis E aguda	114
Figura 27. Avidez en pacientes con infección asintomática o anticuerpos residuales	115
Figura 28. Gel electroforesis con amplicones de 10 pacientes	122
Figura 29. Lectura de una secuencia con el programa Sequence scanner. ...	122
Figura 30. Árbol filogenético	126
Figura 31. Radiografías de tórax del paciente 1 con SPT	130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sensibilidad y especificidad de IgM Anti-VHE	25
Tabla 2: Sensibilidad de IgG Anti-VHE	26
Tabla 3: Datos clínicos y analíticos de los pacientes con SPT	50
Tabla 4: Pacientes grupo 1 clasificados de hepatitis aguda con DIA.PRO.....	94
Tabla 5: Solicitudes de diagnóstico de hepatitis E	96
Tabla 6: Pacientes del grupo 1 clasificados de infección asintomática o anticuerpos residuales a IgM VHE con EIA (DIA.PRO)	96
Tabla 7: Pacientes del grupo 1 clasificados de falso positivo a IgM VHE con EIA (DIA.PRO).....	97
Tabla 8: Comparación de medias y rangos de índices de IgM (DIA.PRO) en el grupo 1	98
Tabla 9: Comparación de resultados de IgM entre EIA (DIA.PRO) y CLIA (VIRCELL).....	102
Tabla 10: Pacientes del grupo 3 clasificados de hepatitis aguda con EIA (DIA.PRO) y analizados por inmunocromatografía (ALL.DIAG)	105
Tabla 11: Resultados de los casos IgM EIA (DIA.PRO) positivos del grupo 4 .	106
Tabla 12: Resultados de IgG CLIA (VIRCELL) en pacientes del medio rural..	107
Tabla 13: Resultados de seguimiento serológico en pacientes con más de un suero disponible.....	112
Tabla 14: Resultados de pruebas diagnósticas en casos con hepatitis aguda del grupo 2.....	116
Tabla 15: Comparación de resultados con las pruebas diagnósticas en casos con infección asintomática o con anticuerpos residuales del grupo 2	117
Tabla 16: Comparación de resultados con las pruebas diagnósticas en pacientes con resultado falso positivo del grupo 2.....	118
Tabla 17: Resumen de los resultados de los distintos equipos	119
Tabla 18: Comparación de medias VIRCELL, MIKROGEN y WANTAI.....	119
Tabla 19: Índice kappa de concordancia entre las distintas técnicas	120
Tabla 20: Resultados de PCR en pacientes del grupo 2	121

Tabla 21: Secuencias descritas en este estudio	124
Tabla 22: Secuencias similares descritas en BLAST	125
Tabla 23: Resultados del estudio de avidez en pacientes del grupo 2	127
Tabla 24: Resultados de los análisis microbiológicos en pacientes con SPT .	128

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

ALT: Alanina Aminotransferasa

AST: Aspartato Aminotransferasa

ARN: Ácido Ribonucleico

CLIA: Ensayo de Quimioluminiscencia

CMV: Citomegalovirus

CO: Punto de corte (Cut-Off)

CT: Ciclo umbral (Cycle Threshold)

Curva ROC: Curva de característica operativa del receptor (Receiver Operating Charasteristic)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

EIA: Enzimoinmunoanálisis

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

GeHEP: Grupo para el Estudio de las Hepatitis víricas

GGT: Gamma glutamil transferasa

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IgA: Inmunoglobulina A

NA: Neuralgia Amniotrófica

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Marco de lectura abierto (Open Reading Frame)

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RVS: Respuesta Viral Sostenida

S/CO: Muestra/punto de corte (Sample/Cut-Off)

SPT: Síndrome de Parsonage-Turner

Tiempo real-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

UI/L: Unidades Internacionales por Litro

URL: Unidades Relativas de Luz

VEB: Virus Epstein-Barr

VHB: Virus de la Hepatitis A

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

VHD: Virus de la Hepatitis D

VHE: Virus de la Hepatitis E

VHS: Virus Herpes Simple

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VVZ: Virus Varicela Zoster

WB: Western-Blot

1. INTRODUCCIÓN

Khuroo MS en 1980 planteó por primera vez la existencia de un nuevo virus de hepatitis tras una epidemia relacionada con el agua ocurrida en el valle de Cachemira, en el Norte de la India. Este nuevo virus sería llamado virus de la hepatitis E (VHE). Se denominó con la letra E aludiendo a su carácter entérico y epidémico. Identificado en 1983 (Balayan MS *et al.*, 1983), se le considera la principal causa de hepatitis aguda en los países subdesarrollados, sobre todo en Asia y en África subsahariana. Produce una infección hepática, mayoritariamente asintomática, de la que se ha detectado un creciente número de casos en los países desarrollados, diagnosticados mediante la detección de IgM específica. El virus infecta a mamíferos, incluido el ser humano, aves y peces (Kamar N *et al.*, 2012).

1.1. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

El VHE es un ribovirus monocatenario de polaridad positiva de clase IV (Rodríguez-Frías F *et al.*, 2012), con una longitud de 7,2 Kb. Presenta forma esférica de 32 nm de diámetro, posee simetría icosaédrica y carece de envoltura (Figura 1). Su cápside consta de una única glicoproteína estructural (Jameel S *et al.*, 1999; Labrique AB *et al.*, 1999). El virus presenta un coeficiente de sedimentación de 183s. Resiste en condiciones de ligera acidez o alcalinidad como lo prueba su supervivencia en el intestino (Quintana-González A *et al.*, 2003). Tiene un único serotipo, a pesar de las diferencias clínicas y epidemiológicas. (Pas SD *et al.*, 2013).



Figura 1. Micrografía electrónica del VHE
[CDC Public Health Image Library. Image credit: CDC/ (PHIL #5605)]

El genoma del VHE fue clonado en 1990 (Reyes GR *et al.*, 1990) y secuenciado en 1991 (Tam AW *et al.*, 1991; Tsarev SA *et al.*, 1992).

Su genoma presenta 3 ORF solapadas y tiene una cola Poli A en su extremo 3'. Contiene dos pequeñas regiones no codificantes en los extremos 3' y 5' de 68 y 27 nucleótidos, respectivamente. Los genes no estructurales se sitúan en el extremo 5' del genoma viral, abarcando las dos terceras partes del mismo, y los estructurales, en el extremo 3' (Figura 2) (Panda S *et al.*, 2007; Kamar N *et al.*, 2012).

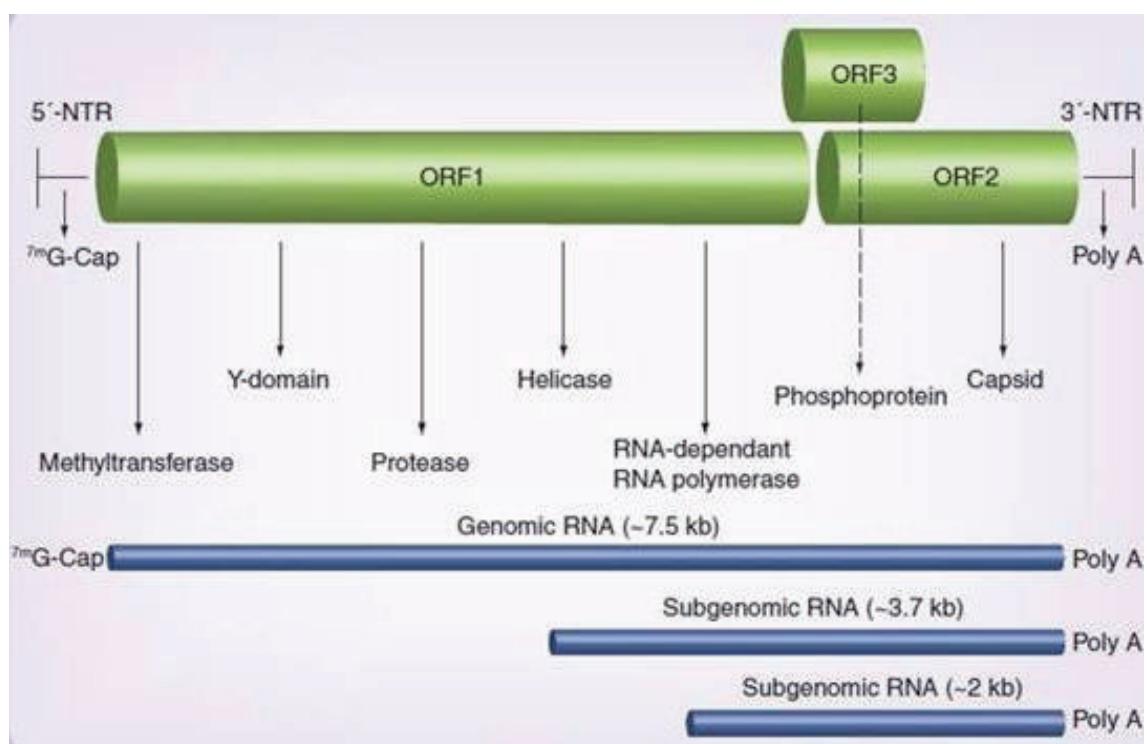


Figura 2. Estructura del genoma del VHE
https://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2011/07/clip_image0023.jpg

- ORF1 (5Kb), de 1693 codones, que se encuentra en el extremo 5' del genoma y codifica una poliproteína (proORF1), de la que proceden las proteínas no estructurales: metiltransferasa, proteasa, helicasa y polimerasa, que intervienen en la replicación del virus.

- ORF2, de 660 codones que se ubica en el extremo 3' del genoma. Codifica la única proteína estructural (proORF2), de la que deriva el péptido de la cápside. Esta región se relaciona con la encapsidación. En el extremo 3' existe un epítopo inmunogénico principal. La proteína proORF2 posee 3 dominios (Xing L *et al.*, 2010): el dominio S (aa:119-319), que forma la cápside, y los dominios M (aa:320-454) y P (aa:320-606), relacionados con la interacción entre el virus y el hepatocito. El dominio P, en la parte externa de la cápside, puede ser la diana de los anticuerpos neutralizantes y, por tanto, de las vacunas (Holla RP *et al.*, 2013).

- ORF3 empieza tras los últimos nucleótidos del ORF1 y se solapa con la ORF2. Codifica una fosfoproteína inmunogénica (proORF3) de 123 aminoácidos que, al parecer, interviene en el ensamblado de los viriones.

1.2. TAXONOMÍA

El VHE fue asignado provisionalmente a la familia *Caliciviridae* y, en 2004, reclasificado como el único miembro del género *Orthohepevirus*, familia *Hepeviridae*.

El género *Orthohepevirus* consta de 4 especies, A a D que infectan a mamíferos y aves. La especie A es la que afecta al ser humano. El género *Piscihepevirus* infecta a las truchas (Smith DB *et al.*, 2015).

1.3. GENOTIPOS

Existen 8 genotipos de *Orthohepevirus A* (Quintana-González A, 2003; Sridhar S *et al.*, 2017). Cuatro de ellos infectan a los seres humanos, presentando diverso grado de virulencia y diferente distribución geográfica. Los diferentes genotipos se relacionan con determinados patrones epidemiológicos (Fogeda M *et al.*, 2009). Los genotipos 1 y 2 son responsables exclusivamente de infecciones humanas y tienen presentación epidémica. El genotipo 1, que consta de 5 subtipos, tiene como único huésped al ser humano y es endémico de centro, sur y sureste de Asia y de África, pero también se detecta en Cuba (Montalvo MC *et al.*, 2008) y Venezuela (Gutiérrez C *et al.*, 2012). Los casos detectados de hepatitis E aguda por genotipos 1 y 2 en Europa son importados de Asia. El genotipo 2a se ha descrito una única vez en una epidemia en México (Huang CC *et al.*, 1992), mientras que el genotipo 2b es de origen africano (Nigeria y Chad) (Kmush B *et al.*, 2013).

Los genotipos 3 (10 subtipos) y 4 (7 subtipos) son zoonóticos y pueden infectar a hombres o animales. El genotipo 3 es ubicuo (Europa, Estados Unidos, Japón, China y Taiwán) e infecta al hombre y a diversas especies de mamíferos salvajes y domésticos: cerdos, conejos, jabalíes, ciervos, mangostas y ratas. Estas cepas causan casos esporádicos humanos de hepatitis E aguda por transmisión de fuente zoonótica o alimentaria (Risalde MA *et al.*, 2017; Meng XJ., 2013). También se han detectado en moluscos (ostras y mejillones) en Europa (Crossan C *et al.*, 2012; Díez-Valcarce M *et al.*, 2012). En pacientes inmunodeprimidos el genotipo 3 puede producir hepatitis crónica y cirrosis (Aggarwal RA *et al.*, 2013). Existe gran homología entre los genotipos descritos en humano y cerdo.

El genotipo 4 tiene un comportamiento similar al genotipo 3, aunque su localización geográfica es más restringida al Sudeste Asiático y Extremo Oriente. No obstante, se ha descrito un brote epidémico en Italia relacionado con ingesta de ostras contaminadas (Garbuglia AR *et al.*, 2013).

El genotipo 5 es de origen aviar (Huang F *et al.*, 2004) e infecta al jabalí (Izopet J., 2017). El genotipo 6 infecta al jabalí (Izopet J., 2017). Los genotipos 7 y 8 infectan a dromedarios y camellos. El genotipo 7 se relacionó con transmisión por leche y carne de camello (Lee GH *et al.*, 2016) en un paciente de Oriente Medio que recibió un trasplante hepático.

En la figura 3 se muestra los huéspedes relacionados con los distintos genotipos.

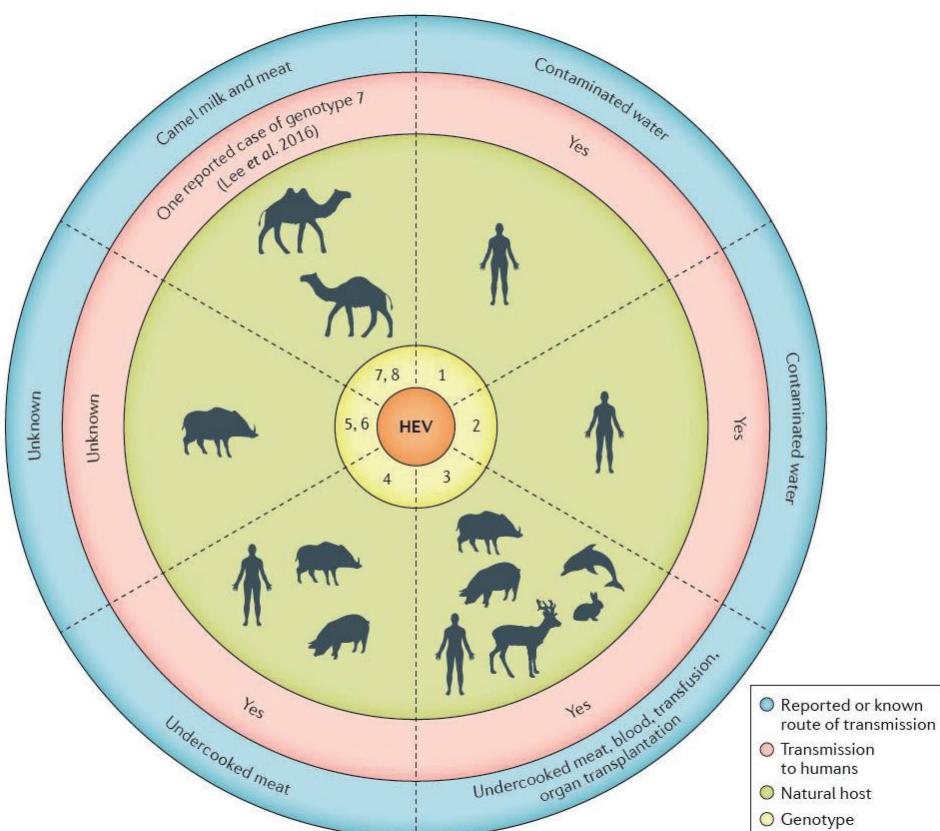


Figura 3. Variedad de huéspedes según genotipos
(Nimgaonkar *et al.*, 2018)

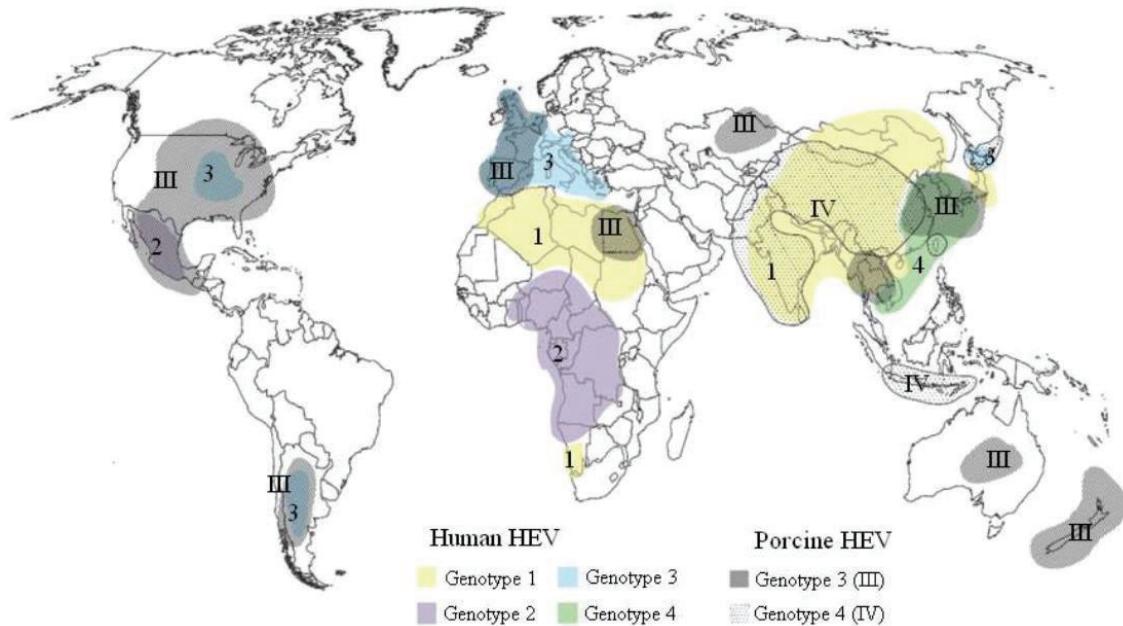


Figura 4. Distribución mundial por genotipos en humanos y cerdos
(Purcell RH *et al.*, 2008)

Se ha detectado la existencia de cuasiespecies en un mismo paciente, con heterogeneidad del 0,11 a 3,4% (Huang F *et al.*, 2004). Se está evaluando su papel en la patogenia de la infección.

1.4. CULTIVO

Se han desarrollado numerosos intentos de cultivo celular sin éxito, sin embargo, solo dos sistemas de cultivo celular han conseguido ser eficientes. (Tanaka T *et al.*, 2007; Sukla *et al.*, 2011).

El VHE existe como forma envuelta y sin envuelta, en heces se encuentra como no envuelto, mientras que las partículas de virus secretadas de las células tienen una envuelta lipídica. La forma envuelta ofrece protección a anticuerpos neutralizantes contra pORF2 y pORF3, sin embargo, es mucho menos eficiente en su entrada a la célula que la forma no envuelta (Yin X *et al.*, 2016; Nimgaonkar

I *et al.*, 2018,). Debido a que el virus desnudo es mucho más infeccioso, esto podría explicar su presencia en las heces, como la razón de que sea la principal vía de transmisión (Fu RM *et al.*, 2019).

En el año 1986, la cepa 87A fue aislada en células 2BS de un paciente con hepatitis E, fue también cultivada en células A549, detectándose efecto citopático y PCR positiva en el sobrenadante, sin embargo, la eficiencia de este cultivo no ha sido descrita completamente. (Huang RT *et al.*, 1992; Zanetti AR *et al.*, 1999). También en la línea celular PLC/PRF/5 (Gupta H *et al.*, 1988; Maneerat Y *et al.*, 1996), se encontró VHE en las células y en el sobrenadante. Se ha observado en cocultivo de células FRhK4 con células primarias de riñón de mono *Cynomolgus*, empleando muestras obtenidas en la fase aguda de la infección por VHE, que no hubo efecto citopático, pero se detectó el virus por hibridación mediante dot-blot con un clon de VHE y por inmunofluorescencia con sueros de convalecientes (Tsarev SA *et al.*, 1999). En cultivos primarios de hepatocitos de monos *Cynomolgus* (Meng J *et al.*, 1997), tras la siembra de una suspensión de heces con VHE, se detectó por inmunofluorescencia la presencia de ARN. Este proceso pudo neutralizarse con sueros que contenían Anti-VHE, pero no con sueros negativos. En un sistema de cultivo celular sin suero fetal bovino (Tam AW *et al.*, 1996) con hepatocitos de monos *Cynomolgus* infectados experimentalmente con VHE (cepa de Birmania), se detectó ARN de VHE en el hepatocito y en el medio de cultivo. También se detectó, en el medio de cultivo, presencia de viriones por inmunomicroscopía electrónica (IME) (Reyes GR *et al.*, 1993). Estos estudios demuestran que el VHE se puede adaptar al crecimiento en cultivo celular.

En el año 2009, se describió por primera vez un sistema de cultivo eficiente de genotipo 3, con células de hepatoma PLC/PRF/5 y células de cáncer de riñón A549 y muestra de heces de un paciente con hepatitis aguda en Japón. (Tanaka *et al.*, 2007). También se han conseguido cultivar en estas células los genotipos 1 y 4 en muestras de suero y genotipo 4 en muestras de heces. En el año 2011, una cepa de genotipo 3 también fue capaz de cultivarse, tras varios pases, en células de hepatoma HepG2/C3A. (Shukla *et al.*, 2011). Sin embargo, los aislados de pacientes son ineficaces en la diseminación y la variabilidad entre las cepas podría conducir a inconsistencias en los resultados, lo cual resta al cultivo valor diagnóstico (Nimagaonkar I *et al.*, 2018).

Debido a las dificultades del cultivo viral, algunos investigadores han creado clones infecciosos de cDNA de VHE para estudiar características del virus, como la función de algunas proteínas virales, estudios de neutralización, entre otras (Panda SK *et al.*, 2000).

1.5. EPIDEMIOLOGÍA

Se pueden observar dos patrones epidemiológicos en la hepatitis E. En áreas con alta endemidad, principalmente países en desarrollo de Asia y África, la hepatitis E se debe a los genotipos 1 y 2, que son transmitidos por consumo de agua contaminada, y producen brotes y casos esporádicos de hepatitis aguda (Wang Y *et al.*, 2016).

En países desarrollados, se han observado casos esporádicos por los genotipos 3 y 4. Los estudios epidemiológicos atribuyen al cerdo el papel de principal

reservorio animal del VHE (Meng XJ, 2000). El VHE se ha descrito en diversos animales: cerdos, roedores, monos, ciervos, cabras, vacas, perros y pollos. La prevalencia del VHE en el cerdo, es del 80%, por lo que la hepatitis E se considera una zoonosis en los países desarrollados. Existe la posibilidad de transmisión del virus del cerdo a humanos y viceversa y esto mismo podría ocurrir entre el ser humano y otros primates: chimpancés, monos rhesus, tamarinos y monos verdes africanos (Meng XJ *et al.*, 1998). Se considera que el ser humano es un huésped natural. No obstante, algunas cepas humanas tienen estrecha relación genética con cepas de cerdos, pollos y ratas, lo que justificaría la transmisión zoonótica (Sánchez DA *et al.*, 2012). La prevalencia de Anti-VHE en animales domésticos y roedores en Cataluña es del 11% (Peralta B *et al.*, 2009). La infección puede transmitirse por alimentos: consumo de carne o de vísceras no cocinadas, poco cocinadas, o curadas, procedentes de animales infectados, especialmente el cerdo y el marisco.

El VHE se transmite por vía fecal-oral (Rein DB *et al.*, 2012). Los viriones se encuentran en la bilis y en las heces de las personas infectadas, desde el final del periodo de incubación hasta varias semanas después del inicio de la enfermedad (Ticehurst J *et al.*, 1992; Nanda SK *et al.*, 1995). El virus puede encontrarse en heces durante 5 semanas y durante más tiempo en inmunocomprometidos (Kamar N *et al.*, 2014; Hewitt PE *et al.*, 2014).

La exposición de tipo profesional a heces de cerdo infectadas también provocaría la transmisión (Echevarría JM *et al.*, 2015). Se ha demostrado la transmisión del virus a través de la sangre (Arankalle VA *et al.*, 1999; Matsubayashi K *et al.*, 2008; Laperche S *et al.*, 2014; Riveiro-Barciela M *et al.*, 2017), incluso en zonas no endémicas, y por trasplante de órganos (Schlosser B *et al.*, 2012; Pourbaix A *et*

al., 2017). En Suecia se ha encontrado ARN de VHE en sangre de una de cada 7980 donaciones de sangre, en ausencia de Anti-VHE, en la mayoría de los casos (Baylis SA *et al.*, 2012). La probabilidad de transmisión de persona a persona es baja (1-2%) (Somani SK *et al.*, 2003), al ser, posiblemente, dosis dependiente. No existe evidencia de que el mecanismo sexual, la lactancia o la transmisión de persona a persona jueguen un papel importante en la epidemiología de la infección (Sánchez DA *et al.*, 2012; Aggarwal R *et al.*, 2000).

En España la infección puede ser importada o autóctona (Sánchez M *et al.*, 2002; Mateos ML *et al.*, 2005; Riveiro-Barciela M *et al.*, 2012). La primera descripción de casos de hepatitis E aguda en España se produjo en 1993 (Jardi R *et al.*, 1993). La mayoría de infecciones autóctonas en España están producidas por el genotipo 3f, con un probable origen porcino (Fogeda *et al.*, 2009; Echevarría JM *et al.*, 2013). De hecho, el VHE ha sido identificado en aguas residuales de un matadero en Barcelona (Pina S *et al.*, 2000). Las infecciones importadas en España tienen origen en la India y países próximos (Echevarría JM *et al.*, 2011).

La prevalencia de IgG Anti-VHE en la población general de la Comunidad de Madrid es del 3,5% (Fogeda M *et al.*, 2012), del 2,8% en donantes de sangre y del 6,3% en enfermos en tratamiento de hemodiálisis (Mateos ML *et al.*, 1999). Echevarría *et al.* (Echevarría JM *et al.*, 2015) estimaron una prevalencia de IgG Anti-VHE en España inferior al 10%, siendo mayor en adultos, especialmente mayores de 50 años, que en niños. La prevalencia en Aragón no se ha precisado, pero se han comunicado casos que demuestran que el virus circula en dicha comunidad (Benito R *et al.*, 2015; Bueno J *et al.*, 2015).

Se han descrito casos en el sur de Francia (Colson P *et al.*, 2017) y se ha estimado una incidencia de infección por VHE entre 0,7 y 2,7% en trasplantados renales (Moal V *et al.*, 2013). En este país los virus B y E han sido la principal causa de hepatitis en trasplantados hepáticos entre 2006 y 2010. La prevalencia global en Francia en donantes de sangre de IgG e IgM es del 22% y del 1%, respectivamente, y de ARN del 0,4% (Colson P *et al.*, 2017). En donantes de sangre del centro de Italia, la prevalencia de IgG es del 49%, de IgM, del 0,6% y de ARN, del 0,6%, siendo todos los casos asintomáticos y con ALT normales (Lucarelli C *et al.*, 2016). En los países del norte de Europa, la situación es parecida (Norder H *et al.*, 2009; Kantala T *et al.*, 2009).

Según la OMS, la prevalencia de VHE en la zona europea varía entre 0,03% al 52% en la población general y donante, siendo la más alta en donantes de sangre de Francia y Holanda (WHO, 2014). Las variaciones en la prevalencia se atribuyen a la falta de estandarización de los reactivos usados, por lo que podría haber cifras infra o sobreestimadas. En estos países el VHE puede ser una amenaza para los pacientes inmunodeprimidos (Clemente-Casares P *et al.*, 2016).

En Latinoamérica hay dos patrones epidemiológicos, uno propio de países como Brasil o Argentina, similares a los de los países occidentales, y otro propio de países como México o los del Caribe, similar a los de Asia y África (Echevarría JM *et al.*, 2013).

En la figura 5 se muestra la distribución geográfica del VHE,

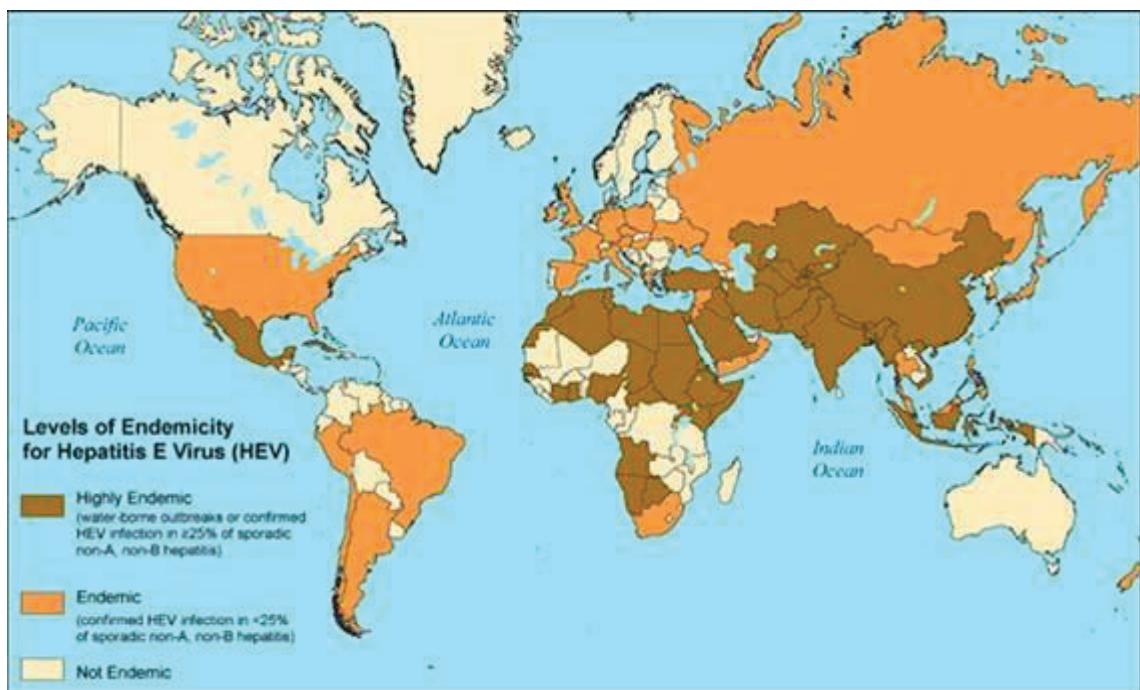


Figura 5. Niveles de endemicidad de VHE
(Centers for Disease Control and Prevention)

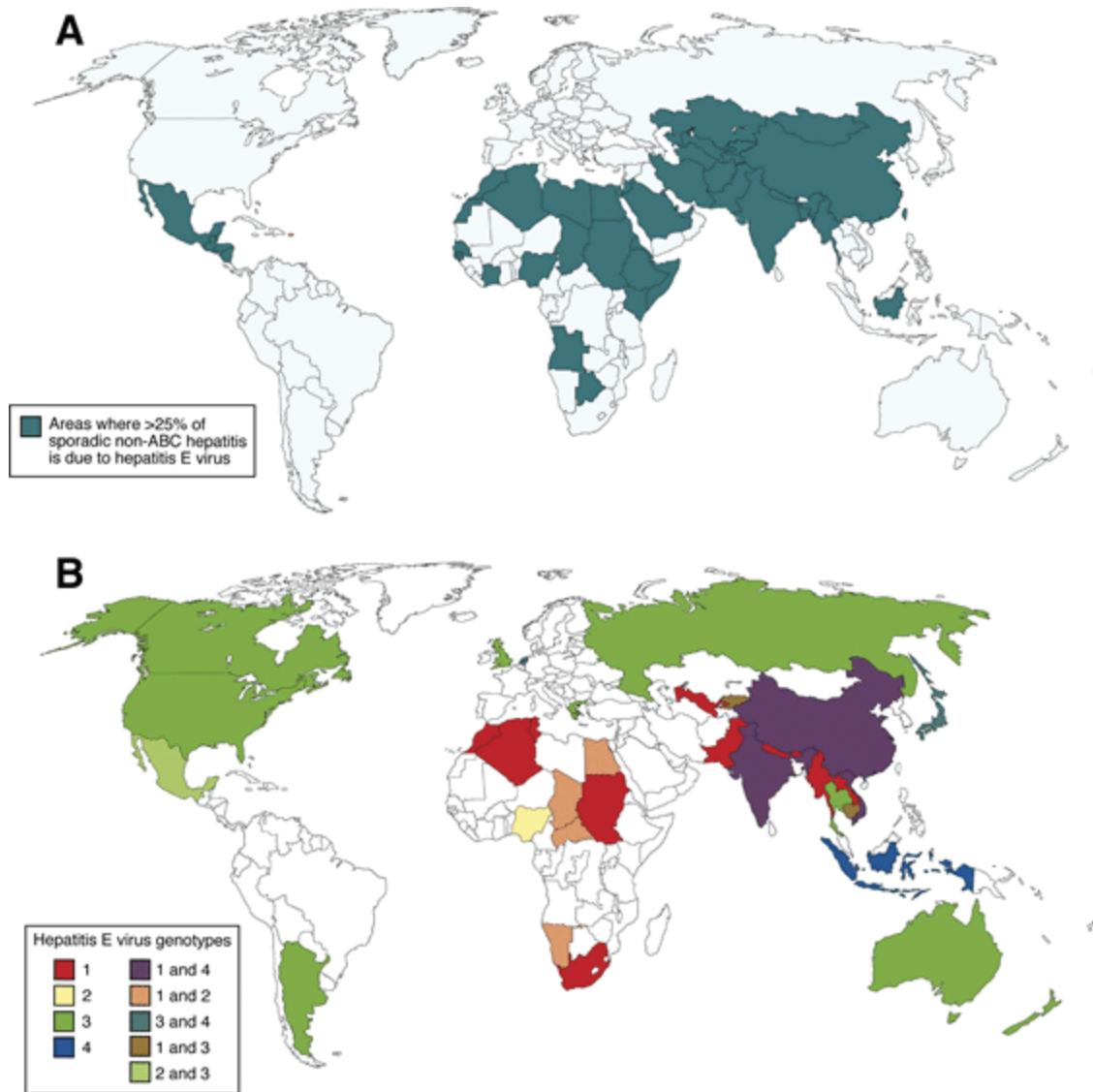


Figura 6. Distribución mundial por genotipos VHE
(Wedemeyer H *et al.*, 2012)

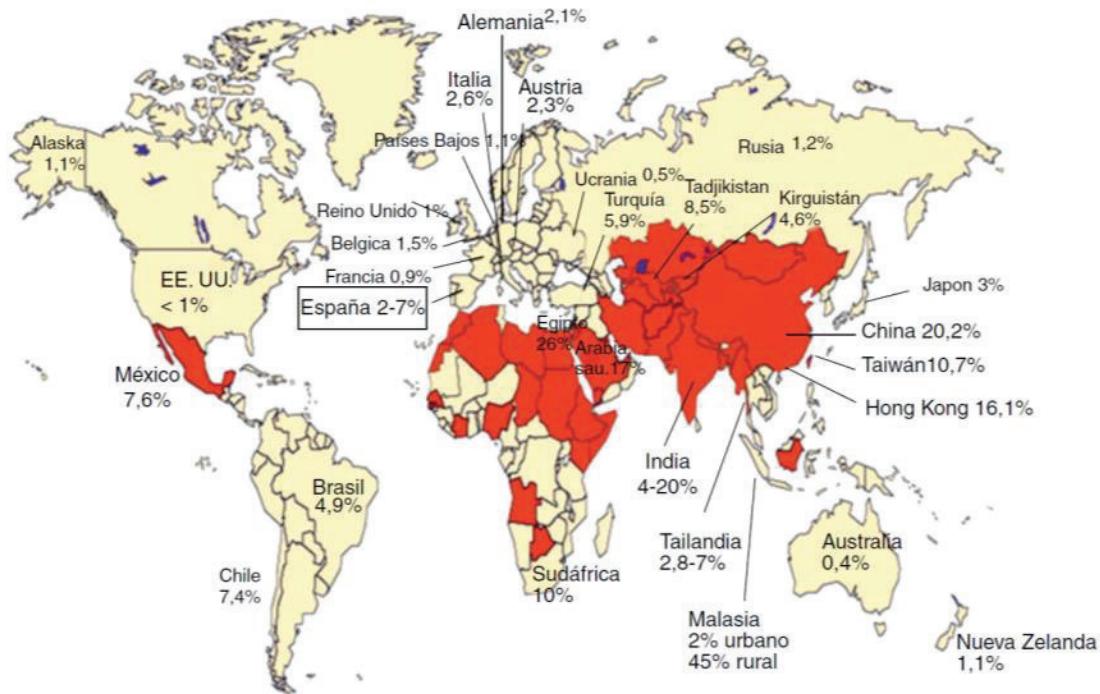


Figura 7. Seroprevalencia de anticuerpos IgG Anti-VHE
(Modificado de Chandra V *et al.*, 2008)

1.6. PATOGENIA

Existen todavía muchas lagunas en el conocimiento de la patogenia de la hepatitis E. Al igual que ocurre con otros virus productores de hepatitis, parece que la respuesta del sistema inmune es la responsable de las lesiones en el hepatocito y que él no produce efecto citopático por sí solo (Tam AW *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha detectado efecto citopático en determinados modelos de cultivo celular, como se ha señalado en el apartado de cultivo.

El virus penetra por vía oral y se replica en el aparato digestivo. Llega al hígado a través de la vena porta y replica en el citoplasma de los hepatocitos (Dienstag JL *et al.*, 1994), desde donde pasa a la bilis y a la sangre.

Tras la inoculación del VHE por vía oral a un voluntario, se detectó viremia el día 22 tras la infección (7 días antes de la aparición de los síntomas) y viriones en

heces, por IME, a los 34 días de la inoculación (Belabbes EH *et al.*, 1988). El pico de ALT se produjo el día 46. Los Anti-VHE aparecieron el día 21 y seguían positivos a los dos años de evolución. En otro estudio similar, la viremia se detectó el día 28 y el pico de ALT a los 42 días (Balayan MS *et al.*, 1983). En un tercer estudio, se analizó la respuesta inmune y el patrón de viremia en pacientes (Chauhan A *et al.*, 1993). En algunos pacientes se ha producido un doble pico de ALT (Chauhan A *et al.*, 1993).

En función de estos estudios, se ha propuesto la siguiente historia natural de la hepatitis E (Quintana-González A, 2003). La presencia de virus en sangre, orina y heces se produce en la fase preictérica (Geng Y *et al.*, 2016; Zhao C *et al.*, 2016). En sangre, dura hasta 10 días después de la aparición de los síntomas, y en heces, 2 semanas más que en sangre. Las IgM e IgG aparecen precozmente. Las IgM duran 6 meses, aproximadamente. Las IgG específicas pueden durar más de 10 años, aunque se desconoce si confieren inmunidad (Khuroo MS *et al.*, 1993). Las IgA se detectan en la fase aguda. En casos en los que no hay aparición de anticuerpos se produce una persistencia de la viremia (Chauhan A *et al.*, 1993). Este fenómeno se ha detectado en el 10% de los pacientes infectados por VHE (Quintana-González A, 2003) y puede ser responsable de la transmisión parenteral en zonas endémicas (Jameel S *et al.*, 1992; Nanda SK *et al.*, 1995; Wang JT *et al.*, 1994; Brazilai A *et al.*, 1995; Sylvan SP *et al.*, 1995).

La cinética de la respuesta Anti-VHE es compleja. Puede ser diferente para cada epítopo y ser de duración variable. Por otra parte, puede ser escasa en la infección subclínica (Aggarwal R *et al.*, 2001) y sufrir un descenso importante después de la infección aguda (Khuroo MS *et al.*, 2010).

1.7. CLÍNICA DE LA HEPATITIS E

La hepatitis E es habitualmente oligo o asintomática sin secuelas. Menos del 5% de los pacientes expuestos desarrollan hepatitis (Said B *et al.*, 2009; Wedemeyer H *et al.*, 2012; Rein DB *et al.*, 2012). Se estima un periodo de incubación de 2 a 9 semanas (6 de promedio) (Sánchez DA *et al.*, 2012). Generalmente, se trata de una hepatitis aguda autolimitada, similar a la hepatitis A (0,5-3% de mortalidad). Puede aparecer colestasis en el 20% de los casos. Ocasionalmente, la hepatitis E puede ser fulminante (0,5-3%), sobre todo en embarazadas, población en la que puede alcanzar alta mortalidad (20%).

El genotipo 3 y, en menor medida el 4, puede causar infección crónica (persistencia de ARN en suero o heces superior a 3 meses), con rápida evolución a cirrosis, en pacientes inmunodeprimidos, como receptores de trasplante de órgano sólido y en tratamiento con quimioterapia (Gerolami R *et al.*, 2008; Haagsma EB *et al.*, 2008; Kamar N *et al.*, 2008; Halac U *et al.*, 2012; Ollier L *et al.*, 2009; Koning N *et al.*, 2013; Fujiwara *et al.*, 2014; Kamar N *et al.*, 2014, Tavitian S *et al.*, 2010).

Aunque se describe a la hepatitis E como una infección autolimitada. El VHE también puede agravar una hepatitis crónica de otra etiología (Kamar N *et al.*, 2010). Se han descrito casos de hepatitis E en pacientes con Anti-VHE, tras finalizar el tratamiento de la hepatitis C con antivirales de acción directa. Esto plantea la posibilidad de reinfección o de reactivación del VHE (Rivero-Juárez A *et al.*, 2017), al igual que se ha descrito reactivación del VHB con infección previa por VHB e infección VHC tratada con antivirales de acción directa (US FDA). Esta posibilidad está apoyada por la observación de persistencia de ARN viral

de VHE en pequeñas concentraciones en el hígado, cuya consecuencia ha sido la reactivación de la infección en sujetos inmunodeprimidos (Le Coute P *et al.*, 2009; Geng Y *et al.*, 2014). La persistencia de VHE en hígado sin viremia ha sido demostrada en jabalíes (Risalde MA *et al.*, 2017).

El VHE también puede producir manifestaciones extrahepáticas (2-5%), como síndromes neurológicos de tipo síndrome de Guillain-Barre (Van den Berg B *et al.*, 2014), neuralgia amiotrófica (síndrome de Parsonage-Turner) (Van Eijk JJ *et al.*, 2016; Kamar N *et al.*, 2014; Dalton HR *et al.*, 2017; Mendoza C *et al.*, 2020) o meningitis (Kamar N *et al.*, 2011; Naha K *et al.*, 2012; Rodríguez-Castro E *et al.*, 2018). Otras manifestaciones extrahepáticas son: lesión renal, pancreatitis, trastornos hematológicos, linfoma, trombopenia, artralgias (Pischke S *et al.*, 2017; Quintana-González A, 2003). Los pacientes con manifestaciones extrahepáticas tienen poca o ninguna lesión hepática.

El virus se encuentra en sangre durante pocas semanas (Bradley DW *et al.*, 1988). Los síntomas aparecen entre los 15 y 60 días tras el contagio y son indistinguibles de otras hepatitis agudas de origen vírico (ictericia, anorexia, abdominalgia, hepatomegalia, coluria). La mayoría de los casos de infección por VHE son anictéricos. En los casos sintomáticos, la ictericia se presenta bruscamente y dura dos semanas aproximadamente. Se acompaña de fiebre, coluria, acolia y elevación de los marcadores de citolisis. En más del 50% de los casos hay artralgias. Los niveles de ALT se elevan durante 4 a 8 semanas y el pico coincide con el inicio de la ictericia, que se correlaciona con presencia de virus en sangre y en heces. Hay elevación de la bilirrubina directa.

Tras la aparición de los síntomas (ictericia, anorexia, hepatomegalia, abdominalgia, náuseas, vómitos), desaparece la viremia, pero el virus persiste en heces. Las IgM específicas alcanzan un pico en la fase sintomática y se negativizan a los 3 a 6 meses de evolución. Las IgG específicas pueden detectarse más de 10 años después (Jameel S, 1999). Pese a ello, no es seguro que produzcan inmunidad, porque pueden aparecer reinfecciones (Balayan MS *et al.*, 1997).

Se han descrito casos de persistencia prolongada de la IgM (21 meses) (Lee SD *et al.*, 1994), y de la viremia (42-112 días), con eliminación por heces hasta 7 semanas, a pesar de la normalización bioquímica y clínica (Khuroo MS *et al.*, 1993).

