



**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE QUIMICA Y FARMACIA**

Profesor Patrocinante: Dra. Stella Riedemann G.  
Instituto de Microbiología  
Facultad de Ciencias

Profesor Copatrocinante: Dr. Humberto Ibarra V.  
Instituto de Medicina  
Facultad de Medicina

**DETECCION DEL VIRUS HEPATITIS E (VHE) MEDIANTE RT-PCR Y M.E.  
EN AGUAS SERVIDAS, HECES DE PORCINOS Y SUEROS HUMANOS  
EN VALDIVIA, X REGION, CHILE**

**Tesis de grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al Título de Químico Farmacéutico**

**MAURICIO DANIEL RUIZ HIPP**

VALDIVIA - CHILE

2005

**Gottes Ruh und Frieden sei  
Diesem Haus beschieden**

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a:

Dra. Stella Riedemann, por la ayuda y tiempo dedicado en la realización de ésta investigación.

Dr. Humberto Ibarra, por su paciencia y tiempo en la culminación de este proyecto.

Dr. Germán Reinhardt por su apoyo y cooperación en la finalización de este estudio.

Dra. Ana Cayul Riffo, por su tiempo, ayuda, paciencia y por sobre todo su amistad, que ha permitido la realización de este trabajo.

Dra. Angara Zambrano, por su paciencia, consejos y tiempo para con el desarrollo de este proyecto.

A todas las personas que trabajan en el Instituto de Microbiología, personal Académico, Técnico Académico y Administrativo.

A mi familia y amigos por su paciencia, tiempo, fe y confianza en que lograría alcanzar la meta de esta importante etapa de mi vida.

**INDICE**

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>5</b>
<b>MATERIAL Y METODO</b>	<b>13</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>37</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>40</b>

## 1. RESUMEN

### **DETECCION VHE MEDIANTE RT-PCR Y M.E. EN AGUAS SERVIDAS, HECES DE PORCINOS Y SUEROS HUMANOS EN VALDIVIA, X REGION, CHILE**

La hepatitis es una reacción inflamatoria del hígado, principalmente causada por virus. Dicha enfermedad es de alta prevalencia en países en desarrollo con escasas políticas sanitarias en cuanto a tratamiento de aguas residuales y potabilización. Los agentes etiológicos más frecuentes son virus denominados alfabéticamente de la A a la E, siendo de especial interés el virus de la hepatitis E (VHE) por su similitud con el virus de la hepatitis A (VHA). El objetivo de la investigación fue desarrollar un protocolo para la detección del VHE en aguas servidas, heces de porcino y sueros humano en Valdivia, X Región, Chile.

El estudio se realizó entre Diciembre de 2003 y Septiembre de 2004, en donde se analizaron, 10 muestras de aguas servidas tomadas de la red de alcantarillado y planta de tratamiento de aguas servidas (pre y post tratamiento), 5 muestras de sueros humanos positivas a ELISA IgG, 14 muestras de heces de porcinos serológicamente positivos a ELISA IgG y macerado de 14 hepatopancreas de *Mytilus chilensis* alimentados con aguas servidas de la red de alcantarillado. Para la detección del VHE se utilizaron protocolos estandarizados de extracción de ARN (ácido ribonucleico) y RT-PCR (Transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa) en aguas servidas, sueros humano, heces de cerdo y hepatopancreas con secuencias genómicas humanas y de cerdo. Además la última muestra de hepatopancreas del grupo de ensayo fue seleccionada para realizar microscopía electrónica.

En las muestras analizadas por RT- PCR no se detectó VHE en aguas servidas concentradas, sueros humanos, fecas de porcino ni moluscos. La no detección de VHE humano o porcino por RT-PCR puede deberse a que existan variables genómicas de VHE presente en Chile no detectadas por los partidores utilizados.

**Financiamiento DID-S-200379**

## SUMMARY

### HEV DETECTION THROUGH RT-PCR AND M.E. IN SEWAGE WATER, SWINE FAECES AND HUMAN SERUM IN VALDIVIA, X REGION, CHILE

Hepatitis is a liver inflammation, mainly caused by viruses. This illness is highly prevalent in underdeveloped countries with lack of sanitary policies regarding sewage and drinking water. Viruses are considered the most frequent etiologic agents and are called alphabetically from A to E. Hepatitis E virus (HEV) is of particular interest due to its similarity to hepatitis A virus (HAV).

The aim of this study was to develop a protocol for the detection of HEV in sewage water, swine faeces and human serum samples in Valdivia city, X region, Chile.

Ten samples from the sewage systems and from the water treatment plant (pre and post treatment), 5 human serum samples positive to ELISA IgG, 14 samples of swine faeces positive to ELISA IgG and 14 macerated hepatopancreas of *Mytilus chilensis* cultured in sewage waters the sewage systems were analyzed between December 2003 and September 2004.

For the HEV detection, standard protocols of extraction for RNA (ribonucleic acid) and RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) on human serum samples, swine faeces and mussel hepatopancreas, using human and swine primers. Additionally the last sample of mussel hepatopancreas was selected in order to carry out an electron microscopy.

From the samples analyzed by RT-PCR, neither sewage water nor swine faeces, human serum and mussels, HEV was detected. The lack of detection of both human or swine HEV by RT-PCR, can be explained by genomic variables of HEV present in Chile that are not detected by the primers used.

**Financing DID-S-200379**

## 2. INTRODUCCIÓN

Hepatitis significa inflamación del hígado cualquiera sea su etiología, la que puede deberse a causas no infecciosas, tales como el exceso de ingesta de alcohol o uso inadecuado de medicamentos (Soza, 2004). Sin embargo, con mayor frecuencia se atribuye a un proceso infeccioso asociado a diferentes virus (Krugman, 1992; Ramos-Soriano y Schwarz, 1994). Dentro de los virus hepatotrópicos ligados a una hepatitis infecciosa existen aquellos actualmente denominados alfabéticamente de la A a la E y otros nombrados según sus síntomas característicos como por ejemplo el Citomegalovirus y virus Epstein-Barr, entre los más conocidos (Peña, 2002).

Pese a que se han realizado innumerables estudios acerca de los agentes etiológicos de la hepatitis infecciosa, fue recién en la segunda mitad del siglo XX que se prestó especial atención a los brotes epidémicos de hepatitis en países en desarrollo, donde el suministro de agua a veces se contamina con fecas. Fue así, como se reportó en 1955 en Nueva Delhi, India la presencia de un virus de la hepatitis que no correspondía a lo esperado, denominándose no A no B (Wong y col., 1980). Por otro lado, Khuroo y col.(1980) confirmaron que una epidemia de hepatitis viral ocurrida en el valle de Cachemira se había producido por un virus hepático de transmisión entérica no A no B, que posteriormente fue denominado como virus de la hepatitis E (VHE) (Quintana-González, 2003).