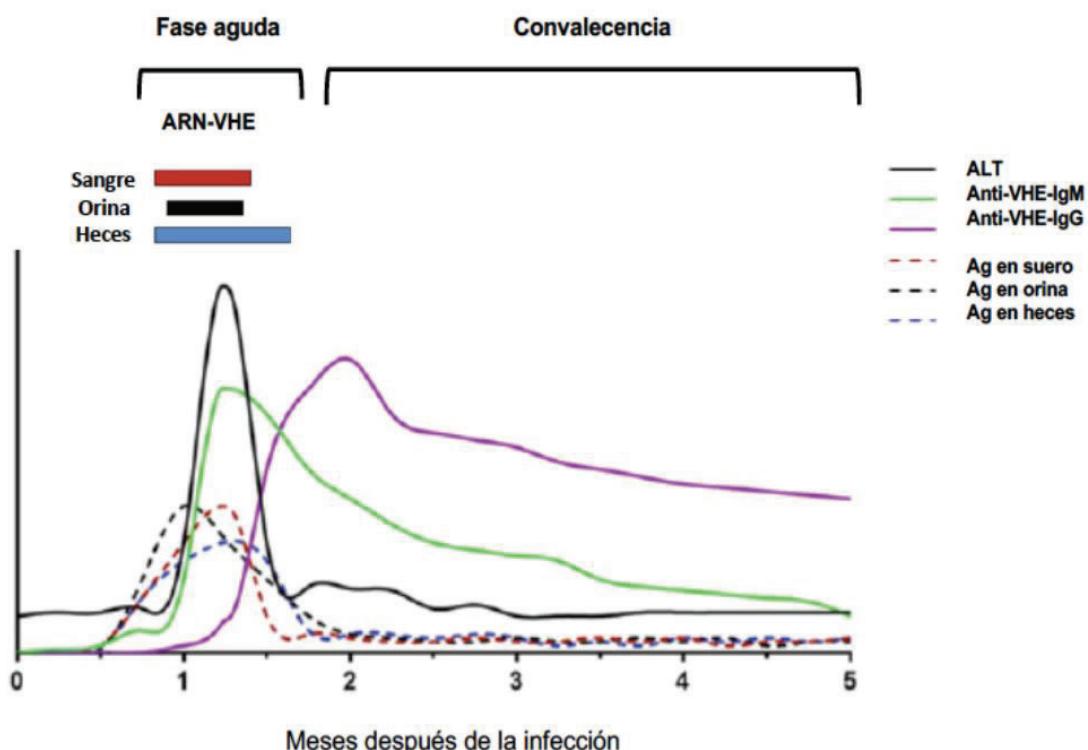


Figura 8. Dinámica de marcadores serológicos y virológicos
(<https://amhigo.com/images/actualidades/noticias/Hepatitis/serologia-VHE.jpeg>)

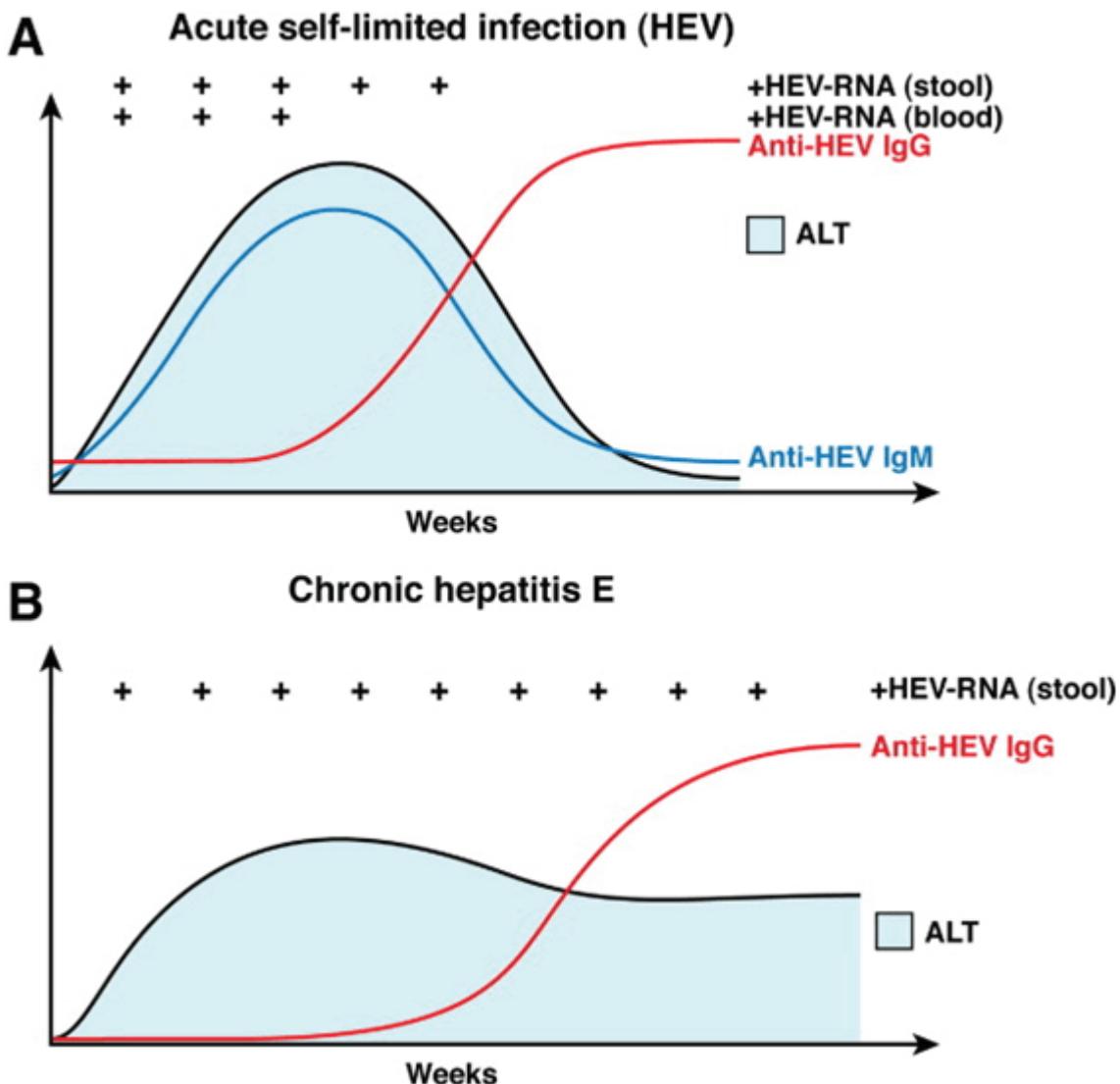


Figura 9. Dinámica de marcadores en hepatitis aguda vs crónica
(Wedemeyer H *et al.*, 2012)

La infección puede evolucionar de forma grave en mujeres gestantes (15-25% de mortalidad), especialmente cuando la infección es mediada por los genotipos 1 y 2. (Quintana-González A, 2003; Kamar N *et al.*, 2014). Presenta una mortalidad del 25%, sobre todo en 2º-3º trimestre de la gestación, en parte a expensas de una forma fulminante (Jilani N *et al.*, 2007; Rathi U *et al.*, 2007) y puede desencadenar abortos espontáneos o partos prematuros. La infección intrauterina puede producir morbimortalidad perinatal (Rathi U *et al.*, 2007).

La muerte se produce por coagulación intravascular diseminada, insuficiencia renal o encefalopatía (Quintana-González A, 2003).

La causa de esta alta mortalidad es desconocida, pero algunos autores (Jilani N *et al.*, 2007) relacionan esta mayor mortalidad en las embarazadas con un descenso de la respuesta inmune celular, con disminución del cociente CD4/CD8 por descenso de CD4 y aumento de CD8, y ascenso de las concentraciones de hormonas esteroideas. Estos factores favorecerían la replicación y expresión virales.

1.8. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la infección por VHE recae sobre las pruebas de laboratorio ya que sus manifestaciones clínicas son similares a la que producen otros agentes de hepatitis. El VHE no se cultiva de forma eficiente. Por ello, la detección de IgM e IgG específica y la detección de antígeno o de ARN viral son las pruebas actualmente utilizadas en el diagnóstico (Huang S *et al.*; 2010; Kamar N *et al.*, 2014).

Las pruebas serológicas utilizan bien antígenos recombinantes o sintéticos (Myint KS *et al.*, 2006), equivalentes a los codificados por las ORF 2 o 3 para detectar IgM, IgA o IgG Anti-VHE. Los codificados por la ORF2 están más conservados en cepas del virus genéticamente alejadas. Los antígenos codificados por la ORF3 solo tienen el 37,5% de similitud entre cepas genéticamente alejadas (Hsieh SY *et al.*, 1998). Por ello, las pruebas basadas en antígenos de la ORF2 son más sensibles que los relacionados con la ORF3 (Ghabrah TM *et al.*, 1998; Hsieh SY *et al.*, 1998; Anderson DA *et al.*, 1999;

Obriadina A *et al.*, 2002) que, al parecer son más específicos de cada cepa (Coursaget P *et al.*, 1993; He J *et al.*, 1993; Khudyakov YE *et al.*, 1994).

Los equipos comerciales no están estandarizados y han mostrado resultados variables (Takahashi M *et al.*, 2005; Avellón A *et al.*, 2015). Las diferencias pueden ser debidas a una menor sensibilidad para detectar anticuerpos en la convalecencia, lo que se traduciría en resultados falsos negativos (Aggarwal R, 2011). Los resultados de los estudios comparativos de las pruebas comerciales son más consistentes en el caso de la IgM, que en el caso de la IgG (Echevarría JM *et al.*, 2015). En un estudio comparativo (Myint KS *et al.*, 2006) parece que todos son más sensibles para detectar casos sintomáticos que asintomáticos.

Los antiguos equipos comerciales diseñados para detectar anticuerpos contra los genotipos 1 (Birmania) y 2 (México) no eran sensibles para detectar los genotipos 3 y 4 (Pas SD *et al.*, 2013). Los equipos actualmente comercializados son adecuados para el diagnóstico de las infecciones por VHE genotipo 3 (Huang WJ *et al.*, 2009; Huang S *et al.*, 2010; Pas SD *et al.*, 2013; Zhao C *et al.*, 2016). Éstos se basan en péptidos sintéticos o antígenos recombinantes de la región ORF2 y ORF3 procedentes del genotipo 1 del VHE, que pueden detectar la presencia de anticuerpos IgG e IgM inducidos por los 4 principales genotipos, ya que constituyen un sólo serotipo.

Existen varios estudios que comparan la especificidad y sensibilidad de los ELISA comerciales (Avellón A *et al.*, 2015; Pas SD *et al.*, 2013, Norder H *et al.*, 2016).

En el estudio de Avellón *et al.* (Avellón A *et al.*, 2015), se compara la sensibilidad de 6 equipos comerciales, para detección de anticuerpos frente al genotipo 3, siendo más sensibles para la detección de IgM los de DSI, MIKROGEN y ALL.DIAG que los de Euroinmun, MP y DIA.PRO, mientras que para la detección de IgG todos los equipos mostraron similar sensibilidad, pero con falta de concordancia en conjunto. Los datos de estos autores difieren de estudios previos, sobre WANTAI, Adaltis, DIA.PRO, MP, MSI y MIKROGEN, resumidos por Avellón *et al.* (Avellón A *et al.*, 2015) (Tablas 1 y 2). Estos estudios previos muestran buena especificidad, pero sensibilidad variable, incluso con la misma técnica. Las diferencias entre este estudio y los estudios previos son atribuidas a las mejoras introducidas por MP y DIA.PRO.

Tabla 1: Sensibilidad y especificidad de IgM Anti-VHE (Modificada de Avellón A <i>et al.</i> , 2015)			
Marca	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Bibliografía
WANTAI/Fortress	74-97,1	99-100	Zhou H <i>et al.</i> , 2008 Abravanel F <i>et al.</i> , 2013 Pas SD <i>et al.</i> , 2013
Adaltis	88-97	87,4-100	Abravanel S <i>et al.</i> , 2013 Pas SD <i>et al.</i> , 2013 Wu WC <i>et al.</i> , 2014
DIA.PRO	81	98	Pas SD <i>et al.</i> , 2013
MP/Genlabs	72-80	74-93	Myint KS <i>et al.</i> , 2006 Drobeniuc J <i>et al.</i> , 2010 Zhou H <i>et al.</i> , 2008 Pas SD <i>et al.</i> , 2013 Wu WC <i>et al.</i> , 2014
DSI	71-98	90-98	Drobeniuc <i>et al.</i> , 2010 Pas SD <i>et al.</i> , 2013
MIKROGEN	65-93,3	88,4-99	Drobeniuc J <i>et al.</i> , 2010 Pas SD <i>et al.</i> , 2013 Wu WC <i>et al.</i> , 2014

Tabla 2: Sensibilidad de IgG Anti-VHE (Modificada de Avellón A <i>et al.</i> , 2015)				
	WANTAI	ADALTIS	MP	Bibliografía
Hepatitis E aguda	45	15		Abravanel F <i>et al.</i> , 2013
	93	8		Abravanel F <i>et al.</i> , 2013
	95,8		66,6	Jiang YZ <i>et al.</i> , 2007
	98		56	Bendall R <i>et al.</i> , 2010
	83	80	53	Schnegg A <i>et al.</i> , 2013
Trasplante órgano sólido	31,3		10,9	Rossi-Tamisier M <i>et al.</i> , 2013
Donantes de sangre	52,5	16,6		Mansuy JM <i>et al.</i> , 2011
	16,0		3,6	Bendall R <i>et al.</i> , 2010
	31,7		7,8	Jiang YZ <i>et al.</i> , 2007
	21,8	4,2	4,9	Schnegg A <i>et al.</i> , 2013
Seguimiento de hepatitis aguda VHE	100		50	Bendall R <i>et al.</i> , 2010
La especificidad de WANTAI y Adaltis han sido determinadas en el 97,8% y 90% respectivamente (Abravanel <i>et al.</i> , 2013).				

Los anticuerpos IgM, detectados por inmunoensayo o por inmunocromatografía, son un marcador de infección reciente (Ghabrah TM *et al.*, 1998; Yu C *et al.*, 2003) y se detectan en más del 90% de los casos, disminuyen rápidamente tras la fase temprana de convalecencia y se vuelven generalmente negativos a las 13 semanas, cayendo por debajo del nivel de corte en la mayoría de los pacientes después de 32 semanas. Esta prueba es útil para hacer el diagnóstico diferencial con otros virus productores de hepatitis. La respuesta de IgM es débil y retardada, incluso indetectable, en pacientes inmunodeprimidos (Legrand-Abravanel F *et al.*, 2010; Takikawa Y *et al.*, 2012). En estos casos, el diagnóstico se basa en la detección de ARN (Pas SD *et al.*, 2012). En caso de IgM sin IgG, se debe considerar la posibilidad de un falso positivo o esperar a la

seroconversión de IgG o confirmar el resultado con inmunoblot, prueba de detección de antígeno o PCR.

Además, los anticuerpos IgG frente a VHE pueden usarse para evaluar la prevalencia de la infección por hepatitis E en una población y suelen ser positivos a las 2-3 semanas del contacto, alcanzando el pico al mes de la infección. Los anticuerpos IgG se desarrollan temprano tras el inicio clínico de la hepatitis E y son de larga duración, hasta más de 10 años (Jameel S, 1999; Khuroo MS *et al.*, 1993; Huang S *et al.*, 2010; Abravanel F *et al.*, 2013; Pérez-Gracia MT *et al.*, 2014). Los métodos de detección basados en quimioluminiscencia han recibido mucha atención debido a su menor ruido de fondo, linealidad y amplio rango dinámico. Cuando se acoplan a inmunoensayos enzimáticos, el efecto de amplificación de la señal proporcionada por la enzima permite el diseño de pruebas de CLIA con tiempos de incubación más cortos, manteniendo o mejorando su sensibilidad. Se puede determinar la avidez de las IgG, como prueba diagnóstica complementaria. La avidez de IgG ha mostrado ser un marcador eficaz en la diferenciación de infección actual o pasada, por lo que puede ser un marcador muy útil acompañando a la IgM (Zhang JZ *et al.*, 2002; Bendall R *et al.*, 2008; Bigaillon C *et al.*, 2010; Huang S *et al.*, 2010). El significado de las pruebas para IgA, como marcador de infección aguda debe ser determinado definitivamente.

También se ha señalado que los anticuerpos aparecen en distintos momentos según cual sea el determinante utilizado como antígeno (Zhang JZ *et al.*, 2002).

La detección de ARN (RT-PCR) puede hacerse en sangre, bilis, heces o en biopsia hepática (Zhao C *et al.*, 2016). El ARN de VHE es detectable en suero 1 a 2 semanas antes del comienzo de los síntomas y, generalmente, persiste

durante una semana, con sondas para las regiones conservadas de ORF3 (Abravanel F *et al.*, 2013; Kamar N *et al.*, 2014). No obstante, se ha descrito persistencia de la viremia de 4 a 16 semanas (Rodríguez-Frías F *et al.*, 2012).

La persistencia en heces es de hasta 6 semanas (Huang S *et al.*, 2010), con una media de 28 días (rango 17-48 días) (Dalton HR *et al.*, 2008). Esta prueba permite hacer el diagnóstico durante el periodo de ventana (Echevarría JM *et al.*, 2015). Debido a la corta duración de la viremia, un resultado negativo de la PCR no descarta el diagnóstico, por lo que la serología es necesaria. Hay que tener en cuenta que el genoma del VHE es muy inestable. Esto aconseja hacer el análisis de ARN sobre muestras recientes, lo que puede restar valor a las muestras conservadas en seroteca (Echevarría JM *et al.*, 2015).

La determinación de ARN es necesaria para el diagnóstico precoz, para determinar si estamos ante una infección autóctona o importada (genotipado), para el seguimiento del tratamiento y para establecer el diagnóstico en los casos con sintomatología extrahepática (Pischke S *et al.*, 2017), especialmente en LCR en los casos de afectación neurológica (GeHEP, 2018).

El antígeno de VHE también puede ser detectado (Zhao C *et al.*, 2016) por inmunoensayo indirecto con antígeno pORF2 en sangre y orina (Zhang H *et al.*, 2017; Lu J *et al.*, 2020). Es menos sensible que PCR para cargas virales inferiores a 3 logaritmos. También es posible el diagnóstico de la infección por inmunomicroscopía electrónica, cultivo celular e inmunohistoquímica, aunque son métodos complicados y poco sensibles (Zhao C *et al.*, 2106; Zaki MS *et al.*, 2009).

En resumen, los criterios diagnósticos son los siguientes (Echevarría JM *et al.*, 2013): 1) Anti-VHE negativo/ARN positivo (periodo de ventana); 2) Anti-VHE IgM positivo/ARN positivo (periodo de seroconversión precoz); 3) Anti-VHE IgM positivo/ARN negativo (periodo postseroconversión); 4) Seroconversión Anti-VHE durante el seguimiento. La presencia de IgG sin IgM ni ARN indica infección pasada.

CMV y VEB pueden producir falsos positivos en la IgM de VHE por estímulo policlonal de los linfocitos B. Esto debe de ser tenido en cuenta en el diagnóstico diferencial de los casos IgM Anti-VHE positivos/ARN negativos (Fogeda M *et al.*, 2009).

En todo caso, el diagnóstico de la hepatitis aguda E obliga a descartar otros agentes hepatotropos primarios (VHA, VHB, VHC), así como a CMV y VEB cuando se detecta IgM Anti-VHE y la PCR es indetectable, como consecuencia de la falta de estandarización de las pruebas serológicas.

La IME permite detectar viriones en las heces, utilizando suero de fase aguda. Tiene como inconveniente las complicaciones técnicas y que el virus puede encontrarse degradado en las heces, lo que disminuye el número de partículas visibles.

1.9. TRATAMIENTO

La infección aguda por el VHE suele cursar de forma leve y es suficiente con medidas de apoyo, sin embargo, algunos pacientes pueden desarrollar fallo hepático agudo, y se podría valorar el uso de rivabirina en estos casos, ya que

ofrece beneficios claros, en cuanto a la duración de la sintomatología. (Gerolami R *et al.*, 2011; Kamar N *et al.*, 2012; EASL 2018). En las embarazadas está contraindicada.

La infección crónica se observa especialmente en pacientes inmunodeprimidos, como receptores de trasplante de órgano sólido, pacientes VIH positivos, etc. En estos casos, uno de las actuaciones más importantes, será reducir el tratamiento inmunosupresor en los pacientes en los que sea posible, ya que ayudará a la erradicación viral (Ahmed A *et al.*, 2015). El interferón α pegilado es efectivo en pacientes receptores de trasplante hepático, pero presenta efectos adversos, como el rechazo agudo. (Kamar N *et al.*, 2010).

En la infección crónica por el VHE, se observó que los pacientes con ARN viral de más de 3 meses, serían incapaces de aclarar el virus espontáneamente sin ayuda de tratamiento (Kamar N *et al.*, 2014). El objetivo del tratamiento es la erradicación del VHE, en términos de respuesta viral sostenida (RVS) con negativización de ARN en suero y heces a las 12 semanas del fin del tratamiento (GeHEP, 2018). El uso de rivabirina durante 12 semanas, ha demostrado la eliminación del virus en pacientes trasplantados con infección crónica (Kamar N *et al.*, 2014; Rivero-Juárez A *et al.*, 2019).

En pacientes receptores de trasplante de órgano sólido, la infección por VHE puede evolucionar a cirrosis y requerir trasplante hepático (Kamar N *et al.*, 2011).

1.10. PROFILAXIS

La educación sanitaria, las medidas de higiene, el adecuado saneamiento de los sistemas de abastecimiento de aguas, la higiene de los alimentos y su consumo adecuadamente cocinados son procedimientos necesarios en este tipo de infecciones.

La administración de gammaglobulina ha demostrado que no es un procedimiento eficaz (Aggarwal R *et al.*, 2009).

Shrestha MP *et al.* (Shrestha MP *et al.*, 2007) han evaluado una vacuna recombinante administrada en 3 dosis a los 0, 1 y 6 meses en 2000 adultos sanos en Nepal. La vacuna mostró una eficacia del 95%. En China se ha desarrollado una vacuna (Hecolin®, Xiameng Innovax Biotech, China) basada en el genotipo 1 que puede proporcionar protección cruzada frente a otros genotipos (Kamar N *et al.*, 2014), gracias a la existencia de un único serotipo. La vacuna mostró una eficacia del 86,8% en un estudio a los 4 años (Zhang J *et al.*, 2013). A pesar de lo esperado, se observó que la mayoría de los casos que desarrollaron hepatitis E en el grupo de vacunados, se infectaron por el genotipo 4 y la vacuna había sido desarrollada con el genotipo 1.

La persistencia de la IgG a los 6,5 años es significativamente mayor en los inmunizados con una vacuna en fase III en China (30%) que en los que han padecido la infección natural (18,6%) (Kmush BL *et al.*, 2019).

En este momento, no se recomienda la vacunación rutinaria en menores de 16 años, mayores de 65 años, pacientes con hepatopatía crónica, pacientes en lista

de trasplante de órgano sólido, mujeres embarazadas, ya que no hay estudios suficientes de post-comercialización.

Los procedimientos actuales para inactivar los agentes infecciosos en los bancos de sangre no son efectivos frente al VHE (Agencia Europea del Medicamento, 2016).

En varios estudios realizados en donantes de sangre en España, se observó que la prevalencia de ARN del VHE detectable fue del 0,05%-0,02% (Sauleda S *et al.*, 2015; Ojea A *et al.*, 2017; Piron M *et al.*, 2017; Rivero-Juárez A *et al.*, 2019).

Por ello, el cribado de los donantes se presenta como una alternativa eficaz. Este procedimiento se utiliza en Irlanda desde 2016 y en Holanda y Reino Unido desde 2017. En Francia y Alemania, solo se criba el plasma destinado a enfermos de riesgo.

Además, se recomienda la realización de cribado de VHE en todos los donantes de órgano sólido, aunque el riesgo de transmisión sea muy bajo. La posibilidad de que la infección cronifique en este tipo de pacientes es mayor, debido al estado de inmunosupresión (Kamar N *et al.*, 2011).

1.11. HEPATITIS E Y SÍNDROME DE PARSONAGE-TURNER

En los últimos años, ha aumentado el conocimiento sobre las manifestaciones extrahepáticas de la infección por VHE (Kamar N *et al.*, 2011; Cheung MCM *et al.*, 2012; Mendoza C *et al.*, 2020). Algunos autores han descrito complicaciones neurológicas en el 5,5-7,5% de pacientes con infección por VHE (Woolson K *et*

al., 2014; Ripellino P *et al.*, 2018), incluida la neuralgia amiotrófica, también conocida como síndrome de Parsonage-Turner (SPT).

El SPT fue descrito por primera vez por Feinberg en 1897 en un paciente con gripe. En 1948, Parsonage y Turner (Parsonage MJ *et al.*, 1948) describieron el síndrome en 136 soldados con el nombre de neuralgia amiotrófica de la cintura escapular. Este cuadro es una rara neuropatía del plexo braquial que afecta principalmente a la cintura escapular y la extremidad superior. Sus manifestaciones clínicas incluyen dolor repentino e intenso en el hombro y en la extremidad superior, que se exacerba por la noche y en reposo, junto con parálisis y amiotrofia (Van Eijk J *et al.*, 2014). Se han descrito casos de SPT en varios países. El diagnóstico se ha facilitado por la disponibilidad de pruebas serológicas y moleculares.

No se conoce su etiología. Se han identificado diversos factores relacionados: enfermedades infecciosas, vacunas, traumatismos, cirugía, gestación, quimioterapia y radioterapia (Van Eijk J *et al.*, 2016). Es posible que esté relacionado con predisposición genética, susceptibilidad a lesiones mecánicas del plexo braquial o procesos autoinmunes desencadenados por una infección del sistema nervioso central (Van Alfen N, 2011).

La asociación entre SPT y VHE puede depender del neurotropismo del virus, recientemente descrito (Drave SA *et al.*, 2016). Estos autores demostraron que líneas celulares de oligodendrocitos permiten la replicación del virus. También se ha demostrado (Shi R *et al.*, 2016) que VHE es capaz de alterar la barrera hematoencefálica y replicarse en cerebro y médula espinal de rata.

El VHE se ha encontrado en el 10% de pacientes con SPT (Van Eijk J *et al.*, 2014), pero esta relación está probablemente infradiagnosticada. No existe tratamiento específico.

En el anexo II se resume la revisión bibliográfica realizada sobre los casos de SPT descritos en el mundo.

2. OBJETIVOS

1. Analizar la situación de la infección por VHE en Aragón.
2. Evaluar distintos métodos serológicos comerciales para diagnóstico de la hepatitis E, en función de las manifestaciones clínicas, tiempo de evolución y tipo de paciente, analizando sus ventajas, aplicaciones y limitaciones.
3. Poner a punto una prueba de avidez de IgG específica para VHE.
4. Evaluar una PCR no comercial para diagnóstico de la hepatitis E, en función de las manifestaciones clínicas, tiempo de evolución y tipo de paciente.
5. Determinar la persistencia de la positividad de los marcadores IgM e IgG específicas de VHE, de la carga viral en suero y de la baja avidez de la IgG.
6. Analizar genotípicamente, mediante secuenciación, todos los amplicones de VHE detectados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES

Se han estudiado los marcadores de infección por virus de la hepatitis E en muestras de suero de varios grupos de pacientes, recibidas entre el 1 de enero de 2011 y el 31 de diciembre de 2018 en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

Todas las muestras de todos los grupos se congelaron a -80°C hasta su análisis.

En todos los pacientes, salvo en los procedentes del Centro Regional de Transfusiones de Granada, se revisaron las historias clínicas para crear una base de datos con las variables de cada individuo, conforme a lo dispuesto en la Ley de protección de datos (LO 15/1999).

Los datos a registrar fueron:

- Datos demográficos: sexo, edad, residencia, raza, profesión y país de origen, utilizando, cuando era necesario, la Base de Datos de Usuarios (BDU) del SALUD (Servicio Aragonés de Salud).
- Datos clínicos: fiebre, náuseas, coluria, diarrea, vómito, abdominalgia, artralgia, ictericia, descompensación hepática, fecha de aparición y duración de los síntomas, tratamiento, transfusiones, inmunodepresión, trasplantes, coinfecciones, embarazo y fechas de obtención de muestras.
- Datos analíticos: ALT, AST, GGT, bilirrubina total, directa e indirecta, plaquetas, leucocitos, coagulación.
- Datos epidemiológicos: alimentación, caza, contacto con animales, viajes, transfusiones, origen del agua de boca, consumo de productos de huerto, manipulación de estiércol, hepatitis previas, infección por VIH.
- Tratamientos concurrentes.

3.1.1. GRUPO 1: PACIENTES CON SOSPECHA DE HEPATITIS E

Formado por 1166 sueros de 1070 pacientes (615 hombres y 455 mujeres) para confirmar o descartar el diagnóstico de hepatitis E, con edad entre 0 y 94 años (media $44,45 \pm 18,84$), procedentes de los distintos Centros Sanitarios de Aragón. Estas muestras fueron analizadas con IgM DIA.PRO.

El estudio en este grupo se realizó para diagnosticar/descartar infección por VHE y estimar la prevalencia de IgM.

3.1.2. GRUPO 2: 106 PACIENTES DEL GRUPO 1 CON IgM POSITIVA CON EIA (DIA.PRO) ANALIZADAS CON CLIA (VIRCELL)

Formado por 106 muestras de 106 pacientes procedentes de los 131 que presentaban índice de IgM de DIA.PRO $>1,0$, es decir, con resultado positivo o dudoso, en los que hubo suficiente volumen de suero para otras determinaciones. Este grupo incluía 70 varones y 36 mujeres. Sus edades oscilaron entre 13 y 88 años (media $52,89 \pm 16,74$).

El objetivo de este grupo es validar los resultados de la IgM positiva de DIA.PRO, relacionándolos con los resultados de IgM e IgG por CLIA (VIRCELL).

3.1.3. GRUPO 3: PACIENTES DEL GRUPO 2 CLASIFICADOS DE HEPATITIS AGUDA CON EIA (DIA.PRO) Y ANALIZADOS POR IC

Formado por 4 muestras de 4 pacientes (3 hombres y una mujer) del grupo 2 con IgM de DIA.PRO positivas para ser analizados por inmunoensayo (ALL.DIAG) (casos 406971, 411105, 411297 y 416208). Sus edades oscilaron entre 44 y 72 años (media $54,09 \pm 12,05$).

El objetivo de este grupo es validar los resultados de la IgM de ALL.DIAG.

3.1.4. GRUPO 4

3.1.4.1. GRUPO 4A: DONANTES DEL BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO LOZANO BLESA

Formado por 72 sueros de 72 donantes (22 hombres y 50 mujeres) de 2014, sin patología hepática, procedentes del Banco de Sangre a los que se extrajo sangre para la preparación de colirios autólogos. Su edad oscilaba entre 8 y 88 años (media $53,74 \pm 17,81$). Estos pacientes se analizaron con IgM DIA.PRO.

Este grupo 4 se analizó para detectar la posible presencia de infecciones asintomáticas por VHE en pacientes sin clínica hepática.

3.1.4.2. GRUPO 4B: PLASMAS DEL CENTRO REGIONAL DE TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA DE GRANADA

Formado por 687 plasmas de 687 donantes del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada. Estas muestras fueron analizadas por CLIA IgG e IgM de VIRCELL.

A partir de las muestras IgG positivas e IgM negativas, se realizó un análisis de curvas ROC, para el establecimiento del punto de corte de la técnica de avidez IgG a VHE.

En este grupo se pretende analizar marcadores positivos a VHE en una población sana de diferente zona geográfica.

3.1.5. GRUPO 5: PACIENTES DEL MEDIO RURAL

Formado por 154 sueros de 154 pacientes (53 hombres y 101 mujeres) que fueron atendidos entre junio y agosto de 2018 en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, procedentes de 13 pueblos del centro de la zona noroccidental de la provincia de Zaragoza. Presentaban patología no hepática (cólico renal, infección urinaria, infertilidad, infección de trasmisión sexual, vitíligo, accidente laboral, carcinoma mamario, cefalea, embarazo, etc.). El rango de edad fue entre 4 y 85 años (media $39,26 \pm 16,92$).

El objetivo de este grupo fue analizar la prevalencia de IgG Anti-VHE CLIA (VIRCELL) en una zona rural de la provincia de Zaragoza (Tabla 12) en la que se concentran los diagnósticos de hepatitis E por DIA.PRO.

Los pacientes procedían de las siguientes localidades: Alagón 13, Borja 19, Ejea de los Caballeros 35, Épila 6, La Almunia 2, Magallón 1, Mallén 3, Pedrola 1, Sádaba 6, Sos del Rey Católico 1, Tarazona 34, Tauste 9 y Utebo 24.

3.1.6. GRUPO 6: PACIENTES CON IgM NEGATIVA FRENTE A VHA

Formado por 50 pacientes (28 hombres y 22 mujeres) con IgM frente a VHA negativa (CMIA, Architect, Abbott), con edades entre 1 y 86 años ($38,84 \pm 23,14$) que fueron cribados para descartar infección por VHA. En este grupo se realizó IgM Anti-VHE CLIA (VIRCELL).

Este grupo pretende evaluar la presencia de VHE en los pacientes que se había descartado infección por VHA, cuyos mecanismos de trasmisión son similares a

los de la hepatitis E, y detectar infecciones por VHE infradiagnosticadas por ausencia de sospecha.

3.1.7. GRUPO 7: SEGUIMIENTO DE PACIENTES IgM ANTI-VHE POSITIVOS

En 31 de los 106 pacientes del grupo 2, pudimos disponer de 42 sueros de seguimiento, a razón de 1-3 muestras por paciente, obtenidas entre los 8 y 940 días de evolución desde la primera muestra.

Con este grupo se pretende analizar la persistencia de la IgM y la evolución de la avidez de la IgG.

3.1.8. GRUPO 8: ESTUDIO COMPARATIVO EN PACIENTES DEL GRUPO 2

Formado por 106 sueros de 106 pacientes del grupo 2 con IgM positiva o dudosa con DIA.PRO para comparar las técnicas de detección de IgM de VIRCELL, WANTAI Y MIKROGEN y PCR. Este grupo incluía 70 varones y 36 mujeres. Sus edades oscilaron entre 13 y 88 años (media 52,89 ±16,74).

El objetivo de este grupo es comparar los resultados obtenidos con las distintas pruebas utilizadas.

3.1.9. GRUPO 9: ANÁLISIS MOLECULAR, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Formado por 106 muestras del grupo 2, sus características han sido descritas anteriormente. Su objetivo es evaluar la replicación del virus en los pacientes con

hepatitis E aguda, con infección asintomática o con anticuerpos residuales y en pacientes con resultado de IgM DIA.PRO falso positivo. En los pacientes con PCR positiva, los amplicones se han secuenciado con el objetivo de saber que cepas están circulando en Aragón.

3.1.10. GRUPO 10: ESTUDIO DE AVIDEZ DE IgG A VHE

Formado por 96 muestras de 96 pacientes del grupo 2, 67 varones y 29 mujeres, con edades entre 21 y 91 años (media $57,87 \pm 15,78$). Se realizó avidez de IgG Anti-VHE (VIRCELL).

Con el estudio de este grupo se pretende evaluar el valor de la prueba de avidez para diferenciar infecciones recientes de antiguas.

3.1.11. GRUPO 11: PACIENTES CON SÍNDROME DE PARSONAGE-TURNER Y VHE

Formado por 4 sueros de 2 pacientes (un varón y una mujer) de 44 y 57 años de edad, respectivamente, que fueron diagnosticados de síndrome de Parsonage-Turner en el Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

Paciente 1

Se trata de un varón caucásico de 44 años, inmunocompetente, calderero, vecino de Monzalbarba. El paciente no había sufrido traumatismos ni presentaba

antecedentes clínicos destacables. Ingresó en el HCU Lozano Blesa en mayo del 2018 por presentar disnea significativa e intenso dolor cervicobraquial, especialmente en la región deltoidea, que hacía imposible la abducción y la rotación externa del brazo derecho desde hacía 24 horas. Estos síntomas se acompañaban de parestesia sin pérdida de sensibilidad, pero con sensación de hormigueo en la punta de los dedos. El dolor no cedía a los analgésicos no esteroideos (metamizol y dexketoprofeno). El paciente refirió fiebre antes de los síntomas. No tuvo ictericia y su exploración abdominal fue normal. Posteriormente los síntomas se extendieron al lado izquierdo, pero presentaron menor intensidad. Sus datos clínicos y analíticos se muestran en la tabla 3. A la exploración mostró debilidad en ambas extremidades superiores con dificultad en la elevación y abducción. Sus reflejos estaban abolidos en el lado derecho del cuerpo y disminuidos en el izquierdo. El paciente no refería viajes fuera de España, ni contacto con animales, ni transfusiones, tatuajes o “piercings” ni abuso de alcohol o drogas. Era consumidor de verduras de un huerto local.

La analítica sanguínea fue normal, salvo una ligera elevación de AST (59 U/L). La exploración ecográfica abdominal tampoco mostró alteraciones. No se detectó presencia de autoanticuerpos y la serología de VHA, VHB, VHC, VEB, CMV, VIH, VVZ, VHS, *Brucella*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* y *Toxoplasma gondii* fueron negativas. El electroneurograma inicial, cinco días después del inicio de los síntomas, fue normal y el electromiograma mostró discretas alteraciones en deltoides y bíceps derecho (raíces C5-C6 del tronco superior del plexo braquial). La resonancia magnética permitió excluir lesiones medulares.

Paciente 2

Se trata de una mujer caucásica de 57 años, ama de casa, también vecina de Monzalbarba. Ingresó en nuestro hospital en mayo de 2018, por presentar dolor intenso en la zona cervical derecha, irradiado al brazo, de tres días de evolución, acompañado de calambres musculares, sin traumatismo previo. La paciente también presentaba parestesia bilateral en ambos brazos. Recibió tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (ibuprofeno y metamizol), previamente al ingreso, sin mejoría en su sintomatología. En el ingreso se suprimió el tratamiento anterior y fue tratada con paracetamol y corticoides. La paciente no mostraba disnea. A las 24 horas, apareció dolor en fosa ilíaca derecho y lumbalgia izquierda, irradiada a la zona poplítea. La sensibilidad y los reflejos estaban conservados. No presentó afectación del nervio frénico. También presentó náuseas y abdominalgia sin fiebre ni ictericia ni alteraciones en la exploración ecográfica abdominal.

Los datos clínicos y analíticos se muestran en la tabla 3. Las pruebas de coagulación fueron normales salvo el fibrinógeno y las plaquetas. El estudio de autoinmunidad (factor reumatoide, ANA, AMA, c ANCA, p ANCA, IgA anti-transglutaminasa) también fue normal. Se descartó hemocromatosis. La paciente era inmunocompetente, no había viajado al extranjero, no había consumido setas, drogas de abuso o alcohol, no había sido transfundida ni llevaba tatuajes o “piercings”, no había recibido traumatismos ni realizado ejercicio físico intenso. También consumía verduras de un huerto local. El estudio

electrofisiológico fue compatible con lesión del plexo braquial derecho con criterios de denervación. La resonancia magnética descartó lesiones medulares. Las pruebas serológicas para VHA, VHB, VHC, VIH, VEB, CMV, Parvovirus B19, *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum* fueron negativas.

Inicialmente, la paciente fue diagnosticada de hepatitis medicamentosa. Permaneció ingresada cuatro días, tras los que fue dada de alta con tratamiento con paracetamol, después de la mejoría de sus síntomas y de la función hepática.

Tabla 3: Datos clínicos y analíticos de los pacientes con SPT

Característica	Paciente 1	Paciente 2
Edad	44	57
Sexo	Hombre	Mujer
Immunocompetencia	Si	Si
Enfermedad hepática crónica subyacente	No	No
AST (U/L)	22	565
ALT (U/L)	59	1267
GGT (U/L)	56	224
ALKP (U/L)	-	80
LDH (U/L)	149	566
Bilirrubina (mg/dL)	-	0,33
Tiempo de protrombina (segs.)	11,2	11,4
Fibrinógeno (mg/dL)	550	453
Plaquetas/mm ³	280000	136000
Autoanticuerpos	Negativo	Negativo
Ictericia	No	No
Fiebre	Si	No
Abdominalgia	No	Si
Afectación bilateral	Si	Si
Afectación del nervio frénico	Si	No
Disnea	Si	No
Hospitalización (días)	Si (17)	Si (4)
Seguimiento	1 año	12 sem.

AST, aspartato aminotransferasa [rango de referencia (0-31)]; ALT, alanina aminotransferasa [rango de referencia (0-33)]; ALKP, fosfatasa alcalina [rango de referencia (35-104)]; GGT, γ -guamil transpeptidasa [rango de referencia (0-40)]; LDH, lactato deshidrogenasa [rango de referencia (135-214)]; fibrinógeno [rango de referencia (200-450 mg/dL)]; Plaquetas [rango de referencia (150000-400000/mm³)]

3.2. MARCADORES ANALIZADOS

3.2.1. ANTI-VHE IgM: se realizó por enzimoimmunoensayo IgM (EIA) (HEV IgM®, DIA.PRO SRL, Milán, Italia), a todas las muestras de los grupos 1, 2, 4a y 7.

Las 106 muestras del grupo 2, las muestras del grupo 4B, las 50 del grupo 6 y las 73 del grupo 7 fueron analizadas también con un ensayo quimioluminiscente (CLIA) de captura para IgM (Hepatitis E Virclia® IgM Monotes, VIRCELL S.L., Granada, España).

Las 4 muestras del grupo 3 también se estudiaron con Inmuno Cromatografía para IgM (HEVTOP® IgM, ALL.DIAG, Estrasburgo).

Las 147 muestras del grupo 8 fueron también analizadas por EIA IgM (HEV-IgM ELISA, Wantai Biological Pharmacy Enterprise, Co, Beijing, China) y por EIA IgM indirecto (Recomwell HEV IgM, Mikrogen Diagnostic, Neuried, Alemania).

3.2.2. ANTI-VHE IgG: se realizó por un ensayo quimioluminiscente (CLIA) indirecto (Hepatitis E Virclia® IgG Monotest, VIRCELL S.L., Granada, España) a todos los pacientes de los Grupos 2, 4B, 5 y 7.

3.2.3. AVIDEZ DE IgG: se realizó un ensayo CLIA no comercial a 96 muestras de 96 pacientes del grupo 2, además de algunos pacientes del 4B y pacientes del grupo 7. He colaborado en la puesta a punto de esta técnica, que se comercializará próximamente, durante una estancia en VIRCELL, S.L.

3.2.4. PCR A VHE: se realizó PCR a tiempo real no comercial a todos los pacientes del grupo 2 y a 11 pacientes del grupo 7 con PCR positiva en el primer suero.

3.2.5. SECUENCIACIÓN: se realizó secuenciación a todos los pacientes con PCR positiva con el objeto de completar la caracterización de los amplicones detectados por PCR a tiempo real.

3.3. TÉCNICAS UTILIZADAS

3.3.1. EIA ANTI-VHE IgM, DIA.PRO SRL (Milán, Italia).

- Fundamento:

Se trata de un EIA indirecto que utiliza microplacas con pocillos tapizados con antígenos recombinantes de los genotipos 1, 2, 3 y 4 de VHE. Las IgM Anti-VHE presentes en el suero se unen a los antígenos de la pared de los pocillos. Los anticuerpos no unidos se eliminan con lavados. Las IgM unidas se detectan con anti-IgM policlonal marcados con peroxidasa. El enzima capturado en la fase sólida actúa sobre el sustrato, generando una señal óptica de intensidad proporcional a la concentración de IgM específica en la muestra. La técnica incorpora la absorción del factor reumatoide para evitar interferencias.

- Reactivos:

- Microplacas con 12 tiras de 8 pocillos sensibilizados con antígeno recombinante de las ORF 2 y 3 de VHE de los genotipos 1, 2, 3, 4.

- Control negativo: proteínas de suero de cabra, tampón citrato sódico, Tween 20 y conservantes.
- Control positivo; IgM Anti-VHE, proteínas de suero de cabra, Tween 20 y conservantes.
- Tampón de lavado concentrado: PBS 10 mM 20X y conservantes.
- Conjugado: anticuerpos policlonales de cabra anti-IgM marcados con peroxidasa de rábano picante, tampón y conservantes.
- Substrato: tetrametilbenzidina, dimetilsulfóxido, tampón citrato, H_2O_2 y conservantes.
- Solución de parada: SO_4H_2 0,3 M.
- Diluyente de muestra: tampón citrato sódico 10 mM, Tween 20 y conservantes.
- Absorbente de factor reumatoide: anti-IgG de cabra, citrato sódico, Tween 20 y conservantes.

- Técnica:

El procesamiento se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de una dilución de suero de 1/101 (Figura 10).



Figura 10. Tira de una placa micrométodo (DIA.PRO)

- Lectura:

Con fotómetro a 450 nm de longitud de onda, con 650 nm como longitud de onda de referencia.

- Validación de la prueba:

Control negativo: <0,100.

Control positivo: >0,500.

- Interpretación:

Cálculo del valor de corte: Media de los controles negativos + 0,250.

Cálculo del índice de anticuerpos de la muestra = lectura de la muestra / lectura del valor de corte.

Índice <1,0: Negativo; índice 1,0 - 1,2; Dudoso; índice >1,2: Positivo.

Las muestras con resultados dudosos deben ser reanalizadas y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.

Las muestras con índices inferiores a 1,0 se considera que no tienen anticuerpos IgM para VHE.

Las muestras con índices superiores a 1,2 se considera que tienen anticuerpos IgM para VHE.

- Sensibilidad y especificidad:

El límite de detección es de 1 UI/mL. Según el fabricante (Rev. 5 oct. 2015), la especificidad es del 95% y la sensibilidad del 100%.

Esta ha sido nuestra prueba de referencia al ser la que veníamos utilizando en nuestro Servicio como prueba de diagnóstico y con la que se seleccionaron los pacientes analizados en este trabajo.

3.3.2. CLIA ANTI-VHE IgM VirClia, VIRCELL S.L. (Granada, España).

- Fundamento:

Método de CLIA basado en la captura de IgM presente en la muestra por anticuerpos anti-IgM anti- μ unidos a la superficie de poliestireno de los pocillos de reacción. Las inmunoglobulinas no unidas son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior el antígeno (ORF 2 y ORF3 de genotipo 1) conjugado con peroxidasa reacciona con las IgM capturadas y el que no se une es eliminado por los lavados; el antígeno unido reacciona con el sustrato

quimioluminiscente que generará una luminiscencia que puede leerse con un luminómetro.

- Reactivos:

El equipo consta de 24 cartuchos para 24 pruebas, cada cartucho consta de 8 pocillos, 3 de reacción y 5 de reactivos (Figura 11) con la siguiente composición:

- Pocillos A, B, C: de reacción, cubiertos con anticuerpo anti-IgM.
- Pocillo D (conjugado) dilución de antígenos recombinantes de VHE marcados con peroxidasa y con neolone y bronidox como conservantes. Color naranja.
- Pocillo E (diluyente): tampón fosfatos con estabilizante de proteínas y con neolone y bronidox como conservantes. Color azul.
- Pocillo F (calibrador): suero positivo diluido con neolone y bronidox como conservantes. Color claro.
- Pocillo G (componente B de sustrato): peróxido. Color claro.
- Pocillo H (componente A de sustrato): luminol. Color claro.

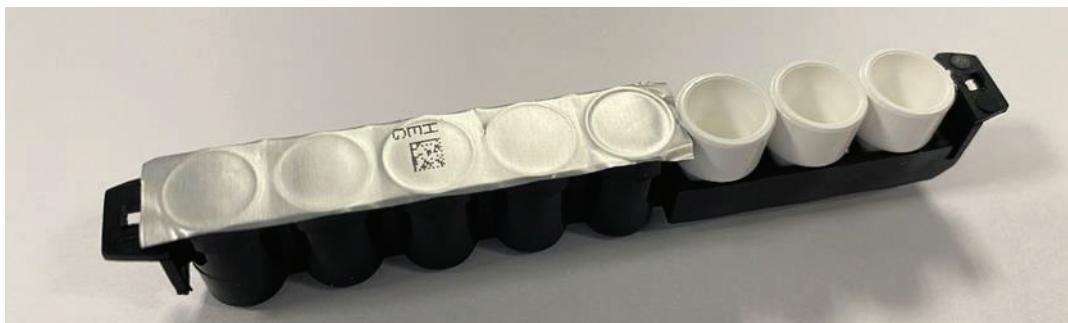


Figura 11. Pocillos de reacción CLIA (VIRCELL)

- Técnica:

La técnica se realiza con el procesador automático VirClia® Plus (VIRCELL, Granada, España) (Figura 12), que diluye la muestra a 1/20.

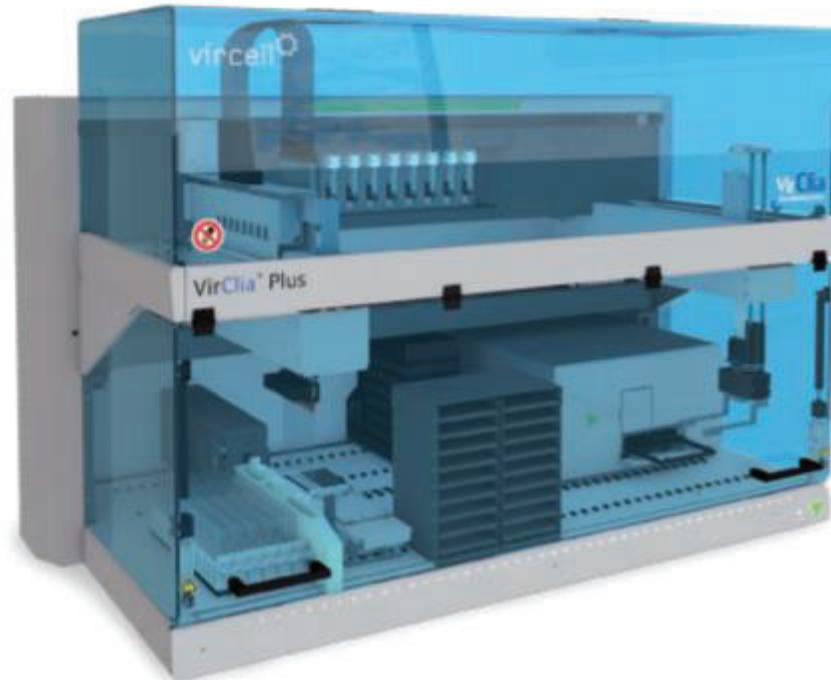


Figura 12. Procesador CLIA automático VirClia® Plus (VIRCELL)

- Validación de la prueba:

Las unidades relativas de luz (URL) del calibrador en el pocillo A y del control negativo (calibrador diluido) en el pocillo C deben estar en los rangos siguientes: 2-7 y <2, respectivamente.

- Interpretación:

Cálculo del índice de anticuerpos de la muestra = URL de la muestra / URL del calibrador.

Índice <0,4: Negativo; índice 0,4-0,5: Dudosos; Índice >0,5: Positivo.

Las muestras con resultados dudosos deben ser reanalizadas y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.

Las muestras con índices inferiores a 0,4 se considera que no tienen anticuerpos IgM para VHE.

Las muestras con índices superiores a 0,5 se considera que tienen anticuerpos IgM para VHE.

- Sensibilidad y especificidad:

Según el fabricante la sensibilidad es del 95% y la especificidad, del 99%.

3.3.3. CLIA ANTI-VHE IgG VirClia, VIRCELL S.L. (Granada, España).

- Fundamento:

Método de CLIA basado en la reacción de los anticuerpos presentes en la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno de los pocillos de reacción. Las inmunoglobulinas no unidas son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior, el conjugado (anti-inmunoglobulina humana) con peroxidasa reacciona con las IgG unidas al antígeno de la pared del pocillo y el que no se une es eliminado por los lavados. El conjugado con peroxidasa unido reacciona con el sustrato quimioluminiscente que generará una luminiscencia que puede leerse con un luminómetro.

- Reactivos:

El equipo consta de 24 cartuchos para 24 pruebas, cada cartucho consta de 8 pocillos, 3 de reacción y 5 de reactivos con la siguiente composición:

- Pocillos A, B, C: de reacción, cubiertos con antígenos recombinantes de VHE (ORF 2 y ORF3 de genotipo 1).
- Pocillo D (conjugado) dilución de antígenos recombinantes de VHE marcados con peroxidasa y con neolone y bronidox como conservantes. Color naranja.
- Pocillo E (diluyente): tampón fosfatos con estabilizante de proteínas y con neolone y bronidox como conservantes. Color azul.
- Pocillo F (calibrador): suero positivo diluido con neolone y bronidox como conservantes. Color claro.
- Pocillo G (componente B de sustrato): peróxido. Color claro.
- Pocillo H (componente A de sustrato): luminol. Color claro.

- Técnica:

La técnica se realiza con el procesador automático VirClia® Plus, que diluye la muestra a 1/20.

- Validación de la prueba:

Las unidades relativas de luz (URL) del calibrador en el pocillo A y del control negativo (calibrador diluido) en el pocillo C deben estar en los rangos siguientes: 2-7 y <2, respectivamente.

- Interpretación:

Cálculo del índice de anticuerpos de la muestra = URL de la muestra / URL del calibrador.

Índice <0,9: Negativo; índice 0,9-1,1: Dudosos; índice >1,1: Positivo.

Las muestras con resultados dudosos deben ser reanalizadas y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.

Las muestras con índices inferiores a 0,9 se considera que no tienen anticuerpos IgG para VHE.

Las muestras con índices superiores a 1,1 se considera que tienen anticuerpos IgG para VHE.

- Sensibilidad y especificidad:

Según el fabricante la sensibilidad es del 89% y la especificidad, del 99%.

3.3.4. INMUNOCROMATOGRAFÍA IgM VHE HEVTOP®, ALL.DIAG (Estrasburgo, Francia).

- Fundamento:

Es una inmuno Cromatografía de flujo lateral para determinación cualitativa de IgM de VHE.

Tras añadir el suero sobre una tira de nitrocelulosa (Figura 13) y la difusión del mismo, la IgM específicas de la muestra se une al antígeno VHE y el

inmunocomplejo es capturado por los anti-IgM de la tira de nitrocelulosa originando una banda coloreada. También se produce la captura de las IgG de conejo conjugadas por las anti-IgG de origen caprino, dando lugar a la banda control.

- Reactivos: tira de nitrocelulosa con:

- Anticuerpos monoclonales anti-IgM (Banda T) y anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo (Banda C).
- Conjugado: antígeno de VHE conjugado con oro coloidal e IgG de conejo conjugada con oro coloidal.

- Técnica:

Se han seguido las instrucciones del fabricante.

- Validación:

La banda C debe estar presente siempre.

- Resultados:

La presencia de las bandas T y C indican la presencia de IgM específica (Figura 13).

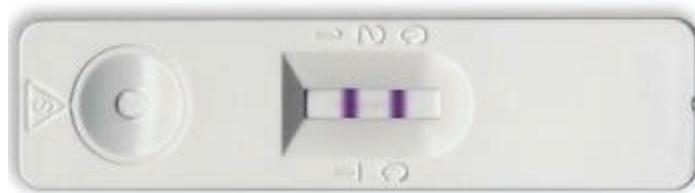


Figura 13. IC IgM HEVTOP® (ALL.DIAG)

3.3.5. EIA DE CAPTURA ANTI-IgM VHE, WANTAI (Pekín, China).

Se trata de un EIA de captura para detectar IgM Anti-VHE.

- Fundamento:

El equipo incluye placas de micrométodo de poliestireno con pocillos tapizados con anti-IgM humana (cadena μ). Tras la adición de la muestra, las IgM presentes en la muestra son capturadas en la pared de los pocillos. Los anticuerpos no unidos se eliminan por lavado. Las IgM específicas capturadas en la fase sólida son detectadas por la adición de antígeno de VHE (ORF 2 genotipos 1 y 2) conjugado con peroxidasa de rábano picante. Un segundo lavado elimina el antígeno conjugado no unido. Tras la adición del cromógeno se forma un producto coloreado en azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de analito. El color azul se vuelve amarillo con la adición de ácido sulfúrico para detener la reacción.

- Reactivos:

- Microplacas de 96 pocillos: con anticuerpos anti-IgM (anti- μ).
- Control negativo: color azul. Tampón con proteínas estabilizadoras.
- Control positivo: color rojo. Anti-VHE IgM purificada.
- Diluyente de muestras: color azul. Suero, caseína y sacarosa.
- Conjugado: color rojo. Antígeno de VHE recombinante (ORF2) conjugado con peroxidasa de rábano picante.
- Tampón de lavado: incoloro. PBS a pH 7,4.
- Solución A de cromógeno: incolora. Solución de peróxido de urea.

- Solución B de cromógeno: incolora. Solución de tetrametilbezidina.
- Solución de parada: ácido sulfúrico 2 M.

- Técnica

Partiendo de una disolución del suero del paciente a 1/101, se procesa la muestra siguiendo las instrucciones del fabricante, con lectura a 450/650 nm.

- Criterios de validación

Valor del pocillo blanco: < 0,080.

Valor del control positivo: $\geq 0,800$.

Valor del control negativo: <0,100.

- Interpretación:

Cut-off (CO): media de los controles negativos + 0,260.

Negativo: <1 muestras con resultado menor al CO.

Positivo: ≥ 1 muestras con resultado mayor o igual al CO.

Borderline: muestras con resultado entre 0,9-1,1.

- Sensibilidad y especificidad:

Según el fabricante la especificidad es del 98,4% y la sensibilidad, del 97,1%.

3.3.6. EIA IgM INDIRECTO recomwell HEV, MIKROGEN DIAGNOSTIC (Neuried, Alemania).

Se trata de un EIA tipo sándwich indirecto.

- Fundamento:

La placa de micrométodo está tapizada con proteínas virales recombinantes altamente purificadas de VHE (ORF2 de genotipos 1 y 3). Las IgM específicas de la muestra se unen a los antígenos de VHE y se eliminan por lavado los anticuerpos no ligados. El conjugado anti-IgM humana marcado con peroxidasa de rábano se une a las IgM del inmunocomplejo inicial. El conjugado no fijado se elimina mediante un nuevo lavado. Tras la adición del substrato se produce la reacción con la peroxidasa, dando lugar a un color de intensidad proporcional al analito de la muestra.

- Reactivos:

- Tampón de lavado 10X: tampón de fosfato, NaCl, detergente, conservantes: metilisotiazolinona (0,01%) y oxipirion (0,1%).
- Diluyente: proteínas, detergentes, colorante azul y conservantes: metilisotiazolinona (0,01%) y oxipirion (0,1%).
- Solución de parada: ácido fosfórico al 24,9%.
- Microplaca de 12x8 pocillos (tira marcada en verde) recubierta de antígeno recombinante de las ORF 2 de VHE genotipos 1 y 3.
- Control positivo (tapón negro): con metilisotiazolinona (0,1%) y oxipirion (0,1%).
- Control de corte (tapón incoloro): con MIT (0,1%) y oxipirion (0,1%).
- Control negativo (tapón blanco): con MIT (0,1%) y oxipirion (0,1%).
- Conjugado IgM antigumano (concentrado 101X): con NaN₃ (<0,1%), MIT (<0,01%) y cloroacetamida (<0,1%).

- Técnica:

El procesamiento se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de una dilución de suero de 1/101 y con lectura a 450/650 nm.

- Validación y control de calidad:

La prueba es válida si:

Los valores de absorbancia individuales para la doble determinación del control de corte no difieren en más del 20% de su valor medio.

La absorbancia del control negativo es $\leq 0,150$.

La absorbancia del control de corte menos la del control negativo es $\geq 0,050$.

- La absorbancia del control positivo menos la absorbancia del control de corte es $\geq 0,300$.

- Interpretación:

Corte (valor límite) = valor medio de las absorbancias de los controles de corte.

Evaluación cualitativa:

Zona gris	Entre el valor de corte y corte +20 % (Corte x 1,2)
Negativo	Muestras con absorbancia por debajo de la zona gris.
Valores límite	Muestras con absorbancia en la zona gris
Positivo	Muestras con absorbancia por encima de la zona gris

Evaluación cuantitativa

Muestra U/mL	(Absorbancia de muestra / absorbancia de corte) x 20
Zona gris	Valores entre 20 y 24 U/mL.
Negativo	Muestra <20 U/mL.
Valores límite	Valores entre 20 y 24 U/mL.
Positivo	Muestra >24 U/mL.

- Sensibilidad y especificidad:

Según el fabricante, la sensibilidad es del 98,9% y la especificidad del 98,6%.

3.3.7. CLIA AVIDEZ ANTI-VHE IgG VIRCLIA®, VIRCELL S.L. (Granada, España) (pendiente de comercialización).

- Fundamento:

Ensayo inmunoenzimático con lectura por quimioluminiscencia, que permite diferenciar anticuerpos de clase IgG de alta y baja avidez.

Se basa en poner en contacto una dilución de la muestra con el antígeno del VHE (ORF 2 y 3 del genotipo 1), previamente fijado en los pocillos de poliestireno.

Tras un paso de lavado para eliminar las inmunoglobulinas no reactivas con el antígeno, se compara una condición en la que el pocillo se mantiene con una solución disociante que contiene urea, que separa los enlaces débiles entre IgG y antígeno, con otra en la que esta incubación se hace con diluyente universal PBS.

Solamente los anticuerpos con alta avidez permanecen unidos al antígeno en la placa en los pocillos sometidos al tratamiento con urea, mientras que los anticuerpos de baja avidez se separan y son eliminados.

Posteriormente, el anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa reacciona con las IgG problema y el que no se une es eliminado por los lavados. Por último, la adicción de un sustrato quimioluminiscente generará una señal que debe leerse con un luminómetro.

- Reactivos:

- Microplacas de poliestireno con 12 tiras de 8 pocillos sensibilizados con antígeno recombinante de las ORF 2 y 3 de VHE del genotipo 1.
- Diluyente universal: PBS pH 7,2.
- Diluyente de muestra: PBS pH 7,2 con 10% de albumina bovina con neolone y bronidox como conservantes.
- Solución de lavado: PBS con 0,05% de tween 20.
- Conjugado: anti-IgG humana obtenida en cabra, marcada con peroxidasa.
- Solución disociante: urea al 33% en tampón TRIS pH 7,5 y Tween-20.
- Solución conservante/bloqueante: suero de ternera al 25% en PBS pH 7,2.
- Componente A de sustrato: luminol al 0,02% en tampón TRIS pH 9.
- Componente B de sustrato: peróxido de urea al 0,05% en tampón acetato a pH 6.

- Optimización de la dilución de muestras y conjugado:

Las diluciones óptimas fueron determinadas por el método de titulación en tablero de ajedrez. Para ello, se utilizaron 6 plasmas procedentes de donantes de sangre sanos del Centro Regional de Transfusión de Granada, con índice de IgG Anti-VHE de VIRCLIA entre 2,25 y 15,81 y de EIA WANTAI de 1,17 a 26,28. Las muestras fueron diluidas a 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1280 en PBS. Cada una de ellas se enfrentó a diluciones del conjugado antihumano de 1/6500, 1/13000, 1/26000, 1/52000 en tampón de dilución de conjugado (Figuras 14 y 15).

Dilución plasma	A-71-068				A-79-023			
	Dilución conjugado				Dilución conjugado			
	6500	13000	26000	52000	6500	13000	26000	52000
20	28,633	14,293	9,043	4,097	92,774	57,779	31,922	17,506
40	15,239	7,579	4,929	2,117	70,735	41,028	23,505	12,326
80	8,123	4,026	2,365	1,174	50,015	28,113	16,387	8,378
160	4,118	2,014	1,237	0,651	30,831	16,870	9,991	4,892
320	1,989	1,029	0,667	0,364	17,275	9,530	5,834	2,891
640	0,977	0,518	0,401	0,280	9,352	4,955	3,083	1,548
1280	0,562	0,312	0,261	0,185	4,616	2,249	1,538	0,797
Blanco	0,203	0,161	0,155	0,152	0,140	0,170	0,157	0,168

Dilución plasma	A-79-026				A-68-046			
	Dilución conjugado				Dilución conjugado			
	6500	13000	26000	52000	6500	13000	26000	52000
20	17,702	8,857	5,238	2,551	19,094	8,560	5,895	2,983
40	8,355	4,250	2,481	1,258	9,855	5,246	2,975	1,583
80	4,246	2,229	1,309	0,667	5,057	2,574	1,552	0,837
160	1,993	1,046	0,656	0,390	2,385	1,337	0,161	0,487
320	0,863	0,515	0,362	0,293	1,239	0,754	0,422	0,359
640	0,488	0,345	0,266	0,252	0,642	0,425	0,267	0,303
1280	0,291	0,251	0,194	0,208	0,338	0,290	0,195	0,274
Blanco	0,145	0,250	0,163	0,214	0,193	0,221	0,113	0,216

Dilución plasma	A-68-058				A-79-025			
	Dilución conjugado				Dilución conjugado			
	6500	13000	26000	52000	6500	13000	26000	52000
20	42,129	23,665	13,311	7,014	58,518	33,601	20,215	10,209
40	24,582	13,332	7,873	3,811	37,083	20,277	11,196	5,972
80	13,378	6,238	4,315	2,108	21,997	11,404	7,307	3,480
160	6,842	3,702	2,287	1,083	11,907	6,258	4,097	1,935
320	3,469	1,851	1,188	0,628	6,191	3,257	2,081	1,033
640	1,687	0,975	0,611	0,403	3,166	1,600	1,070	0,601
1280	0,866	0,518	0,362	0,232	1,491	0,784	0,539	0,307
Blanco	0,156	0,228	0,147	0,181	0,152	0,216	0,158	0,173

Figura 14. Optimización de la dilución de suero y conjugado en tablero de ajedrez

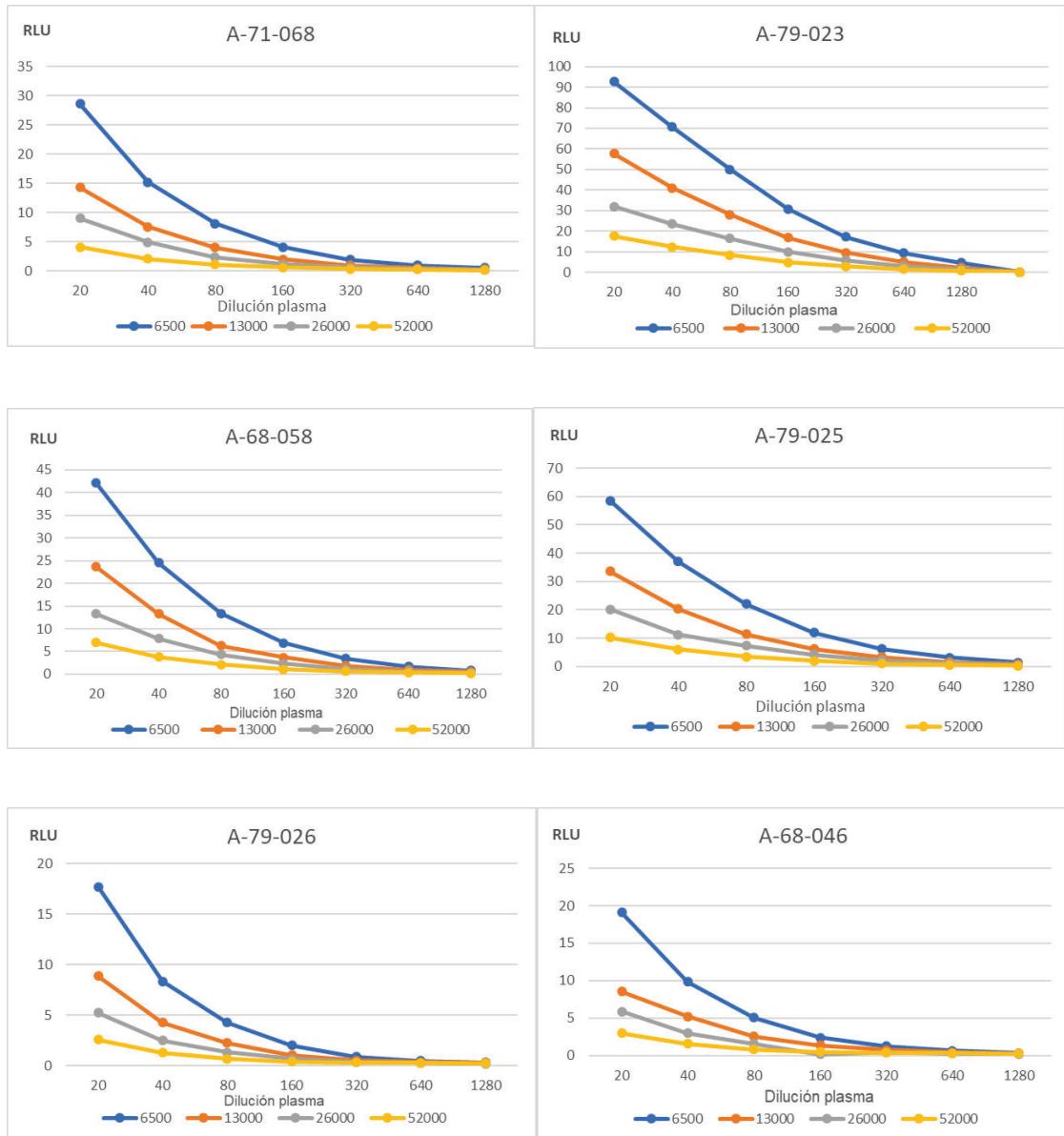


Figura 15. Optimización de la dilución de suero y conjugado, representación gráfica en forma de curvas.

Las diluciones óptimas fueron 1/20 para las muestras y 1/26000 para el conjugado por mostrar mejor linealidad en las 6 muestras para una URL <40, en la que no se produce saturación del receptor lumínico del lector.

- Técnica:

a. Protocolo sensibilización de placas:

- Preparación del antígeno de VHE (ORF 2 y ORF3, genotipo 1) en el tampón PBS pH 7,2 a su título optimo (1/1000).
- Agitación en vortex de la solución.
- Dispensación de 100 μ l por pocillo en la placa de EIA de la solución de antígeno.
- Incubación a temperatura ambiente durante la noche en cámara húmeda.
- Lavado de la placa con solución de lavado.
- Bloqueo de los sitios libres del poliestireno con 280 μ L/pocillo de solución conservante/bloqueante.
- Incubación a temperatura ambiente durante 2 horas.
- Lavado de la placa con solución de lavado.

b. Avidez:

- Dispensar 100 μ l de una dilución 1/20 de las muestras en duplicado en los pocillos sensibilizados previamente con el antígeno y bloqueados.
- Incubar 20 minutos a 37°C.
- Realizar 3 lavados con solución de lavado.
- Añadir 150 μ l de urea (solución de avidez) a la 1^a dilución de muestra y 150 μ L de PBS a la 2^a dilución de muestra.
- Incubar 10 minutos a 37°C.
- Realizar 3 lavados con solución de lavado.
- Conjugado (anticuerpo de cabra anti-IgG humana diluido a 1/26000) diluido a 1/2 con solución de lavado 1X.
- Incubar 20 minutos a 37°C.

- Realizar 4 lavados con solución de lavado.
 - Añadir 100 μ L/pocillo de sustrato quimioluminiscente (sustrato A+B en proporción 1:1).
 - Incubar 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- Lectura:

Se realiza la lectura de las URL en el lector de quimioluminiscencia Thunderbolt (Gold Standard Diagnostic, Davis, USA) (Figura 16).



Figura 16. Analizador ELISA Thunderbolt

- Determinación del punto de corte:

El punto de corte de la técnica se ha calculado 69 plasmas procedentes de donantes de sangre sanos del Centro Regional de Transfusiones de Granada (Grupo 4B) con IgG CLIA VHE positiva y 39 sueros de nuestros pacientes con IgG CLIA e IgM CLIA VHE positiva y PCR positiva a VHE. El estudio se realizó mediante el análisis de curvas ROC con el programa estadístico MedCalc v19.5.3 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica).

El programa para la elaboración de la curva ROC, estableció el punto de corte de avidez IgG en 41%, con el que encontramos los valores más altos de sensibilidad, de 97,4% (95% IC, 86,5% - 99,6%) y de especificidad, de 92,8% (95% IC, 83,9% - 97,6%). Con un valor predictivo positivo 88,4% y un valor predictivo negativo 98,5%.

El análisis del área bajo la curva ROC muestra un valor de 0,954 (Figura 17) con un IC 95% (0,896-0,985, error estándar 0,019) que indica la sensibilidad y especificidad de la prueba seleccionando como punto de corte $\leq 41\%$ para diferenciar entre muestras con alta y baja avidez.

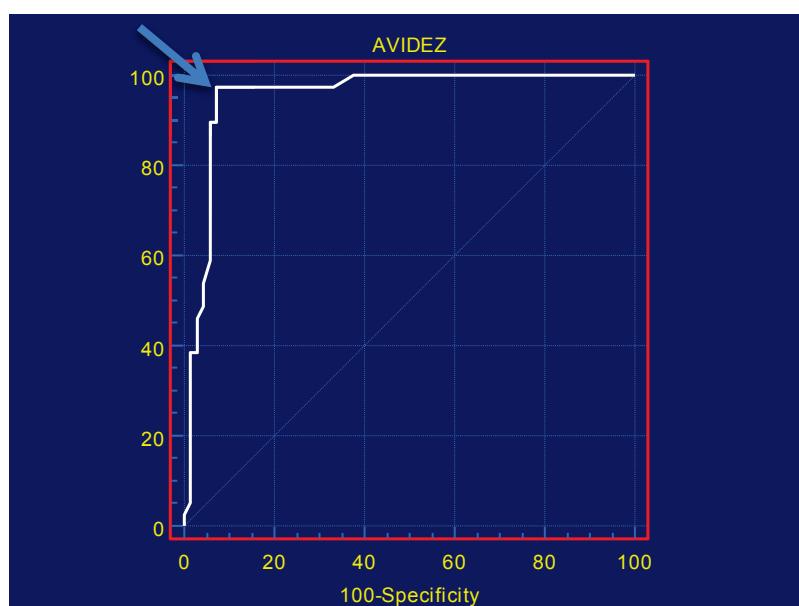


Figura 17. Área bajo la curva ROC del ensayo de avidez IgG

En la figura 18, diagrama de dispersión de los resultados de alta y baja avidez, puede verse como el punto de corte de 41% discrimina bien entre los pacientes con hepatitis reciente con PCR positiva de los pacientes sanos del Centro Regional de Transfusiones de Granada.

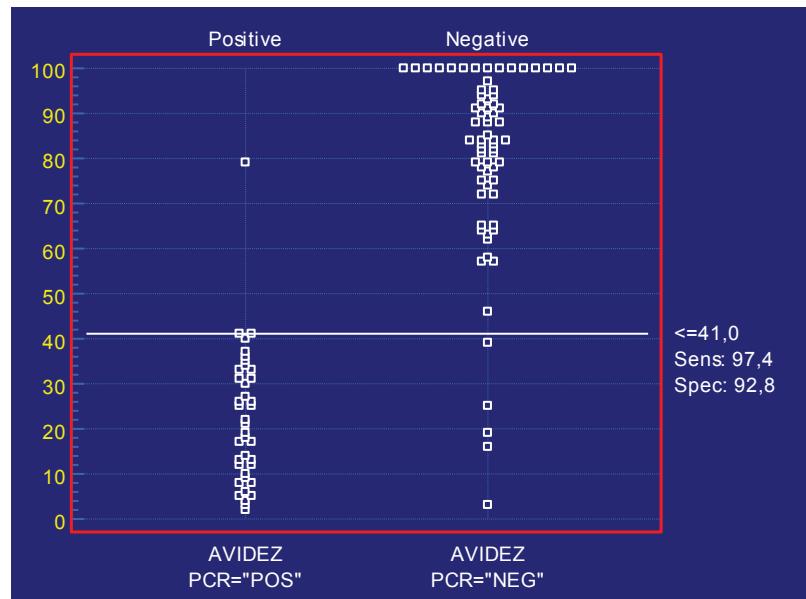


Figura 18. Diagrama de dispersión de valores de avidez IgG

- Interpretación:

Para calcular el índice de avidez de la muestra se procede a realizar el siguiente cálculo:

URL de la muestra (con urea)

$$\text{Índice de avidez} = \frac{\text{URL de la muestra (con urea)}}{\text{URL de la muestra (con PBS)}} \times 100 \text{ (expresado en \%)}$$

URL de la muestra (con PBS)

Se consideró baja avidez para los índices $\leq 41\%$; intermedia para los índices entre 42-50% y alta avidez para los índices $\geq 51\%$.

En el caso en el que las URL de la muestra sean > 40 , se repetirá la prueba tras diluir la muestra a 1/100.

En las muestras con índices de IgG inferiores a 1,1 el resultado de la avidez no se podrá interpretar, ya que los niveles de IgG CLIA para VHE estarían por debajo del límite de detección de la técnica.

- Controles:

Como control de baja avidez, se utilizó el suero 411297 del grupo 2 de pacientes. Se trataba de un paciente con fiebre y dolor en hipocondrio derechos, con transaminasas de 850 (AST) y 2372 (ALT) de 19 días de evolución, e índice de IgG 4,4, además la PCR de VHE fue positiva con 1122820 copias/mL.

Como control de alta avidez, se utilizó el suero 836311 del grupo 7 de pacientes. Se trataba del segundo suero de un paciente (607357) con antecedentes de hepatitis E hacía más de 2 años, asintomático con transaminasas normales, IgM CLIA negativa e índice de IgG CLIA de 11,3 y PCR negativa.

El índice de los controles debía ser \pm 10% de los valores de la determinación inicial.

3.3.8. PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA PARA VHE (NO COMERCIAL).

a. Extracción del ácido nucleico:

Extracción de ARN viral siguiendo protocolo de QIAmpMinElute Virus Spin Kit (QIAgen, Hilden, Alemania) en el sistema automatizado de QIAcube (QIAgen, Hilden, Alemania) (Figura 19).



Figura 19. Sistema automatizado de extracción QIAcube (QIAgen)

- Fundamento:

La extracción de ácidos nucleicos, consiste en tres etapas consecutivas: lisis celular, inactivación de las nucleasas intracelulares y separación de los ácidos nucleicos de los demás componentes celulares. A continuación, se lleva a cabo la purificación de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos quedan retenidos en las columnas de sílice por adsorción, se lavan las columnas con soluciones salinas que eliminan las partículas que no se han unido y los ácidos nucleicos son eluídos con una solución con baja concentración en sales.

- Reactivos:

- Proteasa de Qiagen.
- Buffer AVE: solución de elución.
- Portador de ARN diluido.
- Buffer AL: solución de lisis.
- Etanol al 100%.

- Buffer AW1: solución de lavado 1.
- Buffer AW2: solución de lavado 2.

- Técnica:

El kit QIAamp MinElute Virus Spin, purifica el ARN viral a partir de plasma o suero, utiliza un procedimiento de columna de centrifugado rápido, a partir de 200 μ L de suero o plasma. Los ácidos nucleicos se unen específicamente a la membrana de gel de sílice mientras pasan los contaminantes. Los inhibidores de la PCR, como los cationes divalentes y las proteínas, se eliminan en dos pasos de lavado eficaces. Los ácidos nucleicos puros se eluyen en 50 μ L de la solución de elución.

b. RT- qPCR:

- Fundamento:

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT- qPCR) para VHE permite detectar la carga viral de VHE en suero o plasma. Es una reacción *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ARN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia es copiada fielmente.

- Reactivos:

- Primers ORF3 (20 μ M) (Abravanel F *et al.*, 2012)
- HEV_Foward_5260: (5'-GGTGGTTCTGGGGTGAC-3').
- HEV_Reverse_5330: (5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3').
- Sonda (15 μ M):

- HEV_Sonda_5283: (5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-TAMRA-3').
- Master MIX (Qiagen One-Step RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden, Alemania), que contiene: enzima mix [ADN polimerasa, transcriptasas inversas (Omniscript® y Sensiscript®), 1 mM ditiotreitol (DTT), 0,1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P-40, 0,5% Tween® 20, 50% glicerol, pH 9,0 (20°C)].
- Solución 5x QIAGEN OneStep RT-PCR, con Tris Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 12,5 mM MgCl₂, DTT; pH 8,7 (20°C)
- Solución 1x dNTP Mix: 10 mM de cada uno, dATP, dCTP, dGTP y dTTP.
- Agua libre de ARNasas.

- Técnica:

Volumen necesario para 1 muestra:

“Primer Forward” (20 μM): 0,75 μL .

“Primer Reverse” (20 μM): 0,75 μL .

Sonda (15 μM): 0,75 μL .

Master mix: 10,5 μL .

ARN eluído: 6 μL .

Agua libre de ARNasas: 1,25 μL .

Volumen final: 20 μL .

La PCR a tiempo real se realiza en el termociclador CFX Connect Real Time PCR System (Bio-Rad, California, Estados Unidos) (Figura 20).



Figura 20. Termociclador CFX Connect Real Time PCR System (Bio-Rad)

El perfil térmico es el descrito previamente (Rivero A *et al.*, 2017):

- Retrotranscripción: 50°C durante 30 minutos.
- Desnaturalización: 95°C durante 15 minutos.
- PCR (X45 ciclos):
 - Desnaturalización: 94°C durante 10 segundos.
 - Hibridación: 55°C durante 20 segundos.
 - Extensión: 72°C durante 60 segundos.
- Frío 4°C.

- Validación de la prueba:

Como control positivo se utilizó la cepa estándar de VHE de la OMS (Gen Bank: M73218) suministrada por el instituto Paul-Ehrlich (código 6329/10), a concentración 250000 UI/mL; fue reconstituida con 500 µL de agua tratada con pirocarbonato de dietilo (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, MA, USA).

Como control negativo, se utilizó agua libre de ARNsas.

- Interpretación:

Análisis de los resultados con el software de CFX Connect Real Time PCR System.

Se aplica una curva estándar de ejecución externa para calcular la carga viral de VHE utilizando la cepa estándar de la OMS (Gen Bank: M73218). La carga viral se expresa en UI / mL.

3.3.9. GENOTIPADO Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

3.3.9.1. GENOTIPADO

a. RT-PCR:

- Fundamento:

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), es una variante de la PCR, en la que se retrotranscribe una hebra de ARN a ADNc usando una enzima llamada transcriptasa inversa, a continuación, el ADNc se amplifica por PCR.

La RT-PCR se realizó con el equipo SuperScript VILO cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, MA, USA).

- Reactivos:

- SuperScript VILO cDNA synthesis:
- Solución de reacción: primers, MgCl₂, dNTPs.
- Solución de enzima: transcriptasa inversa.
- Agua libre de ARNasas.

- ARN eluído.

- Técnica:

Solución de reacción: 4 μ L.

Solución de enzima: 2 μ L.

Agua libre ARNasas: 7 μ L.

ARN eluído: 7 μ L.

Volumen final: 20 μ L.

Se realizó en el termociclador Labcycler (SensoQuest, Gotinga, Alemania) (Figura 21).

- Perfil térmico:

Hibridación primers: 25°C, 10 minutos.

Polimerización ADN: 42°C, 60 minutos.

Inactivación transcriptasa inversa: 85°C, 5 minutos.

Frío 4°C.



Figura 21. Termociclador Labcycler (SensoQuest)

b. PCR a tiempo final:

- Fundamento:

Se realizó PCR a tiempo final para amplificar un fragmento del genoma del VHE, perteneciente a la región ORF2 (Rivero-Juárez *et al.*, 2017).

- Reactivos:

- Sensifast Lyo-ready: Taq polimerasa, solución de reacción, dNTPs, MgCl₂.
- Primers: (0,25 μM).

Forward_VHE_5687: 5'- AATTATGCYCAGTAYCGRGTTG - 3'.

Reverse_VHE_6289: 5'- AGCCGACGAAATYAATTCTGTC - 3'.

- Agua libre ARNasas.
- ADNc.

- Técnica:

Sensifast Lyo-ready: 7,5 μL.

Primer Forward: 0,15 μL.

Primer Reverse: 0,15 μL.

Agua libre ARNasas: 2,2 μL.

ADNc: 5 μL.

Volumen final: 15 μL.

- Perfil térmico:

Se realizó en el termociclador Labcycler (SensoQuest, Gotinga, Alemania) (Figura 21).

Activación polimerasa: 95°C, 3 minutos.

X 45 ciclos:

Desnaturalización: 95°C, 15 segundos.

Alineación: 57°C, 45 segundos.

Extensión: 72°C, 1 minuto.

Extensión final: 72°C, 10 minutos.

Frio 4°C.

c. Electroforesis:

- Fundamento:

Técnica de separación de biomoléculas en disolución en base a su forma, tamaño y carga cuando son sometidas a un campo eléctrico.

- Reactivos:

- Bromuro de etidio.
- Gel agarosa 1,5%.
- Producto de PCR.
- Tampón TAE 1X (Tris, acetato y EDTA).
- Marcador de peso 100 pares de bases (DNA ladder, BIORON, Mannheim Alemania).
- Tampón de carga 5X (GoTaq[®], Promega Corporation, Madison, EEUU).

- Técnica:

Los productos de amplificación de la PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa, a concentración de 1,5% elaborado con tampón TAE 1X.

Se cargaron en el gel 5 μ L de cada muestra + 1 μ L de tampón de carga 5X. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta horizontal con tampón TAE 1X aplicando un voltaje de 100 voltios y amperaje constante, durante 45 minutos. La determinación del tamaño del ADN se realizó por comparación con el marcador de peso molecular de 100 pb y bajo previa tinción con 6 μ L de bromuro de etidio. Por último, se visualizaron las bandas correspondientes a ADN en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño del producto separado fue de 611 pb.

- Validación de la prueba:

En cada ensayo se incluyeron como control positivo el estándar internacional de la OMS para virus del VHE (código PEI: 6329/10) a dilución 1/10 y agua como control negativo.

d. Purificación y pureza del ADN:

- Fundamento:

El ADNc fue purificado con el kit NucleoSpin® Gel and PCR clean up Kit (Macherey-Nagel, Duren, Alemania).

Se lleva a cabo este paso para purificar los fragmentos de ADN y geles de agarosa a partir de reacciones enzimáticas, como la PCR.

- Reactivos:

- Solución NTI: Solución de union.
- Solución NT3: Solución de lavado.
- Solución NE: Solución de elución.
- Columnas NucleoSpin® Gel and PCR *clean up*.

- Técnica:

Se añaden 45 μ L del producto de PCR con 5 μ L de agua libre de ARNasas, para llegar a un volumen de 50 μ L. Se añaden 100 μ L de solución NTI a 1:2. El ADN se une a la columna con membrana de sílice, se centrifuga a 11000 x g durante 30 segundos. Se añaden 700 μ L del tampon de lavado NT3 y se vuelve a centrifugar 11000 x g durante 30 segundos. Reemplazar tubo de colección y volver a centrifugar 11000 x g durante 1 minuto para que se elimine totalmente la solución NT3. Finalmente, el ADN se eluye con agua, se incuba a temperatura ambiente 1 minuto y se centrifuga a 11000 x g, 1 minuto.

- Lectura:

Se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, MA, USA) para cuantificar la pureza del ADN obtenido, a una longitud de onda de 260 nm (A260 nm=1 equivale a 40 ng ADN/ μ L).

La cuantificación se realizó utilizando 1 μ L del extracto de ADN

e. Preparación para envío al secuenciador:

- Fundamento:

La secuenciación tipo Sanger consiste en la detección de una secuencia de nucleóticos de un ácido nucleico. La enzima Taq polimerasa irá incorporando

dideoxinucleótido trifosfato (ddNTPs) marcados con fluorescencia en el extremo 3'. Los ddNTPs al no tener el grupo 3'-OH van a impedir la unión del siguiente dNTP y detendrán la reacción. Cada fluorocromo corresponde a un nucleótido específico y emite luz con una longitud de onda distinta.

Se forman fragmentos de diferentes tamaños distinguibles entre sí por el terminador de la cadena, que son separados mediante una columna electroforética capilar.

La luz de un láser, excitará cada fragmento que emitirá fluorescencia, y será transformada por un software de un equipo de secuenciación de ADN en un electroferograma.

En la figura 22 se observa el proceso automatizado del método de secuenciación Sanger y la obtención de un electroferograma partiendo de una mezcla de reacción que contenga ADN molde, un primer (forward o reverse), taq polimerasa, dNTPs y ddNTPs marcados con fluorocromos.

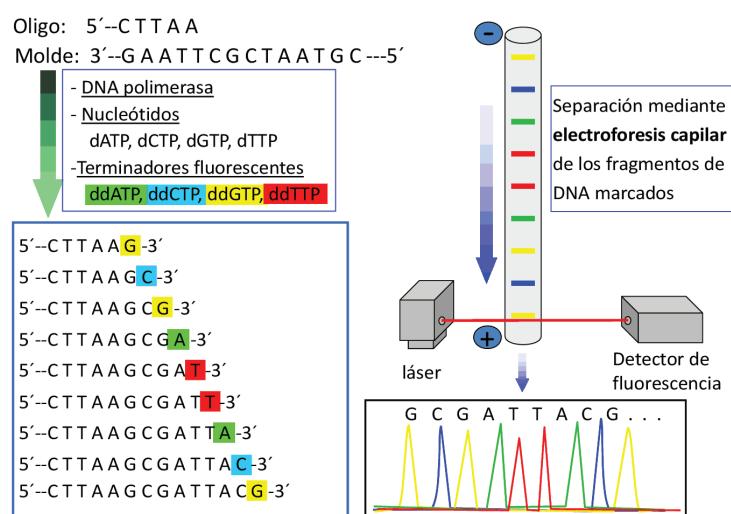


Figura 22. Procedimiento secuenciación automática Sanger

Para secuenciar los amplicones obtenidos se debe tomar en cuenta el tamaño del fragmento a secuenciar, en nuestro caso al tratarse de 500-1000 pb, la cantidad de ADN que se debe enviar es de 10-40 ng y de primers 6,4 pmol.

- Reactivos:

- Primers: (6,4 μ M).

Forward_VHE_5687: 5'- AATTATGCYCACTAYCGRGTTG - 3'.

Reverse_VHE_6289: 5'- AGCCGACGAAATYAATTCTGTC - 3'.

- Agua desionizada.
- ADN purificado.

- Técnica:

Para el envío de las muestras se utilizará un tubo tipo Eppendorf de 0,5 mL, en el que añadimos 1 μ L de primer (6,4 μ M) (forward o reverse) + cantidad en μ L de muestra a secuenciar (40 ng/lectura obtenida en el espectrofotómetro ng/ μ L) + agua desionizada hasta completar volumen total: 12 μ L.

Con los amplicones purificados se realizó secuenciación de Sanger usando los primers previamente descritos “Forward_VHE_5687” y “Reverse_VHE_6289”.