El período de incubación del VHE es de 2 a 9 semanas con un promedio de 6 semanas (Hsieh y col., 1998). La viremia y detección del virus en las heces ocurre en la fase preictérica y dura entre 10 y 15 días en el estado clínico, la aparición de los síntomas ocurre entre el día 28 y 30 post-exposición (Chauhan y col., 1993; Emerson y Purcell, 2003). Las manifestaciones clínicas de una hepatitis provocada por cualquiera de los cinco agentes anteriormente mencionados son aparentemente idénticas, sin embargo, las características relacionadas a la persistencia de cada uno de estos virus son altamente variables, presentando individuos sintomáticos y asintomáticos, los que pueden presentar dolor abdominal, náuseas, vómitos, fiebre, orina oscura y hepatomegalia entre otros (Clayson y col., 1995a; Evans y Kaslow, 1997; Safari, 2001). Por otro lado, al examen bioquímico los individuos infectados crónicamente pueden presentar valores por sobre lo normal de gamma glutamil transpeptidasa (GGT), alanina amino transferasa (ALT) y bilirrubina, indicando inflamación o daño hepático (Clayson y col., 1995a).

La vía de transmisión de las hepatitis B, C y D (VHB, VHC, VHD, respectivamente) es principalmente parenteral (Peña, 2002). Por otra parte, los virus de la hepatitis A y E (VHA y VHE) son agentes infecciosos entéricos, que se encuentran fundamentalmente en agua y alimentos contaminados con fecas que contienen el virus en concentraciones suficientes para provocar una infección (Peña, 2002; Valdivieso, 2003).

La prevalencia de anticuerpos anti VHE en diversos países varía entre 1.4% y 24.5% (Paul y col., 1994; WHO, 2001) es así como, en donantes de sangre de Europa Central y Norte de América la prevalencia es de 1.4% y 2,5%, respectivamente. Por otro lado, se ha detectado amplios rangos de prevalencia de VHE en África del Sur (1.4%), Tailandia (2.8%), Arabia



Saudita (9.5%) y Egipto (24%) (WHO, 2001). En el caso de países sudamericanos, en Chile, en las ciudades de Santiago y Valdivia, se han realizado estudios epidemiológicos detectando anticuerpos anti VHE en diferentes grupos poblacionales, observándose una prevalencia de un 4% a un 7% (Brahm y col., 1996; Ibarra y col., 1997).

En países en desarrollo el VHE es el mayor agente causal de grandes epidemias de hepatitis aguda y esporádica como es el caso de India, Nepal, Myanmar (Burma) y China. Sin embargo, también se han reportado pequeñas epidemias en Kyrghyza, Tajikistan, Pakistán, Hong Kong, Argelia, Costa de Marfil, Somalia, Kenya y México entre otros (Evans y Kaslow, 1997), presentándose endémicamente asociado a las pobres condiciones sanitarias y socioeconómicas de la población, principalmente por la contaminación de las aguas con productos fecales y una deficiente potabilización de aguas con un escaso o ausente tratamiento de aguas servidas (Maneerat y col., 1996; Clayson y col., 1998; Harrison, 1999; Schlauder y col., 1999; Wu y col., 2000; Safary, 2001; Wang y col., 2002).

Se ha determinado que aproximadamente el 7% de casos de hepatitis aguda en adultos en Chile corresponden a VHE (Ibarra y col., 1997), encontrándose que la edad específica de la presencia de anticuerpos anti VHE en donde la enfermedad es endémica sugiere una baja tasa de infección en niños menores de 15 años (0,2 – 3,0%) y una tasa mas alta en adultos de entre 20 y 30 años (3,0 – 10%) (Clayson y col., 1995b; Evans y Kaslow, 1997).

Debido a los recientes avances en la ciencia se ha clasificado el VHE en cuatro genotipos (Nishizawa y Masaharu, 2003) u ocho grupos (Schlauder y Mushahwar, 2001). Genotipo I presente en varios países de Asia y África, genotipo II México y Nigeria, genotipo III USA, Argentina y Europa y genotipo IV China y Taiwán. Grupo 1 varios países de África y

Asia, grupo 2 México y Nigeria, grupo 3 USA, grupo 4 Italia, Nueva Zelanda, grupo 5 Grecia, España, grupo 6 Grecia, grupo 7 Argentina, Austria y grupo 8 China, Taiwán.

La microscopía electrónica ha revelado que por su morfología pertenecería a un virus de la familia Caliciviridae, mide entre 27 y 34 nm de diámetro, careciendo de envoltura. El genoma viral consiste en una cadena ARN monocatenario con polaridad positiva de aproximadamente 7.5 Kb, que se replica en el citoplasma de los hepatocitos (Reyes y col., 1990; Van Cuyck-Gandre y col., 1997; Meng y col., 1998; Chandler y col., 1999; Williams y col., 2001; Choi y col., 2003).

Existen tres marcos abiertos de lectura (ORF o MAL), que codifican diferentes polipéptidos estos incluyen MAL 1 que es una proteína no estructural, MAL 2 representa a la cápside proteica y MAL 3, asociado a fosfoproteínas (Kabrane-Lazizi y col., 2001; Qi y col., 1995).

El MAL 1 es la región genética de hipervariabilidad, mientras que los MAL 2 y 3 se mantienen conservadas, por lo que la expresión de estas proteínas recombinantes se usan en el desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos específicos para la detección de anticuerpos anti-VHE (Favorov y col., 1994; Kabrane-Lazizi y col., 2001).

El genoma de los tres prototipos de secuencia de VHE de Burma (B1 y B2), México (M1) y Estados Unidos (US1 y US2) tienen una secuencia de ácido nucleico con una identidad de 74 - 76% presentando una semejanza de entre un 82 - 84%, 90 - 93% y de un 79 - 87% para cada uno de los MALs respectivamente (MAL 1, MAL2, MAL3) (Schlauder y col., 1999).

Por otro lado, se ha estado analizando la importancia de evaluar o comparar los virus de hepatitis E humano y de cerdo ya que en algunas regiones de alta endemia pudieran pertenecer a similares genotipos (Arankalle y col., 2002). Recientes determinaciones de la secuencia nucleotídica de los extremos 5' y 3' del genoma del VHE de porcino sugieren que los tipos US-1 y US-2 del VHE humano pueden ser de origen porcino (Haqshenas y Meng, 2001; Huang y col., 2002a). Del mismo modo, hay demostraciones de una alta prevalencia de anti VHE en porcinos de uso comercial en distintas regiones de Norte América, lo que podría ser indicador de que los cerdos serían reservorios de VHE, pudiendo ser transmisores de infección de un país a otro (Halbur y col., 2001; Yoo y col., 2001; Wu y col., 2002).

Es así como existen diversos estudios que sindicarían a este tipo de hepatitis como una zoonosis, ya que se ha detectado el VHE en otras especies animales, como es el caso de estudios realizados en Vietnam que reportaron un 36% de anticuerpos anti VHE en cerdos, 44% en aves de corral, 27% en perros y 9% en ratas (Arankalle y col., 2001; Huang y col., 2002b). Además, investigaciones realizadas en diferentes partes del mundo confirman la presencia de anticuerpos contra VHE en ratas en un 77% en Maryland, 90% en Hawai y 44% en Lousiana (Kabrane-Lazizi y col., 1999). Son aún mas interesantes los estudios que determinan que ciertos grupos humanos como los veterinarios, tienen una prevalencia más alta de anticuerpos anti VHE que aquellos que no tienen un contacto estrecho con posibles reservorios del virus (Drobeniuc y col., 2001; Meng y col., 2002; Choi y col., 2003).

Es importante hacer notar que la presencia de anticuerpos anti VHE no sólo se debe asociar a condiciones socioeconómicas deficitarias o transmisión vía feco oral ya que, estudios realizados en el Norte de California demuestran la presencia de un 31 - 38% de individuos con anticuerpos anti VHE que no han tenido historial de viajes a regiones endémicas. (Meng, 2000).

Asimismo, la mayoría de los pacientes que se mantienen en hemodiálisis y que tienen un historial de transfusiones presentan una prevalencia de 9,3% de anticuerpos anti VHE. (Mitsui y col., 2004). También, prisioneros y consumidores de drogas presentan un 16,9% y los homosexuales un 16% en estudios realizados en Europa (Mansuy y col., 2004).

En general la tasa de mortalidad por hepatitis es muy baja (1%) sin embargo, en mujeres embarazadas este porcentaje puede llegar a un 15- 20% en el tercer trimestre por causas que aún no están claras (Borhanmanesh y col., 1973; Khuroo y col., 1995; Clayson y col., 1998).

En cuanto al diagnóstico del VHE según sea el caso se puede realizar Western blot, (Tsarev y col., 1993; Hyans y col., 1992). Sin embargo los métodos más usados para el diagnóstico de la hepatitis E han sido la inmunoelectromicroscopía (IEM) y la prueba de bloqueo de anticuerpos fluorescentes (Faba) (Clayson y col., 1995a), métodos problemáticos por ser poco sensibles y que sólo se realizan en unos pocos centros especializados. Por otro lado, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método muy sensible y específico pudiendo detectar el genoma viral en la bilis, sangre, hígado y heces, siendo muy usado principalmente en investigación (Hsieh y col., 1998). Cabe destacar que el método sugerido como herramienta de investigación es caro y no puede usarse como diagnóstico de rutina, siendo el enzaimunoensayo (ELISA) el método más conveniente y fácilmente disponible para detección de IgM e IgG anti VHE. La IgG anti VHE se usa para estudios seroepidemiológicos, ya que puede permanecer por más de 14 años (Khuroo y col., 1993).

De acuerdo a las evidencias actuales, y dada la distribución universal de esta infección podemos plantear la posibilidad que el VHE esté presente en Chile, más aún si se tiene presente la descripción de un caso clínico en Valdivia (Ibarra y col., 1994). Dado que puede

tratarse de una zoonosis, sería importante investigar con mayor acuciosidad su significado en el ambiente, debido principalmente a estudios que han demostrado la presencia de anticuerpos anti VHE por ELISA en suinos en Chile (Reinhardt y col., 2003) y otras regiones del mundo (Wang y col., 2002). Sin embargo, no se ha detectado el virus por técnicas de biología molecular, especialmente en el cerdo que pudiera ser reservorio y fuente de diseminación.

Debido a la similitud de transmisión de este tipo hepatitis con la hepatitis A, se podría asumir que sería posible pesquisar su presencia en alimentos de consumo común en Chile, como son los moluscos bivalvos en que se demostró la capacidad de concentración de VHA, y por lo tanto suponer que estos moluscos también serían capaces de concentrar el VHE (Enriquez y col., 1992).

Finalmente, considerando los estudios de prevalencia de VHE en Valdivia, X Región, Chile, que confirman la presencia del virus durante la época estival, se plantea la posibilidad detectar el VHE en agua, por ser el principal vehículo de transmisión, pudiendo encontrarse fundamentalmente en aguas servidas.

HIPOTESIS: La investigación microbiológica moderna en nuestro país enfrenta un alto porcentaje de posibilidades de detectar el VHE en aguas servidas, heces de porcino y suero humano.

La presente investigación tiene como objetivo general:

1. Desarrollar un protocolo para la concentración, aislamiento del ácido nucleico, extracción, amplificación e identificación del VHE.

Para poder lograr el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Concentración del VHE, con filtros millipore.
2. Concentración del VHE en *Mytilus chilensis*..
3. Extracción del ARN posiblemente presente en: las muestras de agua concentradas en filtros millipore y en *Mytilus chilensis*, sueros humanos y heces de porcino.
4. Aplicación del sistema de transcriptasa reversa para la obtención de ADNc del VHE.
5. Amplificación del ADNc del VHE hipotéticamente presente.
6. Detección del VHE en gel de agarosa.

### 3. MATERIAL Y METODO

#### 3.1 AGUA SERVIDA DE CAMARAS DE ALCANTARILLADO

El presente estudio consideró la toma de muestras de agua desde cámaras de alcantarillado ubicadas en: la cercanía del Hospital de la ciudad, zona de llegada de aguas a la planta de tratamiento de Aguas Décima y salida de aguas post tratamiento. Todas las muestras fueron tomadas periódicamente a intervalos regulares dos veces por semana.

Las muestras fueron recolectadas en 3 botellas de 350 cc estériles (manteniéndose la mayor asepsia posible), por personal capacitado y debidamente equipado para evitar contaminación cruzada. Posteriormente, las muestras fueron debidamente protegidas y embaladas en cajas de plumavit hasta su llegada al Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral, donde fueron procesadas inmediatamente según el protocolo de concentración de VHE por filtración. (Guttman-Bass, 1983; Rose y col., 1984; Sobsey y Glass, 1984).

#### **MATERIALES:**

- Filtros (tamaño poro): 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,2  $\mu\text{m}$
- 50 mg/l de Tiosulfato de Sodio
- HCl 1 N

- NaOH 1 N
  
- 5 mM de MgCl<sub>2</sub>
  
- Extracto de carne, con Glicina al 0.3%
  
- Antibióticos:    500 µg/ml Amikacina  
  
                          100 µg/ml Gentamicina  
  
                          200 µg/ml Estreptomicina  
  
                          200 U/ml Penicilina.

#### **METODO:**

- 1.- Las muestras de agua son declorinadas con 50 mg/ml de Tiosulfato de Sodio.
  