La secuenciación de ADN se realiza mediante el procedimiento de secuenciación cíclica utilizando la química BigDyeTerminator v3.1 (Applied biosystem, Foster city, EE.UU.) y electroforesis en sistema multicapilar automático en la unidad de genómica de Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (Granada, España) (Figura 22).

f. Análisis datos secuenciados:

Las secuencias obtenidas se analizaron e interpretaron en el programa “Sequence scanner v2.0 software” (Applied Biosystem, Foster city, EE.UU.).

Para realizar los alineamientos de las secuencias se realizó con el programa “Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences v.7” (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

Para obtener la secuencia inversa se utilizó el programa “Reverse complement” (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html).

Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de GenBank para la búsqueda de homologías con secuencias previamente conocidas (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

El genotipo se determinó mediante la utilización de la plataforma “Hepatitis E Virus Genotyping Tool Version 0.1” (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/hev/>) por la similitud con secuencias descritas. El fragmento que se amplificó era de 611 pb y correspondía a ORF2.

3.3.9.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para la realización del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA versión X (Kumar S *et al.*, 2018).

El análisis se realizó utilizando el método de máxima verosimilitud, que se basa en el modelo de Tamura-Nei (Tamura K *et al.*, 1993). El árbol filogenético se construyó con el método de vecino más cercano (neighborjoining), para determinar el probable origen y las relaciones evolutivas de las cepas secuenciadas.

El análisis incluye 87 secuencias: las secuencias de los pacientes de este estudio, secuencias descritas en BLAST similares a éstas, y secuencias de referencia de la reciente propuesta de clasificación por genotipos de la familia *Hepeviridae* de Smith *et al.* (Smith BD *et al.*, 2020).

Una vez construido el árbol se explora la robustez mediante el método de “bootstrap”. Se generaron 1000 réplicas del alineamiento mediante un remuestreo aleatorio con reemplazamiento del conjunto de datos. Se obtiene el árbol filogenético para cada una de las réplicas y se genera un árbol consenso. Se representan los porcentajes de fiabilidad de nuestras agrupaciones. Se acepta un valor de “bootstrap” mayor al 70% como suficientemente robustos.

Se calculó la distancia p entre secuencias con el programa MEGA X, que consiste en la proporción de nucleótidos en la que dos secuencias comparadas son diferentes. Se obtiene dividiendo el numero de nucleótidos diferentes entre el número total de nucleótidos comparados. Cuanto menor sea el valor de la distancia p, mayor similitud habrá entre las secuencias.

3.3.10. PRUEBAS PARA DESCARTAR OTROS VIRUS HEPATÓTROPOS

En todos los casos IgM positivos, se descartaron otras posibles causas de hepatitis víricas por virus hepatótropos primarios (VHA, VHB, VHC, VHD).

- VHA: CMIA IgM VHA (Architect, Abbott).
- VHB: CMIA HBsAg (Architect, Abbott) y CMIA anti-HBc IgM (Architect, Abbott).
- VHC: CMIA HCV Ag (Architect, Abbott), CMIA anti-VHC (Architect, Abbott) y PCR a tiempo real (Roche).
- VEB: CMIA IgM VCA de VEB (Architect, Abbott).

- CMV: CMIA IgM CMV (Architect, Abbott).
- VHD: EIA Anti-VHD (DiaSorin).

Todas estas pruebas se han realizado siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando, salvo en el caso de Anti-VHD, la plataforma Architect i4000 (Abbott) (Figura 23).



Figura 23. Analizador de inmunoensayos Architect i4000

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Inicialmente, se ha realizado el análisis descriptivo de los datos y se han reportado la media y desviación estándar como medidas de tendencia central y de dispersión respectivamente.

Para comparación de proporciones hemos utilizado el test chi-cuadrado o el test exacto de Fisher en aquellos casos para los cuales la hipótesis de tamaño muestral por grupo inferior a 5 no se cumple.

Para la comparación de medias en distintos grupos de muestras hemos utilizado la t de Student. Un intervalo de confianza del 95% se aplicó a los datos obtenidos.

El cálculo del área bajo la curva se utilizó para determinar el punto de corte en la técnica de avidez de la IgG Anti-VHE.

Se calculó el índice kappa para conocer el acuerdo entre las técnicas empleadas, que representa la concordancia observada en un conjunto de datos, más allá del azar.

Para los cálculos estadísticos se utilizó el programa MedCalc v19.5.3 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica).

4. RESULTADOS

En este estudio se han considerado positivas todas las pruebas serológicas con resultado positivo o dudoso.

4.1. RESULTADOS DEL GRUPO 1: PACIENTES CON SOSPECHA DE HEPATITIS E

En el primer grupo, se detectaron 131 pacientes (12,24%) con índice de IgM Anti-VHE (DIA.PRO) ≥ 1.0 . De ellos, 54 (41,22%) fueron clasificados como hepatitis E aguda por presentar clínica y cifras de transaminasas compatibles con hepatitis aguda y haberse descartado otras etiologías. Todos presentaban positividad de IgM DIA.PRO con un índice (S/CO) de IgM DIA.PRO entre 2,05 y 16,00, con media $11,33 \pm 2,97$ (Tablas 4 y 8). Otros 77 (58,78%) eran asintomáticos con transaminasas normales o elevadas o tenían datos compatibles con otras causas

de hepatitis. De los 77 pacientes anteriores, 55 tenían (41,98% sobre los 131) IgG Anti-VHE positiva y fueron clasificados como infección VHE asintomática o presencia de anticuerpos residuales en función de sus datos clínicos y epidemiológicos. Presentaban índice de IgM DIA.PRO entre 1,00 y 7,51, con media $2,74 \pm 1,59$ (Tabla 5 y 8). Los otros 22 (16,79% sobre los 131) fueron clasificados como falsos positivos, por presentar sintomatología atribuible a hepatitis autoinmune, por fármacos, por alcohol, gestación o por otros agentes infecciosos (VHA, CMV, VEB) u otra patología hepática no infecciosa (esteatosis, colangitis) y mostrar ausencia de IgG Anti-VHE. Estos presentaban un índice de IgM DIA.PRO entre 1,01 y 4,64, con media $1,90 \pm 0,88$ (Tablas 7 y 8).

Tabla 4: Pacientes grupo 1 clasificados de hepatitis aguda con DIA.PRO

CASO	ED	SX	AST	ALT	EIA IgM VHE	Resultado	Comentarios
124556	59	F	386	1441	11,41	POS	Utebo.
211321	47	F	1109	2047	10,94	POS	Bárboles, fábrica pintura, ingesta de jabalí.
302793	73	F	446	702	10,80	POS	Zaragoza.
406971	50	M	8025	6394	11,59	POS	Mallén, almacenero, manipula carne, IC IgM+.
411105	72	M	2086	2728	11,29	POS	Borja, jubilado, pescadero, IC IgM+.
411297	54	F	850	2372	11,19	POS	Alagón, ama de casa, IC IgM+.
416208	44	M	1341	2552	5,91	POS	Utebo, camionero, ingesta marisco, IC IgM+.
503015	66	M	247	1211	11,88	POS	Layana, OH.
503455	55	M	800	1913	10,76	POS	Zaragoza, mantenimiento en HUMS.
506697	80	M	1588	1559	11,04	POS	Zaragoza.
506844	57	M	109	745	11,27	POS	Bárboles, alguacil, cirrosis OH, exitus.
513380	64	M	117	481	10,14	POS	El Vallecillo, agua manantial, embutido jabalí.
530615	37	F	1264	2000	12,01	POS	Illueca. Viaje a India 2 m, UCI.
601688	24	F	1050	1157	2,19	POS	Puigmoreno.
604165	37	F	321	783	10,14	POS	La Almunia.
607357	45	M	914	2610	12,99	POS	Épila.
607765	57	M	336	725	12,76	POS	La Almunia.
610503	39	M	31	70	12,97	POS	Tauste, hepatomegalia, familia de 602647.
613706	41	F	1346	2014	2,05	POS	Sarrión.
613891	74	M	653	1017	12,77	POS	Zaragoza.
614251	61	M	598	649	12,21	POS	Zaragoza.
615414	62	M	4572	5136	13,01	POS	Ejea, comercial de granjas, OH, carne jabalí.
619993	67	M	239	696	12,69	POS	Zaragoza, hace 2 m coluria.
621325	51	M	2218	1987	13,18	POS	Zaragoza, pintor.

RESULTADOS

621326	68	M	808	1311	13,04	POS	Zaragoza.
624466	42	M	7690	5642	2,07	POS	Barbastro, Bulgaria, IgM+ a VHA, VHE y VEB.
628072	46	M	385	918	13,23	POS	Bombarda, R. Dominicana.
710291	49	M	836	1735	12,67	POS	Zaragoza, cazador.
710242	74	M	32	24	13,43	POS	Zaragoza, ALT 1178 45 d. antes.
715061	63	M	146	749	13,08	POS	Zaragoza, ATC ALT 1084, ALT 2400
722164	46	F	225	66	13,35	POS	Jaca. S. Parsonage-Turner.
717213	41	M	1256	2923	12,75	POS	Valderrobles, empresa cárnica porcina.
719453	72	M	861	1270	13,27	POS	Zaragoza.
719906	63	M	782	1900	16,00	POS	Sádaba, pastor.
722811	47	M	48	95	12,41	POS	Zaragoza, hiperBRB, ALT 1246/2521 15 d. antes.
724406	55	M	112	305	2,13	POS	Zaragoza, ATC ALT 1168 15 d. antes, consumo carne de cerdo, huerto y gallinero.
809536	83	M	243	440	11,86	POS	Zaragoza, coluria, ISCiii: IgM e IgG POS, PCR NEG, esposa 810715.
810715	83	F	381	932	11,56	POS	Zaragoza, marido 809536, PCR+ ISCiii
812478	87	M	364	568	11,80	POS	Zaragoza.
813128	53	M	912	1111	12,20	POS	Zaragoza.
814048	44	M	22	59	12,00	POS	Monzalbarba. S. Parsonage-Turner, calderero.
814689	57	F	565	1267	12,29	POS	Monzalbarba, S. Parsonage-Turner, ama casa.
818111	67	M	30	76	11,98	POS	Zaragoza, ALT 539 e hiperBRB 40 d. antes.
818227	70	M	82	687	11,10	POS	Zaragoza, al ingreso AST/ALT: 1930/3486.
819359	88	M	747	1082	13,00	POS	Huesca.
819647	63	M	2248	3541	8,48	POS	Huesca.
830159	77	F	491	696	13,10	POS	La Muela.
830171	59	F	147	393	13,10	POS	Pedrola, auxiliar de clínica.
830395	62	M	883	2095	13,10	POS	Sabiñánigo.
831740	64	M	184	569	12,34	POS	Alagón.
834083	48	M	668	2073	12,56	POS	Zaragoza.
837376	59	M	946	1932	12,62	POS	Gotor, empresa de calzado, OH.
841689	59	M	321	386	12,01	POS	Cariñena.
842153	58	M	1477	1467	12,04	POS	Zaragoza, OH.

ED: edad; SX: sexo; ATC: antecedentes; OH: alcohol, BRB: bilirrubina; HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet.

De los casos con hepatitis aguda, se detectaron 1/104 (0,96%) en 2011, 1/67 (1,49%) en 2012, 1/50 (2%) en 2013, 4/79 (5,06%) en 2014, 6/126 (4,76%) en 2015, 14/239 (5,85%) en 2016, 9/179 (5,02%) en 2017 y 18/243 (7,40%) en 2018.

Tabla 5: Solicitudes de diagnóstico de hepatitis E			
Año	Nº solicitudes	Nº hepatitis E aguda	%
2011	104	1	0,96
2012	67	1	1,49
2013	50	1	2,00
2014	79	4	5,06
2015	126	6	4,76
2016	239	14	5,85
2017	179	9	5,02
2018	243	18	7,40

Se observa un mayor índice de sospecha desde 2012, que se traduce en un mayor número de diagnósticos tanto numérica como porcentualmente.

Tabla 6: Pacientes del grupo 1 clasificados de infección asintomática o anticuerpos residuales a IgM VHE con EIA (DIA.PRO)							
Caso	ED	SX	AST	ALT	EIA IgM VHE	Resultado	Comentarios
110850	54	M	99	51	2,95	POS	Zaragoza, cirrosis OH. AST/ALT 169/145 10 días antes.
116869	24	M	309	123	3,26	POS	Zaragoza, hepatitis OH.
407964	36	M	19	20	3,10	POS	Illueca, carnícola. No síntomas.
409046	50	M	21	37	2,30	POS	Illueca, carnícola (carnicería de 407946).
409994	31	F	18	12	5,88	POS	Illueca, pareja del caso índice de Illueca.
417772	32	M	17	14	3,49	POS	Pedrola, ADVP, sexo de riesgo, panadero, IgM 0,92 2 m después.
426432	76	M	102	237	1,61	POS	Agón, tumor páncreas.
504340	61	F	276	199	1,78	POS	Zaragoza, bronconeumonía (Neumococo)
506604	60	M	140	205	2,40	POS	Bárboles, hostelería, pancreatitis.
508948	91	F	78	107	6,08	POS	La Muela, vómitos, náuseas, ictericia.
514243	77	F	141	56	3,24	POS	Torralbilla, endocarditis.
514914	64	M	784	1416	2,06	POS	Alfajarín, carne jabalí, IgM neg 2 m. después y ALT alta, hepatitis autoinmune
528537	31	F	1233	1972	3,15	POS	Burgo de Ebro, hepatitis aguda autoinmune en biopsia. En UCI, pre-TOH.
530078	16	F	166	199	3,23	POS	Zaragoza, infección VHE y VEB, linfocitosis.
602647	57	M	35	45	2,95	POS	Tauste, hepatomegalia, familia de 610503.
604639	60	M	572	922	6,97	POS	Tarazona. Hepatitis autoinmune.
613155	64	F	499	229	1,70	POS	Huesca.
614612	46	M	245	716	3,13	POS	Gallur. Hepatocarcinoma, ATC hepatitis E.
621101	46	M	26	21	4,00	POS	Zaragoza, ATC de hepatitis aguda.
621802	76	M	555	585	6,24	POS	Alagón, hepatitis medicamentosa.
627851	69	F	98	64	1,02	DUD	Huesca, reactividad policlonal.
624844	54	F	29	30	2,32	POS	Utebo. LES, hiperALT, esteatosis hepática.
625516	59	M	177	216	2,54	POS	Zaragoza, hemocromatosis.
628769	67	M	29	17	1,92	POS	Mallén, OH, adenocarcinoma pulmonar.
633045	40	M	675	1755	5,10	POS	Zaragoza, Rumanía, hepatitis B aguda.

RESULTADOS

701480	21	F	1096	2382	1,56	POS	Zaragoza, hepatitis autoinmune.
702319	61	F	295	234	7,51	POS	Puigmoreno, hiperALT, ATC familiar VHE.
702885	88	M	165	271	1,08	DUD	Zaragoza, agricultor.
705090	53	F	1582	2086	2,02	POS	Zuera. Hepatitis aguda autoinmune.
705027	78	M	320	635	2,48	POS	Tortoles, hepatopatia medicamentosa.
705546	81	M	87	115	1,63	POS	Zaragoza.
709140	63	M	20	17	3,86	POS	Zaragoza. ATC ASST/ALT elevadas.
713093	64	F	1700	1069	1,83	POS	María Huerva, hepatitis medicamentosa.
718439	75	F	373	465	4,98	POS	Zaragoza, hiperALT por hipertiroidismo?
718459	63	M	28	21	1,39	POS	Utebo, LES.
719572	69	F	610	398	1,30	POS	Zaragoza, hepatitis autoinmune.
726583	37	M	646	1715	2,89	POS	Utebo, supermercado, IgM+ VHA, VEB, CMV
802102	83	F	356	789	2,35	POS	Zaragoza, hepatitis medicamentosa.
804536	65	M	31	27	1,38	POS	Zaragoza, dermatosis, ATC ALT elevada.
806822	65	M	53	42	2,74	POS	Zaragoza, cirrosis autoinmune.
808646	51	M	21	31	1,01	DUD	Alcañiz, dolor hipocondrio dch.
810677	52	F	56	138	1,04	DUD	Vistabella, veterinaria, hepatitis medicamentosa, cáncer de mama.
813420	64	F	136	205	1,04	DUD	Zaragoza, hiperALT, LES.
814353	48	M	126	172	3,95	POS	Zaragoza, hepatitis B, TOH, biopsia.
818273	47	M	21	16	1,11	DUD	Casetas, parálisis de Bell.
818447	24	-	-	-	1,16	DUD	Sin datos.
819056	63	M	27	17	2,51	POS	Zaragoza, polineuropatia axonal mixta.
819597	44	M	169	450	1,00	DUD	Zaragoza, dolor flanco, vómitos, coluria.
831541	42	F	1045	1013	2,34	POS	Zaragoza, colelitiasis.
832658	73	M	1047	2109	1,06	DUD	Grañén. Abdominalgia.
837497	47	F	111	276	1,66	POS	Zaragoza, enfermera, cervicalgia
837879	23	M	39	27	1,31	POS	Huesca, gastroenteritis infecciosa.
841018	42	M	85	97	3,92	POS	Sariñena. Hepatitis OH, pendiente TOH.
841157	70	M	339	347	2,28	POS	Calatayud, cirrosis, cáncer hígado, exitus.
841418	53	F	48	100	4,15	POS	María Huerva. Hepatitis medicamentosa.

ED: edad; SX: sexo; DUD: dudosos; OH: alcohol, HTA: hipertensión, LES: lupus, TOH: trasplante hígado, DM: diabetes;

Tabla 7: Pacientes del grupo 1 clasificados de falso positivo a IgM VHE con EIA (DIA.PRO)

Caso	ED	SX	AST	ALT	EIA IgM VHE	Resultado	Comentarios
105711	27	F	35	72	1,30	POS	Zaragoza, Venezuela, gestante.
112744	77	F	48	45	1,70	POS	Zaragoza, Perú.
519650	64	M	53	106	1,20	POS	Alagón, agricultor.
522189	27	F	104	173	1,30	POS	Zaragoza, HiperALT por estatinas.
526330	33	F	36	58	2,91	POS	Tarazona, abdominalgia.
528312	80	M	35	41	1,25	POS	Zaragoza, esteatosis leve, OH.
601557	77	F	28	40	2,22	POS	Grañén, abdominalgia.
603949	38	F	432	643	1,44	POS	Zaragoza, insuficiencia hepática, exitus.

610612	49	M	26	37	1,31	POS	María Huerva, enfermedad autoinmune.
615906	77	M	34	43	1,24	POS	Cariñena, OH.
617060	60	M	21	15	2,13	POS	Zaragoza.
618843	61	M	21	18	1,70	POS	Tarazona.
629700	61	M	357	578	3,30	POS	Zaragoza.
727682	40	M	150	253	2,52	POS	María Huerva, sospecha CMV.
803785	38	F	19	41	1,10	DUD	Sena, hepatopatía crónica.
812599	30	F	148	243	4,64	POS	Huesca, Australia, cervicalgia, colangitis.
813326	39	M	776	1603	1,19	DUD	Zaragoza, viaje a Marruecos, hepatitis A.
838739	33	M	871	1880	1,01	DUD	Biescas, Marruecos hace 2 m. hepatitis A.
839423	40	F	94	31	1,82	POS	Zaragoza, cirrosis OH.
840654	62	M	270	88	2,06	POS	Cariñena, Rumanía, mecánico.
840880	13	F	2455	2720	1,18	DUD	Almudevar, hepatitis A.
105711	61	F	19	12	1,14	DUD	Zaragoza.

ED: edad; SX: sexo; DUD: dudosos; OH: alcohol.

En la tabla 8, se comparan los índices medios de IgM de DIA.PRO de los 3 tipos de pacientes: hepatitis aguda, infección asintomática/anticuerpos residuales y falsos positivos.

La media de IgM (DIA.PRO) de los pacientes con hepatitis aguda fue significativamente más elevada que la de los otros dos grupos. Aunque hay cierto solapamiento entre los índices de los 3 grupos, todos los índices de IgM >8 correspondían a pacientes con hepatitis aguda, lo que supone el 90,74% (49 de 54) de las mismas.

El índice medio de los falsos positivos es siempre <5.

Tabla 8: Comparación de medias y rangos de índices de IgM (DIA.PRO) en el grupo 1				
Subgrupo	Nº	Rango	Media + DE	
Hepatitis aguda	54	2,05 - 16,00	11,33 + 2,97	
Infección asintomática o anticuerpos residuales	55	1,00 - 7,51	2,74 + 1,59	
Falsos positivos	22	1,01 - 4,64	1,90 + 0,88	

Las comarcas de Aragón donde se han encontrado casos IgM anti-VHE verdaderos positivos del grupo 1 (grupo hepatitis E aguda e infección E asintomática o anticuerpos residuales) son: Alto Gallego (1), Aranda (5), Bajo Aragón (3), Comunidad de Calatayud (1), Campo de Borja (4), Campo de Cariñena (2), Campo de Daroca (1), Cinco Villas (6), Gúdar-Javalambre (1), Hoya de Huesca (6), La Jacetania (1), Los Monegros (1), Matarraña (1), Ribera Alta del Ebro (8), Sierra de Albarracín (1), Somontano de Barbastro (1), Tarazona-El Moncayo (2), Valdejalón (5), y Zaragoza (59). Se detecta una mayor concentración en las comarcas del centro y noroccidentales de la provincia de Zaragoza (Figura 24).



Figura 24. Distribución por comarcas de casos del grupo 1 IgM a VHE verdaderos positivos en Aragón

4.2. RESULTADOS DEL GRUPO 2: 106 PACIENTES DEL GRUPO 1 CON IgM POSITIVA CON EIA (DIA.PRO) ANALIZADAS CON CLIA (VIRCELL)

Hemos comparado los resultados de IgM EIA de DIA.PRO con IgM CLIA (VIRCELL) en 106 pacientes del grupo 1 en los que se disponía de suficiente muestra para estudios adicionales. Hemos elegido CLIA porque disponíamos de reactivos para determinar también la IgG por la misma tecnología y fabricante, para avalar la especificidad de los resultados IgM positivos.

Los resultados de la comparación pueden verse en la tabla 9.

En el conjunto de los 106 pacientes del grupo 2, 44 (41,51%) fueron IgM CLIA positivos. Este dato sugiere menor sensibilidad de CLIA IgM (VIRCLIA) que EIA IgM (DIA.PRO).

Las muestras en verde en la tabla 9 corresponden a los 46 pacientes del grupo 2 catalogados como hepatitis aguda. Las muestras en naranja corresponden a los 49 pacientes del grupo 2 con infección asintomática/anticuerpos residuales.

Las muestras en rojo corresponden a los 11 pacientes del grupo 2 con resultados falsos positivos.

De los 46 pacientes del grupo 2 con hepatitis aguda, 42 (91,3%) tuvieron IgM positiva con CLIA, con índices entre 0,6 y 13,5 (media 6,42 + 3,63). De los 4 IgM CLIA negativo, 3 llevaban menos de 10 días tras el inicio de los síntomas y uno, 45 días tras el inicio de los síntomas. Los 46 pacientes (100%) del grupo 2 con hepatitis aguda tuvieron IgG CLIA positiva, con índices entre 1,5 y 28,2 (media 9,01 ± 4,88). De los 49 pacientes del grupo 2 con infección asintomática/anticuerpos residuales, solo 2 (4,00%) fueron IgM CLIA positivos

(S/CO=2,1 en ambos), los cuales llevaban 53 y 64 días de evolución, respectivamente. Igualmente, los 49 pacientes (100%) del grupo 2 con infección asintomática/anticuerpos residuales tuvieron IgG CLIA positiva con índices entre 1,2 y 27,6 (media 8,91 + 4,88). Los 11 pacientes con resultados IgM EIA falso positivo fueron IgM CLIA negativo. Solo uno (9,09%) de los 11 pacientes (paciente 840880) con resultado IgM EIA falso positivo con DIA.PRO tuvo IgG CLIA positiva (S/CO=1,6). Dicho paciente presentaba una hepatitis A. Estos datos sugieren mayor especificidad del CLIA IgM (VIRCLIA).

El análisis conjunto de estos datos refleja una mejor asociación de IgM CLIA (VIRCELL) con infección aguda por VHE, lo que facilita su interpretación. La positividad de EIA IgM (DIA.PRO) sugiere infección previa y debe interpretarse junto con la clínica/transaminasas.

Tabla 9: Comparación de resultados de IgM entre EIA (DIA.PRO) y CLIA (VIRCELL)

Caso	AST	ALT	EIA IgM VHE	Resultado	CLIA IgM VHE	Resultado	CLIA IgG VHE	Resultado
116869	309	123	3,26	POS	0,2	NEG	7,6	POS
211321	1109	2047	10,94	POS	4,7	POS	21,6	POS
302793	446	702	10,80	POS	7,9	POS	19,1	POS
406971	8025	6394	11,59	POS	13,5	POS	2,7	POS
407964	19	20	3,10	POS	0,3	NEG	27,6	POS
409046	21	37	2,30	POS	0,0	NEG	13,8	POS
409994	18	12	5,88	POS	0,1	NEG	23,1	POS
411105	2086	2728	11,29	POS	10,6	POS	13,6	POS
411297	850	2372	11,19	POS	7,1	POS	4,4	POS
416208	1341	2552	5,91	POS	1,1	POS	28,2	POS
417772	17	14	3,49	POS	0,1	NEG	1,9	POS
426432	102	237	1,61	POS	2,1	POS	3,9	POS
503015	247	1211	11,88	POS	10,4	POS	9,4	POS
503455	800	1913	10,76	POS	2,4	POS	9,8	POS
504340	276	199	1,78	POS	0,1	NEG	8,1	POS
506604	140	205	2,40	POS	0,1	NEG	9,8	POS
506697	1588	1559	11,04	POS	6,4	POS	13,1	POS

RESULTADOS

506844	109	745	11,27	POS	9,2	POS	8,6	POS
508948	78	107	6,08	POS	0,1	NEG	11,6	POS
514243	141	56	3,24	POS	0,2	NEG	1,2	POS
514914	784	1416	2,06	POS	0,1	NEG	2,2	POS
528537	1233	1972	3,15	POS	0,1	NEG	9,4	POS
604165	321	783	10,14	POS	10,8	POS	1,5	POS
607357	914	2610	12,99	POS	10,4	POS	6,7	POS
607765	336	725	12,76	POS	1,7	POS	10,0	POS
610503	31	70	12,97	POS	4,1	POS	6,1	POS
618843	21	18	1,70	POS	0,1	NEG	0,1	NEG
619993	239	696	12,69	POS	3,8	POS	4,9	POS
621101	26	21	4,00	POS	2,1	POS	7,5	POS
621325	2218	1987	13,18	POS	3,9	POS	5,0	POS
621326	808	1311	13,04	POS	11,8	POS	6,9	POS
621802	555	585	6,24	POS	0,0	NEG	16,0	POS
624466	7690	5642	2,07	POS	0,1	NEG	9,0	POS
627851	98	64	1,02	DUD	0,0	NEG	2,0	POS
624844	29	30	2,32	POS	0,1	NEG	9,4	POS
625516	177	216	2,54	POS	0,1	NEG	5,8	POS
628072	385	918	13,23	POS	3,9	POS	8,9	POS
628769	29	17	1,92	POS	0,1	NEG	8,8	POS
629700	357	578	3,30	POS	0,0	NEG	0,2	NEG
633045	675	1755	5,10	POS	0,2	NEG	9,7	POS
701480	1096	2382	1,56	POS	0,1	NEG	5,2	POS
702319	295	234	7,51	POS	0,1	NEG	6,6	POS
702885	165	271	1,08	DUD	0,1	NEG	9,6	POS
705090	1582	2086	2,02	POS	0,1	NEG	2,6	POS
705027	320	635	2,48	POS	0,0	NEG	11,0	POS
705546	87	115	1,63	POS	0,1	NEG	7,9	POS
709140	20	17	3,86	POS	0,1	NEG	2,0	POS
710291	836	1735	12,67	POS	0,2	NEG	1,7	POS
710242	32	24	13,43	POS	6,1	POS	10,7	POS
713093	1700	1069	1,83	POS	0,1	NEG	14,4	POS
715061	146	749	13,08	POS	4,9	POS	8,9	POS
722164	225	66	13,35	POS	5,3	POS	11,0	POS
717213	1256	2923	12,75	POS	4,1	POS	8,7	POS
718439	373	465	4,98	POS	0,1	NEG	14,4	POS
718459	28	21	1,39	POS	0,1	NEG	13,1	POS
719453	861	1270	13,27	POS	13,3	POS	11,0	POS
719572	610	398	1,30	POS	0,1	NEG	9,8	POS
719906	782	1900	16,00	POS	6,7	POS	1,6	POS
722811	48	95	12,41	POS	3,0	POS	9,8	POS
724406	112	305	2,13	POS	0,3	NEG	5,5	POS
726583	646	1715	2,89	POS	0,0	NEG	8,5	POS
727682	150	253	2,52	POS	0,1	NEG	0,3	NEG
802102	356	789	2,35	POS	0,1	NEG	11,4	POS
803785	19	41	1,10	DUD	0,1	NEG	0,2	NEG
804536	31	27	1,38	POS	0,1	NEG	7,1	POS
806822	53	42	2,74	POS	0,1	NEG	2,8	POS

808646	21	31	1,01	DUD	0,2	NEG	5,3	POS
809536	243	440	11,86	POS	11,5	POS	6,2	POS
810715	381	932	11,56	POS	6,7	POS	11,7	POS
810677	56	138	1,04	DUD	0,1	NEG	5,0	POS
812478	364	568	11,80	POS	13,5	POS	11,6	POS
812599	148	243	4,64	POS	0,1	NEG	0,6	NEG
813128	912	1111	12,20	POS	2,2	POS	10,5	POS
813326	776	1603	1,19	DUD	0,0	NEG	1,6	POS
813420	136	205	1,04	DUD	0,1	NEG	8,3	POS
814048	22	59	12,00	POS	6,6	POS	2,7	POS
814353	126	172	3,95	POS	0,1	NEG	12,3	POS
814689	565	1267	12,29	POS	10,4	POS	12,0	POS
818111	30	76	11,98	POS	6,2	POS	9,7	POS
818227	82	687	11,10	POS	0,6	POS	8,4	POS
818273	21	16	1,11	DUD	0,0	NEG	3,2	POS
818447	-	-	1,16	DUD	0,0	NEG	1,7	POS
819056	27	17	2,51	POS	0,0	NEG	2,6	POS
819359	747	1082	13,00	POS	7,7	POS	6,4	POS
819597	169	450	1,00	DUD	0,1	NEG	10,0	POS
819647	2248	3541	8,48	POS	3,6	POS	5,8	POS
830159	491	696	13,10	POS	4,5	POS	8,0	POS
830171	147	393	13,10	POS	5,3	POS	8,1	POS
830395	883	2095	13,10	POS	1,5	POS	7,9	POS
831541	1045	1013	2,34	POS	0,2	NEG	5,6	POS
831740	184	569	12,34	POS	6,4	POS	6,5	POS
832658	1047	2109	1,06	DUD	0,2	NEG	6,5	POS
834083	668	2073	12,56	POS	10,4	POS	7,7	POS
837376	946	1932	12,62	POS	2,7	POS	10,0	POS
837497	111	276	1,66	POS	0,1	NEG	5,1	POS
837879	39	27	1,31	POS	0,0	NEG	5,6	POS
838739	871	1880	1,01	DUD	0,0	NEG	0,8	NEG
839423	94	31	1,82	POS	0,0	NEG	0,8	NEG
840654	270	88	2,06	POS	0,0	NEG	0,2	NEG
840880	2455	2720	1,18	DUD	0,1	NEG	0,4	NEG
841018	85	97	3,92	POS	0,0	NEG	6,6	POS
841157	339	347	2,28	POS	0,1	NEG	1,9	POS
841430	19	12	1,14	DUD	0,0	NEG	0,1	NEG
841418	48	100	4,15	POS	0,0	NEG	7,6	POS
841689	321	386	12,01	POS	0,1	NEG	10,0	POS
842153	1477	1467	12,04	POS	3,1	POS	8,6	POS

Color verde: hepatitis aguda, color naranja: anticuerpos residuales/infección asintomática, color rojo: falsos positivos, color gris: VIRCELL positivos en pacientes con hepatitis aguda.

4.3. RESULTADOS DEL GRUPO 3: PACIENTES DEL GRUPO 1 CLASIFICADOS DE HEPATITIS AGUDA CON EIA (DIA.PRO) Y ANALIZADOS POR IC

Cuatro pacientes del Grupo 1 clasificados como hepatitis aguda con IgM positiva con EIA DIA.PRO fueron analizados para IgM por inmunocromatografía (IC) (ALL.DIAG). Todos fueron IgM positivos por IC (Tabla 10) y presentaron índices altos de IgG CLIA (VIRCELL), incluso uno de ellos desde los 6 días tras la aparición de los síntomas. Los cuatro pacientes fueron positivos para IgM e IgG por CLIA. Estos datos, pese al bajo número de pruebas analizadas apuntan a una buena sensibilidad de la inmunocromatografía.

Tabla 10: Pacientes del grupo 3 clasificados de hepatitis aguda con EIA (DIA.PRO) y analizados por inmunocromatografía (ALL.DIAG)									
Caso	ED	SX	Días evol.	AST	ALT	EIA IgM VHE	IC IgM VHE	CLIA IgM VHE	CLIA IgG VHE
406971	50	M	11	802	6394	POS 11,59	POS	13,5	2,7
411105	72	M	26	208	2728	POS 11,29	POS	10,6	13,6
411297	54	F	19	850	2372	POS 11,19	POS	7,1	4,4
416208	44	M	6	1341	2552	POS 5,91	POS	1,1	28,2

ED: edad; SX: sexo; IC: inmunocromatografía; Días evol.: Días evolución.

4.4. RESULTADOS DEL GRUPO 4

4.4.1. GRUPO 4A: DONANTES DEL BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO LOZANO BLESA

Cuatro de los 72 donantes (5,55%) fueron IgM repetidamente positivos con EIA IgM (DIA.PRO) y cuyos índices de la primera determinación pueden verse en la Tabla 11.

Tabla 11: Resultados de los casos IgM EIA (DIA.PRO) positivos del grupo 4						
Caso	ED	SX	AST	ALT	EIA IgM	Comentarios
403026	60	M	64	40	POS 1,26	Zaragoza. Leve elevación de AST/ALT desde hace 4 a.
403441	80	F	23	13	POS 1,60	Ejea.
404356	88	M	23	12	POS 1,23	Ejea.
405367	82	M	36	59	POS 1,49	Mallén.

Los índices de IgM oscilaron entre 1,23 y 1,80 (media $1,40 \pm 0,18$) y todos eran asintomáticos y sin analítica de hepatitis aguda (transaminasas normales o ligeramente elevadas). En estos donantes no se determinó IgG.

4.4.2. GRUPO 4B: PLASMAS DEL CENTRO REGIONAL DE TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA DE GRANADA

De los 687 plasmas analizados, 606 resultaron VIRCLIA IgG negativos y 81, IgG positivos. La prevalencia de IgG en este grupo fue del 11,79%.

Doce (14,81%) de los plasmas con VIRCLIA IgG positivos fueron VIRCLIA IgM positivos con índices entre 1,18 y 9,53 ($4,29 \pm 2,87$).

La avidez de IgG VIRCLIA, de los 69 VIRCLIA IgM negativa/VIRCLIA IgG positiva, fue baja en 4, intermedia en uno y alta en 64.

4.5. RESULTADOS DEL GRUPO 5: PACIENTES DEL MEDIO RURAL

Se detectó IgG CLIA en 29 (18,83%) de los 154 pacientes analizados (Tabla 12).

Los casos positivos se concentraron en 7 localidades (Figura 25), en las que existía una prevalencia superior al 11%. Estas localidades se encuentran en comarcas donde abundaban los casos de hepatitis E Aguda (Figura 24).

**Tabla 12: Resultados de IgG CLIA (VIRCELL)
en pacientes del medio rural**

Localidad	Nº total	Nº IgG +	%
Alagón	13	2	15,38%
Borja	19	6	31,58%
Ejea	35	9	25,71%
Épila	6	0	0,00%
La Almunia	2	0	0,00%
Magallón	1	0	0,00%
Mallén	3	0	0,00%
Pedrola	1	1	100,00%
Sádaba	6	0	0,00%
Sos	1	0	0,00%
Tarazona	34	4	11,76%
Tauste	9	2	22,20%
Utebo	24	5	20,83%
TOTAL	154	29	18,83%



Figura 25. Distribución por comarcas de los casos IgG positivos del grupo 5 en Aragón

La edad media de los positivos fue de 60 años (DE \pm 19,36), muy superior a la de los pacientes de este grupo analizados.

4.6. RESULTADOS DEL GRUPO 6: PACIENTES CON IgM NEGATIVA FRENTE A VHA

Las 50 muestras del grupo 6 (anti-VHA IgM negativas) fueron negativas para CLIA IgM VHE, con índices entre 0,029 y 0,243 (media 0,057 \pm 0,034).

4.7. RESULTADOS DEL GRUPO 7: SEGUIMIENTO DE PACIENTES IgM ANTI-VHE POSITIVOS

Los resultados de los 73 sueros (31 primeros sueros y 42 muestras de seguimiento) de 31 pacientes en los que se dispuso de más de un suero pueden verse en la tabla 13.

Se observa que en los 12 pacientes con hepatitis aguda (en verde en la tabla 13) la IgM de DIA.PRO fue positiva en todos los casos durante todo el periodo de seguimiento, que llegó a ser mayor a 2,5 años (940 días). En los pacientes con infección asintomática/IgM persistente (en naranja en la tabla 13), la IgM de DIA.PRO fue positiva o dudosa durante todo el periodo de seguimiento, que se prolongó una media de 170,17 días \pm 223,12 (rango 8-915 días), en 15 de los 17 pacientes (88,23%). En los dos pacientes en los que se negativizó la IgM de DIA.PRO, el periodo de seguimiento fue de 210 y 80 días, y sus cifras de IgM basales, de 5,0 y 2,1, respectivamente. Las cifras de IgM en los sueros de los

dos pacientes falsos positivos (en rojo en la tabla 13) fueron iguales o menores a 3,3 y en uno, permaneció positiva más de 200 días.

La IgM de VIRCELL fue positiva o dudosa en 5 de los 12 (58,33%) pacientes con hepatitis aguda durante todo el periodo de seguimiento, que se prolongó una media de 58,8 días \pm 27,75 (rango 37-202 días). En dos pacientes la IgM se negativizó antes de finalizar el periodo de estudio a los 359 días (719906) y 180 días (610503).

En los 17 pacientes con infección asintomática/IgM persistente, la IgM de VIRCELL fue negativa en todos (100%) durante el seguimiento. La IgM de VIRCELL fue negativa en todos los falsos positivos.

La IgG de VIRCELL fue negativa en dos pacientes clasificados como falsos positivos a IgM de DIA.PRO, pero positiva en el resto (infección aguda e infección asintomática/IgM persistente).

La IgM de MIKROGEN fue positiva o dudosa en 10 de los 12 pacientes (83,33%) con hepatitis aguda en los que se pudo hacer seguimiento durante un periodo que llegó a ser de hasta 359 días, con una media de 150 días \pm 119,79 (rango 37-359). En los pacientes con infección asintomática/IgM persistente en los que se pudo hacer seguimiento, la IgM de MIKROGEN fue negativa 12 de 17 (70,58%) durante el seguimiento. En un paciente la IgM se negativizó antes de finalizar el periodo de estudio a los 329 días (801909). La IgM de MIKROGEN fue negativa en el seguimiento de todos los falsos positivos.

La IgM de WANTAI fue positiva o dudosa en 9 de los 12 pacientes (75%) con hepatitis aguda durante un periodo de seguimiento que llegó a ser de hasta 359

días, con una media de 88,50 días \pm 132,05 (rango 37-359). En los 17 pacientes con infección asintomática/IgM persistente, la IgM de WANTAI fue negativa en 15 (88,23%) durante el seguimiento. La IgM de WANTAI fue negativa en el seguimiento de todos los falsos positivos.

Tabla 13: Resultados de seguimiento serológico en pacientes con más de un suero disponible

Nº	DTS	DIA.PRO		VIR M		VIR G		MKG		WNT		PCR	AVIDEZ
607357	9	13,0	POS	10,4	POS	6,7	POS	100,7	POS	14,4	POS	POS	17 BAJA
	351	6,0	POS	0,1	NEG	11,6	POS	25,5	POS	0,4	NEG	NEG	89 ALTA
	940	1,6	POS	0,0	NEG	11,3	POS	13,8	NEG	0,1	NEG	NR	92 ALTA
705090	7	2,0	POS	0,1	NEG	2,6	POS	25,6	POS	0,1	NEG	NEG	69 ALTA
	395	2,6	POS	0,1	NEG	1,8	POS	45,4	POS	0,0	NEG	NR	63 ALTA
722164	2	13,4	POS	5,3	POS	11,0	POS	90,8	POS	12,5	POS	POS	25 BAJA
	70	5,1	POS	0,3	NEG	9,8	POS	93,8	POS	2,5	POS	NR	63 ALTA
832658	6	1,1	DUD	0,2	NEG	6,5	POS	17,6	NEG	0,5	NEG	NEG	67 ALTA
	40	1,8	POS	0,2	NEG	6,5	POS	17,5	NEG	0,3	NEG	NR	78 ALTA
628769	-	1,9	POS	0,1	NEG	8,8	POS	3,2	NEG	0,0	NEG	NEG	58 ALTA
	+14	2,9	POS	0,1	NEG	8,5	POS	5,4	NEG	0,0	NEG	NR	66 ALTA
	+34	1,5	POS	0,0	NEG	8,4	POS	6,5	NEG	0,0	NEG	NR	70 ALTA
619993	11	12,7	POS	3,8	POS	4,9	POS	107,4	POS	14,0	POS	POS	13 BAJA
	50	12,6	POS	2,2	POS	9,0	POS	149,0	POS	11,8	POS	POS	44 INT
819056	120	2,5	POS	0,0	NEG	2,6	POS	14,2	NEG	0,0	NEG	NEG	55 ALTA
	135	1,9	POS	0,0	NEG	2,2	POS	22,8	DUD	0,0	NEG	NR	55 ALTA
710242	43	13,4	POS	6,1	POS	10,7	POS	92,1	POS	12,0	POS	NEG	26 BAJA
	353	7,1	POS	0,3	NEG	11,4	POS	67,5	POS	2,3	POS	NR	87 ALTA
718439	7	5,0	POS	0,1	NEG	14,4	POS	2,6	NEG	0,0	NEG	NEG	94 ALTA
	54	1,2	POS	0,0	NEG	10,0	POS	3,3	NEG	0,0	NEG	NR	91 ALTA
	210	0,7	NEG	0,1	NEG	10,8	POS	3,2	NEG	0,0	NEG	NR	98 ALTA
503455	34	10,8	POS	2,4	POS	9,8	POS	131,4	POS	8,2	POS	NEG	16 BAJA
	160	4,5	POS	0,1	NEG	9,1	POS	14	NEG	0,2	NEG	NEG	71 ALTA
722811	15	12,4	POS	3,0	POS	9,8	POS	108,1	POS	13,4	POS	POS	31 BAJA
	45	11,3	POS	0,4	DUD	9,1	POS	109,7	POS	2,3	POS	NEG	36 BAJA
702885	-	1,1	DUD	0,1	NEG	9,6	POS	7,3	NEG	0,0	NEG	NEG	94 ALTA
	+37	1,1	DUD	0,1	NEG	9,5	POS	6,9	NEG	0,0	NEG	NR	91 ALTA
	+120	3,8	POS	0,1	NEG	9,2	POS	5,0	NEG	0,0	NEG	NR	89 ALTA
627851	-	1,0	DUD	0,0	NEG	2,0	POS	10,8	NEG	1,0	DUD	NEG	36 BAJA
	+40	1,2	DUD	0,3	NEG	2,5	POS	16,5	NEG	1,4	POS	NR	29 BAJA
719906	15	16,0	POS	6,7	POS	1,6	POS	86,6	POS	12,7	POS	POS	12 BAJA
	80	11,8	POS	2,3	POS	8,9	POS	127,8	POS	9,6	POS	NEG	73 ALTA
	202	8,2	POS	0,7	POS	12,7	POS	47,8	POS	5,2	POS	NEG	84 ALTA
	359	1,9	POS	0,4	NEG	9,0	POS	22,9	DUD	2,1	POS	NR	98 ALTA
819597	3	1,0	DUD	0,1	NEG	10,0	POS	13,9	NEG	0,1	NEG	NEG	76 ALTA
	8	1,9	POS	0,1	NEG	8,8	POS	18,3	NEG	0,0	NEG	NR	96 ALTA
	94	1,9	POS	0,1	NEG	8,6	POS	16,2	NEG	0,1	NEG	NR	91 ALTA
837497	29	1,7	POS	0,1	NEG	5,1	POS	17,8	NEG	0,2	NEG	NEG	87 ALTA
	21	2,7	POS	0,0	NEG	4,2	POS	18,8	NEG	0,2	NEG	NR	83 ALTA
610503	-	13,9	POS	4,1	POS	6,1	POS	127,6	POS	5,9	POS	NEG	14 BAJA
	+90	10,2	POS	0,7	POS	12,4	POS	95,9	POS	1,4	POS	NR	77 ALTA

RESULTADOS

	+180	8,9	POS	0,4	DUD	12,3	POS	96,3	POS	0,9	NEG	NR	89	ALTA
	+210	1,5	POS	0,2	NEG	10,1	POS	43,3	POS	0,4	NEG	NR	87	ALTA
701480	18	1,6	POS	0,1	NEG	5,2	POS	13,9	NEG	0,0	NEG	NEG	96	ALTA
	24	1,0	DUD	0,0	NEG	4,8	POS	19,8	NEG	0,0	NEG	NR	96	ALTA
814048	14	12,0	POS	6,6	POS	2,7	POS	NR	NR	NR	NR	POS	33	BAJA
	55	9,1	POS	0,9	POS	4,9	POS	103,3	POS	4,0	POS	NEG	45	INT
804536	120	1,4	POS	0,1	NEG	7,1	POS	8,7	NEG	0,0	NEG	NEG	80	ALTA
	213	1,2	DUD	0,1	NEG	7,5	POS	9,2	NEG	0,0	NEG	NR	67	ALTA
726583	9	2,9	POS	0,0	NEG	8,5	POS	27,6	POS	0,1	NEG	NEG	96	ALTA
	106	2,6	POS	0,1	NEG	11,5	POS	24,9	POS	0,4	NEG	NEG	96	ALTA
	329	1,2	POS	0,1	NEG	8,6	POS	11,6	NEG	0,3	NEG	NEG	96	ALTA
837376	7	12,6	POS	2,7	POS	10,0	POS	148,9	POS	9,9	POS	POS	12	BAJA
	37	17,0	POS	2,1	POS	11,5	POS	138,7	POS	5,2	POS	NR	14	BAJA
506697	7	11,0	POS	6,4	POS	13,1	POS	107,9	POS	14,6	POS	POS	33	BAJA
	107	10,1	POS	0,5	POS	10,5	POS	90,7	POS	2,3	POS	NEG	94	ALTA
514914	30	2,1	POS	0,1	NEG	2,2	POS	9,1	NEG	0,2	NEG	NEG	65	ALTA
	80	0,4	NEG	0,1	NEG	1,4	POS	13,8	NEG	0,2	NEG	NR	64	ALTA
806822	90	2,7	POS	0,1	NEG	2,8	POS	19,2	NEG	0,0	NEG	NEG	72	ALTA
	210	1,3	POS	0,0	NEG	1,7	POS	18,1	NEG	0,0	NEG	NR	76	ALTA
528537	3	3,2	POS	0,1	NEG	9,4	POS	37,3	POS	0,1	NEG	NEG	88	ALTA
	915	3,2	POS	0,1	NEG	8,8	POS	33,9	POS	0,0	NEG	NR	78	ALTA
810677	-	1,0	DUD	0,1	NEG	5,0	POS	3,5	NEG	0,0	NEG	NEG	86	ALTA
	+15	1,0	DUD	0,1	NEG	5,2	POS	4,6	NEG	0,0	NEG	NR	78	ALTA
407964	-	3,1	POS	0,3	NEG	27,6	POS	64,7	POS	2,3	POS	NEG	92	ALTA
	+18	4,5	POS	0,2	NEG	10,7	POS	75,4	POS	1,5	POS	NR	94	ALTA
746481	7	12,3	POS	10,4	POS	12,0	POS	107,8	POS	16,4	POS	POS	17	BAJA
	56	2,7	POS	0,2	NEG	16,0	POS	63,4	POS	1,7	POS	NR	72	ALTA
618843	-	2,1	POS	0,1	NEG	0,2	NEG	12,8	NEG	0,1	NEG	NEG	NR	NR
	+90	1,8	POS	0,1	NEG	0,1	NEG	17,5	NEG	0,0	NEG	NR	NR	NR
	+200	1,7	POS	0,1	NEG	0,1	NEG	18,9	NEG	0,0	NEG	NEG	NR	NR
629700	11	3,3	POS	0,0	NEG	0,2	NEG	8,2	NEG	0,0	NEG	NEG	NR	NR
	24	0,9	DUD	0,0	NEG	0,2	NEG	7,4	NEG	0,0	NEG	NR	NR	NR

DTS: Días tras síntomas; DP: DIA.PRO IgM; VIR M: Virclia IgM; VIR G: Virclia IgG; MKG: MIKROGEN IgM; WNT: WANTAI IgM; AVIDEZ: Avidez IgG, NR: No realizado, INT: Intermedia. Color verde: hepatitis aguda, color naranja: infección asintomática/anticuerpos residuales, color rojo: falsos positivos.