- 2.- Estas se prefiltran en un filtro de porosidad 0.45 µm, para remover los sólidos en suspensión.
  
- 3.- Luego las muestras de agua se tratan con HCl 1N y se ajusta el pH a 3.5, junto con añadir 5 mM de MgCl<sub>2</sub> que permite una mejor retención del virus en el filtro.
  
- 4.- Se filtra por segunda vez en un filtro de porosidad 0,2 µm.
  
- 5.- El filtrado es colectado en un matraz.
  
- 6.- Los virus adsorbidos por el filtro son eluidos con dos volúmenes sucesivos de 7.5 ml de extracto de carne 0,3% en 50 mM de glicina a pH 9.5.
  
- 7.- Este eluido se neutraliza con HCl 0,1 N ajustando a pH 7.5.



8.- Las muestras eluidas se tratan con 0,5 ml. de una mezcla de antibióticos y se almacenan a -20°C, hasta su análisis.

### **3.2. HECES DE PORCINOS Y SUERO HUMANO A UTILIZAR EN RT-PCR**

Todas las muestras analizadas (14 de heces de porcino y 5 sueros humanos) estaban incluidas en el Proyecto DID 200379 y eran positivos a IgG anti VHE.

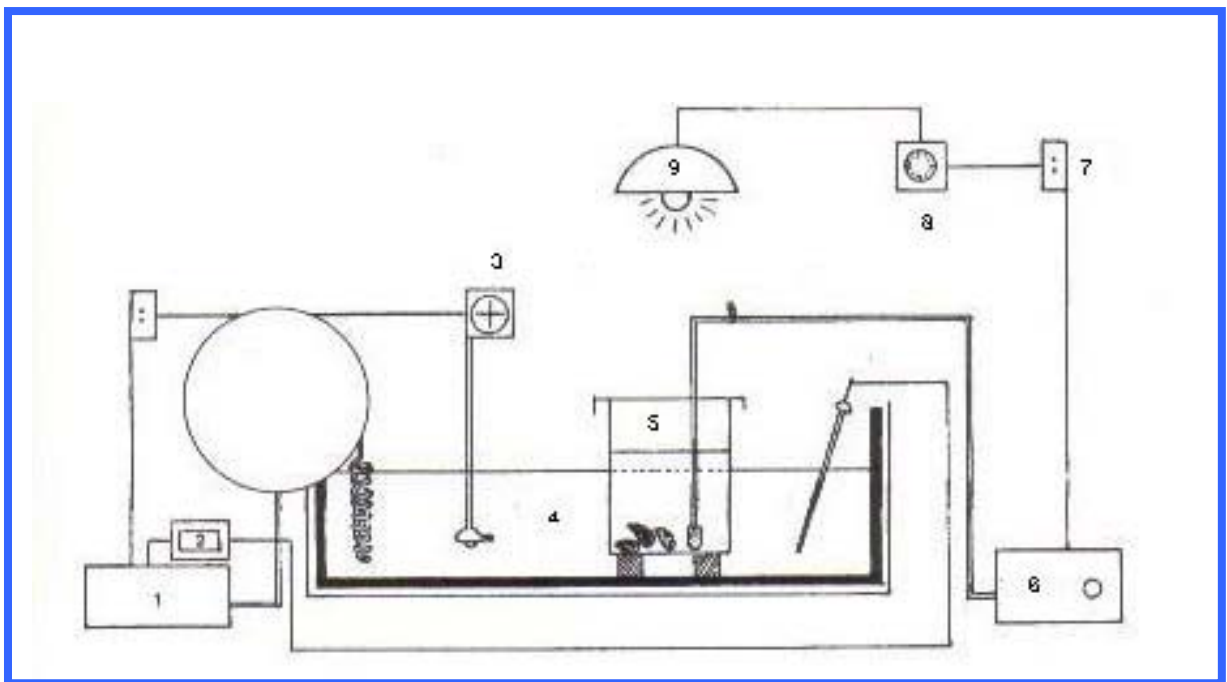
### **3.3 CHORITOS (*MYTILUS CHILENSIS*)**

Los choritos usados en el presente estudio, fueron obtenidos de la localidad de Yaldad (Quellón, Chiloé, X Región, Chile). Los choritos tenían un largo entre 45-52 mm. Bajo condiciones óptimas los bivalvos filtran entre 1.32 y 1.52 litros de agua por hora (Navarro y Winter 1982).

#### **MATERIALES:**

1. - 14 *Mytilus chilensis*..
2. - Agua contaminada con VHE hipotéticamente presente (3.200 – 3.400 ml), obtenida de cámaras del alcantarillado de Valdivia, cercanas al Hospital y a la entrada y salida de la planta de tratamiento.
3. - 2 envases de polietileno de 10 litros, para el cultivo.

4. - Sal marina (para regular la salinidad a 2.5 %).
5. - Agua de mar.
6. - Sistema de cultivo (Según esquema).
7. - Alimento: *Isochrysis galbana*  $2.7 \times 10^7$  células por día, por cada chorito.
8. - Sistema de refrigeración con capacidad de 600 lt.



1- Sistema de refrigeración	4- Sist. termorregulador	7- Sist. eléctrico
2- Termostato (14°C)	5- Unidad de cultivo	8- Reloj
3- Bomba de circulación	6- Bomba de aireación	9- Sist. foto-período

**METODO** (Enríquez, y col 1992).

Condiciones del experimento para *Mytilus chilensis*.

- a)- Tiempo de depuración: 3 días (en agua de mar filtrada).
- b)- Temperatura de cultivo: 14°C.
- c)- Salinidad: 2.5%.
- d)- Tiempo de fotoperíodo: 12 horas.
- e)- Duración del experimento: 13 días (3 días de depuración).
- f)- Periodicidad de muestreo: 1 vez al día por 7 días hábiles.
- g)- Cantidad de *M. chilensis* a extraer por muestreo: 2 especímenes (1 Control y 1 Muestra).
- h)- Tratamiento del agua de mar: El agua es filtrada en un filtro de Borosilicato de porosidad 0,45 µm, para eliminar o reducir elementos contaminantes y partículas nutritivas del agua.
- i)- Proceso de salado del agua: El agua se satura en sal marina alcanzando una concentración de  $78.1 \pm 3\%$ , para así diluirla en el agua contaminada y obtener la salinidad deseada.
- j)- Concentración del alimento: 1 ml del alimento se diluye en 50 ml de agua de mar, a la solución se le mide el número de células por 0.5 ml. A esto se le resta el blanco (agua de mar sin alimento externo), esta concentración se multiplica por 2 para obtener la cantidad de alga por ml. Sabemos que el requerimiento de *Isochrysis galbana* es de  $2.7 \times 10^7$  células día/chorito. Se realiza una regla de tres para saber cuantos ml. de alimento hay que proporcionarle diariamente a nuestro sistema de experimentación.

Durante el experimento los 14 bivalvos fueron depositados en 2 envases de plástico de 16 cm de diámetro y 25 cm de alto aproximadamente. A un envase de cultivo se le agregó aproximadamente 3.300 ml de agua contaminada con una salinidad de 2,5%. El agua

contaminada se cambió todos los días, al igual que el agua del grupo control. Se chequeó constantemente la bomba de aireación y el tubo que provee de oxígeno al sistema de cultivo. En el tanque en que se mantuvo los envases con choritos en cultivo se usó 170 litros de agua (Enríquez y col., 1992; Navarro y col., 2003).

Se extrajo diariamente 2 choritos de los envases de cultivo, uno del grupo control y el otro del grupo de experimentación (agua contaminada), para ser procesados en el Instituto de Microbiología. A los choritos se les extrajo el hepatopancreas, el cual se depositó en un mortero de porcelana estéril, al que se le añadió una cantidad similar en peso de arena estéril. A continuación se trituro y se le agregó 9 ml de buffer fosfato salino de pH 7.2 estéril. Luego se dejo decantar la solución, para poder extraer el sobrenadante libre de la arena. Por último se le adicionó 0,5 ml de una mezcla de antibióticos (100 UI de penicilina, 0,1 mg de estreptomycin y 80 mg. de gentamicina por ml).

En el Instituto de Biología Marina fueron almacenadas las muestras a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta obtener el total de los hepatopancrea, a los que se les extrajo el material genético (ARN).

### **3.4. HECES PORCINAS**

Las muestras de heces porcinas (1 gr.) fueron colocadas en tubos venoject y diluidas en PBS estéril hasta alcanzar 10 ml a un pH 7,2 a temperatura ambiente. Posteriormente cada muestra se dejo por una hora en reposo a temperatura ambiente, para extraer el material sólido. Finalmente a cada una de las muestras diluidas se les adicionó 0,5 ml de una mezcla de antibióticos (100 UI penicilina, 0,1 mg. de estreptomycin y 80 mg. de gentamicina por ml).

Las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta la extracción del material genético (ARN).

### **3.5 EXTRACION DEL ARN**

Todas las muestras debidamente identificadas y rotuladas fueron sometidas a un protocolo estandarizado para la extracción del ARN (Sambrook y Russell, 2001).

Se transfirió 250  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras a tubos eppendorf de 2 ml, se agregó 750  $\mu\text{l}$  de Trizol. Luego, se adicionó 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo agitando en un vortex por 15 segundos y posteriormente se incubó 5 minutos, en ambos casos a temperatura ambiente.

Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se extrajo la fase acuosa (ARN) cuidando no contaminar el ARN con proteínas de la interfase. A este sobrenadante se agregó 500  $\mu\text{l}$  de alcohol isopropílico frío con el objeto de precipitar el ARN, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se dejó precipitar el ARN toda la noche a  $-20^{\circ}$ . Posteriormente, se centrifugó la muestra a 12.000 g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  se removió completamente el sobrenadante y el sedimento de ARN se resuspendió en 1 ml de etanol al 75%, se homogenizó la muestra en un vortex y se centrifugó por 5 minutos a 7.500 g a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Se eliminó el sobrenadante dejando secar el sedimento por algunos minutos, obteniéndose un pellet que se resuspendió en 10 µl de agua destilada estéril, para luego procesarlas según el punto 3.6.

### **3.6 FASE DE TRANSCRIPCION REVERSA**

#### **MATERIAL**

1. - Partidores:

Humano: p4874 (anti-sentido).

Secuencia: -GGG-CCC-CAA-TTC-TTC-T

Cerdo: p3157 (anti-sentido).

Secuencia: -TCAGCAAGATTAAATAAGGTC-

2. - Transcriptasa reversa SuperScript II. (TR)

3.- 5X Buffer (250mM tris-HCl, pH 8.3 a temperatura ambiente; 375 mM KCl; 15mM MgCl<sub>2</sub>).

4. - 0.1 M DTT.

5. - 10 mM dNTPs

6. - Baño Termorregulado.

**METODO** (Sambrook y Russell, 2001):

1. - En un tubo Eppendorf de 200  $\mu$ l. se deposita: 1,0  $\mu$ l de partidor 6mM (humano o porcino según corresponda), 5,0  $\mu$ l de ARN hipotéticamente presente y 4,0  $\mu$ l de agua destilada estéril. Se calienta a 90°C por 2 minutos y posteriormente se deja en hielo.
- 2.- Luego se adiciona: 4  $\mu$ l de Buffer 5X, 2  $\mu$ l de DTT 0,10 M, 3,0  $\mu$ l de dNTPs 10 mM y al final 1,0  $\mu$ l de TR, para completar un volumen final de 20  $\mu$ l. Por último, se incuba la mezcla a 37°C por 1 hora. El ADNc obtenido se almacena a -20°C. Posteriormente las muestras son sometidas al punto 3.7

**3.7 AMPLIFICACION DEL ADNc** (Sambrook y Russell, 2001).

La amplificación del ADNc se realizó según un protocolo establecido y estandarizado que se presenta a continuación.

**MATERIALES:** (*Humano*)

1. - Partidores: (Clayson y col., 1995b).

p4653 (sentido).                      Secuencia: TTT-TCA-GGT-GGC-TGC-C

p4842 (anti-sentido).                Secuencia: GAA-GCG-CAC-AAC-ATC-AGG

p4706 (sentido).                      Secuencia: ATC-GTC-AGA-GTC-CAG-GAG

p4874 (anti-sentido).                Secuencia: GGG-CCC-CAA-TTC-TTC-T

2. - Taq ADN Polimerasa.

3. - Buffer PCR 10X, sin Cloruro de Magnesio

4.- 50 mM Cloruro de Magnesio

5.- 10 mM dNTPs

6.- Termociclador (Bio-Rad)



## METODO

Según el orden y volumen de los componentes señalados en la tabla siguiente se van agregando los reactivos, partidores y la muestra en un tubo Eppendorf.