En relación con la avidez, los 12 pacientes clasificados como hepatitis aguda presentaron baja avidez de IgG, de los que 10 pasaron a avidez alta (8 casos) o intermedia (2 casos) en la segunda muestra (Tabla 13 y figura 26). Las dos muestras con avidez intermedia habían sido obtenidas a los 50 y 55 días,

respectivamente. Las dos muestras de pacientes con baja avidez en las muestras de seguimiento habían sido obtenidas a los 45 y 37 días, respectivamente.

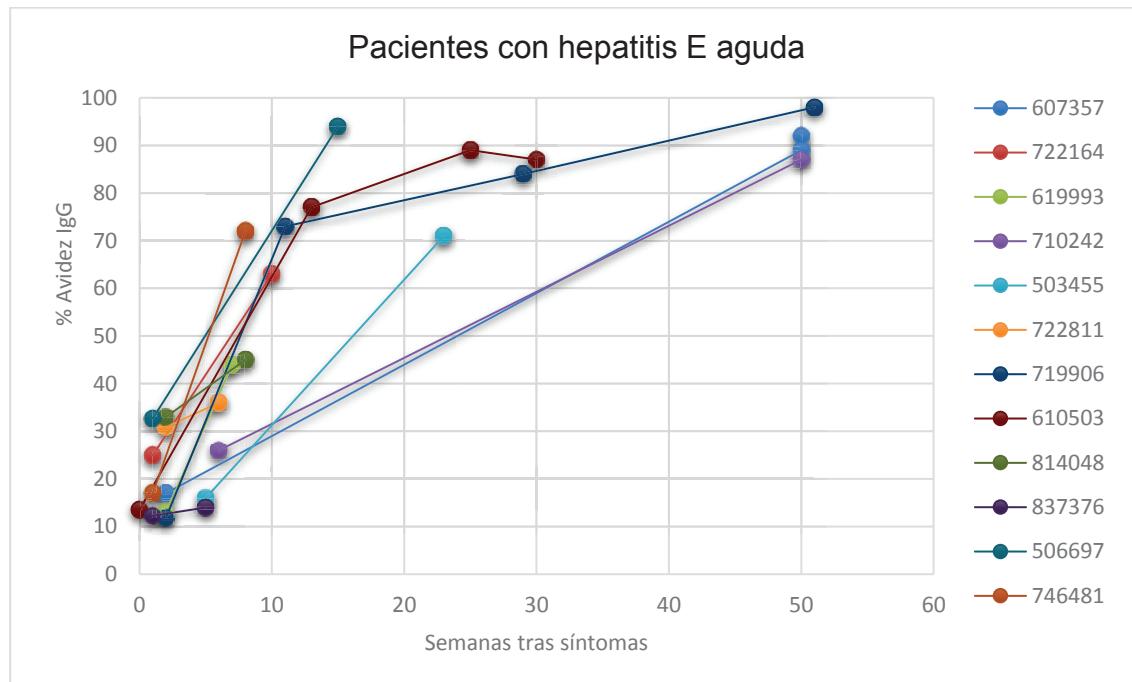


Figura 26. Avidez en pacientes con hepatitis E aguda

Solo un paciente con infección pasada/IgM persistente presentó baja avidez en ambas muestras. El día del inicio de los síntomas era desconocido y el segundo suero se obtuvo 40 días después del primero. En el resto de los pacientes el valor de avidez se mantuvo alto y sin cambios significativos (Tabla 13 y figura 27).

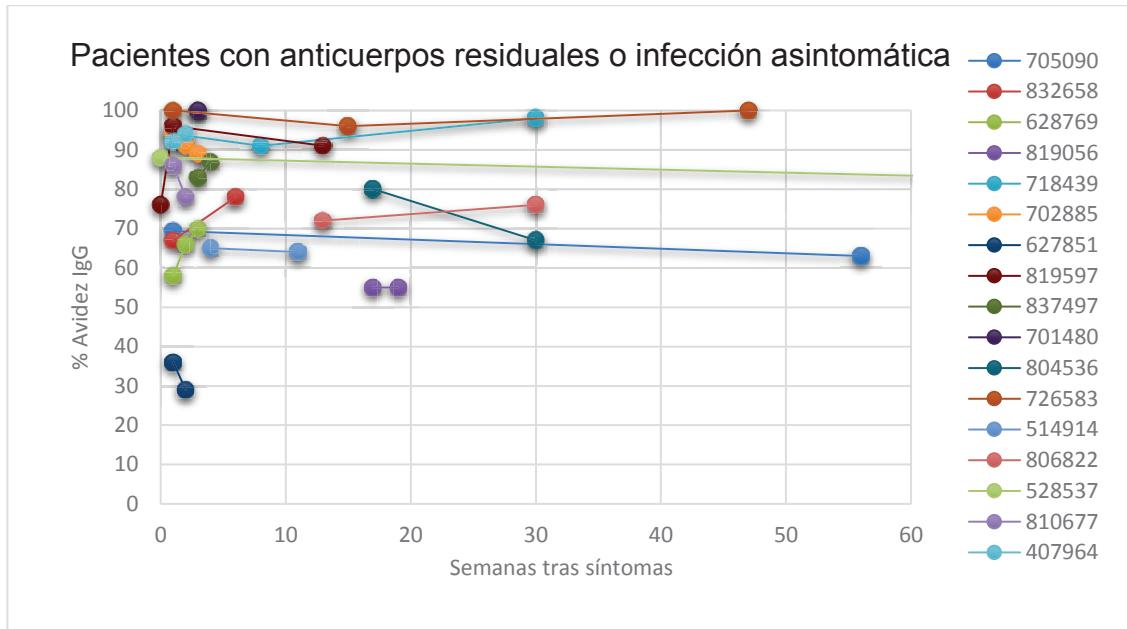


Figura 27. Avidez en pacientes con infección asintomática o anticuerpos residuales

En 8 pacientes PCR positiva se pudo volver a realizar la prueba en una segunda muestra obtenida entre 45 y 351 días (media 65,40 días + 120,04). Solo un paciente fue PCR positiva en una muestra obtenida a los 50 días. Solo en un caso el seguimiento fue a corto plazo, 45 días de evolución y el resto superaba los 55 días.

4.8. RESULTADOS DEL GRUPO 8: ESTUDIO COMPARATIVO EN LOS PACIENTES DEL GRUPO 2

En las tablas 14, 15 y 16 se muestran los resultados de las distintas pruebas diagnósticas utilizadas en los 3 tipos de pacientes: hepatitis E aguda, infección asintomática/anticuerpos residuales y pacientes con resultados falsos positivos con DIA.PRO.

Tabla 14: Resultados de pruebas diagnósticas en casos con hepatitis aguda del grupo 2

Caso	DIA.PRO M	VIRC M	VIRC G	MKG M	WAN M	PCR	CV	AVIDEZ	DTS						
211321	10,94	POS	4,7	POS	21,6	POS	86,9	POS	12,0	POS	5265	36	BAJA	21	
302793	10,80	POS	7,9	POS	19,1	POS	83,0	POS	12,3	POS	NEG	-	31	BAJA	23
406971	11,59	POS	13,5	POS	2,7	POS	94,5	POS	16,4	POS	POS	2590025	8	BAJA	11
411105	11,29	POS	10,6	POS	13,6	POS	85,8	POS	10,9	POS	POS	35757	34	BAJA	26
411297	11,19	POS	7,1	POS	4,4	POS	94,6	POS	13,8	POS	POS	1122820	10	BAJA	19
416208	5,91	POS	1,1	POS	28,2	POS	108,3	POS	7,0	POS	POS	630592	26	BAJA	6
503015	11,88	POS	10,4	POS	9,4	POS	108,2	POS	13,5	POS	POS	476070	41	BAJA	6
503455	10,76	POS	2,4	POS	9,8	POS	131,4	POS	8,2	POS	NEG	-	16	BAJA	34
506697	11,04	POS	6,4	POS	13,1	POS	107,9	POS	14,6	POS	POS	37105	33	BAJA	7
506844	11,27	POS	9,2	POS	8,6	POS	110,9	POS	13,4	POS	POS	20148	31	BAJA	8
604165	10,14	POS	10,8	POS	1,5	POS	100,8	POS	14,4	POS	POS	5663	5	BAJA	8
607357	12,99	POS	10,4	POS	6,7	POS	100,7	POS	14,4	POS	POS	961281	17	BAJA	9
607765	12,76	POS	1,7	POS	10,0	POS	107,7	POS	10,6	POS	POS	38502	13	BAJA	7
610503	12,97	POS	4,1	POS	6,1	POS	127,6	POS	5,9	POS	NEG	-	14	BAJA	-
619993	12,69	POS	3,8	POS	4,9	POS	107,4	POS	14,0	POS	POS	1940	13	BAJA	11
621325	13,18	POS	3,9	POS	5,0	POS	86,2	POS	10,8	POS	POS	87510	8	BAJA	8
621326	13,04	POS	11,8	POS	6,9	POS	107,9	POS	14,2	POS	POS	11113	27	BAJA	10
624466	2,07	POS	0,1	NEG	9,0	POS	30,4	POS	0,1	NEG	POS	35088	79	ALTA	8
628072	13,23	POS	3,9	POS	8,9	POS	94,7	POS	11,8	POS	POS	933	37	BAJA	23
710291	12,67	POS	0,2	NEG	1,7	POS	91,9	POS	1,1	POS	POS	16302290	4	BAJA	10
710242	13,43	POS	6,1	POS	10,7	POS	92,1	POS	12,0	POS	NEG	-	25	BAJA	43
715061	13,08	POS	4,9	POS	8,9	POS	100,8	POS	9,7	POS	POS	214000	26	BAJA	5
722164	13,35	POS	5,3	POS	11,0	POS	90,8	POS	12,5	POS	POS	120410	25	BAJA	2
717213	12,75	POS	4,1	POS	8,7	POS	94,8	POS	13,5	POS	POS	1856730	22	BAJA	5
719453	13,27	POS	13,3	POS	11,0	POS	107,7	POS	7,8	POS	POS	300302	35	BAJA	25
719906	16,00	POS	6,7	POS	1,6	POS	86,6	POS	12,7	POS	POS	1330567	12	BAJA	15
722811	12,41	POS	3,0	POS	9,8	POS	108,1	POS	13,4	POS	POS	70145	31	BAJA	15
724406	2,13	POS	0,3	NEG	5,5	POS	33,9	POS	1,3	POS	NEG	-	91	ALTA	40
809536	11,86	POS	11,5	POS	6,2	POS	108,2	POS	16,4	POS	POS	1170	21	BAJA	21
810715	11,56	POS	6,7	POS	11,7	POS	108,0	POS	13,4	POS	POS	32478	25	BAJA	9
812478	11,80	POS	13,5	POS	11,6	POS	100,8	POS	15,3	POS	POS	30569930	41	BAJA	10
813128	12,20	POS	2,2	POS	10,5	POS	100,7	POS	11,8	POS	POS	316957	18	BAJA	5
814048	12,00	POS	6,6	POS	2,7	POS	NR	NR	NR	POS	POS	663	33	BAJA	14
814689	12,29	POS	10,4	POS	12,0	POS	107,8	POS	16,4	POS	POS	72200	17	BAJA	7
818111	11,98	POS	6,2	POS	9,7	POS	79,7	POS	13,0	POS	NEG	-	19	BAJA	39
818227	11,10	POS	0,6	POS	8,4	POS	107,5	POS	2,4	POS	POS	38218	30	BAJA	18
819359	13,00	POS	7,7	POS	6,4	POS	85,8	POS	11,5	POS	POS	673998	6	BAJA	7
819647	8,48	POS	3,6	POS	5,8	POS	108,1	POS	16,3	POS	POS	1331050	5	BAJA	9
830159	13,10	POS	4,5	POS	8,0	POS	108,0	POS	13,7	POS	POS	5187	19	BAJA	5
830171	13,10	POS	5,3	POS	8,1	POS	92,4	POS	14,4	POS	POS	58693	40	BAJA	19
830395	13,10	POS	1,5	POS	7,9	POS	108,0	POS	7,9	POS	POS	1004905	9	BAJA	10
831740	12,34	POS	6,4	POS	6,5	POS	107,8	POS	12,5	POS	POS	616752	14	BAJA	6
834083	12,56	POS	10,4	POS	7,7	POS	115,0	POS	13,0	POS	POS	904	2	BAJA	18
837376	12,62	POS	2,7	POS	10,0	POS	148,9	POS	9,9	POS	POS	6776	12	BAJA	7
841689	12,01	POS	0,1	NEG	10,0	POS	117,6	POS	0,2	NEG	NEG	-	39	BAJA	5
842153	12,04	POS	3,1	POS	8,6	POS	149,4	POS	14,7	POS	POS	223302	3	BAJA	5

VIRC = VIRCELL; MKG = MIKROGEN; WAN = WANTAI; DTS = DIAS TRAS SÍNTOMAS

En los casos con hepatitis aguda, la IgM Anti-VHE fue positiva en el 91,30% (42/46) con VIRCELL; en el 100% (45/45), con MIKROGEN; en el 95,55% (43/45) con WANTAI; en el 84,78%, (39/46), con PCR y en el 95,65% (44/46), con avidez.

Tabla 15: Comparación de resultados con las pruebas diagnósticas en casos con infección asintomática o con anticuerpos residuales del grupo 2

Caso	DIA.PRO M	VIRC M	VIRC G	MKG M	WAN M	PCR	AVIDEZ	DTS
116869	3,26	POS	0,2	NEG	7,6	POS	66,4	POS
407964	3,10	POS	0,3	NEG	27,6	POS	64,7	POS
409046	2,30	POS	0,0	NEG	13,8	POS	4,5	NEG
409994	5,88	POS	0,1	NEG	23,1	POS	23,4	DUD
417772	3,49	POS	0,1	NEG	1,9	POS	17,7	NEG
426432	1,61	POS	2,1	POS	3,9	POS	12,9	NEG
504340	1,78	POS	0,1	NEG	8,1	POS	9,0	NEG
506604	2,40	POS	0,1	NEG	9,8	POS	4,7	NEG
508948	6,08	POS	0,1	NEG	11,6	POS	8,7	NEG
514243	3,24	POS	0,2	NEG	1,2	POS	25,6	POS
514914	2,06	POS	0,1	NEG	2,2	POS	9,1	NEG
528537	3,15	POS	0,1	NEG	9,4	POS	37,3	POS
621101	4,00	POS	2,1	POS	7,5	POS	48,0	POS
621802	6,24	POS	0,0	NEG	16,0	POS	3,6	NEG
627851	1,02	DUD	0,0	NEG	2,0	POS	10,8	NEG
624844	2,32	POS	0,1	NEG	9,4	POS	4,6	NEG
625516	2,54	POS	0,1	NEG	5,8	POS	42,5	POS
628769	1,92	POS	0,1	NEG	8,8	POS	3,2	NEG
633045	5,10	POS	0,2	NEG	9,7	POS	31,9	POS
701480	1,56	POS	0,1	NEG	5,2	POS	13,9	NEG
702319	7,51	POS	0,1	NEG	6,6	POS	18,3	NEG
702885	1,08	DUD	0,1	NEG	9,6	POS	7,3	NEG
705090	2,02	POS	0,1	NEG	2,6	POS	25,6	POS
705027	2,48	POS	0,0	NEG	11,0	POS	2,7	NEG
705546	1,63	POS	0,1	NEG	7,9	POS	3,7	NEG
709140	3,86	POS	0,1	NEG	2,0	POS	35,7	POS
713093	1,83	POS	0,1	NEG	14,4	POS	10,9	NEG
718439	4,98	POS	0,1	NEG	14,4	POS	2,6	NEG
718459	1,39	POS	0,1	NEG	13,1	POS	5,3	NEG
719572	1,30	POS	0,1	NEG	9,8	POS	14,2	NEG
726583	2,89	POS	0,0	NEG	8,5	POS	27,6	POS
802102	2,35	POS	0,1	NEG	11,4	POS	2,7	NEG
804536	1,38	POS	0,1	NEG	7,1	POS	8,7	NEG
806822	2,74	POS	0,1	NEG	2,8	POS	19,2	NEG
808646	1,01	DUD	0,2	NEG	5,3	POS	11,6	NEG
810677	1,04	DUD	0,1	NEG	5,0	POS	3,5	NEG

813420	1,04	DUD	0,1	NEG	8,3	POS	3,2	NEG	NS	NEG	NEG	90	ALTA	7
814353	3,95	POS	0,1	NEG	12,3	POS	26,9	POS	0,0	NEG	NEG	51	ALTA	-
818273	1,11	DUD	0,0	NEG	3,2	POS	7,2	NEG	0,1	NEG	NEG	69	ALTA	33
818447	1,16	DUD	0,0	NEG	1,7	POS	1,8	NEG	0,0	NEG	NEG	29	BAJA	-
819056	2,51	POS	0,0	NEG	2,6	POS	14,2	NEG	0,0	NEG	NEG	55	ALTA	120
819597	1,00	DUD	0,1	NEG	10,0	POS	13,9	NEG	0,1	NEG	NEG	76	ALTA	3
831541	2,34	POS	0,2	NEG	5,6	POS	22,2	DUD	0,7	NEG	NEG	74	ALTA	15
832658	1,06	DUD	0,2	NEG	6,5	POS	17,6	NEG	0,5	NEG	NEG	67	ALTA	6
837497	1,66	POS	0,1	NEG	5,1	POS	17,8	NEG	0,2	NEG	NEG	87	ALTA	29
837879	1,31	POS	0,0	NEG	5,6	POS	8,9	NEG	0,0	NEG	NEG	72	ALTA	18
841018	3,92	POS	0,0	NEG	6,6	POS	4,6	NEG	0,2	NEG	NEG	58	ALTA	-
841157	2,28	POS	0,1	NEG	1,9	POS	2,2	NEG	0,2	NEG	NEG	87	ALTA	12
841418	4,15	POS	0,0	NEG	7,6	POS	2,0	NEG	0,0	NEG	NEG	65	ALTA	39

VIRC = VIRCELL; MKG = MIKROGEN; WAN = WANTAI; DTS = DIAS TRAS SÍNTOMAS

En los casos con persistencia de IgM/infección asintomática, la IgM anti-VHE fue positiva en el 4,08% (2/49) con VIRCELL; en el 26,53% (13/49) con MIKROGEN; en el 16,33% (8/49) con WANTAI; en el 0% (0/49), con PCR y en el 4,08% (2/49), con avidez.

Tabla 16: Comparación de resultados con las pruebas diagnósticas en pacientes con resultado falso positivo del grupo 2

Caso	DIA.PRO M	VIRCELL M	VIRCELL G		MIKROGEN M		WANTAI M	PCR	DTS
618843	1,70	POS	0,1	NEG	0,1	NEG	18,9	NEG	0,0
629700	3,30	POS	0,0	NEG	0,2	NEG	8,2	NEG	0,0
727682	2,52	POS	0,1	NEG	0,3	NEG	5,0	NEG	0,0
803785	1,10	DUD	0,1	NEG	0,2	NEG	3,1	NEG	0,4
812599	4,64	POS	0,1	NEG	0,6	NEG	4,4	NEG	0,0
813326	1,19	DUD	0,0	NEG	1,6	POS	3,9	NEG	0,0
838739	1,01	DUD	0,0	NEG	0,8	NEG	4,7	NEG	0,0
839423	1,82	POS	0,0	NEG	0,8	NEG	12,8	NEG	0,0
840654	2,06	POS	0,0	NEG	0,2	NEG	5,8	NEG	0,1
840880	1,18	DUD	0,1	NEG	0,4	NEG	3,0	NEG	0,0
841430	1,14	DUD	0,0	NEG	0,1	NEG	2,5	NEG	0,0

DTS = DIAS TRAS SÍNTOMAS

Los 11 casos del grupo 2 clasificados como IgM falsos positivos con DIA.PRO fueron negativos con VIRCELL, MIKROGEN y WANTAI. Todos fueron también

PCR negativos. Uno de ellos (813326) fue IgG positivo con VIRCELL. Este paciente tuvo infección por VHA 45 días antes.

Sin tener en cuenta los resultados de la marca DIA.PRO ya que es la prueba utilizada para la selección de casos, en la tabla 17 se muestran resumidos los resultados de las distintas pruebas en los tres tipos de situaciones clínicas consideradas en este estudio.

Tabla 17: Resumen de los resultados de los distintos equipos						
	Hepatitis aguda		Infección asintomática o anticuerpos residuales		Falsos positivos	
	+ / Total	%	+ / Total	%	+ / Total	%
DIA.PRO M	46 / 46	100%	49 / 49	100%	11 / 11	100%
VIRC M	42 / 46	91,30%	2 / 49	4,08%	0 / 11	0,00%
VIRC G	46 / 46	100%	49 / 49	100%	1 / 11	9,08%
MKG M	45 / 45	100%	13 / 49	26,53%	0 / 11	0,00%
WAN M	43 / 45	95,55%	8 / 49	16,33%	0 / 11	0,00%
PCR	39 / 46	84,78%	0 / 49	0,00%	0 / 11	0,00%
AVIDEZ BAJA	44 / 46	95,65%	2 / 49	4,08%	0 / 11	0,00%

En la tabla 18 se muestran las medias de los índices de IgM de VIRCELL, MIKROGEN Y WANTAI. Se aprecia que, al igual que con DIA.PRO los valores de las muestras de casos con hepatitis aguda son significativamente más elevadas que en los pacientes asintomáticos/persistencia de IgM y falsos positivos.

Tabla 18: Comparación de medias VIRCELL, MIKROGEN y WANTAI				
Subgrupo	Nº	Índ. VIRCELL	Índ. MIKROGEN	Índ. WANTAI
Hepatitis aguda	46	6,42 (\pm 3,63)	100,77 (\pm 21,02)	11,22 (\pm 4,39)
Inf.asint./ac residuales	48	0,16 (\pm 0,41)	16,01 (\pm 15,36)	0,48 (\pm 0,95)
Falsos positivos	11	0,04 (\pm 0,02)	6,56 (\pm 5,01)	0,06 (\pm 0,11)

La concordancia entre las distintas técnicas empleadas en hepatitis aguda, se evaluó mediante el índice de kappa de Cohen. Valores kappa < 0,20 indican concordancia pobre, débil para valores 0,21-0,40, moderada para valores 0,41-0,60, buena entre 0,60 y 0,80 y muy buena para valores superiores a 0,80.

Se excluyó a DIA.PRO del análisis al ser nuestra técnica de selección de casos.

Tabla 19: Índice kappa de concordancia entre las distintas técnicas					
Índice kappa	Vircell IgM	Wantai IgM	Mikrogen IgM	Avidez IgG	PCR
Vircell IgM	-	0,84	0,67	0,87	0,81
Wantai IgM	0,84	-	0,74	0,80	0,72
Mikrogen IgM	0,67	0,74	-	0,68	0,66
Avidez IgG	0,87	0,80	0,68	-	0,88

4.9. RESULTADOS DEL GRUPO 9: ANÁLISIS MOLECULAR, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

4.9.1. ANÁLISIS MOLECULAR

En la tabla 20 se muestran los resultados de la PCR en los 106 pacientes del grupo 2, en función de la clínica.

La PCR fue positiva en 39 (84,78%) de los casos clasificados como hepatitis aguda y en ninguno de los casos de los otros tipos de pacientes.

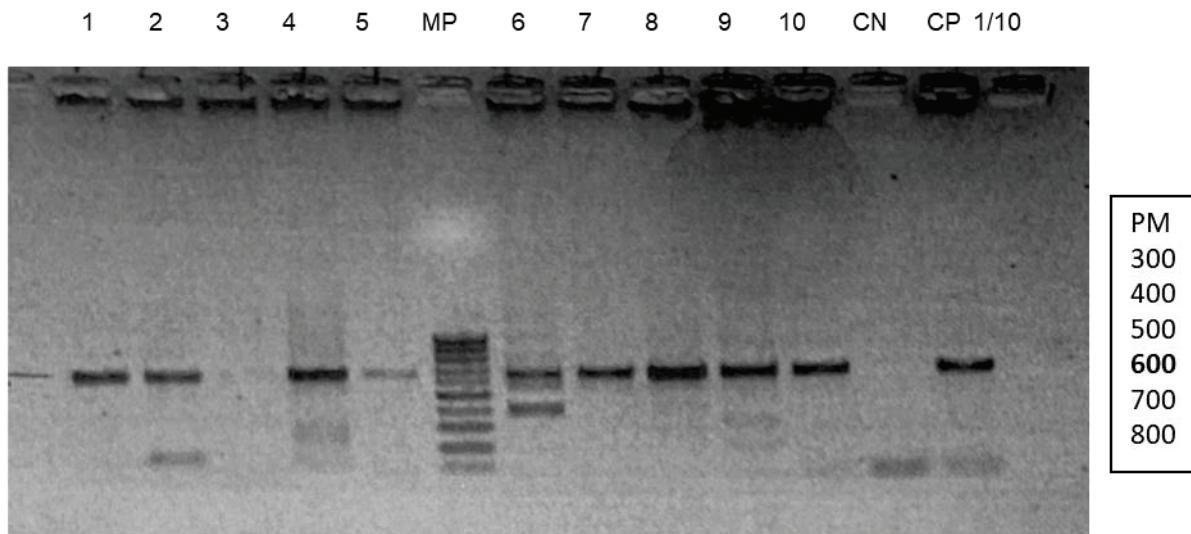
Los 7 casos PCR negativos eran muestras de pacientes obtenidas entre 5 y 43 días tras los síntomas, eran IgM DIA.PRO, MIKROGEN Y WANTAI e IgG CLIA positivos (Tabla 14) y 5 de ellos, IgM CLIA positivos. Tres tenían IgG CLIA de baja avidez (14%, 31% y 39%) y 4 de alta avidez (Tabla 14).

Tabla 20: Resultados de PCR en pacientes del grupo 2			
Subgrupo	Nº	PCR positiva	%
Hepatitis aguda	46	39	84,78%
Infección asintomática o anticuerpos residuales	49	0	0%
Falsos positivos	11	0	0%

El resultado negativo en los casos clasificados de infección asintomática o anticuerpos residuales/falsos positivos confirma lo adecuado de la clasificación. La PCR de los pacientes con SPT fue positiva con una carga viral de 663 copias/mL y 72200 copias/mL, respectivamente para los pacientes 1 y 2.

4.9.2. SECUENCIACIÓN

Se realizó en 34 muestras de las 39 con PCR positiva, en cinco no disponíamos de volumen suficiente (muestras 607765, 713093, 834083, 837376, 842153).



1: 818227, 2: 819359, 3: 810715, 4: 812478, 5: 722811, 6: 715061, 7: 211321, 8: 406971, 9: 416208, 10: 506697, MP: marcador de peso molecular 100 pb, CN: control negativo, CP: control positivo.

Figura 28. Gel electroforesis con amplicones de 10 pacientes

Las muestras sin la calidad necesaria para análisis posteriores fueron 7 (casos 607765, 619993, 621325, 628072, 830159, 830171, 830395). Las lecturas emitidas por el secuenciador, se revisaron para comprobar su calidad, y se deshecharon las inconsistentes (Figura 29).

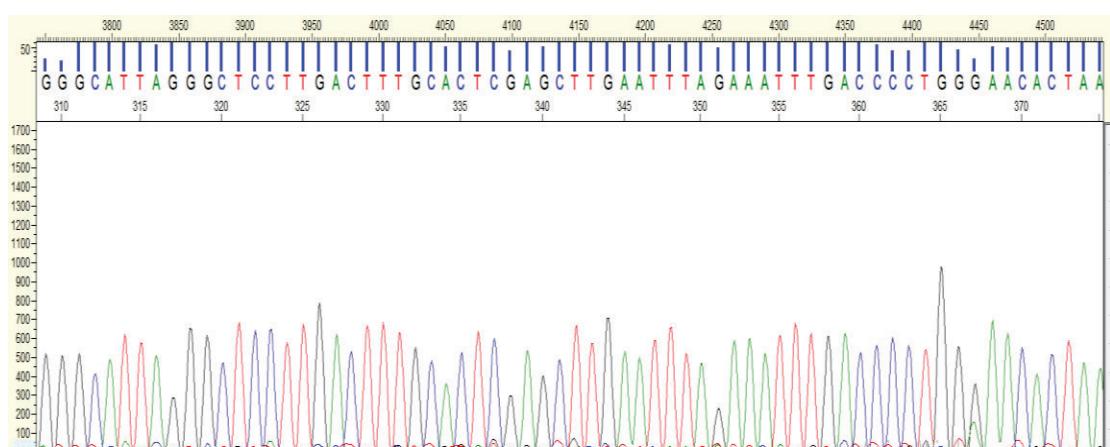


Figura 29. Lectura de una secuencia con el programa Sequence scanner.

4.9.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Todas las secuencias de este estudio fueron depositadas en GenBank (Tabla 21) y correspondieron por homología con miembros de la familia *Hepeviridae*. Nuestras secuencias se compararon con secuencias depositadas en GenBank, y mostraron la mayor homología con las descritas en cerdo, jabalí, caballo y humanos (Tabla 22).

Según el árbol en la figura 30, todas las secuencias descritas fueron agrupadas dentro del genotipo 3 de la especie *Orthohepevirus*.

Se asignaron a las secuencias los subgenotipos de acuerdo a su posición en el árbol filogenético y utilizando la herramienta “Hepatitis E Virus Genotyping Tool Version 0.1”. De acuerdo con ésto, 24 secuencias del estudio pertenecen al subgenotipo 3f y resultaron ser similares a secuencias depositadas en BLAST de humano, cerdo y caballo descritas en Francia, España y Japón. La distancia “p” entre las secuencias de este estudio osciló entre 0,020 y 0,235.

Se encontraron mediante el análisis filogenético dos subtipos distintos al 3f en las secuencias estudiadas:

Las secuencias pertenecientes a los pacientes 710291 y 719906 resultaron ser similares entre ellas en el análisis filogenético, formando un clado cercano con un “bootstrap” de 88% y fueron similares a secuencias anteriormente descritas como subtipo 3m. El paciente 710291, era cazador y vivía en Zaragoza. La secuencia presentó la mayor homología con una depositada en BLAST encontrada en jabalí en España, MH891834 (distancia p: 0,054). A su vez, el paciente 719906, era pastor y vivía en Sádaba. La mayor homología fue con una

secuencia depositada en BLAST, descrita en humano en Francia KU176130 (distancia p: 0,013).

Por otro lado, la secuencia perteneciente el paciente 416208, camionero de profesión y que vivía en Utebo, pertenece al subgenotipo 3c por su similitud con varias secuencias depositadas en BLAST, la menor distancia p resultó ser con la secuencia MF444043, descrita en Francia en humano (distancia p: 0,010).

La mayoría de secuencias identificadas pertenecieron al subgenotipo 3f (88,88%), 2 al subgenotipo nuevo 3m (7,40%) y 1 de ellas (3,70%) al subgenotipo 3c. En el análisis filogenético, los círculos negros son cadenas identificadas en este estudio. Los pacientes con SPT y VHE están representados además con los números de acceso de GenBank. La distancia p entre estas dos secuencias fue de 0,115.

Tabla 21: Secuencias descritas en este estudio				
Caso	GenBank	Genotipo	Hospedador	País
411297	MW656376	3f	Humano	España
621326	MW656375	3f	Humano	España
810715	MW685511	3f	Humano	España
411105	MW671052	3f	Humano	España
717213	MW656362	3f	Humano	España
416208	MW685506	3c	Humano	España
607357	MW656363	3f	Humano	España
406971	MW656364	3f	Humano	España
719453	MW656365	3f	Humano	España
831740	MW656366	3f	Humano	España
819359	MW685512	3f	Humano	España
722811	MW685508	3f	Humano	España
719906	MW656367	3m	Humano	España
211321	MW685505	3f	Humano	España
819647	MW685507	3f	Humano	España
818227	MW656368	3f	Humano	España
503015	MW656369	3f	Humano	España
710291	MW656370	3m	Humano	España
814048	MT262882	3f	Humano	España
814689	MT262883	3f	Humano	España
809536	MW656371	3f	Humano	España
812478	MW685509	3f	Humano	España
506697	MW656372	3f	Humano	España

813128	MW656374	3f	Humano	España
604165	MW685513	3f	Humano	España
715061	MW656373	3f	Humano	España
624466	MW685510	3f	Humano	España

Tabla 22: Secuencias similares descritas en BLAST

GenBank	Genotipo	Hospedador	País
LC055973	3f	Humano	Japón
MH178352	3f	Caballo	España
MN646695	3f	Humano	Francia
MF444039	3f	Humano	Francia
MF444061	3f	Humano	Francia
MF444043	3c	Humano	Francia
MF444075	3f	Humano	Francia
MF444076	3f	Humano	Francia
KU513561	3m	Humano	España
MF444096	3f	Humano	Francia
EU723516	3f	Cerdo	España
MF444095	3f	Humano	Francia
MF444127	3f	Humano	Francia
MH891834	3m	Jabalí	España
MF444140	3f	Humano	Francia
MF444094	3f	Humano	Francia
KU176130	3m	Humano	Francia

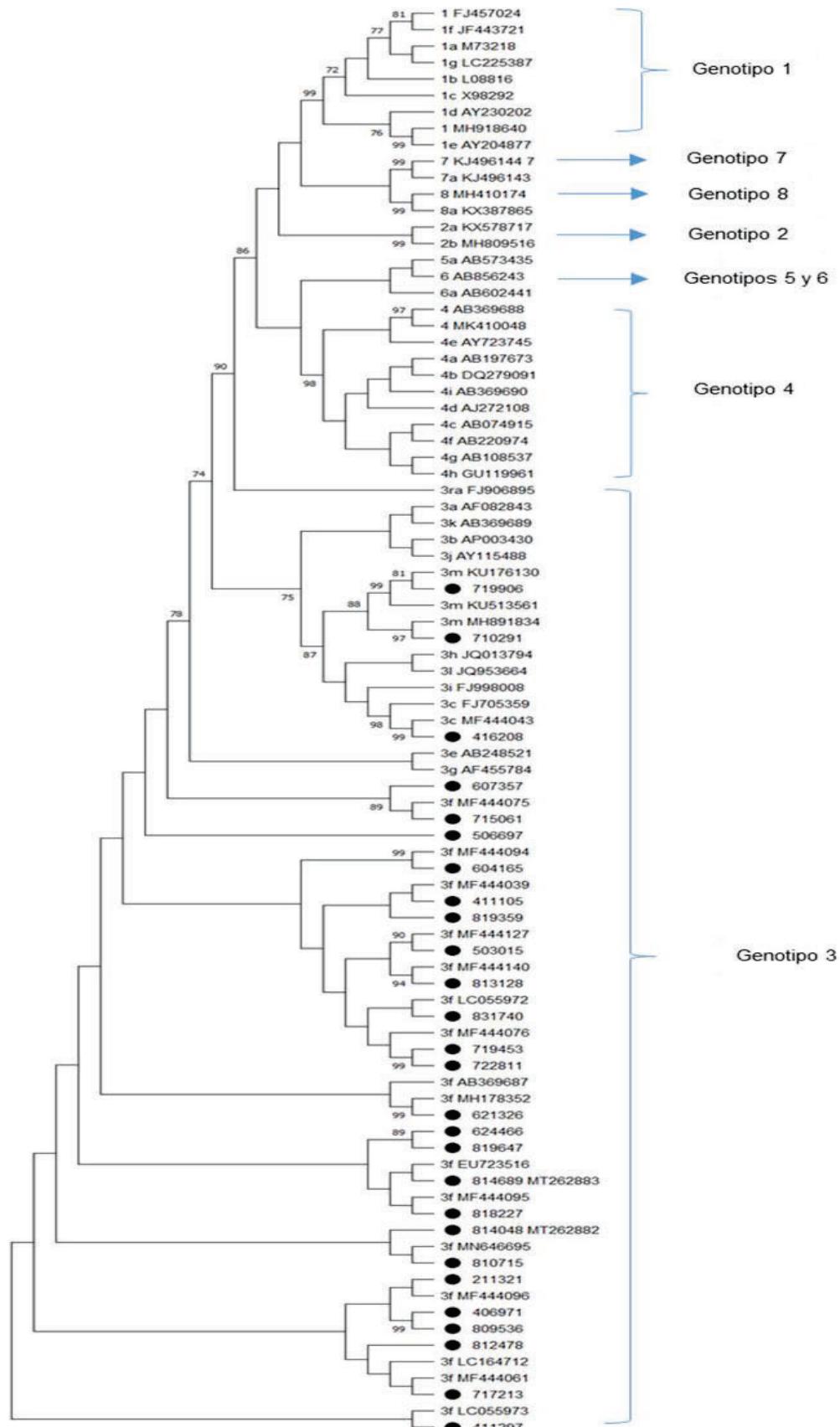


Figura 30. Árbol filogenético

4.10. RESULTADOS DEL GRUPO 10: ESTUDIO DE AVIDEZ IgG A VHE

En la tabla 23 se muestran los resultados del análisis de la avidez de IgG en los pacientes del grupo 2.

En los 44 pacientes con hepatitis aguda la avidez fue baja (95,65%). De los 2 casos con alta avidez, uno fue PCR VHE positiva (caso 624466) y con índices de IgM bajos y discordantes. Este caso, que llevaba aparentemente 8 días de evolución, era un paciente búlgaro con transaminasas muy elevadas y positividad para IgM frente VHA y VEB VCA. El otro caso con alta avidez (caso 724406) presentaba 39 días de evolución, IgM discordantes y transaminasas elevadas.

En los casos clasificados como infección asintomática o residual solo hubo dos pacientes (4,08%) con baja avidez (casos 627851, 818447 de la tabla 15). Sus PCR fueron negativas y los índices de IgM bajos o negativos y discrepantes entre las distintas técnicas.

Tabla 23: Resultados del estudio de avidez en pacientes del grupo 2

Subgrupo	Nº	Baja avidez	%
Hepatitis aguda	46	44	95,65 %
Infección asintomática o anticuerpos residuales	49	2	4,08 %
Falsos positivos	1	0	0,00 %

Hubo diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) en el porcentaje de casos con baja avidez entre pacientes con hepatitis E aguda y pacientes con infección asintomática/anticuerpos residuales.

La determinación de avidez no se realizó en 10 de las 11 muestras consideradas como falsas positivas por ser IgG negativas.

4.11. RESULTADOS DEL GRUPO 11: PACIENTES CON SÍNDROME DE PARSONAGE-TURNER Y VHE

En la tabla 24 se muestran los resultados de los análisis microbiológicos en los dos pacientes con SPT.

Tabla 24: Resultados de los análisis microbiológicos en pacientes con SPT

	PACIENTE 1		PACIENTE 2	
Días desde el comienzo	14	45	7	56
Prueba serológica	Índice (S/CO)		Índice (S/CO)	
IgM VHE (EIA) (CO 1,2)	12,00	9,14	12,29	2,74
IgM VHE (CLIA) (CO 0,5)	6,57	0,94	10,39	0,20
IgG VHE (CLIA) (CO 1,1)	2,71	4,94	11,99	15,96
Otras pruebas microbiológicas				
Avidez IgG VHE (EIA) (%)	35 (bajo)	45 (int)	17 (bajo)	72 (alto)
Carga viral (IU/mL)	663	NEG	72000	NEG
Genotipo VHE	3f	-	3f	-
EIA=enzimoinmunoensayo; CLIA=inmunoensayo quimioluminiscente; CO=cut-off; Int = intermedia.				

En el paciente 1, la IgM Anti-VHE, la IgG Anti-VHE y la PCR, realizadas a los 7 días de evolución fueron positivas y la avidez de IgG fue baja. El análisis filogenético mostró la pertenencia al genotipo 3f (número de acceso a GenBank MT262882) (Figura 30).

El paciente fue diagnosticado de neuropatía del plexo braquial (Síndrome de Parsonage-Turner) asociado a infección por VHE genotipo 3f. Recibió tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (naproxeno, dexketoprofeno), corticoides

(metilprednisolona 500 mg/d durante tres días), analgésicos (tramadol i.v., oxicodona, metamizol), gabapentina y rehabilitación, mostrando una leve mejoría clínica.

En un suero obtenido durante la convalecencia a los 40 días del comienzo de los síntomas, se detectó un aumento del índice de IgG Anti-VHE (índice CLIA 4,94) y de avidez (45%). El ARN fue negativo y las enzimas hepáticas se normalizaron (ALT 27 UI/L y AST 11 U/L). Un mes después el paciente fue reingresado en el hospital por dolor persistente, impotencia funcional y disnea, junto con atrofia del miembro derecho superior. Se le administraron corticoides (metilprednisolona 1 gr/d durante 5 días) y se repitió el estudio electrofisiológico. En este momento, el electroneurograma mostró alteración en el nervio frénico izquierdo (raíz C4, debilidad diafragmática) y en el nervio supraescapular derecho (raíz C5-C6, debilidad del supra e infraespinoso) y el electromiograma, discreta polifasia, en el bíceps y supraespinoso sin otras alteraciones ni ausencia de denervación en los músculos explorados. Un año después el paciente podría trabajar, no presentaba debilidad muscular ni atrofia significativa, aunque tenía ligera disnea de esfuerzo (Figura 31).

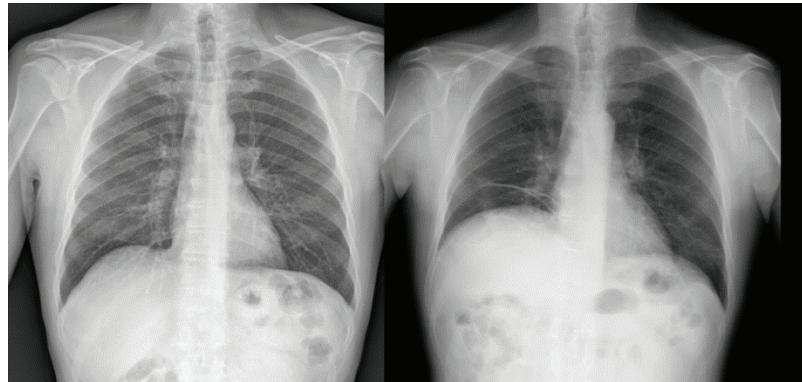


Figura 31. Radiografías de tórax del paciente 1 con SPT

Izquierda 04/05/18: Ligera elevación del hemidiaphragma derecho. Derecha 09/04/19: Persistencia de la elevación del hemidiaphragma derecho con presencia de atelectasia laminar.

El caso 2, fue diagnosticado de hepatitis aguda, después de la realización de las pruebas virológicas, con neuropatía del plexo braquial (SPT) asociada a la infección viral. La IgM, la IgG anti-VHE y la PCR fueron positivas a los 7 días de evolución. La avidez de la IgG fue baja. El estudio del genoma mostró que se trataba del genotipo 3f (número de acceso a GenBank MT262883) (Figura 30).

No se hizo estudio de LCR para VHE.

A los 49 días de evolución se volvió a realizar serología de VHE, la cual mostró elevación de la IgG Anti-VHE (índice CLIA 15,96) y de la avidez (72%), siendo la PCR negativa. Las enzimas hepáticas también se normalizaron (AST 17 U/L y ALT 20 U/L), pero el dolor cervicobraquial y abdominal persistió.

5. DISCUSIÓN

El aumento de los casos descritos de la infección por VHE en los países desarrollados, en general, y en España, en particular, ha puesto en evidencia la necesidad de disponer de medios diagnósticos adecuados. En este sentido, han aparecido guías de diagnóstico de la hepatitis E, como la del Grupo de Estudio de Hepatitis (GeHEP) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (GeHEP, 2018), la de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL, 2018) o la del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, 2019).

Todas las guías mencionadas tienen en común la recomendación de combinar métodos moleculares y serológicos para el diagnóstico de las infecciones por VHE. EASL y ECDC recomiendan la detección de ARN (persistencia al menos durante 3 meses) o antígeno de VHE para diagnóstico de las infecciones crónicas. Las 3 guías recomiendan investigar VHE en todos los casos con

hepatitis o sospecha de hepatitis. GeHEP hace énfasis en la equivalencia de la detección de ARN y antígeno de VHE.

El diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis E se basa en el diagnóstico de laboratorio, ya que clínicamente, es indistinguible de otras hepatitis agudas. Con anterioridad a la aparición de métodos diagnósticos adecuados de la infección por virus de la hepatitis E, su diagnóstico se realizaba, cuando se pensaba en ella, en buena medida por exclusión de los virus A, B, C y D. Así, en muchos casos su sintomatología ha sido atribuida a una hepatitis medicamentosa (Dalton HR *et al.*, 2007; Davern TJ *et al.*, 2011; Webb GW *et al.*, 2019).

En Europa solo dos países determinan la presencia del VHE de forma sistemática en los casos de hepatitis aguda: Reino Unido (Escocia), donde los laboratorios realizan la determinación si la ALT supera las 100 U/L, e Irlanda, donde se realiza siempre que se solicita la determinación del VHA. (Aspinall EJ *et al.*, 2017; GeHEP 2018). En el resto de países europeos, la determinación de VHE se realiza de forma variable según el área geográfica. Algunos autores, como Wallace *et al.* (Wallace SJ *et al.*, 2017) recomiendan realizar diagnóstico de VHE cuando la ALT es mayor a 300 UI/L.

En este sentido, en Europa, en los últimos años han surgido diversas pruebas serológicas comerciales para la determinación de IgM e IgG específicas, a las que se han sumado las pruebas de biología molecular. Sin embargo, ninguna de las pruebas disponibles ha sido aprobada por la FDA (Sauleda S *et al.*, 2015; CDC., 2020).

El diagnóstico de la hepatitis E se podría realizar mediante diferentes métodos. El diagnóstico directo, mediante cultivo, no es método de referencia debido a la pobre efectividad de crecimiento de VHE in vitro. El antígeno de VHE, ha demostrado ser un sistema útil con buena correlación con el ARN de VHE, aunque, al igual que la detección de ARN mediante PCR, tiene sus limitaciones, debido a la corta duración de la viremia del VHE y el largo periodo de incubación, lo que implica que un resultado negativo no descarte su diagnóstico. Además, su resultado depende de las condiciones de conservación de la muestra (GeHEP 2018).

Respecto al diagnóstico indirecto, el más utilizado hasta ahora, presenta algunos inconvenientes, ya que la IgG puede durar hasta 14 años (Khuroo MS *et al.*, 1993) y la IgM también puede persistir de forma prolongada, lo que le resta utilidad en el diagnóstico de hepatitis aguda. Además, estas pruebas, están basadas en la utilización de diferentes antígenos y presentan distinto diseño y características (Takahashi M *et al.*, 2005; Avellón A *et al.*, 2015). Su sensibilidad es variable (74% al 97% para IgM y 16 al 100% para IgG) y su especificidad (74% al 100% para IgM y 90% al 97% para IgG) también. El grado de concordancia también es mejorable. Según Norder *et al.* (Norder H *et al.*, 2016) es el 71 % para IgM y del 70% para IgG. Algunos autores (Avellón A *et al.*, 2015) encuentran resultados discordantes dependientes del tipo de paciente. Por ello, el uso de la avidez IgG como técnica complementaria al uso de la IgM puede ayudar a diferenciar mejor entre infección reciente o infección pasada.

En el año 2000 el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza introdujo en su cartera de servicios una prueba para la detección de IgM específica frente al VHE (EIA ANTI-VHE IgM, DIA.PRO SRL, Milán, Italia), que ha sido nuestra prueba de referencia. Dicha prueba permitió hacer el diagnóstico de algunas hepatitis agudas E, pero también era positiva en pacientes asintomáticos o que presentaban niveles bajos de transaminasas, incluso en casos asintomáticos que tenían relación epidemiológica con pacientes con hepatitis E aguda o que tenían antecedentes de una hepatitis aguda no diagnosticada etiológicamente.

El Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza es el único de Aragón que realiza diagnóstico de la hepatitis E y que, por lo tanto, recibe muestras de toda la Comunidad Autónoma. Esta circunstancia nos permite conocer la situación de la hepatitis E en Aragón.

Nuestro interés por la hepatitis E surgió a partir de la detección de casos con IgM frente al virus de la hepatitis E en pacientes asintomáticos relacionados epidemiológicamente, lo que motivó una revisión de los casos diagnosticados entre 2011 y 2015 (Benito R *et al.*, 2016; Bueno J *et al.*, 2015). Estos casos con antecedentes de infección por VHE eran especialmente prevalentes en la zona geográfica noroccidental de la provincia de Zaragoza, además de en la capital. La elevada concentración de casos en la capital es explicable por el hecho de que Zaragoza concentra la mayor parte de la población de Aragón. Sin embargo, llamaba la atención el otro foco mencionado.

Según el INE (Instituto Nacional de Estadística) la población en la provincia de Zaragoza en el año 2020 era de 972.528 y en la comarca de Zaragoza de 768.141

(78,98% de la población). En este trabajo se encontraron en el grupo 1 solo un 54,12% de los casos de IgM positiva en la comarca de Zaragoza, lo que nos puede indicar que hay algunos factores que favorecen la transmisión en zonas rurales, pese a la menor población, como puede ser, la existencia de granjas y ganadería, huertos de consumo propio regados con aguas que contienen restos fecales de animales.

Esta impresión también se confirma con los datos obtenidos en los estudios de prevalencia obtenidos en zonas rurales, con un 82,75% de IgG positivas frente a un 17,24% de IgG positivas en la comarca de Zaragoza.

Como se ha señalado, entre 2011 y 2018 se han detectado 131 casos de IgM positiva para VHE con DIA.PRO entre los 1070 analizados con sospecha de infección por VHE. Esto supone una prevalencia de IgM del 12,24% entre los pacientes en los que se quería confirmar o descartar una hepatitis E, que se reduce al 10,19% si excluimos los falsos positivos.

Aunque la IgM no es un marcador de prevalencia, este dato sugiere que, pese al sesgo que supone no haber estudiado sistemáticamente la presencia de IgM frente a VHE en pacientes con infección aguda, el VHE circula en nuestro medio con una prevalencia posiblemente mayor a la descrita en Madrid por Mateos *et al.* (Mateos ML *et al.*, 2005) y por Fogeda *et al.* (Fogeda M *et al.*, 2012) en población general, donantes de sangre y hemodializados, que oscilaba entre el 2,8% y el 6,3% y a la estimación hecha por Echeverría (Echeverría JM *et al.*, 2015) de inferior al 10% para España. De hecho, en Aragón se observa un progresivo incremento del número de solicitudes (sospechas) diagnósticas de

hepatitis E y del porcentaje de casos IgM positivos con DIA.PRO en los años estudiados.

Este aumento es congruente con el observado en Francia (Nicand E *et al.*, 2008) y en el conjunto de Europa desde 2005 (Aspinall EJ *et al.*, 2017), que se traduce en un aumento de las hospitalizaciones relacionadas con VHE de menos de 100 en 2005 a más de 1110 en 2015) y el registro de hasta 28 casos mortales.

Se ha descrito un número no despreciable de resultados IgM positivos en donantes sanos en países con baja prevalencia. Esta situación puede corresponder a infecciones asintomáticas, infecciones pasadas o a resultados falsos positivos (Pan JS *et al.*, 2010; Khudyakov Y *et al.*, 2011; Hyams C *et al.*, 2014; Landry ML *et al.*, 2016).

La prevalencia de VHE en España ha sido estudiada por diversos autores: Mateos *et al.* (Mateos ML *et al.*, 1999) en Madrid; por Buti *et al.* (Buti M *et al.*, 2006) (7,3%), López-Izquierdo *et al.* (López-Izquierdo R *et al.*, 2007) (0,8%) y Fogeda *et al.* (Fogeda M *et al.*, 2012) (2,1%) en población general de Barcelona, Castilla-León y Madrid, respectivamente; por Sauleda *et al.* (Sauleda S *et al.*, 2014) (19,97%) en bancos de sangre en Cataluña; por Riveiro-Barciela *et al.* (Riveiro-Barciela M *et al.*, 2014) en pacientes VIH (9,2%) y en postrasplantados hepáticos por cirrosis (32,1%); por López-Fabal *et al.* (López-Fabal MF *et al.*, 2015) y Rivero-Juárez *et al.* (Rivero-Juárez *et al.*, 2020) en pacientes VIH (23,5% y 11,9%, respectivamente) y en pacientes VIH y/o VHC (40%); por Galiana *et al.* (Galiana C *et al.*, 2008 y Rivero-Barciela M *et al.*, 2012) en población con exposición profesional al ganado porcino (18,8% y 19% respectivamente); por Suárez González *et al.* (Suárez González A *et al.*, 2004) (0,6%), Buti *et al.* (Buti

M *et al.*, 2010) (5,4%) y Mateos-Lindeman *et al.* (Mateos-Lindeman ML *et al.*, 2010) en gestantes 3,6% para IgG y 0,67% para IgM.

Estos datos ofrecen una gran variabilidad en función de la población estudiada, el periodo de tiempo, el tipo de técnica y antígenos utilizados. Lo mismo sucede en los diversos países europeos como lo refleja la OMS en su revisión de 2014 (WHO, 2014). Por eso los resultados son difícilmente comparables a menos que sea entre estudios que usen la misma marca.

En nuestro estudio, la prevalencia de la IgM en donantes sanos (pacientes de Banco de Sangre del HCULB de Zaragoza) ha sido del 5,55%, inferior a la del grupo 1, pero confirma la circulación del virus de forma significativa en nuestro medio. La determinación de IgG de VHE en muestras del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada ofrece una prevalencia del 11,79%, superponible a la estimada por Echeverría (Echeverría JM *et al.*, 2015), incluso se encontraron casos IgM positivos. Los estudios en ambos grupos de donantes muestran la presencia de infecciones recientes asintomáticas, incluso a niveles superiores a los descritos previamente en determinadas poblaciones de España como hemos expuesto anteriormente. Estos datos sugieren la conveniencia de cribar VHE en este tipo de población.

El estudio de prevalencia en pacientes de pueblos de la zona noroccidental de la provincia de Zaragoza sin sospecha de hepatitis, donde anteriormente se habían detectado numerosos casos (Bueno J *et al.*, 2015; Benito R *et al.*, 2016) y, a pesar de no ser un número elevado, ha mostrado cifras entre el 11% y el 34%. Estos datos sugieren una importante circulación del virus en la zona

probablemente relacionada con la existencia de un número elevado de granjas porcinas.

La determinación de IgM anti-VHE es el marcador más usado en los laboratorios para el diagnóstico de infección por VHE (ECDC 2018). La IgM anti-VHE aparece durante la fase aguda de la enfermedad, desde los 4 días del inicio de la ictericia. Se detecta en >90% de los pacientes entre los 4 y 14 días tras la aparición de la enfermedad, constituyendo un marcador muy adecuado para el diagnóstico de la infección aguda (Rodríguez-Frías F *et al.*, 2012).

Al no disponerse de un sistema efectivo de cultivo celular, no es posible la utilización de antígenos nativos, por lo que los antígenos usados en los ensayos de anticuerpos se obtienen de polipéptidos sintéticos o proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes simulan mejor la conformación de los epítopos nativos que los péptidos sintéticos (Wang Y *et al.*, 2016).

La cápside del VHE contiene diversos epítopos que conforman distintas estructuras en las distintas cepas virales debido a la variación de las secuencias de aminoácidos. El extremo N terminal de las ORF2 y ORF3 presenta diferencias entre los genotipos 1 y 4. La longitud de la ORF2 del genotipo 1 contiene 14 aminoácidos menos que la del genotipo 4, mientras que la ORF3 tiene 9 aminoácidos más (Ma H *et al.*, 2009).

Los epítopos antigenicos más importantes para el diagnóstico se encontraron en los dominios 1 y 6 ubicados en los extremos N y C de la proteína codificada por la ORF2 (Ma H *et al.*, 2009). Estos epítopos son dependientes de la

conformación y su conocimiento ha permitido el desarrollo de nuevos versiones de los reactivos para diagnóstico IgM (Khudyakov Y *et al.*, 2011).

Nuestra prueba serológica de referencia (EIA ANTI-VHE IgM, DIA.PRO SRL, Milán, Italia) nos ha permitido detectar 131 casos con IgM positiva frente al virus de la hepatitis E, entre 2011 y 2018. Las muestras de estos pacientes fueron conservadas a -80°C y han sido utilizadas para determinar el valor diagnóstico de diversos equipos comerciales alternativos para detección de IgM o IgG, así como de una prueba de avidez de IgG específica, puesta a punto por nosotros, y estudiar el valor de una PCR no comercial. A la vez, hemos podido secuenciar y genotipar los amplicones detectados por PCR.

Los pacientes IgM anti-VHE positivos detectados fueron clasificados, en función del nivel de IgM, de la sintomatología clínica, de los datos bioquímicos y epidemiológicos en 3 grupos: hepatitis E aguda, infección asintomática por VHE/persistencia de IgM y falsos positivos.

Como era de esperar el índice medio de IgM de DIA.PRO es significativamente más elevado en los casos de hepatitis aguda que en los pacientes con infección asintomática/residual o con resultado falso positivo. El 90,7% de los pacientes con hepatitis aguda tienen índices mayores a 8 y el 100% de los falsos positivos, menores a 5. Índices mayores a 8 y menores a 5 nos han permitido discriminar los casos de hepatitis agudas de los falsos positivos, respectivamente. La elevación del punto de corte, ayudaría a mejorar el VPP de la IgM de DIA.PRO para hepatitis E aguda. Esta valoración es similar a la realizada por Landry ML.,

2016, que indica que los índices de IgM menores a 4 corresponden a falsos positivos, mientras que los índices superiores a 9 son verdaderos positivos.

La técnica de DIA.PRO es muy sensible, pero muestra un número no despreciable de falsos positivos (16,79%) en pacientes con sospecha de infección por VHE, lo que disminuye su valor predictivo positivo de hepatitis aguda. Este perfil falso positivo viene definido por presencia de IgM con índices bajos en ausencia de IgG (Mateos-Lindemann ML *et al.*, 2017). Esta técnica es un EIA indirecto con antígenos codificados por las ORF2 y 3 para identificar los determinantes inmunodominantes y conservados de todos los genotipos 1 a 4, lo que puede contribuir a explicar su alta sensibilidad (Norder H *et al.*, 2016) y menor especificidad para diagnóstico de hepatitis aguda. Aunque ha sido nuestra técnica de referencia, por razones de disponibilidad, no es el “gold standard” y eso nos ha impulsado a explorar y evaluar nuevas opciones serológicas diagnósticas y conocer sus características.

La presencia de IgM específica de VHE con DIA.PRO en pacientes sin clínica/analítica de hepatitis aguda (58,78%) nos hizo pensar en la necesidad de verificar la calidad de la mencionada prueba. Para ello comparamos los resultados de DIA.PRO (EIA) con los obtenidos con VIRCELL (IgM e IgG) (CLIA) (Grupo 2).

La IgM de VIRCELL fue positiva en menos del 50% de los casos de DIA.PRO IgM positivos. Esto sugiere una mayor sensibilidad de DIA.PRO que origina una persistencia prolongada de IgM que le resta VPP para hepatitis E aguda y

proporciona una elevada tasa de falsos positivos. Esto último obliga a realizar IgG específica de VHE en los casos asintomáticos/oligosintomáticos.

Estudios previos sobre DIA.PRO (Pas SD *et al.*, 2013) conceden a la IgM una sensibilidad del 81% en pacientes PCR positivos y una especificidad del 98%, pero no hablan de VPP, ni hacen referencia a la clínica que mostraban los pacientes reclutados, ni al tiempo de evolución. Este estudio comparaba 8 equipos comerciales, siendo DIA.PRO el de mayor sensibilidad, mientras que WANTAI tuvo la mejor especificidad y el índice que mejor identificaba casos de hepatitis aguda.

La IgM de VIRCELL mostró buena sensibilidad en pacientes con hepatitis aguda E aguda, asociada a índices altos. Tres de las cuatro discrepancias se debieron a muestras obtenidas antes de los 10 días de evolución y la cuarta en un paciente con 45 días de evolución. Solo el 4,09% de los pacientes clasificados como asintomáticos/persistencia y ninguno de los clasificados como falsos positivos fueron VIRCELL IgM positivos, lo que concede elevado VPP y especificidad a esta prueba.

Aparentemente, la sensibilidad de CLIA debería ser mayor que la de EIA (Ghosh M *et al.*, 2015), cosa que no ha sucedido, Los diferentes antígenos utilizados en los equipos comerciales pueden justificar dicha paradoja.

El análisis conjunto de estos datos refleja una mejor asociación de la IgM de CLIA (VIRCELL) con infección aguda por VHE, lo que facilita su interpretación. La positividad de EIA IgM (DIA.PRO) sugiere infección previa y debe

interpretarse junto con la clínica/transaminasas además de otras pruebas diagnósticas complementarias.

En el grupo de pacientes con hepatitis aguda, en la comparación de las técnicas de VIRCELL, MIKROGEN Y WANTAI con DIA.PRO para detectar IgM se detectaron 4 casos VIRCELL negativos (624466, 710292, 724406 y 841689). En tres de ellos, la muestra había sido obtenida antes de los 10 días. El cuarto caso (724406), cuya muestra había sido obtenida a los 40 días, mostró índices bajos de IgM en DIA.PRO, MIKROGEN y WANTAI y PCR negativa y avidez alta de IgG, lo que sugiere una rápida negativización de VIRCELL por su menor sensibilidad.

MIKROGEN mostró total concordancia con DIA.PRO. WANTAI fue negativo en dos casos (624466 y 841689) cuyas muestras fueron obtenidas a los 8 y 5 días de evolución, respectivamente, y también habían sido negativas con VIRCELL.

Llama la atención el caso 624466. Era un paciente búlgaro procedente de Barbastro (Huesca) con antecedentes de hepatopatía alcohólica con fiebre, ictericia y artromialgias de 3 días de evolución. La muestra fue obtenida a los 8 días. Sus cifras de AST y ALT fueron 7690 y 5642 U/L. Presentaba hiperbilirrubinemia y tiempo de protrombina alterado. El paciente ingresó en UCI con encefalopatía y fue candidato a trasplante hepático. Tenía IgM positiva frente a VHA (10,08) y frente al antígeno VCA de VEB (8,13). La IgM frente VHE era positiva con DIA.PRO (índice 2,07) y con MIKROGEN (índice 30,4) y negativa con VIRCELL y WANTAI. La IgG frente a VHE era también positiva (índice 9,0) con alta avidez (79%). La PCR de VHE mostró una carga viral de 35088

copias/mL. La detección del virus en sangre nos indicó que el paciente padecía hepatitis aguda E, asociada a infección aguda por virus de la hepatitis A, con reactivación del VEB, pero caben otras interpretaciones a la vista de la repetida alta avidez (79%) de su IgG, como una reinfección (Bigaillon C *et al.*, 2010; Huang S *et al.*, 2010; Hyams C *et al.*, 2014). Es cierto que la probabilidad de coexistencia de hepatitis A y E es baja (Jang JH *et al.*, 2011), y que la necrosis celular grave asociada con la infección por VHA puede inducir una reacción autoinmune como anemia hemolítica o hepatitis autoinmune y aparición de IgM inespecífica anti-VHE (Kim HS *et al.*, 2011). La coinfección de VHE y VHA ha sido descrita previamente (Kumar A *et al.*, 2006), aunque con índices más elevados para IgM de VHA que para VHE (Rodríguez-Lay LA *et al.*, 2008; Mateos-Lindeman ML *et al.*, 2013), como en este paciente, pero nosotros no hemos encontrado ningún caso descrito de doble positividad confirmada de la PCR para VHA y VHE en la bibliografía publicada. En nuestro caso, la positividad de la PCR a VHE hace que nuestra primera opción en la interpretación de este perfil sea la antes mencionada.

Las técnicas de WANTAI y MIKROGEN utilizan, a su vez, antígenos codificados por la ORF2 de los genotipos 1 y 2 y antígenos utilizados por la ORF2 de los genotipos 1 y 3. Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2003) sugieren que los péptidos usados por WANTAI forman dímeros que tienen una reacción más fuerte con los sueros reactivos a VHE que los antígenos monoméricos usados en otros ensayos, lo que conferiría a WANTAI una mayor sensibilidad.

Al comparar las técnicas empleadas mediante el índice kappa en los 106 pacientes del grupo 2 y los 96 en los que se realizó la avidez IgG, la técnica que

mayor concordancia con la PCR mostró fue la avidez IgG. Entre los ensayos IgM, la mejor concordancia entre técnicas se encontró entre VIRCELL y WANTAI. Nuestros resultados de la comparación entre MIKROGEN Y WANTAI difieren de los descritos por Pas SD *et al.* (Pas SD *et al.*, 2013) en los que el índice kappa de 0,94 fue mayor que el obtenido por nosotros, de 0,74. Pas SD *et al.* (Pas SD *et al.*, 2013) realizaron la comparación sobre pacientes con PCR a VHE positiva, mientras que en nuestro estudio hemos contemplado los casos IgM positivos de pacientes con hepatitis E aguda y de pacientes con infección asintomática/anticuerpos residuales.

Los ensayos que determinan IgM pueden tener gran variabilidad en sensibilidad y especificidad (Khudyakov Y *et al.*, 2011; Jan JH *et al.*, 2011; Pas SD *et al.*, 2013), aspecto que se ha puesto de manifiesto también en nuestro estudio. Estos problemas también ocurren en la determinación de IgG (Wang Y *et al.*, 2016), pero no han sido objeto de este estudio.

Estas discrepancias pueden ser debidas a: secuencias genéticas que codifican distintos epítopos en cada cepa viral; diferencias en morfología y propiedades de los antígenos recombinantes producidos por los distintos sistemas de expresión; diferente capacidad de los fragmentos antigenicos para inducir anticuerpos; y al momento de aparición de los diferentes anticuerpos frente a los distintos antígenos. Esta lista puede no estar completa por lo que sería necesario estudiar si existen otros factores que influyen en la discrepancia entre los resultados de las distintas marcas comerciales.

Se ha comprobado (MA H *et al.*, 2009) que los polipéptidos codificados por el extremo N-terminal de la ORF3 y de la zona media de ORF2 fueron débilmente 146

o nada reactivos con la IgM, mientras que los de las restantes regiones de las ORF2 y ORF4 se mostraban reactivos. A la vez, las IgM anti-VHE contra antígenos codificados por los extremos N o C terminales de ORF2 aparecen más precozmente y desaparecen más rápidamente que los dirigidos contra polipéptidos codificados por la región C-terminal de la ORF3. Las reactividades de las ORF2 de los genotipos 1 y 4 fueron similares, mientras que fue diferente para ambos genotipos en el caso de la ORF3. Igualmente, Zhang *et al.* (Zhang JZ *et al.*, 2002) señalan que los anticuerpos frente al péptido pE2 (codificado por ORF2) son más precoces, mientras que los producidos frente al antígeno GL (mezcla de péptidos recombinantes codificados por ORF2 y ORF3) son más tardíos, pero más persistentes. Wang *et al.* (Wang *et al.* 2016) también demostraron que la detección de IgM es más temprana para ORF2 que para ORF3. En todo caso, existe reactividad cruzada entre los genotipos, lo que palía el problema del diferente diseño de las pruebas diagnósticas, en lo referente a tipo de antígeno utilizado (Norder H *et al.*, 2016). A pesar de existir varios genotipos del VHE, solo forman un serotipo (Pas SD *et al.*, 2013), sin embargo, esto ha sido cuestionado por Ma *et al.* (Ma H *et al.*, 2009), que señalaron que tras evaluar la actividad antigénica de ORF3 entre los diferentes genotipos, comprobaron que, si existía diferencia antigénica entre genotipos, sin que esto suceda con ORF2, pero el estudio se realizó en infección experimental, sin que haya sido posteriormente demostrado en humanos.

Por otra parte, el diseño de las pruebas comerciales analizadas es diferente. El diseño afecta a la presencia de falsos positivos por factor reumatoide en las técnicas de detección de IgM y de falsos negativos a IgM por exceso de IgG

específicas (Yu C *et al.*, 2010; Wang Y *et al.*, 2016). DIA.PRO minimiza estos problemas con un reactivo absorbente del factor reumatoide, que también reduce la concentración de IgG, mientras que VIRCELL y WANTAI los evitan al ser enzimoinmunoensayos de captura de IgM. MIKROGEN sería el equipo más expuesto a estas situaciones al tratarse de un EIA indirecto sin absorción del factor reumatoide.

Las infecciones por CMV o VEB también se han relacionado con resultados falsos positivos de VHE, ya que la afectación hepática es común en estas infecciones y la reactividad cruzada es un factor a tener en cuenta. Tanto CMV como VEB pueden estimular clones heterólogos de memoria de células B durante la mononucleosis infecciosa, y este mecanismo explicaría la inducción heteróloga de IgM anti-VHE de bajo nivel, en pacientes con IgG anti-VHE en suero (Fogeda M *et al.*, 2009; Hyams C *et al.*, 2014).

Por otra parte, la probabilidad de infectarse con el virus varía geográficamente. Por lo tanto, este es un factor a tener en cuenta a la hora de seleccionar los reactivos a utilizar, de forma que los reactivos con gran sensibilidad deberían usarse en zonas con alta prevalencia y los que tienen alta especificidad, en zonas con baja prevalencia (Wang Y *et al.*, 2016).

La inmunoensayo avaló los resultados de IgM de DIA.PRO y VIRCLIA en los cuatro pacientes con hepatitis aguda analizados. La inmunoensayo puede ser una prueba útil, en función de la especificidad descrita en la literatura, superior al EIA para infecciones por Flavivirus (Koraka P *et al.*, 2002) y de una persistencia de la IgM más corta (3 meses) (Legrand-Abravanel *et al.*, 2009).

En un pequeño grupo de pacientes con IgM Anti-VHA negativa (grupo 7), no se detectaron casos de IgM Anti-VHE, lo que sugiere que se han dejado de diagnosticar pocos casos de hepatitis E, ya que se tiene en cuenta la posibilidad de presencia de este virus en los casos con clínica hepática.

La IgM anti-VHE persistió de forma prolongada en la infección por VHE, especialmente en los pacientes con hepatitis aguda, independientemente de la marca del equipo utilizado, pero especialmente con el de DIA.PRO. En el caso de DIA.PRO persistió durante todo el periodo de observación que se prolongó hasta más de 2,5 años, fruto de la sensibilidad de esta marca, como ya hemos señalado anteriormente. En el estudio de Riveiro-Barciela *et al.* (Riveiro-Barciela M *et al.*, 2020) se detectó una persistencia de IgM anti-VHE del 80%-100% en el segundo año pasada la infección aguda y del 17%-42% pasados los 3 años, con WANTAI Y MIKROGEN, respectivamente. En el estudio de Myint *et al.* (Myint KS *et al.*, 2006) se observó persistencia de IgM superior a los 14 meses en el 25% de los casos con un inmunoensayo no comercial. También, Favorov *et al.* (Favorov MO *et al.*, 1992) describieron persistencias de IgM de más de 6 meses en pacientes con infección aguda y Lu *et al.* (Lu J *et al.*, 2020), superior a 10 meses con WANTAI. La persistencia de IgM que hemos detectado es la más alta de la literatura revisada. En los equipos utilizados por nosotros la persistencia de la IgM de hasta un máximo de: 940 días con DIA.PRO, 915 días con MIKROGEN, 395 con WANTAI y 202 con VIRCELL.

La gran persistencia de la IgM afecta al diagnóstico de hepatitis E aguda y explica el bajo VPP de la prueba por sí sola (Lu J *et al.*, 2020). Un resultado IgM positivo no significa necesariamente hepatitis E actual, pero un resultado negativo, la

descarta. Un ensayo que determine anti-IgM específica debe ser sensible, evitar falsos positivos, y ser capaz de distinguir entre infección reciente e infección pasada, evitando excesiva duración de la positividad de la IgM (Ma H *et al.*, 2009).

Por otra parte, la IgM también se detecta en casos de activación policlonal del sistema inmune por virus productores de clínica similar (Fogeda M *et al.*, 2009; Bigaillon C *et al.*, 2010; Hyams C *et al.*, 2014) y existen otras circunstancias productoras de falsos positivos a IgM, descritas por Landry *et al.* (Landry M *et al.*, 2016) como pueden ser enfermedades autoinmunes, baja probabilidad preprueba, reactivación subclínica de virus latentes, entre otras.

Estas circunstancias afectan al valor diagnóstico de esta prueba, pero es el marcador más útil (Huang S *et al.*, 2010; Alonso R *et al.*, 2015). La IgM detectada con el equipo de VIRCELL fue la que mejor se asoció con la infección aguda/reciente, avalando su mayor VPP. Liu *et al.* (Liu J *et al.*, 2020) con WANTAI confirman una persistencia prolongada de IgM, mayor a 10 meses, que le resta VPP, sugiriendo que la mitad de los casos con IgM Anti-VHE positivo no son infecciones actuales.

Un resultado IgM positivo no significa necesariamente infección actual, salvo índice alto y acompañado de gran elevación de ALT. IgM con índice bajo puede persistir más tiempo, pero no se debe realizar un diagnóstico de hepatitis E aguda con índices bajos y solo con IgM (Bendall R *et al.*, 2008).

Debido a la falta de especificidad que se ha observado en las pruebas de EIA, la confirmación del diagnóstico de hepatitis E aguda, fuera de las regiones de alta

endemia, requiere la confirmación del diagnóstico con otra prueba complementaria. En algunos trabajos se ha hablado de la necesidad de usar otras técnicas diagnósticas complementarias a la IgM, para reducir este problema, como puede ser la avidez IgG, la seroconversión de IgG específica, o algoritmos basados en utilización de antígeno y transaminasas. (Bigaillon C *et al.*, 2010; Hyams C *et al.*, 2014; Landry ML, 2016; Trémeaux P *et al.*, 2016; EASL 2018).

Algunos autores, como Landry ML., 2016 recomienda una variedad de estrategias para mejorar la exactitud de las pruebas que miden IgM para diagnóstico de cualquier tipo de enfermedad infecciosa reciente: valorar la intensidad de la respuesta de IgM e IgG (en general el índice de IgM debería ser mayor que el de IgG), analizar muestras seriadas para comprobar si los niveles de IgG se elevan, usar un método de captura de IgM, utilizar un punto de corte más alto, utilizar una prueba serológica más específica como inmunoblot, detectar el agente causal o sus antígenos, documentar una seroconversión a IgG y valorar otros hallazgos de laboratorio y el riesgo epidemiológico.

En el caso de IgG, los anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de ORF2 son de aparición temprana y larga persistencia. (Wang Y *et al.*, 2016). La IgG anti-VHE suele aparecer poco tiempo después de la IgM, ambas pueden detectarse en la fase aguda de la infección, la IgG puede persistir hasta 14 años (Khuroo MS *et al.*, 1993). La determinación simultánea de ambos marcadores, puede ayudar a distinguir entre posibles falsos positivos y verdaderos positivos. La seroconversión de IgG también podría ser útil para distinguir entre infección reciente o pasada, aunque requiere la toma de una nueva muestra, con el

consiguiente retraso en el diagnóstico. Para el ahorro de este tiempo, algunos autores (Zhang JZ *et al.*, 2002; Bigaillon C *et al.*, 2010; Hyams C *et al.*, 2014), han recalado la utilidad de la avidez de la IgG.

Hemos puesto a punto una técnica para medir la avidez de la IgG, procedimiento que se ha mostrado útil en el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas: *Toxoplasma* (Rahbari AH *et al.*, 2012), CMV (Baccard-Longere M *et al.*, 2001; Delforge ML *et al.*, 2019), mujeres embarazadas con IgM anti-CMV (Prince HE *et al.*, 2014), infecciones por VEB con presencia de IgG anti-EBNA-1 de difícil interpretación (Just-Nübling G *et al.*, 2003), rubéola (Hofmann J *et al.*, 2005), hepatitis A (Roque-Afonso AM *et al.*, 2004) y virus West Nile (Fox JL *et al.*, 2006). Se basa en la constatación de que al principio de la respuesta inmune las IgG pueden separarse fácilmente del antígeno por la actuación de diversos agentes disociantes, como la urea (Bigaillon C *et al.*, 2010), el tiocianato de amonio (Otero AJ., 2010) o el cloruro de guanidinio (Taylor DW *et al.*, 2020). Esto cambia a los pocos meses de iniciada la respuesta inmune, por lo que sería posible distinguir anticuerpos IgG formados recientemente de anticuerpos IgG formados mucho tiempo antes y, por lo tanto, no relacionados con la infección actual.

La baja avidez de IgG presentó buena concordancia con la PCR y se asoció con la infección aguda en nuestros pacientes y pasó a alta avidez durante el seguimiento en todos los pacientes en los que la segunda muestra fue obtenida después de los 60 días de evolución (Mendoza C *et al.*, 2019).

Hemos detectado dos pacientes clasificados como hepatitis aguda, con alta avidez. Uno de ellos, 724406, con 40 días de evolución, presentó IgM discordantes con índices bajos, PCR negativa y antecedente de transaminasas 152

superiores a 1000, 15 días antes. La tardía toma de la muestra podría explicar este perfil, aunque tal vez pudiera corresponder a una reinfección con PCR ya negativa.

El otro paciente, 624466 presentó IgM discordantes de las distintas marcas comerciales con índices bajos y ARN detectable en suero, pudiendo tratarse de una reinfección. En la literatura se define una reinfección cuando existe avidez alta, ARN detectable e índices bajos o negativos de IgM (Bendall R *et al.*, 2008; Bigaillon C *et al.*, 2010; Hyams C *et al.*, 2014; Baylis SA *et al.*, 2015).

En un estudio en el que se reinfecaron macacos con VHE, se concluyó que tener anticuerpos específicos con IgG de alta avidez son factores importantes para la protección contra la reinfección. Se comprobó que la avidez de IgG decrece con el tiempo después de la primera infección y esto los hace más susceptibles a la reinfección. Ninguno de los macacos reinfestados tuvo respuesta IgM o elevación de ALT (Choi Y *et al.*, 2019).

En las muestras de dos pacientes con infección asintomática/anticuerpos residuales (627851 y 818447) se detectó baja avidez. Sus PCR fueron negativas y los índices de IgM bajos o negativos y discrepantes entre las distintas técnicas. Los índices de IgG de CLIA también fueron bajos. No dispusimos de datos clínicos de estos pacientes, pero estos resultados podrían explicarse por presencia de factor reumatoide o por reactivación policlonal (el paciente 627851 tenía IgM anti-VEB y anti-CMV y ambos tenían IgM anti-VHE negativa con la técnica de captura M de WANTAI y VIRCELL), como sugieren algunos autores (Bigaillon C *et al.*, 2010; Landry ML, 2016) para explicar presencias inesperadas

de IgM. No obstante, la baja avidez apunta a una infección IgG de menos de 6 meses de evolución, como indica la literatura. (Bigaillon C *et al.*, 2010) con persistencia prolongada de IgM.

En un estudio se utilizó una clasificación similar a la de este trabajo, y se separaron los pacientes en aguda, intermedia y convaleciente según el tiempo de evolución. Con algunas excepciones, la avidez fue baja en los agudos y alta en los convalecientes (Bendall R *et al.*, 2008). En otro estudio, (Shata MT *et al.*, 2012), se realizó avidez IgG a un grupo de pacientes con infección por VHE sintomáticos y a un grupo de pacientes asintomáticos y se comprobó que la avidez aumentaba con el tiempo considerablemente en el primer grupo y no en el segundo, al igual que lo sucedido en este estudio. Se trata de un procedimiento muy útil como apoyo diagnóstico basado en la determinación de la IgM. La avidez puede ser un marcador muy útil en aquellos laboratorios que no disponen de PCR a VHE.

Algunos autores han señalado la importancia de la avidez IgG en el diagnóstico de la VHE, especialmente en casos de infección pasada con IgM positiva o activación policlonal (Zhang *et al.*, 2002; Bendall R *et al.*, 2008; Bigaillon C *et al.*, 2009; Huang S *et al.*, 2010; Landry ML, 2016). La avidez ha diferenciado bien las hepatitis agudas, tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos, aunque en estos últimos la maduración de la avidez puede tardar más que en los primeros (Renou C *et al.*, 2010; Sellier P *et al.*, 2011). También puede ser útil junto con IgM para diagnosticar infecciones subclínicas durante brotes de VHE en países de alta incidencia como India (Majumdar M *et al.*, 2015).

No obstante, los resultados de avidez intermedia pueden suponer un problema, por lo que puede estar indicado repetir la prueba pasados unos días en una nueva muestra (Bigaillon C *et al.*, 2010).

La detección de virus en sangre o heces es posible desde los pocos días a las pocas semanas durante la fase aguda (Lin CC *et al.*, 2000; Aggarwal R *et al.*, 2000). La carga viral suele oscilar entre $2,0 \times 10^3$ a $1,7 \times 10^7$ copias/mL (Takahashi M *et al.*, 2007), pero puede ser intermitente (Zhang JZ *et al.*, 2002).

El ARN de VHE puede ser detectado en sueros de donantes de sangre con Anti-VHE IgM como único marcador, con IgG como único marcador, con ambos marcadores positivos o sin anticuerpos (Norder H *et al.*, 2016). Esta falta de anticuerpos en PCR positivos en pacientes inmunocompetentes podría explicarse por tratarse de infecciones muy precoces. Pese a todo, y en opinión de estos autores, la PCR es un buen complemento en el diagnóstico de la hepatitis E.

En nuestro estudio, la PCR se ha mostrado como un marcador de infección reciente, ya que solo fue positiva en la fase aguda de la enfermedad, con una excepción en una muestra de seguimiento, obtenida a los 50 días. Todas las muestras obtenidas más tarde de esta fecha fueron PCR negativas. La persistencia de la PCR positiva es corta, al menos en los casos sin cronicidad, lo que confirma los datos referidos en la bibliografía publicada (Norder H *et al.*, 2016). Solo un caso (624466), que se describe más adelante, presentó PCR positiva con IgM negativa en VIRCELL y WANTAI, reflejo de la menor

sensibilidad de estas pruebas para la detección de IgM. No obstante, los índices de DIA.PRO y MIKROGEN fueron bajos.

La detección de ARN del VHE mediante PCR, pese a no estar estandarizada (Baylis SA *et al.*, 2011), es el método de referencia, ya que, además, puede aportar información muy valiosa como conocer el genotipo mediante secuenciación, confirmar los resultados serológicos y monitorizar el tratamiento.

El periodo de viremia es corto, ya que suele producirse durante el periodo de incubación y al inicio de la fase aguda, negativizando poco después del comienzo de síntomas, siendo detectable durante 3 semanas desde la infección, por tanto, un resultado negativo en un paciente sintomático no excluye la infección. (Pan JS *et al.*, 2010; Khudyakov Y *et al.*, 2011).

La PCR negativa en casos IgM DIA.PRO positivos se ha dado en 7 muestras de pacientes con infección aguda, de las que 5 fueron obtenidas entre los 23 y 43 días de evolución, en una no se pudo precisar la fecha de obtención y en otra, que había sido obtenida a los 5 días. A veces, el paciente especifica mal los días de evolución y esta puede ser una explicación a la PCR negativa en fecha tan temprana. Alternativamente podría tratarse de un caso de negativización precoz de la PCR, que también ha sido descrita por otros autores (Huang S *et al.*, 2010).

Aunque no es objeto de este trabajo, el antígeno VHE puede ser una opción en los laboratorios que no disponen de biología molecular, con la limitación de su menor sensibilidad, alrededor del 65% (Trémeaux P *et al.*, 2016; Riveiro-Barciela M *et al.*, 2020; Liu J *et al.*, 2020; Pankovics P *et al.*, 2020), especialmente cuando

la carga viral es baja o la IgG anti-VHE está presente, al competir con la IgG policlonal que incorpora para capturar el antígeno de VHE (Lu J *et al.*, 2020).

Una combinación de pruebas (PCR, IgM, avidez de IgG y elevación del nivel de IgG en dos muestras), probablemente sea una estrategia más adecuada para un diagnóstico más exacto, como también han señalado algunos autores (Huang S *et al.*, 2020; Lu J *et al.*, 2020), ya que todas las pruebas son susceptibles de proporcionar resultados falsos positivos o negativos.

La amplificación de ácidos nucleicos presenta la ventaja de poder realizar posteriormente secuenciación, para conocer los genotipos circulantes, estudiar posibles brotes, reconocer genotipos asociados a enfermedad crónica o extrahepática y monitorizar el tratamiento.

Las variantes del VHE genotipo 3 se pueden dividir consistentemente en tres clados: 3abchij (incluidos los subtipos 3a, 3b, 3c, 3h, 3i, 3j y cuatro variantes no clasificadas), 3efg (incluidos los subtipos 3e, 3f, 3g y cinco variantes no clasificadas) y 3ra (Smith DB *et al.*, 2015). El subgenotipo 3ra, aislado en conejos y humanos, es filogenéticamente distinto al resto y consta de una región hipervariable en ORF1. Algunos autores lo clasifican como un genotipo distinto (Izopet J *et al.*, 2012; Smith DB *et al.*, 2015).

El subgenotipo 3f es el que circula mayoritariamente en Europa y especialmente en Francia y España. Este subtipo circula entre el ganado porcino y algunos mamíferos salvajes, y se transmiten a humanos por contacto directo con los reservorios o alimentos contaminados (Lu L *et al.*, 2006; Blasco-Perrin H *et al.*,

2015; Mateos-Lindemann ML *et al.*, 2017; Ripellino P *et al.*, 2018). La mayoría (88,8%) de las secuencias de este estudio pertenecieron a este subgenotipo.

Respecto a los otros subtipos encontrados en este trabajo, Avellón *et al.* (Avellón A *et al.*, 2018) describieron la similitud de la secuencia KU513561 descrita en España a la secuencia KU176130 descrita en Francia, sugiriendo la posibilidad de un nuevo subgenotipo. En este sentido, Smith *et al.* (Smith DB *et al.*, 2020) propusieron un nuevo subtipo 3chi compuesto por 4 secuencias (MF444089, KU176130, KU513561 y MF444030) divididas en dos grupos, las tres primeras relacionadas entre ellas y la MF444030 más distante. Y proponen que este nuevo subtipo se llame 3m, siguiendo los anteriores consensos de nombres, siendo KU513561 la secuencia de referencia por ser la primera notificada.