### PRIMER CICLO

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Tampón PCR 10X	3,0 $\mu$ l	1 X
dNTPs 1,25 mM	2.4 $\mu$ l	0,1 mM
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 $\mu$ l	2,5 mM
Partidor 4874 10 $\mu$ M	1,0 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
Partidor 4653 10 $\mu$ M	1,0 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
ADNc	5,0 $\mu$ l	
Taq 5U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	1 U
Agua destilada estéril	15.9 $\mu$ l	
Volumen final	30,0 $\mu$ l	

A continuación las muestras se depositan en tubos Eppendorf para PCR de 200  $\mu$ l, se introducen al termociclador, según el siguiente programa:

<b>1. -</b>	94°C por 5 m'
<b>2. -</b>	94°C por 1 m'
<b>3. -</b>	50°C por 1 m'
<b>4. -</b>	72°C por 2,5 m'
<b>5. -</b>	Se repiten 39 veces los pasos del 2 al 4
<b>6. -</b>	72°C por 20 m'

Nota: Las muestras se retiran del Termociclador y se almacenan a -20°C

Según el orden y volumen de los componentes indicados en la tabla se van agregando en un tubo Eppendorf los diferentes reactivos, partidores y la muestra del paso anterior.

## SEGUNDO CICLO

<b>REACTIVOS</b>	<b>VOLUMEN</b>	<b>CONCENTRACION FINAL</b>
Tampón PCR 10 X	5,0 $\mu$ l	1 X
dNTPs 1,25 mM	4,0 $\mu$ l	0,1 mM
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 $\mu$ l	1,5 mM
Partidor 4842 10 $\mu$ m	1,5 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
Partidor 4706 10 $\mu$ m	1,5 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
ADNc	5,0 $\mu$ l	
Taq 5U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	1 U
Agua destilada estéril	31.3 $\mu$ l	
Volumen final	50,0 $\mu$ l	

A continuación las muestras se transfieren a tubos Eppendorf para PCR de 200  $\mu$ l, se introducen al termociclador, según el siguiente programa:

<b>1. -</b>	94°C por 5 m'
<b>2. -</b>	94°C por 1 m'
<b>3. -</b>	50°C por 1 m'
<b>4. -</b>	72°C por 2,5 m'
<b>5. -</b>	Se repiten 39 veces los pasos del 2 al 4
<b>6. -</b>	72°C por 20 m'

Nota: Las muestras se retiran del Termociclador y se almacenan a -20°C

**MATERIALES** (*Porcino*)

1.- Partidores: (Meng y col.,1997)

p3156 (sentido). Secuencia: -AATACACCTTACTGGC-

p3157 (anti-sentido). Secuencia: -TCAGCAAGATTAAATAAGGTC-

p3158 (sentido). Secuencia: -ACACTGGCGCCCTCGGTC-

p3159 (anti-sentido). Secuencia: -AGATTAAATAAGGTCAGCGCT-

2. - *Taq* ADN Polimerasa

3. - Buffer PCR 10 X, sin Cloruro de Magnesio

4. - 50 mM Cloruro de Magnesio

5. - 10 mM dNTPs

## METODO

Según el orden y volumen de los componentes indicados en la tabla se van agregando en un tubo Eppendorf los diferentes reactivos, partidores y la muestra.

### PRIMER CICLO

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Tampón PCR 10 X	3,0 $\mu$ l	1 X
dNTPs 1,25 mM	2.4 $\mu$ l	0,1 mM
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 $\mu$ l	2,5 mM
Partidor 3156 10 $\mu$ m	1,0 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
Partidor 3157 10 $\mu$ m	1,0 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
cDNA	5,0 $\mu$ l	
Taq 5U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	1 U
Agua destilada estéril	15.9 $\mu$ l	
Volumen final	30,0 $\mu$ l	

A continuación las muestras se transfieren a tubos Eppendorf para PCR de 200  $\mu$ l y se introducen al termociclador, según el siguiente programa:

<b>1. -</b>	94°C por 5 m'
<b>2. -</b>	94°C por 1 m'
<b>3. -</b>	50°C por 1 m'
<b>4. -</b>	72°C por 2,5 m'
<b>5. -</b>	Se repiten 39 veces los pasos del 2 al 4
<b>6. -</b>	72°C por 20 m'

Nota: Las muestras se retiran del Termociclador y se almacenan a -20°C

Según el orden y volumen de los componentes indicados en la tabla se van agregando en un tubo Eppendorf los diferentes reactivos, partidores y la muestra del paso anterior.

## SEGUNDO CICLO

<b>REACTIVOS</b>	<b>VOLUMEN</b>	<b>CONCENTRACION FINAL</b>
Tampón PCR 10 X	5,0 µl	1 X
dNTPs 1,25 mM	4,0 µl	0,1 mM
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl	1,5 mM
Partidor 3158 10 µm	1,5 µl	0,3 µM
Partidor 3159 10 µm	1,5 µl	0,3 µM
ADNc	5,0 µl	
Taq 5U/µl	0,2 µl	1 U
Agua Destilada/Estéril	31.3 µl	
Volumen final	50,0 µl	



A continuación las muestras se transfieren a tubos Eppendorf para PCR de 200  $\mu$ l y se introducen al termociclador, según el siguiente programa:

<b>1. -</b>	94°C por 5 m'
<b>2. -</b>	94°C por 1 m'
<b>3. -</b>	50°C por 1 m'
<b>4. -</b>	72°C por 2,5 m'
<b>5. -</b>	Se repiten 39 veces los pasos del 2 al 4
<b>6. -</b>	72°C por 20 m'

Nota: Las muestras se retiran del Termociclador y se almacenan a -20°C

### **3.8 DETECCION DEL VHE EN GEL DE AGAROSA**

Las muestras amplificadas fueron procesadas y depositadas en el gel de agarosa dentro del sistema de electroforesis horizontal, al que se le aplicó una corriente de 75 mv por aproximadamente una hora, y luego se observó contra luz Ultra Violeta (UV), para identificar y confirmar la presencia o ausencia de VHE en ellas.

**MATERIALES**

1. - Gel de Agarosa 1.5 %
2. - TAE 1 X (Tris-Acetato-EDTA).
3. - Bromuro de Etidio.
4. - Buffer de muestra.
5. - Muestra de la amplificación del ADNc.
6. - 100 pb ADN, marcadores estándares de peso molecular.
7. - Sistema de corrida de Electroforesis ( Bio-Rad).

**METODO** (Sambrook y Russell, 2001).

1. - En un papel parafilm se depositan los siguientes volúmenes de muestras mezclándose posteriormente:
  - a).- 0,5 µl de marcador estandar de peso molecular + 1 µl de Bromuro de Etidio + 1 µl Buffer de muestra (Carril N°1)
  - b).- 5,0 µl de agua estéril + 1 µl de Bromuro de Etidio + 1 µl Buffer de muestra (Carril N°3)
  - c).- 16 µl de muestra en estudio (VHE) + 4 µl de Bromuro de Etidio + 4 µl Buffer de muestra (diferentes muestras, en los carriles del 4 al 8)
2. - Al gel se le agrega el TAE 1 X

3. - Las muestras (a, b y c del punto N° 1) se cargan en los diferentes carriles del gel, donde se le aplica una corriente 75 mv por aproximadamente 1 hora
4. - Por último las muestras son observadas en luz UV. (Esto permite la identificación y confirmación de la presencia de VHE en ellas).

### **3.9 MICROSCOPIA ELECTRONICA**

Se realizó microscopía electrónica en una solución concentrada de extracto de hepatopancreas del último *Mytilus chilensis* colectado (día 13), que fueron teñidas con acetato de uranilo 1% (Glauert, 1965). Las preparaciones teñidas sobre grillas de 200 mesh, previamente cubiertas con membrana de colodión y film de carbón, fueron observadas en microscopio Philips Em - 300 con un voltaje de aceleración de 60 KW.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 RT-PCR EN MUESTRAS DE AGUAS SERVIDAS**

Se analizó 10 muestras de aguas provenientes de las cámaras del alcantarillado de Valdivia aledaña al Hospital Regional y de la planta de tratamiento (entrada y salida post tratamiento) de Aguas Décimas, en la X Región, Chile. El muestreo se realizó entre el 12 de Diciembre de 2003 y el 7 de Abril de 2004. El resultado arrojado para las 10 muestras fue negativo a RT-PCR.

### **4.2 RT-PCR EN MUESTRAS DE SUEROS HUMANOS**

El resultado de RT-PCR en 5 muestras (4 de pacientes del hospital de la ciudad de Santiago y 1 de operario de Aguas Décimas) de suero humano positivas a ELISA anti VHE IgG fue negativo.

### 4.3 RT-PCR EN HECES DE PORCINO

El resultado negativo de RT-PCR en 14 muestras de heces de porcino positivas a Elisa IgG, se detalla en el Cuadro 1, dado que pertenecen a diferentes grupos etarios.

**Cuadro 1**

**Resultados de RT-PCR en 14 muestras de heces de porcino**

<b>Rango de edades (días)</b>	<b>N° anti VHE + ELISA IgG anti- porcino</b>	<b>RT-PCR</b>
90	1	Negativo
120	2	Negativo
260	1	Negativo
360	2	Negativo
Destete 5° parto	1	Negativo
Destete 6° parto	2	Negativo
Destete 7° parto	2	Negativo
Destete 8° parto	1	Negativo
Verracos viejos	2	Negativo

#### **4.4 RT-PCR EN MUESTRAS DE CONCENTRADO DE *Mytilus chilensis***

Las 14 muestras de concentrado de hepatopaneas de *Mytilus chilensis*, 7 muestras control y 7 muestras problema, fueron negativas a RT-PCR.

#### **4.5 MICROSCOPIA ELECTRONICA**

La M.E. de la última muestra de hepatopaneas de *Mytilus Chilensis* arrojó un resultado negativo para la presencia del VHE.

## 5. DISCUSION

Las muestras de aguas servidas concentradas por filtración, en el presente estudio, de manera similar a los experimentos realizados por diferentes autores en la década del 80' fueron negativas (Guttman – Bass, 1983; Rose y col., 1984; Sobsey y Glass, 1984). Si bien ellas concentraron diferentes tipos de enterovirus (poliovirus, echovirus, reovirus, adenovirus), la diferencia con el actual resultado se debe a que las características de los enterovirus difieren entre sí. Además, debe tenerse en consideración que la eficiencia de recuperación luego de la concentración con filtros millipore presenta rangos tan variados que en estudios realizados en Estados Unidos se reportó un mínimo de 2,1% (+/- 2,1) y un máximo de 75% (+/- 61) de recuperación (Sobsey y Glass, 1984), lo que podría explicar la dificultad para lograr concentrar al VHE en el presente trabajo.

En el caso de las muestras de suero humano, la no detección del VHE en esta tesis, podría explicarse por que se estudió individuos IgG positivos, lo que no necesariamente nos da certeza de que el paciente esté cursando el período de viremia, lo que se describe como imperativo para la concentración de VHE (Quintana-Gonzalez, A., 2003). La viremia en hepatitis E comienza el día 28 y 30 post-infección perdurando sólo por un período de alrededor de entre 10 y 15 días, lo que reduce visiblemente la etapa de la enfermedad en que sería posible la pesquisa del virus en suero (Chauhan y col., 1993; Emerson y Purcell, 2003).

Meng y col. (1997) y Clayson y col. (1995b) en la década de los 90' aplicaron un protocolo estandarizado para la identificación del VHE en muestras de suero humano y heces de porcino, utilizando partidores específicos para las zonas en estudio dependiendo de la endemia del lugar, logrando detectar la presencia del virus en menos del 7% de las muestras en

estudio. Sin embargo, en este trabajo no fue posible la detección del VHE, esto posiblemente se debe a que el presente experimento fue pionero en la búsqueda de virus hepatitis E en Chile, por medio de RT-PCR ya que no se disponía de secuencias genómicas específicas para el virus presente en este país. Esto, implicó el uso de partidores utilizados en otras regiones donde la hepatitis E es endémica, lo que indudablemente pudo influir en el resultado dado que es probable que los partidores requeridos para la detección del VHE presente en Chile podrían ser diferentes a los empleados.

La concentración del VHE en *Mytilus chilensis* se realizó basado en el protocolo de acumulación y persistencia del virus de la hepatitis A en bivalvos, según experimentos realizados con anterioridad en el Instituto de Microbiología (Enriquez y col., 1992). Sin embargo, pese a haberse efectuado el presente ensayo en similares condiciones no fue posible la detección del VHE en las muestras analizadas. Esto podría explicarse debido a que se ha presentado una clara tendencia al descenso de la incidencia de hepatitis A entre 1992 y 2004, pudiendo extrapolarse a la hepatitis E debido a su similitud en la transmisión. Por otro lado, en cuanto a la prevalencia de anticuerpos protectores se ha demostrado diferencias en distintas regiones del país, es así como en Valdivia, en 1984 (Riedemann y col.) el 96.9 % de los adultos tenía anticuerpos contra VHA, en 2002 la prevalencia de anticuerpos en adultos jóvenes fue de 67%. (Medina y col., 2003; Medina, 2004). También debe tenerse presente el importante rol de las medidas de prevención por parte de la población, en evitar, retrasar o controlar los ciclos epidémicos, todo lo que lleva a una reducción de las posibilidades de pesquisar el virus. (Medina y col., 2003). Además, otro factor que reduce las posibilidades de pesquisar al virus son las políticas gubernamentales de mejoras sanitarias y disposición de excretas, ya que la mayoría de los sectores poblacionales actualmente cuentan con agua potable y alcantarillado.



Es así como no debemos olvidar que se analizaron muestras de aguas servidas provenientes de la planta de tratamiento, previo a la liberación al río Calle Calle.

Debe reflexionarse que este ensayo es precursor de futuras investigaciones para la detección del VHE, ya que es una enfermedad presente en Chile de la que sin embargo, no se tienen mayores antecedentes.