Por tanto, las secuencias pertenecientes a los pacientes 710291 y 719906, al ser similares a KU513561 y a KU176130, pertenecerían al nuevo subtipo 3m, descrito en Francia y España (Avellón A *et al.*, 2018; Nicot F *et al.*, 2018). Además, la secuencia del paciente 710291 resultó ser muy similar a MH891834, reportada en España en jabalí (Caballero-Gómez J *et al.*, 2019). El genotipo 3m podría tratarse de un subgenotipo zoonótico emergente en Europa.

La secuencia del paciente 416208, también se distanció del resto, y presentó homología con MF444043 (Nicot F *et al.*, 2018). En el análisis filogenético se detecta proximidad a secuencias del subtipo 3c, que han sido descritos mayoritariamente en Alemania, Holanda e Inglaterra, en humanos, cerdos y jabalíes (Vina-Rodríguez A *et al.*, 2015).

En un estudio realizado en Francia, (Nicot F *et al.*, 2018), la distribución por genotipos fue la siguiente 3f (66%), 3c (16%), 3h (6%), 3e (3%), observándose un claro aumento de subtipo 3c en Europa. En nuestro estudio se cumple esta proporción para el subtipo 3f, ya que la gran parte de los amplicones, 24, pertenecían al subtipo 3f (88,88%), mientras que 2 pertenecieron al subtipo 3m (7,40%) y una secuencia al 3c (3,70%).

También se ha estudiado si existía diferencia de patogenicidad entre los subtipos de genotipo 3 entre diferentes grupos de población, pero se concluyó que las diferencias en la clínica se debían a la susceptibilidad del hospedador o a la respuesta a la infección, más que a las diferencias entre variantes. (Smith DB *et al.*, 2015). Estos datos cuadran con nuestro hallazgo de dos variantes distintas de VHE subtipo 3f capaces de causar SPT.

Hemos descrito dos nuevos casos de SPT en España asociados a infección autóctona por VHE en dos pacientes inmunocompetentes no relacionados que vivían en una localidad cercana a Zaragoza. El SPT asociado a VHE es una situación poco frecuente. Los casos diagnosticados hasta 2020 están recogidos en nuestra revisión (Anexo II) a propósito del síndrome (Mendoza C *et al.*, 2020).

Resumimos los datos clínicos encontrados en la revisión que realizamos de los trabajos publicados de SPT asociado a infección por el VHE (Mendoza C *et al.*, 2020). Encontramos que un 79,68% de los casos se han dado en hombres, con una edad media de $45,55 \pm 9,68$. La media de AST fue de $398,91 \pm 348,92$ y la media de ALT fue de $1121 \pm 828,18$. Un 11,29% de los pacientes tuvieron valores de ALT ligeramente elevados, por debajo de 100 UI/mL. Un 77,41% tuvieron

afectación bilateral, se utilizó como tratamiento ribavirina en el 9,67% de los casos, y esteroides en el 20,96%, la recuperación no fue completa en el 82,25% de los casos. El país que más casos ha reportado hasta la fecha es Francia con 23, seguido de Inglaterra 10, Suiza 9 y España 6.

Nuestros dos casos, de acuerdo con la bibliografía revisada reflejan el primer diagnóstico de esta enfermedad en un corto periodo de tiempo en la misma localidad.

Nuestros dos pacientes reúnen los principales criterios de diagnóstico de SPT, dolor intenso en el hombro resistente a los analgésicos, comienzo brusco y neuropatía multifocal sensitiva y/o motora (Briceño F *et al.*, 2010; Van Eijk JJ *et al.*, 2016). Nuestro diagnóstico de SPT se basó en los hallazgos clínicos reforzados por el estudio electrofisiológico. Ambos casos presentaron afectación bilateral y asimétrica de ambos brazos y parestesia. Sin embargo, solo el paciente 1 mostró debilidad en la extremidad superior derecha. Ninguno tuvo ictericia, pero el paciente 2 tuvo elevación de los niveles de ALT. Ambos pacientes presentaron paresia residual y dolor tres meses después del alta. En este sentido, Scavvion *et al.* (Scavvion Q *et al.*, 2017) describieron un fenotipo particular de SPT con las siguientes características: prevalente en hombres $46 \pm 9,8$ años, afectación bilateral y asimétrica, frecuente afectación del nervio frénico y lenta mejoría clínica. Las características clínicas descritas se cumplen en el caso 1, pero no en el caso 2, que era una mujer sin afectación del nervio frénico. El estudio genético del virus de estos pacientes mostró que la infección estaba causada por el genotipo 3f, el más prevalente en Europa (Ripellino P *et al.*, 2018; Blasco-Perrin H *et al.*, 2015; Lu L *et al.*, 2006). En los casos de pacientes

con SPT descritos en la literatura en los que se pudo secuenciar el virus todos pertenecían a genotipo 3 (Rianthavorn P *et al.*, 2010; Mendoza C *et al.*, 2020).

Resulta sorprendente que los dos casos fueron diagnosticados en un transcurso de tiempo muy corto, mayo de 2018, y ambos pacientes vivían en el mismo pueblo, Monzalbarba (pueblo de 2000 habitantes, aproximadamente, cercano a Zaragoza), pero no tenían relación personal o familiar. Los dos pacientes consumían vegetales cultivados en huertos locales, regados con agua de la misma acequia, procedente del río Jalón, lo cual podría considerarse un factor de riesgo para VHE. Otros autores han concluido que el consumo de frutas sin pelar o vegetales crudos son factores de riesgo para VHE, probablemente por exposición a agua contaminada o estiércol de cerdos (Abravanel F *et al.*, 2018; Slot E *et al.*, 2017). Por lo tanto, los datos de ambos casos del momento de diagnóstico (mayo de 2018), localización (Monzalbarba) y epidemiológicos (vegetales locales) coincidentes en pacientes de distinta familia sugerirían que las dos cepas de VHE causales fueran la misma. No obstante, el análisis filogenético de las dos cepas mostró que tenían secuencias diferentes. Esto implica la circulación simultánea de al menos dos cepas diferentes en la misma área geográfica. El escenario conjunto apunta a que el VHE, asociado a otros factores, puede desencadenar la aparición de SPT (Van Eijk JJJ *et al.*, 2014). Ambos pacientes tuvieron altos índices de IgM, por dos técnicas distintas, y de IgG pero con baja avidez. Estos resultados son compatibles con hepatitis aguda E reciente y replicación viral. Esta interpretación fue confirmada por un resultado positivo de PCR en sangre y por los resultados serológicos de una segunda muestra de suero. Los datos antes mencionados son compatibles con que la

neuropatía fue desencadenada por VHE, dado que se descartaron otras infecciones y otras enfermedades autoinmunes.

El diagnóstico de VHE pudo haber pasado desapercibido ya que los síntomas estuvieron ausentes y las alteraciones bioquímicas fueron mínimas en el paciente 1 y la paciente 2 había sido diagnosticada inicialmente de hepatitis medicamentosa, lo cual es frecuente en pacientes con hepatitis E (Dalton HR *et al.*, 2007; Davern TJ *et al.*, 2011). La ausencia de ictericia en ambos pacientes, las diferencias en las manifestaciones clínicas generales y la levedad de las alteraciones bioquímicas en el caso 1 no apuntaban a hepatitis E. La sospecha de infección por VHE se produjo cuando aparecieron síntomas compatibles con SPT, tras los que se realizaron los correspondientes estudios microbiológicos. Finalmente, ambos pacientes fueron dados de alta con tratamiento sintomático pero sus síntomas persistieron durante un largo periodo de tiempo, a pesar del tratamiento con esteroides e inmunomoduladores, como previamente había sido señalado por algunos autores (Van Eijk JJJ *et al.*, 2009 y 2016). Los pacientes no recibieron antivirales, puesto que se necesita mayor experiencia sobre la eficacia del tratamiento con rivabirina (Scanvion Q *et al.*, 2017).

Por lo tanto, es evidente que es necesaria la realización de pruebas microbiológicas para VHE en los pacientes diagnosticados de lesiones neurológica no traumáticas, incluso en ausencia de citolisis y que se requieren investigaciones prospectivas para determinar el tratamiento más adecuado (Rodríguez-Castro E *et al.*, 2018).

La determinación de IgM es una prueba habitual en el diagnóstico de la hepatitis E, pero deber tenerse en cuenta que un resultado positivo no significa necesariamente infección activa, aunque un resultado negativo virtualmente la descarta.

El diagnóstico de la hepatitis E es todavía un reto, entre otras cosas por la falta de estandarización de las pruebas comerciales. Por este motivo es necesario conocer el rendimiento de las mismas y sus ventajas y limitaciones de cara a una correcta interpretación de los resultados.

6. CONCLUSIONES

1. El VHE circula en nuestro medio, especialmente en determinadas comarcas de Aragón, con una prevalencia reseñable a la descrita hasta ahora en España por lo que es necesario pensar en el VHE ante una elevación de ALT.
2. Se aprecia un aumento en los diagnósticos de hepatitis aguda en los años analizados, como consecuencia de la implementación de pruebas adecuadas y un mayor índice de sospecha.
3. Las pruebas diagnósticas analizadas de infección por el virus de la hepatitis E tienen virtudes y defectos. Es necesario conocer las características de las pruebas diagnósticas comerciales, para una correcta interpretación de sus resultados.
4. La persistencia de anticuerpos IgM puede ser prolongada, lo que dificulta la interpretación de la serología.
5. La avidez de IgG ha mostrado ser un marcador eficaz en la diferenciación de infección actual o pasada.

6. La técnica de PCR es útil en el diagnóstico, en el seguimiento y para disponer de amplicones para estudios genéticos (secuenciación y tipado) y epidemiológicos.

7. En infecciones por VHE, con largo periodo de incubación y con alto porcentaje de casos asintomáticos, es necesaria la asociación de varios tipos de pruebas microbiológicas y bioquímicas para una adecuada interpretación y un diagnóstico más preciso.

8. El genotipo 3f es el más habitual en nuestro medio, pero también circulan otros genotipos como el 3m y el 3c.

9. El VHE genotipo 3f puede ser un desencadenante del síndrome de Parsonage-Turner.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, Dubois M, Mansuy JM, Izopet J. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 897-902. doi: 10.1128/JCM.05942-11
- Abravanel F, Chapuy-Regaud S, L'homme S, Miedouge M, Peron JM, Alric L, Rostaing L, Kamar N, Izopet J. Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. *J Clin Virol.* 2013; 58: 624-628. doi: 10.1016/j.jcv.2013.10.003
- Abravanel F, Chapuy-Regaud S, L'homme S, Peron JM, Alric L, Rostaing L, Kamar N, Izopet J. Performance of two commercial assays for detecting hepatitis E virus RNA in acute or chronic infections. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 1913-1916. doi: 10.1128/JCM.00661-13
- Abravanel F, Pique J, Couturier E, Nicot F, Dimeglio C, Lhomme S, Chiabrandi J, Saune K, Péron JM, Kamar N, Evrard S, de Valk H, Cintas P, Izopet J. Acute hepatitis E in French patients and neurological manifestations. *J Infect.* 2018; 77: 220-226. doi: 10.1016/j.jinf.2018.06.007

- Aggarwal R, Krawczynsky K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15: 9-20. doi: 10.1046/j.1440-1746.2000.02006.x
- Aggarwal R, Kini D, Sofat S, Naik SR, Krawczynski K. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet.* 2000, 356: 1081-1082. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02737-9
- Aggarwal R, Kamili S, Spelbring J, Krawczynski K. Experimental studies on subclinical hepatitis E virus infection in *Cynomolgus* macaques. *J Infect Dis.* 2001; 184: 1380-1385. doi: 10.1086/324376
- Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24: 1484-1493. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05933.x
- Aggarwal R. Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res.* 2011; 161: 15–22. doi: 10.1016/j.virusres.2011.03.017
- Aggarwal RA. Hepatitis E: Clinical presentation in disease-endemic areas and diagnosis. *Sem Liver Dis.* 2013; 33: 30-40. doi: 10.1055/s-0033-1338112
- Ahmed A, Ali IA, Ghazal H, Fazili J, Nusrat S. Mystery of hepatitis E virus: recent advances in its diagnosis and management. *Int J Hepatol.* 2015; 872431. doi: 10.1155/2015/872431
- Alonso R, Aguilera A, Córdoba J, Fuertes A. Diagnóstico microbiológico de las hepatitis virales. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2015;33(9): e53-62. doi: 10.1016/j.eimc.2014.08.002
- Altuna Azkargorta M, Torné Hernández L, Aznar Gómez P, Ibíricu Yanguas MA, Ducouret A. Infección por virus de la hepatitis E como factor desencadenante del síndrome de Parsonage-Turner. *Rev Neurol.* 2016; 62(12): 572. doi:10.33588/rn.6212.2016106

- Anderson DA, Li F, Riddell M, Howard T, Seow HF, Torresi J, Perry G, Sumarsidi D, Shrestha SM, Shrestha IL. 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: 131-142. doi: 10.1016/s0166-0934(99)00069-5
- Arankalle VA, Chobe LP. Hepatitis E virus: can it be transmitted parenterally? *J Viral Hepat*. 1999; 6: 161-164. doi: 10.1046/j.1365-2893.1999.00141.x
- Arányi Z, Szpisjak L, Szőke K. Multiphasic presentation of neuralgic amyotrophy associated with hepatitis E virus infection. *Muscle Nerve*. 2020; 61: 95-115. doi:10.1002/mus.26722
- Aspinall EJ, Couturier E, Faber M, Said B, Ijaz S, Tavoschi L, Takkinen J, Adlhoch C; country experts. 2017. Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Euro Surveill*. 2017; 29: 22: pii: 30561. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.26.30561
- Avellón A, Morago L, Garcia-Galera MC, Muñoz M, Echevarría JM. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J Med Virol*. 2015; 87: 1934-1939. doi: 10.1002/jmv.24251
- Avellón A, Muñoz-Chimeno M, Arroyo S, Morago L, Molina AA. New proposed HEV-3 sub-genotype related to acute hepatitis in Spain. HEV2018, hepatitis E workshop. Madrid, 4-5 de junio de 2018. Comunicación oral.
- Avila JD, Lacomis D, Lam EM. Neuralgic Amyotrophy Associated with Hepatitis e Virus Infection: First Case in the United States. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2016; 18(2): 96-100. doi:10.1097/CND.0000000000000137
- Baccard-Longere M, Freymuth F, Cointe D, Seigneurin JM, Grangeot-Keros L. Multicenter evaluation of a rapid and convenient method for determination of

cytomegalovirus immunoglobulin G avidity. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8: 429-431. doi: 10.1128/CDLI.8.2.429-431.2001

- Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 1983; 20: 23-31. doi: 10.1159/000149370

- Balayan MS. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepatol.* 1997; 4: 155-165. doi: 10.1046/j.1365-2893.1997.00145.x

- Baylis SA, Hanschmann K-M, Blümel J, Nübling CM on behalf of the HEV Collaborative Study Group. Standardization of Hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol.* 2011; 9: 1234-1239. doi:10.1128/JCM.02578-10

- Baylis SA, Gartner T, Nick S, Ovemyr J, Blumel J. Occurrence of hepatitis E virus RNA in plasma donations from Sweden, Germany and the United States. *Vox Sang.* 2012; 103: 89-90. doi: 10.1111/j.1423-0410.2011.01583.x

- Belabbes EH, Bougeurmouh A, Benatallah A, Illoul G. Epidemic non-A, non-B viral hepatitis in Algeria: strong evidence for its spreading by water. *J Med Virol.* 1985; 16: 257-263. doi: 10.1002/jmv.1890160306

- Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Thurairajah P, Dalton HR. Serological response to hepatitis E virus genotype 3 infection: IgG quantitation, avidity, and IgM response. *J Med Virol.* 2008; 80, 95-101. doi: 10.1002/jmv.21033

- Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence

- data in developed countries. *J Med Virol.* 2010; 82: 799-805. doi: 10.1002/jmv.21656
- Benito R, Bueno J, Cebollada R, Algarate A. Infecciones por virus de la hepatitis E en Zaragoza, España (2011-2015). *Med Clin (Barc).* 2016; 146: 512-514. doi: 10.1016/j.medcli.2015.11.019
- Bigaillon C, Tessé S, Lagathu G, Nicand E. Use of hepatitis E IgG avidity for diagnosis of hepatitis E infection. *J Virol Methods.* 2010; 164: 127-130. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.11.028
- Bisciglia M, Van den Bergh P, Duprez T, Kabamba BM, Ivanoiu A. Neuralgic amyotrophy associated with hepatitis E virus (HEV) infection: a case report. *Acta Neurol Belg.* 2017; 117(2): 555-557. doi:10.1007/s13760-016-0642-1
- Blasco-Perrin H, Cintas P, Abravanel F, Gérolami R, D'Alteroche L, Raynal JN, Alric L, Dupuis E, Prudhomme L, Vaucher E, Couzigou P, Liversain JM, Buscaill L, Bureau C, Vinel JP, Kamar N, Izopet J, Peron JM. Neurologic disorders in immunocompetent patients with autochthonous acute hepatitis E. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21: 1928-1934. doi.org/10.3201/eid2111.141789
- Bradley DW, Andjaparidze A, Cook EH, McCaustland KA, Balayan M, Steler H, Velázquez O, Robertson B, Humphrey C, Kane M, Weisfuse I. Aetiological agent of enterically transmitted non-A non-B hepatitis. *J Gen Virol.* 1988; 69: 731-738. doi: 10.1099/0022-1317-69-3-731
- Brazilai A, Schulman S, Karetnyi YV, Favorov MO, Levin E, Mendelson PW, Weiss P, Fields HA, Varon D, Martinowitz U. Hepatitis E virus infection in hemophiliacs. *J Med Virol.* 1995; 45: 153-156. doi: 10.1002/jmv.1890460213

- Briceño S, Rodriguez Montero SA. Síndrome de Parsonage-Turner. Revisión bibliográfica. *Semin Fund Esp Reumatol.* 2010; 11: 144-151. doi: 10.1016/j.semreu.2010.05.002
- Bueno J, Cebollada R, Algarate S, Arribas J, Belles A, Benito R. Infecciones por VHE en Zaragoza (2011-2014). XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Sevilla, 28-30 de mayo de 2015. Comunicación Póster 760.
- Buti M, Domínguez A, Plans P, Jardí R, Schaper M, Espuñes J, Cardeñosa N, Rodríguez-Frías F, Esteban R, Plasència A, Salleras L. Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin Vac Immunol.* 2006; 13: 1328-1332. doi: 10.1128/CVI.00255-06
- Buti M, Dominguez A, Plans P, Jardí R, Rodriguez-Frias F, Gironés R, Esteban R, Salleras L, Plasencia A. Infrequent detection of hepatitis E virus RNA in pregnant women with hepatitis E virus antibodies in Spain. *Liver Int.* 2010; 30: 1549-1551. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02304.x
- Caballero-Gómez J, Jiménez-Ruiz S, Lopez-Lopez P, Vicente J, Risalde MA, Cano-Terriza D, Frias M, Barasona JA, Rivero A, García-Bocanegra I, Rivero-Juarez A. Emergent subtype of hepatitis E virus genotype 3 in wild boar in Spain. *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66: 1803-1808. doi: 10.1111/tbed.13251
- Carli P, Landais C, Poisnel E, Cournac JM, Aletti M, Paris JF, Martinez V. Le syndrome d'Aesculape. *Rev Med Interne.* 2012; 33(2): 111-114. doi:10.1016/j.revmed.2011.11.004
- CDC (Center for Diseases Control). Hepatitis E questions and answers for health professionals. Disponible y consultado en 2020 en <https://www.cdc.gov/hepatitis/hev/hevfaq.htm>

- Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jaqmeel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci*. 2008; 33: 451-464. doi: 10.1007/s12038-008-0064-1
- Chauhan A, Jameel S, Dilawari JB, Chawla YK, Kaur U, Ganguly NK. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet*. 1993; 341: 149-150. doi: 10.1016/0140-6736(93)90008-5
- Cheung MCM, Maguire J, Carey I, Wenden J, Agarwal K. Review of the neurological manifestations of hepatitis E infection. *Ann Hepatol*. 2012; 11: 618-622. doi: 10.1016/S1665-2681(19)31434-31436
- Choi Y, Zhang X, Skinner B. Analysis of IgG Anti-HEV Antibody Protective Levels During Hepatitis E Virus Reinfection in Experimentally Infected Rhesus Macaques. *J Infect Dis*. 2019; 219: 916-924. doi: 10.1093/infdis/jiy603
- Clemente-Casares P, Ramos-Romero C, Ramírez-González E, Mas A. Hepatitis E virus in industrialized countries: The silent threat. *Biomed Res Int*. 2016; 9838041. doi: 10.1155/2016/9838041.
- Coursaget P, Buisson Y, Depril N, le Cann P, Chabaud M, Molinie C, Roue R. Mapping of linear B cell epitopes on open reading frames 2- and 3-encoded proteins of hepatitis E virus using synthetic peptides. *FEMS Microbiol Lett*. 1993; 109: 251-256. doi: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06176.x
- Colson P, Raoult D. Autochthonous hepatitis E: a common and fatal but neglecting emerging disease in France. *Clin Microbiol Infect*. 2017; 23: 898-899. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.027
- Dalton HR, Fellows HJ, Stableforth W, Joseph M, Thurairajah PH, Warshaw U, Hazeldine S, Remnarace R, Ijaz S, Hussaini SH, Bendall RP. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 2: 1429-1435. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03504.x

...

- Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8: 698-709. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70255-X
- Dalton HR, Van Eijk JJJ, Cintas P, Madden RG, Jones C, Webb GW, Norton B, Pique J, Lutgens S, Devooght-Johnson N, Woolson K, Baker J, Saunders M, Househam L, Griffiths J, Abravanel F, Izopet J, Kamar N, van Alfen N, van Engelen BGM, Hunter JG, van der Eijk AA, Bendall RP, Mclean BN, Jacobs BC. Hepatitis E virus infection and acute non-traumatic neurological injury: A prospective multicentre study. *J Hepatol.* 2017; 67: 925-932. doi: 10.1016/j.jhep.2017.07.010
- Darvetel A, Colombe B, Bosseray A, Larrat S, Sarrot-Reynauld F, Belbezier A, Lagrange E, Bouillet L. Hepatitis E and neuralgic amyotrophy: Five cases and review of literature. *J Clin Virol.* 2015; 69: 156-164. doi:10.1016/j.jcv.2015.06.091
- Davern TJ, Chalasani N, Fontana RJ, Hayashi PH, Protiva P, Kleiner DE, Engle RE, Nguyen H, Emerson SU, Purcell RH, Tillmann HL, Gu J, Serrano J, Hoofnagle JH. Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology.* 2011; 141: 1665-1672. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.051
- Décard BF, Grimm A, Andelova M, Deman A, Banderet B, Garcia M, Fuhr P. Hepatitis-E virus associated neuralgic amyotrophy with sustained plexus brachialis swelling visualized by high-resolution ultrasound. *J Neurol Sci.* 2015; 351(1-2): 208-210. doi:10.1016/j.jns.2015.03.003
- Delforge ML, Eykmans J, Steensels D, Costa E, Donner C, Montesinos I. Combination of line immunoassays Mikrogen recomLine CMV IgG and recomLine CMV IgG avidity helps to date the onset of CMV primary infection.

- Diagn Microbiol Infect Dis. 2019; 93: 208-212. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.013
- Deroux A, Brion JP, Hyerle L, Belbezier A, Vaillant M, Mosnier E, Larrat S, Morand P, Pavese P. Association between hepatitis E and neurological disorders: Two case studies and literature review. *J Clin Virol.* 2014; 60(1): 60-62. doi:10.1016/j.jcv.2014.01.026
- Diebold M, Fischer-Barnicol B, Tsagkas C, Kuhle J, Kappos L, Derfuss T, Décard BF. Hepatitis E virus infections in patients with MS on oral disease-modifying treatment. *Neurol-Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2019; 6(5): e594. doi:10.1212/nxi.0000000000000594
- Dienstag JL, Isselbacher KJ. Acute hepatitis. En: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS and Kasper DL (eds.). *Harrison's Principles of Internal Medicine.* New York: McGraw-Hill Inc. 1994; 266: 1471-1472.
- Drave SA, Debing Y, Walter S, Todt D, Engelmann M, Friesland M, Wedemeyer H, Neyts J, Behrendt P, Steinmann E. 2016. Extra-hepatic replication and infection of hepatitis E virus in neuronal-derived cells. *J Viral Hepat.* 23: 512-521. doi: 10.1111/jvh.12515
- Drobeniuc J, Meng J, Reuter G, Greene-Montfort T, Khudyakova N, Dimitrova Z, Kamili S, Teo CG. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: Pangenotypic evaluation of performances. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: e24-e27. doi: 10.1086/654801
- Echevarría JM, Fogeda M, Avellón A. Diagnosis of acute hepatitis E by antibody and molecular testing: a study on 277 suspected cases. *J Clin Virol.* 2011; 50: 69-71. doi: 10.1016/j.jcv.2010.09.016

- Echevarría JM, Fogeda M, Avellón A. Puesta al día de los casos de hepatitis E aguda confirmados por el Centro Nacional de Microbiología (España, 2004-2011). *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2013; 31: 57-61. doi: 10.1016/j.eimc.2012.06.008
- Echevarría JM, González JE, Lewis-Ximenez LL, Dos Santos DR, Munné MS, Pinto MA, Pujol FH, Rodríguez-Lay LA. Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. *J Med Virol.* 2013; 85: 1037-1045. doi: 10.1002/jmv.23526
- Echevarría JM, Fogeda M, Avellón A. Epidemiología de la infección por el virus de la hepatitis E en España. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2015; 33: 281-286. doi: 10.1016/j.eimc.2013.11.009
- EASL (European Association for the Study of the Liver). EASL clinical practice guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol.* 2018; 68: 1256-1271. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.005
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Hepatitis E in the EU/EEA, 2005-2015. Surveillance report. 2017. doi: 10.2900/059144
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Options for national testing and surveillance for hepatitis E virus in the EU/EEA. Operational guidance. 2019. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/hepatitis-e-guidance.pdf>
- European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Reflection paper on viral safety of plasma-derived medicinal products with respect to Hepatitis E virus. 2016. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-viral-safety-plasma-derived-medicinal-products-respect-hepatitis-e-virus_en.pdf

- Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, Yashina TL, Aleksandrov AG, Alter MJ, Yarasheva DM, Bradley DW, Margolis HS. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol.* 1992; 36: 246-250. doi: 10.1002/jmv.1890360403
- Fogeda M, de Ory F, Avellón A, Echevarría JM. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol.* 2009; 45: 259-261. doi: 10.1016/j.jcv.2009.05.022
- Fogeda M, Avellón A, Cilla CG, Echevarría JM. Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J Med Virol.* 2009; 81: 1743-1749. doi: 10.1002/jmv.21564
- Fogeda M, Avellón A, Echevarría JM. Prevalence of specific antibody to hepatitis E virus in the general population of the Community of Madrid, Spain. *J Med Virol.* 2012; 84: 71-74. doi: 10.1002/jmv.22270
- Fong F, Illahi M. Neuralgic amyotrophy associated with hepatitis E virus. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009; 111(2): 193-195. doi:10.1016/j.clineuro.2008.09.005
- Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, Busch MP. Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13: 33-36. doi: 10.1128/CVI.13.1.33-36.2006
- Fraga M, Doerig C, Moulin H, Bihl F, Brunner F, Müllhaupt B, Ripellino P, Semela D, Stickel F, Terzioli Beretta-Piccoli B, Aubert V, Telenti A, Greub G, Sahli R, Moradpour D. Hepatitis E virus as a cause of acute hepatitis acquired in Switzerland. *Liver Int.* 2018; 38(4): 619-626. doi:10.1111/liv.13557
- Fritz M, Berger B, Schemmerer M, Endres D, Wenzel J, Stich O, Panning M. Pathological cerebrospinal fluid findings in patients with neuralgic amyotrophy

and acute hepatitis e virus infection. *J Infect Dis.* 2018; 217(12): 1897-1901.

doi:10.1093/infdis/jiy128

- Fu RM, Decker CC, Dao Thi VL. Cell Culture Models for Hepatitis E Virus.

Viruses. 2019; 11(7):608. doi: 10.3390/v11070608.

- Galiana C, Fernández-Barredo S, García A, Gómez MT, Pérez-Gracia MT,

Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swineworkers. *Amer J Trop*

Med Hyg. 2008; 78: 1012-1015. doi: 10.4269/ajtmh.2008.78.1012

- Garbuglia AR, Scognamiglio P, Petrosillo N, Mastroianni CM, Sordillo P, Gentile

D, La Scala P, Girardi E, Capobianchi MR. Hepatitis E virus genotype 4 outbreak,

Italy, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19: 110-114. doi: 10.3201/eid1901.120983

- GeHEP de SEIMC. Documento de consenso sobre el diagnóstico, manejo y

prevención de la infección por el virus de la hepatitis E. 2018. Disponible en:

www.seimc.org.

- Geng Y, Zhang H, Huang W, Harrison T, Geng K, Li Z, Wang Y. Persistent

hepatitis E virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia.

Hepat Mon. 2014; 14: e15618. doi: 10.5812/hepatmon.15618

- Geng Y, Zhao C, Huang W, Harrison TJ, Zhang H, Geng K, Wang Y. Detection

and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *J Hepatol.* 2016; 64: 37-

43. doi: 10.1016/j.jhep.2015.08.034

- Gerolami R, Moal V, Colson P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-

transplant recipient. *N Engl J Med.* 2008; 358: 859-860. doi:

10.1056/NEJM0708687

- Gerolami R, Borentain P, Raissouni F, Motte A, Solas C, Colson P. Treatment

of severe acute hepatitis E by ribavirin. *J Clin Virol.* 2011; 52: 60-62. doi:

10.1016/j.jcv.2011.06.004

- Ghabrah TM, Tsarev S, Yarbough PO, Emerson SU, Strickland GT, Purcell RH. Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *J Med Virol.* 1998; 55: 134-137. doi:10.1002/(sici)1096-9071(199806)55:2<134::aid-jmv9>3.0.co;2-3
- Ghosh M, Nandi S, Dutta S, Saha MK. Detection of hepatitis B virus infection: A systematic review. *World J Hepatol.* 2015; 7: 2482-2491. doi: 10.4254/wjh.v7.i23.2482
- Gupta H, Joshi YK, Tandon BN. An enzyme linked immunoassay for the possible detection of non-A, non-B viral antigen in patients with epidemic viral hepatitis. *Liver.* 1988; 8: 111-115. doi: 10.1111/j.1600-0676.1988.tb00977.x
- Gutiérrez C, Sánchez D, Villalba MC, Pujol FH, Rodríguez-Lay L, Pinto B, Chacón EP, Guzmán MG. Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. *J Med Virol.* 2012; 84: 1025-1029. doi: 10.1002/jmv.23277
- Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, Benne CA, Vennema H, Reimerink JH, Koopmans MP. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2008; 14: 547-553. doi: 10.1002/lt.21480
- Halac U, Beland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard J, Houde A, Alvarez F. Cirrhosis due to chronic hepatitis E infection in a child post-bone marrow transplant. *J Pediatr.* 2012; 160: 871-874. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.01.028
- He J, Tam AW, Yarbough PO, Reyes GR, Carl M. Expression and diagnostic utility of hepatitis E virus putative structural proteins expressed in insect cells. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2167-2173. doi: 10.1128/JCM.31.8.2167-2173.1993
- Hewitt PE, Ijaz S, Brailsford SR, Brett R, Dicks S, Haywood B, Kennedy ITR, Kitchen A, Patel P, Poh J, Russell K, Tettmar KI, Tossell J, Ushiro-Lumb I, Tedder RS. Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and

transmission study in southeast England. *Lancet.* 2014; 384: 1766e73. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61034-5

- Hofmann J, Liebert UG. Significance of avidity and immunoblot analysis for rubella IgM-positive serum samples in pregnant women. *J Virol Methods.* 2005; 130: 66-71. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.06.004

- Holla RP, Ahmad I, Ahmad Z, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis.* 2013; 33: 3-14. doi: 10.1055/s-0033-1338110

- Hsieh SY, Yang PY, Ho YP, Chu CM, Liaw YF. Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J Med Virol.* 1998; 55: 3000-3004. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199808)55:4<300::aid-jmv8>3.0.co;2-4

- Huang RT, Li DR, Wei J, Huang XR, Yuan XT, Tian X. Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China. *J Gen Virol.* 1992; 73 (Pt 5):1143-1148. doi: 10.1099/0022-1317-73-5-1143

- Huang CC, Nguyen D, Fernandez J, Yun KY, Fry KE, Bradley DW, Tam AW, Reyes GR. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology.* 1992; 191: 550-558. doi: 10.1016/0042-6822(92)90230-m

- Huang F, Sun F, Emerson S, Purcell R, Shivaprasad H, Pierson F, Toth TE, Meng XJ. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol.* 2004; 85: 1609-1618. doi: 10.1099/vir.0.79841-0

- Huang WJ, Zhang HY, Harrison TJ, Lan HY, Huang GY, Wang YC. Immunogenicity and protective efficacy in rhesus monkeys of a recombinant ORF2 protein from hepatitis E virus genotype 4. *Arch Virol.* 2009; 154: 481-488. doi: 10.1007/s00705-009-0335-7

- Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, Cai J, Jiang L, Wu T, Wang Z, Guan L, Shih JW, Ng MH, Zhu F, Zhang J, Xia N. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One.* 2010; 5: e13560. doi: 10.1371/journal.pone.0013560
- Hyams C, Mabayaje DA, Copping R, Maranao D, Patel M, Labbett W, Haque T, Webster DP. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J Med Virol.* 2014; 86:478-483. doi: 10.1002/jmv.23827
- Inghilleri ML, Grini Mazouzi M, Juntas Morales R. Syndrome de Parsonage Turner associé à une infection par le virus de l'hépatite E. *Rev Neurol (Paris).* 2012; 168(4): 383-384. doi:10.1016/j.neurol.2011.07.014
- Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, Lhomme S, Marchandeau S, Boucher S, Kamar N, Abravanel F, Guérin JL. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 1274-1281. doi: 10.3201/eid1808.120057
- Jameel S, Durgapal H, Habibullah CM, Khuroo MS, Panda SK. Enteric non-A, non-B hepatitis: Epidemics animal transmission and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1992; 37: 263-270. doi: 10.1002/jmv.1890370405
- Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Exp Rev Mol Med.* 1999; 6: 1-16. doi: 10.1017/S1462399499001271
- Jang JH, Jung YM, Kim JS, Lee SH, Kim JW, Hwang SG, Rim KS, Park SJ, Park YM, Kang SK, Lee HS, Yun H, Kim JH, Jeong SH. Coexistence of IgM antihepatitis A virus and IgM antihepatitis E virus in acute viral hepatitis: a

prospective, multicentre study in Korea. *J Viral Hepat.* 2011; 18: e408-14. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01477.x

- Jardí R, Buti M, Rodriguez-Frías F, Esteban R. Hepatitis E infection in acute sporadic hepatitis in Spain. *Lancet.* 1993; 341: 1355-1356. doi: 10.1016/0140-6736(93)90874-g

- Jiang YZ, Tian RG, Lu J, Bi SL. Evaluation of the ELISA diagnostic kits for hepatitis E virus antibody in the reference serum, the suspect patients of hepatitis E and normal persons' sera. *Chin J Exp Clin Virol.* 2007; 21: 59-61.

- Jilani N, Das BC, Husain SA, Baweja UK, Chattopadhyay D, Gupta RK, Sardana S, Kar P. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22: 676-682. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.04913.x

- Just-Nübling G, Korn S, Ludwig B, Stephan C, Doerr HW, Preiser W. Primary cytomegalovirus infection in an outpatient settinglaboratory markers and clinical aspects. *Infection.* 2003; 31: 318-323. doi: 10.1007/s15010-003-3129-y

- Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel JP, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2008; 358: 811-817. doi: 10.1056/NEJMoa0706992

- Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Esposito L, Cardeau-Desangles I, Mansuy JM, Selves J, Peron JM, Otal P, Muscari F, Izopet J. Pegylated interferón-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010; 50: e30-33. doi: 10.1086/650488.

- Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, Dumortier J, Cannesson A, Cassuto-Viguier E, Thervet E, Conti F, Lebray P,

- Dalton HR, Santella R, Kanaan N, Essig M, Mousson C, Radenne S, Roque-Afonso AM, Izopet J, Rostaing L. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*. 2011; 140: 1481-489. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.050.
- Kamar N, Bendall RP, Peron JM, Cintas P, Prudhomme L, Mansuy JM, Rostaing L, Keane F, Ijaz S, Izopet J, Dalton HR. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17: 173-179. doi: 10.3201/eid1702.100856
- Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, Dumortier J, Cannesson A, Cassuto-Viguier E, Thervet E, Conti F, Lebray P, Dalton HR, Santella R, Kanaan N, Essig M, Mousson C, Radenne S, Roque-Afonso AM, Izopet J, Rostaing L. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*. 2011; 140: 1481-9. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.050
- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, Dalton HR. Hepatitis E. *Lancet*. 2012; 379: 2477-2488. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61849-7
- Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27: 116-138. doi: 10.1038/nrdp.2017.86
- Kamar N, Izopet J, Tripone S, Bismuth M, Hillaire S, Dumortier J, Radenne S, Coilly A, Garrigue V, D'Alteroche L, Buchler M, Couzi L, Lebray P, Dharancy S, Minello A, Hourmant M, Roque-Afonso AM, Abravanel F, Pol S, Rostaing L, Mallet V. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med*. 2014; 370: 1111-1120. doi: 10.1056/NEJMoa1215246
- Kumar A, Yachha SK, Poddar U, Singh U, Aggarwal R. Does coinfection with multiple viruses adversely influence the course and outcome of sporadic acute

viral hepatitis in children? *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21: 1533-1537. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04509.x

- Kantala T, Maunula L, von Bonsdorff CH, Peltomaa J, Lappalainen M. Hepatitis E virus in patients with unexplained hepatitis in Finland. *J Clin Virol.* 2009; 45: 109-113. doi: 10.1016/j.jcv.2009.03.006

- Khudyakov YE, Khudyakova NS, Jue DL, Wells TW, Pandya N, Fields HA. Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in Burmese and Mexican strains of hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 1994; 75: 641-646. doi: 10.1099/0022-1317-75-3-641

- Khuroo MS. 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.* 1980; 68: 818-824. doi: 10.1016/0002-9343(80)90200-4

- Khuroo MS, Kamili S, Dar MY, Moeckli R, Jameel S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet.* 1993; 341: 1355.

- Khuroo MS, Kamili S. Hepatitis E: From hypothesis to reality (editorial). *Indian J Gastroenterol.* 1994; 13: 39-43.

- Khuroo MS. Seroepidemiology of a second epidemic of hepatitis E in a population that had recorded first epidemic 30 years before and has been under surveillance since then. *Hepatol Int.* 2010; 4: 494-499. doi: 10.1007/s12072-009-9159-5

- Kmush B, Wierzba T, Krain L, Nelson K, Labrique A. Epidemiology of hepatitis E in low- and middle-income countries of Asia and Africa. *Sem Liver Dis.* 2013; 33: 15-29. doi: 10.1055/s-0033-1338111

- Kmush BL, Yu H, Huang H, Zhang X, Wu T, Nelson KE, Labrique AB. Long-term antibody persistence after hepatitis E virus infection and vaccination in Dongtai, China. *Open Forum Infect Dis.* 2019; 28: 6: ofz144. doi: 10.1093/ofid/ofz144
- Koning L, Pas SD, de Man RA, Balk AH, de Knegt RJ, ten Kate FJ, Osterhaus AD, van der Eijk AA. Clinical implications of chronic hepatitis E virus infection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant Off Pub Int Soc Heart Transplant.* 2013; 32: 78-85. doi: 10.1016/j.jcv.2013.10.010
- Khudyakov Y, Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011; 161: 84-92. doi: 10.1016/j.virusres.2011.06.006
- Kim HS, Jeong SH, Jang JH, Myung HJ, Kim JW, Bang SM, Song SH, Kim H, Yun HS. Coinfection of hepatitis A virus genotype IA and IIIA complicated with autoimmune hemolytic anemia, prolonged cholestasis, and false-positive immunoglobulin M anti-hepatitis E virus: a case report. *Korean J Hepatol.* 2011; 17: 323-327. doi: 10.3350/kjhep.2011.17.4.323.
- Khuroo MS, Kamili S, Dar MY, Moecklii R, Jameel S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet.* 1993; 341: 1355. doi: 10.1016/0140-6736(93)90873-F
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35:1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Labrique AB, Thomas DL, Stoszek SK, Nelson KE. Hepatitis E: an emerging infectious disease. *Epidemiol Rev.* 1999; 21: 162-179. doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a017994
- Landry ML. Immunoglobulin M for acute infection: true or false? 2016. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; 23: 540-545. doi:10.1128/CVI.00211-16

- Laperche S, Izopet J, Lefrere JJ. 2014. Safety measures to prevent hepatitis E virus transmission by blood transfusion. *Transfusion*. 2014; 54: 2134-2135. doi: 10.1111/trf.12735
- Le Coute P, Meisel H, Hofmann J, Röcken C, Vuong GL, Neuburger S, Hemmati PG, Dörken B, Arnold R. Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut*. 2009; 58: 699-702. doi: 10.1136/gut.2008.165571
- Lee SD, Wang YJ, Lu RH, Chan CY, Lo KJ, Moeckli R. Seroprevalence of antibody to hepatitis E virus among Chinese subjects in Taiwan. *Hepatology*. 1994; 19: 866-870. doi: 10.1002/hep.1840190410
- Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, Wee A, Aw PP, Zhu Y, Hibberd ML, Tan CK, Purdy MA, Teo CG. Chronic infection with wamelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology*. 2016; 150: 355-357. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.048
- Legrand-Abravanel F, Thevenet I, Mansuy JM, Saune K, Vischi F, Peron JM, Kamar N, Rostaing L, Izopet J. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16, 772-774. doi: 10.1128/CVI.00438-08
- Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Garrouste C, Dubois M, Mansuy JM, Muscari F, Sallusto F, Rostaing L, Izopet J. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis*. 2010; 202: 835-844. doi: 10.1086/655899
- Lin CC, Wu JC, Chang TT, Chang WY, Yu ML, Tam AW, Wang SC, Huang YH, Chang FY, Lee SD. Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is

not endemic. *J Clin Microbiol.* 2020; 38: 3915-3918. doi: 10.1128/JCM.38.11.3915-3918.2000

- López-Fabal MF, Gómez-Garcés JL. Seroprevalence of hepatitis E virus in patients with hepatitis C and / or infected with HIV. *Rev Esp Quimioter.* 2015; 28: 314-316.

- Lopez-Izquierdo R, Udaondo MA, Zarzosa P, García-Ramón R, Garcinuño S, Orduña A, Rodríguez-Torres A, Ana Almaraz. Seroprevalencia de las hepatitis virales en población general representativa de una zona básica de salud urbana en Castilla y León. *Enf Infect Microbiol Clin.* 2007; 25: 317-323. doi: 10.1157/13102267

- Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol.* 2006; 16: 5-36. doi: 10.1002/rmv.482

- Lu J, Huang Y, Wang P, Li Q, Li Z, Jiang J, Guo Q, Gui H, Xie Q. Dynamics of HEV antibodies and development of a multi-factorial model to improve the diagnosis of current HEV infection in resource-limited settings. *J Clin Microbiol.* 2020; JCM.02321-20. doi: 10.1128/JCM.02321-20

- Lucarelli C, Spada E, Taliani G, Chionne P, Madonna E, Marcantonio C, Pezzotti P, Bruni R, La Rosa G, Pisani G, Dell'Orso L, Ragone K, Tomei C, Ciccaglione AR. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies among blood donors in central Italy, February to March 2014. *Euro Surveill.* 2016; 21: pii=30299. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.30.30 299

- Ma H, Song X, Li Z, Harrison TJ, Zhang H, Huang W, Hao W, Kong W, Wang Y. Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis

E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J Med Virol.* 2009; 81: 1052-1061. doi: 10.1002/jmv.21484

- Majumdar M, Singh MP, Goyal K, Chawla Y, Rathon RK. Detailed investigation of ongoing subclinical hepatitis E virus infections; occurring in outbreak settings of North India. *Liver Int.* 2015; 35: 826-833. doi: 10.1111/liv.12568

- Maneerat Y, Clayson ET, Myint SA, Young GD, Innis BL. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol* 1996; 48: 121-128.

- Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Sauné K, Miédouge M, Ellis V, Rech H, Destruel F, Kamar N, Dalton HR, Izopet J. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 2309-2312. doi: 10.3201/eid1712.110371

- Martínez Rodríguez L, Carvajal P, Morís G. Neuralgia amiotrófica en relación con infección por el virus de la hepatitis E. *Med Clin (Barc).* 2015; 145(10): 462-463. doi:10.1016/j.medcli.2015.01.021

- Mateos ML, Camarero C, Lasa E, Teruel JL, Mir N, Baquero F. Hepatitis E virus: Relevance in blood donors and risk groups. *Vox Sang.* 1999; 76: 78-80. doi: 10.1159/000031024

- Mateos ML, Molina A, Patier JL, Moreira V. Hepatitis E en España: nueve casos autóctonos y tres importados. *Med Clin (Barc).* 2005; 125: 117-119. doi: 10.1157/13076758

- Mateos-Lindemann ML, Gabilondo G, Romero B, De La Maza OMS, Pérez-Gracia MT. Low prevalence of hepatitis E infection among pregnant women in Madrid, Spain. *J Med Virol.* 2010; 82: 1666-1668. doi: 10.1002/jmv.21840

- Mateos ML, González-Galdámez A, Bordallo M, Pérez-Gracia MT. Are HIV-infected patients a high-risk population for hepatitis E virus infection in Spain? *Enf Infect Microbiol Clin.* 2012; 30: 580-585. doi: 10.1016/j.eimc.2012.03.010
- Mateos-Lindemann ML, Diez-Aguilar M, González-Galdamez A, Graus-Morales J, Moreno-Zamora A, Perez-Gracia MT. Hepatitis agudas, crónicas y fulminantes por virus de la hepatitisE: 7 años de experiencia (2004-2011). *Enf Infect Microbiol Clin.* 2013; 31; 595-598. doi: 10.1016/j.eimc.2013.03.014
- Mateos-Lindemann ML, Pérez-Gracia MT. Hepatitis E: situación actual en España. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2017; 35 (Supl 3): 15-2.
- Matsubayashi K, Kang JH, Sakataq H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, Nishimori H, Tsuji K, Maguchi H, Yoshida J, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion.* 2008; 48: 1368-1375. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01722.x
- Mendoza C, Leyva A, Rivero-Juárez A, Mendoza P, Benito R. IgG avidity in the diagnosis of hepatitis E virus: performance of a new technique. XXIX European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Amsterdam, 13-16 abril de 2019. Comunicación Póster 807.
- Mendoza-López C, López-López P, Atienza S, Rivero-Juárez A, Benito R. Parsonage-Turner syndrome associated with hepatitis E infection in immunocompetent patients. *Virus Res.* 2020; 290: 198165. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198165
- Meng J, Dubreuil P, Pillot J. A new PCR-based seroneutralization assay in cell culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1373-1377. doi: 10.1128/JCM.35.6.1373-1377.1997

- Meng X-J, Halbur PG, Shapiro MS, Jeremy SG, Mushahwar BI, Purcell RH, Emerson SU. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol.* 1998; 72: 9714-9721. doi: 10.1128/JVI.72.12.9714-9721.1998
- Meng XJ. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol.* 2000; 33: 842-845. doi: 10.1016/s0168-8278(00)80319-0.
- Meng XJ. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Sem Liver Dis.* 2013; 33: 41-49. doi: 10.1016/s0168-8278(00)80319-0
- Moisset X, Vitello N, Bicilli E, Courtin R, Ferrier A, Taithe F, Lahaye C, Hssain AA, Garrouste C, Pierre C. Severe bilateral amyotrophic neuralgia associated with major dysphagia secondary to acute hepatitis E. *F1000Research.* 2014; 2:1-10. doi:10.12688/f1000research.2-259.v2
- Montalvo MC, Rodríguez-Lay LA, Chandra V, Bello M, Sariego S, Gutiérrez-Moreno A, Jamee S. Hepatitis E virus genotype 1, Cuba. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 1320-1322. doi: 10.3201/eid1408.080049
- Motte A, Franques JÔ, Weitten T, Colson P. Hepatitis E-associated Parsonage-Turner syndrome, France. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014; 38(1):11-14. doi:10.1016/j.clinre.2013.08.011
- Myint KS, Endy TP, Gibbons RV, Laras K, Mammen MP Jr, Sedyangingsih ER, Seriwatana J, Glass JS, Narupiti S, Corwin AL. Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1581-1583. doi: 10.1128/JCM.44.4.1581-1583.2006
- Myint KS, Endy TP, Shrestha MP, Shrestha SK, Vaughn DW, Innis BL, Gibbons RV, Kuschner RA, Seriwatana J, Scott RM. Hepatitis E antibody kinetics in

Nepalese patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100: 938-941. doi: 10.1016/j.trstmh.2005.12.005.

- Naha K, Karanth S, Prabhu M, Sidhu MS. 2012. Dual infection with hepatitis A and E virus presenting with aseptic meningitis: a case report. *Asian Pac J Trop Med.* 2012; 5: 587-588. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60104-7

- Nanda SK, Ansari IH, Acharya SK, Jameel S, Panda SK. Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infections. *Gastroenterol.* 1995; 108: 225-230. doi: 10.1016/0016-5085(95)90028-4

- Ngah C, Gilbert A, Brasseur E, Zandona R, Ghysen A, D'Orio V. Parsonage - Turne Syndrome as a rare extrahepatic complication of hepatitis E infection. *Eur J case reports Intern Med.* 2019; 6. doi:10.12890/2019_001208

- Nicand E, Bigaillon C, Tessé S. Hepatitis E: an emerging disease? *Pathol Biol. (Paris)* 2009; 57: 203-211. doi: 10.1016/j.patbio.2008.04.002

- Nicot F, Jeanne N, Roulet A, Lefebvre C, Carcenac R, Manno M, Dubois M, Kamar N, Lhomme S, Abravanel F, Izopet J. Diversity of hepatitis E virus genotype 3. *Rev Med Virol.* 2018; 28: e1987. doi: 10.1002/rmv.1987

- Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018; 15: 96-110. doi: 10.1038/nrgastro.2017.150

- Norder H, Sundqvist L, Magnusson L, Østergaard S, Löfdahl M, Larsen LE, Hjulsager CK, Magnus L, Böttiger BE, Widén F. Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Euro Surveill.* 2009; 14, pii: 192119.8. doi: 10.2807/ese.14.19.19211-en

- Norder H, Karlsson M, Mellgren Å, Konar J, Sandberg E, Lasson A, Castedal M, Magnus L, Lagging M. Diagnostic performance of five assays for anti-hepatitis

E virus IgG and IgM in a large cohort study. *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 549-555.

doi: 10.1128/JCM.02343-15

- Obriadina A, Meng J, Ulanova T, Trinta K, Burkov A, Fields H, Khudyakov Y. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 17(Suppl. 3): S360-S364. doi: 10.1046/j.1440-1746.17.s3.28.x

- Ojea A, González I, Blanco L, Martínez-Lorenzo M, Alfonso A, Muñoz M, Arroyo J, Ontanón A, Aramburu E, Sola C. Prospective study of prevalence of hepatitis E virus in donors from North-Spain. 27th Regional Congress of the ISBT. June 17-21, 2017. Copenhagen, Denmark. Abstract P-409.

- Ollier L, Tieulie N, Sanderson F, Heudier P, Giordanengo V, Fuzibet JG, Nicand E. Chronic hepatitis after hepatitis E virus infection in a patient with non-Hodgkin lymphoma taking rituximab. *Ann Intern Med.* 2009; 150: 430-431. doi: 10.7326/0003-4819-150-6-200903170-00025

- Otero AJ. Inmunoensayos enzimáticos para detectar agentes infecciosos o sus productos: algunos diseños y aplicaciones, *Rev Cubana Med Trop.* 2010; 62: 167-179.

- Panda SK, Ansari IH, Durgapal H, Agrawal S, Jameel S. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J Virol.* 2000; 74(5): 2430-2437. doi: 10.1128/jvi.74.5.2430-2437.2000

- Panda S, Thakral D, Rehman S. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol.* 2007; 17: 151-180. doi: 10.1002/rmv.522

- Parsonage MJ, Aldren Turner JW. Neuralgic amyotrophy the shoulder-girdle syndrome. *Lancet.* 1948; 251: 973-978. doi: 10.1016/S0140-6736(48) 90611-4

- Pan JS, Zhang K, Zhou J, Wu C, Zhuang H, Zhou YH. Application of truncated immunodominant polypeptide from hepatitis E virus (VHE) ORF2 in an assay to exclude nonspecific binding in detecting anti-VHE immunoglobulin M. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 779-784. doi: 10.1128/JCM.01671-09
- Pankovics P, Némethy O, Boros Á, Pár G, Szakály P, Reuter G. Four-year long (2014-2017) clinical and laboratory surveillance of hepatitis E virus infection using combined antibody, molecular, antigen and avidity detection methods: Increasing incidence and chronic HEV case in Hungary. *J Clin Virol.* 2020; 124: 104284. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104284
- Pas SD, de Man RA, Mulders C, Balk AH, van Hal PT, Weimar W, Koopmans MP, Osterhaus AD, van der Eijk AA. Hepatitis E virus infection among solid organ transplant recipients, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 869-872. doi: 10.3201/eid1805.111712
- Pas SD, Streefkerk RH, Pronk M, de Man RA, Beersma MF, Osterhaus AD, van der Eijk AA. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *J Clin Virol.* 2013; 58: 629-634. doi: 10.1016/j.jcv.2013.10.010
- Peralta B, Casas M, de Deus N, Martín M, Ortúñoz A, Pérez-Martín E, Pina S, Mateu E. Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. *Vet Microbiol.* 2009; 137: 66-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.006
- Pérez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: an emerging disease. *Infect Genet Evol* 2014; 22: 40-59. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.002

- 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: 825-833. doi: 10.1016/s0168-8278(00)80316-5
- Piron M, de la Torre Rial C, Bes M, Llorens M, Quer J, Gregori J, Casamitjana N, Sauleda S. Infección por el virus de la hepatitis E: incidencia y características epidemiológicas en donantes de sangre. *Blood Transfusion.* 2017; 15 (Suppl 2): s292.
- Pischke S, Ryll U, De Weerth A, Ufer F, Gelderblom M. Neuralgische Schulteramyotrophie: Eine extrahepatische Manifestation der Hepatitis E. *Dtsch Medizinische Wochenschrift.* 2016; 141(17): 1239-1242. doi:10.1055/s-0042-102289
- Pischke S, Hartl J, Pas SD, Lohse AW, Jacobs BC, Van der Eijk AA. Hepatitis E virus: infection beyond the liver? *J Hepatol.* 2017; 66: 1082-1095. doi: 10.1016/j.jhep.2016.11.016
- Pourbaix A, Ouali N, Soussan P, Roque Afonso AM, Péraldi MN, Rondeau E, Peltier J. Evidence of hepatitis E virus transmission by renal graft. *Transpl Infect Dis.* 2017; 19. doi: 10.1111/tid.12624
- Prince HE, Lape-Nixon M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clin Vaccine Immunol.* 2014; 21: 1377-1384. doi: 10.1128/CVI.00487-14
- Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol.* 2008; 48: 494-503. doi: 10.1016/j.jhep.2007.12.008
- Quintana-González A. Virus de la hepatitis E. *Rev Biomed.* 2003; 14: 165-189. doi: 10.32776/revbiomed.v14i3.355

- Rahbari AH, Keshavarz H, Shojaee S, Mohebali M, Rezaeian M. IgG avidity ELISA test for diagnosis of acute toxoplasmosis in humans. *Korean J Parasitol.* 2012; 50: 99-102. doi: 10.3347/kjp.2012.50.2.99
- Rhati U, Bapat M, Rhati P, Abraham P. Effect of liver disease on maternal and fetal outcome. A prospective study. *Indian Soc Gastroenterol.* 2007; 26: 59-63.
- Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology.* 2012; 55: 988-997. doi: 10.1002/hep.25505
- Renou C, Lafeuillade A, Cadranel JF, Pavio N, Pariente A, Allègre T, Poggi C, Pénaranda G, Cordier F, Nicand E; ANGH. Hepatitis E virus in HIV-infected patients. *AIDS.* 2010; 24: 1493-1499. doi: 10.1097/QAD.0b013e32833a29ab
- Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1990; 247: 1335-1339. doi: 10.1126/science.2107574
- Reyes GR, Bradley DW, Twu JS, Purdy MA, Tam AW, Krawczynski K. Hepatitis E virus vaccine and method. *Europe Patent Appl.* 1993, PCT/US 93/00475 and WO Publication 1993, 93/14208.
- Rianthavorn P, Thongmee C, Limpaphayom N, Komolmit P, Theamboonlers A, Poovorawan Y. The entire genome sequence of hepatitis E virus genotype 3 isolated from a patient with neuralgic amyotrophy. *Scand J Infect Dis.* 2010; 42: 395-400. doi: 10.3109/00365540903496551
- Ripellino P, Norton B, Van Eijk J, Dalton HR. Non-traumatic neurological injury and hepatitis E infection. *Expert Rev Anti Ther.* 2018; 16: 255-257. doi: 10.1080/14787210.2018.1446827

- Risalde MA, Rivero-Juárez A, Romero-Palomo F, Frías M, López-López P, Cano-Terriza D, García-Bocanegra I, Jiménez-Ruiz S, Camacho A, Machuca I, Gómez-Villamandos JC, Rivero A. Persistence of hepatitis E virus in the liver of non-viremic naturally infected wild boar. *PLoS ONE*. 2017; 12: e0186858. doi: 10.1371/journal.pone.0186858
- Riveiro-Barciela M, Rodríguez-Frías F, Buti M. Hepatitis E: Dimensión del problema en España. *Gastroenterol Hepatol*. 2012; 35: 719-724. doi: 10.1016/j.gastrohep.2012.03.003
- Riveiro-Barciela M, Buti M, Homs M, Campos-Varela I, Cantarell C, Crespo M, Castells L, Tabernero D, Quer J, Esteban R, Rodriguez-Frías F. Cirrhosis, liver transplantation and HIV infection are risk factors associated with hepatitis E virus infection. *PLoS ONE*. 2014; 28; 9: e103028. doi: 10.1371/journal.pone.0103028
- Riveiro-Barciela M, Sauleda S, Quer J, Salvador F, Gregori J, Pirón M, Rodríguez-Frías F, Buti M. Red blood cell transfusion transmitted acute hepatitis E in an immunocompetent subject in Europe: a case report. *Transfusion*. 2017; 57: 244-247. doi: 10.1111/trf.13876
- Riveiro-Barciela M, Rando-Segura A, Barreira-Díaz A, Bes M, P Ruzo S, Piron M, Quer J, Sauleda S, Rodríguez-Frías F, Esteban R, Buti M. Unexpected long-lasting anti-VHE IgM positivity: is VHE antigen a better serological marker for hepatitis E infection diagnosis? *J Viral Hepat*. 2020; 27: 747-753. doi: 10.1111/jvh.13285
- Rivero-Juárez A, Frías M, López-López P, Risalde MA, Brieva T, Machuca I, Camacho A, Martínez-Peinado A, Gómez-Villamandos JC, Rivero A. Hepatitis E virus (HEV) infection in anti-HEV immunoglobulin G-carrying patients after

- successful hepatitis C virus treatment: reactivation or reinfection? *Clin Infect Dis.* 2017; 64: 964-966. doi: 10.1093/cid/cix004
- Rivero-Juárez A, Frias M, Martinez-Peinado A, Risalde MA, Rodriguez-Cano D, Camacho A, García-Bocanegra I, Cuenca-Lopez F, Gomez-Villamandos JC, Rivero A. Familial hepatitis E outbreak linked to wild boar meat consumption. *Zoonoses Public Health.* 2017; 64: 561-565. doi: 10.1111/zph.12343
- Rivero-Juárez A, Jarilla-Fernandez M, Frias M, Madrigal-Sánchez E, López-López P, Andújar-Troncoso G, Machuca I, Camacho A, Muñoz-Valbuena P, Rivero A. Hepatitis E virus in Spanish donors and the necessity for screening. *J Viral Hepat.* 2019; 26: 603-608. doi: 10.1111/jvh.13064
- Rivero-Juárez A, Vallejo N, Lopez-Lopez P, Díaz-Mareque AI, Frias M, Vallejo A, Caballero-Gómez J, Rodríguez-Velasco M, Molina E, Aguilera A. Ribavirin as a first treatment approach for Hepatitis E virus infection in transplant recipient patients. *Microorganisms.* 2019; 8: 51. doi: 10.3390/microorganisms8010051
- Rivero-Juárez A, Frias M, Lopez-Lopez P, Berenguer J, García F, Macias J, Alcaraz B, Castro-Iglesias A, Caballero-Gomez J, Rivero A. Hepatitis E 3ra genotype infection in people living with HIV in Spain. *Front Microbiol.* 2020; 11: 2189. doi: 10.3389/fmicb.2020.564486
- Rodríguez-Castro E, Trastoy R, Rodríguez-Osorio X, Domínguez-Santalla MJ, Fernández-Lebrero A, González-Alba JM, Aguilera A. Meningitis due to autochthonous acute infection with hepatitis E virus in a chef: a case report. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(6):1726-1728. doi: 10.1093/jac/dky052
- Rodríguez-Lay LA, Quintana A, Montalvo MC, Lemos G, Bello M, Gutiérrez Moreno A, Prieto PA, Guzmán MG, Anderson D. Dual infection with hepatitis A

and E viruses in out-breaks and in sporadic clinical cases: Cuba 1998-2003. J Med Virol. 2008; 80: 798-802. doi: 10.1002/jmv.21147

- Rodríguez-Frías F, Jardi R, Buti M. Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis. Enferm Infect Microbiol Clin. 2012; 30: 624-634.

- Roque-Afonso AM, Grangeot-Keros L, Roquebert B, Desbois D, Poveda JD, Mackiewicz V, Dussaix E. Diagnostic relevance of immunoglobulin G avidity for hepatitis A virus. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5121-5124. doi: 10.1128/jcm.42.11.5121-5124.2004

- Rossi-Tamisier M, Moal V, Gerolami R, Colson P. Discrepancy between anti-hepatitis E virus immunoglobulin G prevalence assessed by two assays in kidney and liver transplant recipients. J Clin Virol. 2013; 56: 62-64. doi: 10.1016/j.jcv.2012.09.010

- Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A, Ramsay M, Morgan D. 2009. Hepatitis E outbreak on cruise ship. Emerg Infect Dis. 2009; 15: 1738-1744. doi: 10.3201/eid1511.091094

- Sánchez-Azofra M, Romero-Portales M, Tortajada-Laureiro L, García-Samaniego J, Mora-Sanz P. Hepatitis E virus in neurological disorders: A case of parsonage-turner syndrome. Rev Esp Enfermedades Dig. 2018; 110(6): 402-403. doi:10.17235/reed.2018.5506/2018

- Sánchez MA, Moreno ME, García Avello A, Mateos ML. Dos nuevos casos de hepatitis E autóctonos, Enferm Infect Microbiol Clin. 2002; 20: 138. doi: 10.1016/S0213-005X(02)72772-9

- Sánchez DA, Gutiérrez CR. Virus de la hepatitis E. Características biológicas y epidemiológicas. Rev Soc Venez Microbiol. 2012; 32: 6-12.

- Sauleda S, Ong E, Bes M, Janssen A, Cory R, Babizki M, Shin T, Lindquist A, Hoang A, Vang L, Piron M, Casamitjana N, Koppelman M, Danzig L, Linnen JM. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). *Transfusion*. 2015; 55: 972-979. doi: 10.1111/trf.12929
- Scavion Q, Perez T, Cassim F, Outteryck O, Lanteri A, Hatron PY, Lambert, M, Morell-Dubois S. Neuralgic amyotrophy triggered by hepatitis E virus: a particular phenotype. *J Neurol*. 2017; 264: 770–780. doi: 10.1007/s00415-017-8433-z
- 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; 57: 243-251. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199903)57:3<243::aid-jmv6>3.0.co;2-r
- Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, Pahl S, Ramez B, Krüger DH, Berg T, Hofmann J. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol*. 2012; 56: 500-502. doi: 10.1016/j.jhep.2011.06.021
- Schnegg A, Burgisser P, Andre C, Kenfak-Foguena A, Canellini G, Moradpour D, Abravanel F, Izopet J, Cavassini M, Darling KE. 2013. An analysis of the benefit of using HEV genotype 3 antigens in detecting anti-HEV IgG in a European population. *PLoS One*. 2013; 8: e62980. doi: 10.1371/journal.pone.0062980
- Sellier P, Mazeron MC, Tesse S, Badsi E, Evans J, Magnier JD, Sanson-Le-Pors MJ, Bergmann JF, Nicand E. Hepatitis E virus infection in HIV-infected patients with elevated serum transaminases levels. *Virol J*. 2011; 8: 171. doi: 10.1186/1743-422X-8-171

- Shata MT, Daef EA, Zaki ME, Abdelwahab SF, Marzuuk NM, Sobhy M, Rafaat M, Abdelbaki L, Nafeh MA, Hashem M, El-Kamary SS, Shardell MD, Mikhail NN, Strickland GT, Sherman KE. Protective role of humoral immune responses during an outbreak of hepatitis E in Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106: 613-618. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.07.004
- Shi R, Soomro MH, She Y, Yang Y, Wang T, Wu Q, Li H, Hao W. Evidence of Hepatitis E virus breaking through the blood-brain barrier and replicating in the central nervous system. *J Viral Hepat.* 2016; 23: 930-939. doi: 10.1111/jvh.12557
- Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MPJr, Thapa GB, Thapa N, Myint KS, Founeau M, Kuschner RA, Shrestha SK, David MP, Seriwatana J, Vaughn DW, Salary A, Endy TP, Innis BL. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med.* 2007; 356: 895-903. doi: 10.1056/NEJMoa061847
- Shukla P, Nguyen HT, Torian U, Engle RE, Faulk K, Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Purcell RH, Emerson SU. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(6): 2438-43. doi: 10.1073/pnas.1018878108
- Silva M, Wicki B, Tsouni P, Cunningham S, Doerig C, Zanetti G, Aubert V, Sahli R, Moradpour D, Kuntzer T. Hepatitis E virus infection as a direct cause of neuralgic amyotrophy. *Muscle and Nerve.* 2016; 54(2): 325-327. doi:10.1002/mus.25096
- Slot E, Zaaijer HL, Molier M, Van den Hurk K, Prinsze F, Hogema BM. Meat consumption is a major risk factor for hepatitis E virus infection. *PLoS One.* 2018; 12: e0176414. doi: 10.1371/journal.pone.0176414
- Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WH, Purdy MA. 2015. Consensus proposals for 204

classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2015; 96: 1191-1192. doi: 10.1099/vir.0.000115

- Smith DB, Ijaz S, Tedder RS, Hogema B, Zaaijer HL, Izopet J, Bradley-Stewart A, Gunson R, Harvala H, Kokki I, Simmonds P. Variability and pathogenicity of hepatitis E virus genotype 3 variants. *J Gen Virol.* 2015; 96: 3255-3264. doi: 10.1099/jgv.0.000264

- Smith DB, Izopet J, Nicot F, Simmonds P, Jameel S, Meng XJ, Norder H, Okamoto H, van der Poel WHM, Reuter G, Purdy MA. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species *Orthohepevirus A*). *J Gen Virol.* 2020; 101: 692-698. doi:10.1099/jgv.0.001435

- Somani SK, Aggarwal R, Naik SR, Srivastava S, Naik S. A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E infection. *J Viral Hep.* 2003; 10: 446-449. doi: 10.1046/j.1365-2893.2003.00458.x

- Sridhar S, Teng JLL, Chiu TH, Lau SKP, Woo PCY. Hepatitis E Virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int J Mol Sci.* 2017; 18; 869. doi: 10.3390/ijms18040869

- Suárez González A, Solís Sánchez G, Guerra L, de la Guerra GV, Navascués CA, García López R. Prevalence of immunity to hepatitis viruses in pregnant women from the health area of Gijon (Spain). *Gastroenterol Hepatol.* 2004; 27: 347-352. doi: 10.1157/13062888

- Sylvan SP, Hellstrom UB, Hampl H, Kapprell HP, Troonen H. Hepatitis E in patients with chronic autoimmune liver disease. *JAMA.* 1995; 273: 377-378. doi:10.1001/jama.1995.03520290029022

- Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H. Simultaneous detection of Immunoglobulin

A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 49-56. doi: 10.1128/JCM.43.1.49-56.2005

- Takahashi M, Tanaka T, Azuma M, Kusano E, Aikawa T, Shibayam T, Yazaki Y, Mizuo H, Inoue J, Okamoto H. Prolonged fecal shedding of hepatitis E virus during sporadic acute hepatitis E: evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 3671-3679. doi: 10.1128/JCM.01086-07

- Tam AW, White R, Reed E, Short M, Zhang Y, Fuerst TR, Lanford RE. In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology.* 1996; 215:1-9. doi: 10.1006/viro.1996.0001

- Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology.* 1991; 185: 120-131. doi: 10.1016/0042-6822(91)90760-9

- Tam AW, White R, Yarbough PO, Murphy BJ, McAtee CP, Lanford RE, Fuerst TR. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary Cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology.* 1997;238(1):94-102. doi:10.1006/viro.1997.8817

- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol and Evol.* 1993; 10: 512-526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

- Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 2007; 88:903-911. doi: 10.1099/vir.0.82535-0

- Taylor DW, Bobbili N, Kayatani A, Tassi Yunga S, Kidima W, Leke RFG. Measuring antibody avidity to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens using 206

- a multiplex immunoassay approach. *Malar J.* 2020; 19: 171. doi: 10.1186/s12936-020-03243-3
- Tavitian S, Peron JM, Huynh A, Mansuy JM, Ysebaert L, Huguet F, Vinel JP, Attal M, Izopet J, Recher C. Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J Clin Virol.* 2010; 49: 141-144. doi: 10.1016/j.jcv.2010.06.016
- Theochari E, Vincent-Smith L, Ellis C. Neuralgic amyotrophy complicating acute hepatitis E infection: A rare association. *BMJ Case Rep.* 2015; 2014-2016. doi:10.1136/bcr-2014-207669
- Ticehurst J, Popkin TJ, Bryan JP, Innis BL, Duncan JF, Ahmed A, Iqbal M, Malik I, Kapikian AZ, Legters LJ, Purcell RH. Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis on Pakistan: serologic responses and pattern of virus excretion. *J Med Virol.* 1992; 36: 84-92. doi: 10.1002/jmv.1890360205
- Trémeaux P, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Peron J-M, Alric L, Kamar N, Izopet J, Abravanel F. Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection. *J Clin Virol.* 2016; 79: 1-5. doi: 10.1016/j.jcv.2016.03.019
- Tsarev SA, Emerson SU, Reyes GR, Tsareva TS, Legters LJ, Malik IA, Iqbal M, Purcell RH. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 559–563. doi: 10.1073/pnas.89.2.559
- Tsarev SA, Binn LN, Gomatos PJ, Arthur RR, Monier MK, van Cuyck-Gandre H Longer CF, Innis BL. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J Med Virol.* 1999; 57: 68-79. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199901)57:1<68::aid-jmv10>3.0.co;2-e

- US Food and Drug Administration. Drug safety communication: FDA warns about the risk of hepatitis B reactivating in some patients treated with direct-acting antivirals for hepatitis C. Disponible en:

<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm522932.htm>.

- Van Alfen N. Clinical and pathophysiological concepts of neuralgic amyotrophy. *Nat Rev Neurol.* 2011; 7: 315-322. doi: 10.1038/nrneurol.2011.62.

- Van den Berg B, van der Eijk AA, Pas SD, Hunter JG, Madden RG, Tio-Gillen AP, Dalton HR, Jacobs BC. Guillain-Barre syndrome associated with preceding hepatitis E virus infection. *Neurology.* 2014; 82: 491-497. doi: 10.1212/WNL.0000000000000111

- Van Eijk JJJ, Van Alfen N, Berrevoets M, Van Der Wilt GJ, Pillen S, Van Engelen BGM. Evaluation of prednisolone treatment in the acute phase of neuralgic amyotrophy: an observational study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009; 80: 1120-1124. doi: 10.1136/jnnp.2008.163386

- Van Eijk JJJ, Madden RG, Van Der Eijk AA, Hunter JG, Reimerink JHJ, Bendall RP, Pas SD, Ellis V, Van Alfen N, Beynon L, Southwell L, McLean B, Jacobs BC, Van Engelen BGM, Dalton HR. Neuralgic amyotrophy and hepatitis E virus infection. *Neurology.* 2014; 82: 498-503. doi: 10.1212/WNL.0000000000000112

- Van Eijk JJJ, Grootenhuis JT, Van Alfen N. Neuralgic amyotrophy: an update on diagnosis, pathophysiology, and treatment. *Muscle Nerve.* 2016; 53: 337-350. doi: 10.1002/mus.25008

- Van Eijk JJ, Madden RG, van der Eijk AA, Hunter JG, Reimerink JH, Bendall RP, Pas SD, Ellis V, van Alfen N, Beynon L, Southwell L, McLean B, Jacobs BC, van Engelen BG, Dalton HR. Neuralgic amyotrophy and hepatitis E virus infection. *Neurology.* 2016; 82: 498-503. doi: 10.1212/WNL.0000000000000112

- Velay A, Kack-Kack W, Abravanel F, Lhomme S, Leyendecker P, Kremer L, Chamouard P, Izopet J, Fafi-Kremer S, Barth H. Parsonage-Turner syndrome due to autochthonous acute genotype 3f hepatitis E virus infection in a nonimmunocompromised 55-year-old patient. *J Neurovirol.* 2017; 23(4): 615-620. doi:10.1007/s13365-017-0525-0
- Vina-Rodriguez A, Schlosser J, Becher D, Kaden V, Groschup MH, Eiden M. Hepatitis E virus genotype 3 diversity: phylogenetic analysis and presence of subtype 3b in wild boar in Europe. *Viruses.* 2015; 7: 2704-2726. doi:10.3390/v7052704
- Wallace SJ, Webb GW, Madden RG, Dalton HC, Palmer J, Dalton RT, Pollard A, Martin R, Panayi V, Bennett G, Bendall RP, Dalton HR. Investigation of liver dysfunction: who should we test for hepatitis E? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017;29(2):215-220. doi: 10.1097/MEG.0000000000000781
- Wang JT, Lin JT, Sheu JC, Wang TH, Chen DS. Hepatitis E virus and post-transfusion hepatitis. *J Infect Dis.* 1994; 169: 229-230. doi: 10.1093/infdis/169.1.229
- Wang Y, Zhao C, Qi Y, Geng Y. Hepatitis E Virus. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 948: 1-16. doi: 10.1007/978-94-024-0942-0_1
- Webb GW, Dalton HR. Hepatitis E: an underestimated emerging threat. *Ther Adv Infect Dis.* 2019; 6:2049936119837162. doi: 10.1177/2049936119837162.
- Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. *Gastroenterology.* 2012; 142: 1388-1397. doi: 10.1053/j.gastro.2012.02.014
- Woolson K, Forbes A, Vine L, Beynon L, McElhinney L, Panayi V, Hunter JG, Madden RG, Glasgow T, Kotecha A, Dalton HC, Mihailescu L, Warshaw U,

Hussaini HS, Palmer J, Mclean BN, Haywood B, Bendall RP, Dalton HCR. Extrahepatic manifestations of autochthonous hepatitis E infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014; 40: 1282-1291. doi: 10.1111/apt.12986

- World Health Organization (WHO). A Systematic Review on Hepatitis E Virus Globally. Geneva: WHO; 2014. Disponible en: http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/october/7_summary_HEV_systematic_review.pdf

- Wu WC, Su CW, Yang JY, Lin SF, Chen JY, Wu JC. Application of serologic assays for diagnosing acute hepatitis E in national surveillance of a nonendemic area. *J Med Virol.* 2014; 86: 720-728. doi: 10.1002/jmv.23785

- Xing L, Li TC, Mayakaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, Wang CY, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Cheng RH. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dopendent viral assembly pathway. *J Biol Chem.* 2010; 285: 33175-33183. doi: 10.1074/jbc.M110.106336

- Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J Virol.* 2016; 90(8): 4232-4242. doi: 10.1128/JVI.02804-15

- Yu C, Engle RE, Bryan JP. Detection of immunoglobulin M antibodies by class capture immunoassay. *Clin Diag Lab Immunol.* 2003; 10: 579-586. doi: 10.1128/cdli.10.4.579-586.2003

- Zaki Mel-S, Found MF, Mohamed AF. Value of hepatitis E virus detection by cell culture compared with nested PCR and serological studies by IgM and IgG. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 56: 73-79. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00552.x

- Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, Tanzi E, Fabris P, Dawson GJ, Mushahwar IK. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol.* 1999; 57: 356-360. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199904)57:4<356::aid-jmv5>3.0.co;2-d
- Zhang JZ, Im SW, Lau SH, Chau TN, Lai ST, Ng SP, Peiris M, Tse C, Ng TK, Ng MH. Occurrence of hepatitis E virus IgM, low avidity IgG serum antibodies, and viremia in sporadic cases of Non-A, -B, and -C acute hepatitis. *J Med Virol.* 2002; 66: 40-48. doi: 10.1002/jmv.2109
- Zhang J, Ge SX, Huang GY, Li SW, He ZQ, Wang YB, Zheng YJ, Gu Y, Ng MH, Xia NS. Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. *J Med Virol.* 2003; 71: 518-26. doi: 10.1002/jmv.10523
- Zhang J, Shih JW, Wu T, Li SW, Xia NS. Development of the hepatitis E vaccine: from bench to field. *Semin Liver Dis.* 2013; 33: 79-88. doi: 10.1055/s-0033-1338116
- Zhang H, Rao H, Wang J, Wang Z, Kong X, Wei L. Role of HEV antigen detection for diagnosis of acute hepatitis E. 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Washington, DC, October 20-24, 2017. Abstract 760
- Zhao C, Wang Y. Laboratory diagnosis of HEV Infection. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 948: 191-209. doi: 10.1007/978-94-024-0942-0_11
- Zhou H, Jiang CW, Li LP, Zhao CY, Wang YC, Xu YW, Chen XF. Comparison of the reliability of two ELISA kits for detecting IgM antibody against hepatitis E virus. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2008; 42: 667-671

8. ANEXOS

Anexo I: Informe Dictamen Favorable Comité Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón.



Departamento de Salud

Informe Dictamen Favorable
Trabajos académicos
C.P. - C.I. PI19/164
22 de mayo de 2019

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 22/05/2019, Acta Nº 10/2019 ha evaluado la propuesta del Trabajo:

Título: Hepatitis E en Aragón.

Alumna: Claudia Mendoza López
Director: Rafael Benito Ruesca

Versión protocolo: Versión B. 10/05/2019

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.
- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, el adecuado tratamiento de los datos en cumplimiento de la legislación vigente y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización.
- Se admite como excepción la revisión retrospectiva de historias sin el consentimiento de los pacientes, con la autorización de la dirección del centro.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza

GONZALEZ
HINJOS MARIA - MARIA - DNI 038574568
DNI 038574568 1839.30 +02'00"

María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

Anexo II. Revisión de la literatura sobre síndrome Parsonage-Turner e infección por VHE.

Ref.	Año	Edad	Sexo	DTS	VHE ARN	VHE IgM/IgG	AST/ALAT (U/mL)	Tratamiento	Resolución	EMG/IRM	Fuente de infección	Mono o Bilateral	País	Genotipo
Fong and Illahi (2009)	2009	53	M	0	ND	+/ND	247/2547	Fisioterapia	Completa 2 años	EMG: denervación irregular musculos serrato y supraspinoso. IRM: Protuberancia disco intervertebral en C6/C7	Viaje Ecuador	Bilateral, D>I	Reino Unido	ND
Rianthavorn <i>et al.</i> (2010)	2010	49	M	7	+	+/ND	155/795	ND	Parcial 10 meses, debilidad residual	EMG: NA cervical izquierda. IRM: cambios degenerativos en discos intervertebrales C4-6	ND	Bilateral, I>D	Tailandia	3
Kamar <i>et al.</i> (2011)	2011	38	M	5	+	+ / +	ND/1160	Nada	Parcial 18 meses, debilidad residual	EMG: denervación de supraspinoso, infraspinoso y triceps. IRM:ND	ND	Bilateral, D>I	Reino Unido	3e
Carli <i>et al.</i> (2012)	2012	30	M	7	ND	+/ND	517/1518	Esteroides	Mejoría parcial.	EMG: ND. IRM: ND	ND	Bilateral, I>D	Francia	ND
Inghilleri <i>et al.</i> (2012)	2012	28	M	1	ND	+/ND	147/1007	ND	15 días dolor	EMG: señal neurogénica en músculos derecho supraspinoso y bíceps derecho. IRM: ND	Salchichas Figatelli	Bilateral	Francia	ND
Cheung <i>et al.</i> (2012)	2012	56	M	1	+	+/ND	243/ ND	Nada	10 meses dolor persistente.	EMG: ND. IRM: ND	Salchichas Figatelli	Bilateral	Reino Unido	3
Moisset <i>et al.</i> (2014)	2013	36	M	7	+	+/ND	554/1707	RBV + IV Ig + Fisioterapia	Parcial 6 meses.	EMG: denervación músculos supraspinoso, infraspinoso, subescapular y deltoides. IRM: NP	ND	Bilateral	Francia	3f
Motte <i>et al.</i> (2014)	2013	52	M	7	+	+ / +	179/590	ND	Mejoría parcial en 3 meses	EMG: denervación en deltoides izquierdo. IRM: lesiones degenerativas disco	ND	Bilateral, I>D	Francia	3f
Deroux <i>et al.</i> (2014)	2014	38	M	ND	-	+/ND	772/1612	Nada	Parcial 4 meses, amiotrofia persistió.	EMG: denervación en suprascapular. IRM: ND	ND	Monolateral, I	Francia	ND
		30	M	ND	+	+ / +	ND/1160	ND	Parcial 12 meses, discapacidad funcional a largo plazo	EMG: daño plexo braquial. IRM: ND	ND	Bilateral	Reino Unido	3
Woolson <i>et al.</i> (2014)	2014	30 approx.	M	ND	+	+ / +	N/319	ND	Parcial 12 meses, discapacidad funcional a largo plazo	EMG: daño plexo braquial. IRM: ND	ND	Bilateral	Reino Unido	3
		30 approx.	M	ND	- (3 meses después)	+ / +	ND/27 (3m)	ND	Parcial 12 meses, discapacidad funcional a largo plazo	EMG: daño plexo braquial. IRM: ND	ND	Bilateral	Reino Unido	ND
Van Eijk <i>et al.</i> (2014)	2014	37	M	1	0	+ / +	113/313	ND	Lenta recuperación, debilidad residual	EMG: ND. IRM: ND	ND	Bilateral, I>D	Reino Unido	ND
		35	M	90	-	+ / +	ND/ND	ND	Lenta recuperación, debilidad residual	EMG: ND. IRM: ND	ND	Bilateral, D>I	Reino Unido	ND

		40	F	4	+	+ / +	177/183	ND	Lenta recuperación, debilidad residual	EMG: ND. IRM: ND	ND	Bilateral, D>I	Holanda	3
		36	M	15	+	+ / +	64/34	ND	Lenta recuperación, debilidad residual	EMG: ND. IRM: ND	ND	Bilateral, D>I	Holanda	ND
		34	M	7	+	+ / +	86/76	ND	Lenta recuperación, debilidad residual	EMG: ND. IRM: ND	ND	Bilateral, D>I	Holanda	ND
		51	M	ND	+	+ / +	897/1334	RBV + IV/g	Completa	†/IRM: ND	ND	Bilateral	Francia	ND
Blasco-Perrin <i>et al.</i> (2015)	2015	55	F	ND	+	+ / +	1330/1900	Nada	Debilidad residual 126 semanas	†/IRM: ND	ND	Bilateral	Francia	ND
		56	M	ND	ND	+ / +	601/1376	Nada	Debilidad residual 42 semanas	†/IRM: ND	ND	Bilateral	Francia	ND
		56	M	ND	Suero +, Heces +	+ / +	135/495	RBV + IV/g	Debilidad residual 16 semanas	†/IRM: ND	ND	Bilateral	Francia	3f
Décard <i>et al.</i> (2015)	2015	47	M	21	ND	+ / +	221/106	Fisioterapia	Debilidad residual 12 meses	EMG: actividad patológica espontánea músculo deltoides, serrato y romboides y plexo braquial. IRM: hipertrofia del plexo braquial	ND	Bilateral, D>I	Suiza	ND
Theochari <i>et al.</i> (2015)	2015	65	M	3	ND	+ / +	167/1368	Esteroides	10 meses completa	EMG: denervación plexo braquial. IRM: NP	Manipulación estiercol caballo	Bilateral, D>I	Reino Unido	ND
Martínez Rodríguez <i>et al.</i> (2015)	2015	41	M	5	- (2 meses después)	+ / ND	481/1270	ND	Debilidad residual	EMG: denervación plexo braquial. IRM: NP	ND	Monolateral, D	España	ND
		54	M	ND	+	+ / ND	259/1036	Fisioterapia, analgésicos y esteroides.	10 meses ortopnea y dolor hombro derecho	EMG: denervación y señal neurogénica en músculos en regiones irrigadas por C5-C6. IRM: ND.	ND	Bilateral	Francia	3f
Darvetel <i>et al.</i> (2015)	2015	54	M	ND	Suero +, Heces +	+ / ND	332/812	Fisioterapia	deficiencia motora	EMG: implicación de la raíz del C6 derecho. IRM: fuerte señal T2	ND	Bilateral	Francia	3f
		40	F	5	ND	+ / -	438/1305	IV/g	12 meses, hipoesfisia.	EMG: denervación de ambos miembros superiores. IRM: ND.	ND	Bilateral	Francia	3f
		51	F	ND	Suero +, Heces +	+ / ND	ND/ND	IV/g	10 meses disnea persistía	EMG: reinnervación de varios músculos del miembro superior derecho. IRM: NP	ND	Monolateral, D	Francia	ND
		59	M	ND	+ / +	32/88	Fisioterapia	ND	EMG: denervación a nivel C5-C6 y C7. IRM: ND.	ND	Bilateral	Francia	ND	
Ávila <i>et al.</i> (2016)	2016	52	M	-	ND	+ / +	154/708	Esteroides	Debilidad residual 5 meses, ortopnea.	EMG: denervación y señal neurológica en varios músculos en la región irrigada por C5-C6. IRM: NP.	Viaje Méjico	Bilateral, I>D	EEUU	ND
Silva <i>et al.</i> (2016)	2016	51	M	2	+	+ / +	1234/2579	AINES + opiáceos + IV/g	Completa 12 meses	EMG: reclutamiento disminuido de músculos supraespínoso, infraespínoso, prontator, flexor. IRM: NP	ND	Bilateral, I>D	Suiza	3

Altuna azkargorta et al. (2016)	2016	60	M	7	ND	+ /+	553/1091	AINES + esteroides + opiáceos	4 meses, dolor residual	EMG: denervación en músculos deltoides, biceps y infraspinatus derechos. IRM: miopatia por denervación. Alteración de la señal en músculo deltoides	ND	Bilateral, D>I	España	ND
Pischke et al. (2016)	2016	39	F	2	ND	+/ND	>140/>280	IVIg + fisioterapia	4 meses completa	EMG: denervación en ambos músculos deltoides y biceps. IRM: NP.	ND	Bilateral, I>D	España	ND
Bisciglia et al. (2017)	2017	46	M	1	+	ND/ND	495/1152	RBV	Completa 1 mes	EMG: daño motor en plexo braquial derecho. IRM: ND	ND	Bilateral, D>I	Alemania	ND
Velay et al. (2017)	2017	50	F	14	+	ND / +	812/2086	Opiáceos+ AINES + esteroides + fisioterapia	Parcial 5-9 meses, paresia residual y pérdida de sensibilidad.	EMG: disfunción sensorial y motora del plexo braquial. IRM: hipertrofia y señal hiper sensible del segmento proximal izquierdo de las raíces del plexo braquial	ND	Monolateral, I	Bélgica	3
Scanyon et al. (2017)	2017	42	M	1	+	+ /+	>1500/>1500	RBV + IVIg	Recuperación parcial 2 meses.	EMG: denervación bilateral irregular del plexo braquial. IRM: Incrementada señal T2 en plexo braquial.	ND	Bilateral, D>I	Francia	3f
Fraga et al. (2018)	2017	45-62	M	ND	+	ND/ND	99/2579	Fisioterapia	12 meses, hipoesferia persistente y paresis n. frénico.	EMG: paresis frénica bilateral. IRM: hipersensibilidad del infraspinoso derecho. Miositis.	ND	Salchichas Figatelli	Francia	3f
Dalton et al. (2017)	2017	44	M	ND	+	ND/ND	99/2579	ND	Recuperación parcial 2 años, déficit motor menor	EMG: ND. IRM: ND.	ND	ND	Suiza	3
		45-62	M	ND	+	ND/ND	99/2579	ND	Recuperación parcial 2 años, déficit motor menor	EMG: ND. IRM: ND.	ND	ND	Suiza	3
		45-62	M	ND	+	ND/ND	99/2579	ND	Recuperación parcial 2 años, déficit motor menor	EMG: ND. IRM: ND.	ND	ND	Suiza	3
		45-62	M	ND	+	ND/ND	99/2579	ND	Recuperación parcial 2 años, déficit motor menor	EMG: ND. IRM: ND.	ND	ND	Suiza	3
		45-62	M	ND	+	ND/ND	99/2579	ND	Recuperación parcial 2 años, déficit motor menor	EMG: ND. IRM: ND.	ND	ND	Suiza	3
		45-62	M	ND	+	ND/ND	99/2579	ND	Recuperación parcial 2 años, déficit motor menor	EMG: ND. IRM: ND.	ND	ND	Reino Unido	ND
		52	M	2	+	+ /+	ND/92	Esteroides	4 meses, insensibilidad residual	EMG: denervación bilateral plexo braquial. IRM: ND.	ND	Bilateral, D>I	Holanda	3

Electromiografía: Trípticos: Días trás síntomas: ND. No datos; AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; EMG: Electromiografía; IRM:Imagen por Resonancia Magnética; NP: No patológico; †: en 3 pacientes, EMG denervación bilateral regular. Tronco superior del plexo braquial; RBV: Rhabdovirus; IgG: Immunoglobulina interváscena; ANES: Antinflamatorios no esteroides.