Se debe considerar que, cada uno de los procedimientos requirió la utilización de partidores provenientes de otras regiones endémicas, ya que no se han desarrollado partidores en Chile, lo que disminuye la probabilidad de que estos presenten complementariedad con la monocadena del virus presente en Chile.

Además, es indispensable considerar que para el caso de las muestras de heces de porcino el tiempo de permanencia del virus de la hepatitis E en la fase preictérica (post infección) dura por un corto tiempo en heces fluctuando entre 10 y 15 días, lo que disminuye la posibilidad de encontrar el VHE en las muestras, sin olvidar que en este ensayo se consideraron muestras de individuos IgG positivos lo que no necesariamente coincide con la presencia del virus en heces sirviendo solo como referencia de que la muestra proviene de un individuo que tuvo contacto con el virus y no que haya estado cursando la enfermedad en ese momento.

Finalmente, cabe destacar que, a pesar de que se siguieron protocolos estandarizados, las muestras fueron manipuladas de acuerdo a las necesidades de las mismas en condiciones óptimas de transporte, almacenamiento y procesamiento, fue imposible la detección del VHE lo que no significa que el virus no se encuentre presente en Chile, sino que, su detección no fue posible con los métodos utilizados en el presente estudio.

## 6. BIBLIOGRAFIA

**Arankalle, VA., Joshi, MV. y Kulkarni, AM.** (2001). Prevalence of anti-VHE antibodies in different Indian animal species. *J. Viral. Hepatol.*, 8, 223-227.

**Arankalle, VA., Chobe, LP. y Joshi, MV.** (2002). Human and swine hepatitis E virus from Western India belong to different genotypes. *J. Hepatol.*, 36, 417-425.

**Borhanmanesh, F., Haghghi, P., Itekmat, K., Rezaizadieh, K. y Ghavami, A.G.** (1973). Viral hepatitis during pregnancy. Severity and effect on gestation. *Gastroenterol.*, 64, 304-312.

**Brahm, J., Hurtado, C. y Moraga, M.** (1996). Infección con el virus de la hepatitis E en Chile. *Rev. Med. Chil.*, 124, 947-949.

**Chandler, J., Riddell, M., Li, F., Robert, J. y Anderson, D.** (1999). Serological evidence of swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet. Microbiol.*, 68, 95-105.

**Chauhan, A., Jameel, S., Dilawari, J., Chawla, Y., Kaur, U. y Ganguly, N.** (1993). Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet.*, 341, 149-150.

**Choi, I., Kwon, H., Shin, N. y Yoo, H.** (2003). Identification of swine hepatitis E virus (VHE) and prevalence of anti-VHE antibodies in swine and human populations in Korea. *J. Clin. Microb.*, 41, 3602-3608.

**Clayson, E., Myint, K., Snitbhan, R., Vaughn, D., Innis, B., Chan, L., Cheung, P. y Shrestha, M.** (1995a). Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J. Inf. Dis.*, 172, 927-933.

**Clayson, E., Innis, B., Mijint, K., Narupiti, S., Vaughn, D., Giri, S., Ranabhat P. y Shrestha, M.** (1995b). Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Katmandu Valley of Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 53, 228-232.

**Clayson, E., Vaughn, D., Bruce, I., Shrestha, M., Pandey, R. y Malla, D.** (1998). Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis at a military training camp in Nepal. *J. Med. Virol.*, 54, 178-182.

**Drobeniuc, J., Favorov, MO. y Shapiro, CN.** (2001). Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J. Infect. Dis.*, 184, 594-1597.

**Emerson, S. y Purcell, R.** (2003). Hepatitis E Virus. *Rev. Med. Virol.*, 13, 145-154.

**Enríquez, R., Frösner, G., Hochstein-Mintzel, V., Riedemann, S. y Reinhardt, G.** (1992). Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *J. Med. Virol.*, 37, 174-179.

**Evans, A. y Kaslow, R.** (1997). *Viral infections of humans*. 14<sup>o</sup>. Ed., New York and London, 400-406.

**Favorov, M., Khudyakov, Y., Fields, H., Khudyakova, N., Padhye, N., Alter, M., Mast, E., Polish, H., Yashina, T., Yarasheva, D., Onischenko, G. y Margolis, H.** (1994). Enzyme immunoassay for the detection for antibody to hepatitis E virus based on synthetic peptides. *J. Virol. Meth.*, 53, 340-347.

**Glauert, AM.** (1965). Techniques for electron microscopy. B. Kay. Ed Oxford and Edimburg London.

**Guttman-Bass, N.** (1983). Developments in methods for the detection of virus in large volumes of water. *Wat. Sci. Tech.*, 15, 59-67.

**Halbur, PG., Kasorndorkbua, C. y Gilbert, C.** (2001). Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 918-923.

**Haqshenas, G. y Meng, XJ.** (2001). Determination of nucleotid sequences at the extreme 5' and 3' ends of swine hepatitis E virus genome. *Arch. Virol.*, 146, 2461-2467.

**Harrison, TJ.** (1999). Hepatitis E virus. *Liver.*, 19, 171-176.

**Hsieh, S., Yang, P., Ho, Y., Chu, C. y Liaw, Y.** (1998). Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J. Med. Virol.*, 55, 300-304.

**Huang, F., Haqshenas, C., Guenette, D., Halbur, P., Schommer, S., Pierson, F., Toth, T. y Meng, XJ.** (2002a). Detection by reverse transcription - PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J. Clin. Microb.*, 40, 1326-1332.

**Huang, F., Haqshenas, C., Shivaprasad, H., Guenette, D., Woolcock, P., Larsen, C., Pierson, F., Elvinger, F., Toth, T. y Meng, XJ.** (2002b). Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis E virus from chickens in the United States. *J. Clin. Microb.*, 40, 4197-4202.

**Hyans, K., Purdy, M., Kaur, M., McCarthy, M., Hussain, M., Bradley, D. y Carl, M.** (1992). Acute sporadic hepatitis E in Sudanese children: analysis based on a New Western Blot Assay. *J. Inf. Dis.*, 165, 1001-1005.

**Ibarra, H., Riedemann, S., Siegel, F., Reinhardt, G. y Frösner, G.** (1994). Hepatitis E virus in Chile. *Lancet.*, 344, 1501.

**Ibarra, H., Riedemann, S., y Reinhardt, G.** (1997). Prevalencia de anticuerpos del virus Hepatitis E en donantes de sangre y otros grupos de población en la X región, Chile. *Rev Med Chil.*, 125, 275 -278.

**Kabrane-Lazizi, Y., Fine, J., Gregory, E., Glass, Harry., Diwan, A., Gibbs, C., Meng, XJ., Emerson, S. y Purcell, R.** (1999). Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(2), 331-335.

**Kabrane-Lazizi, Y., Zhang, M., Purcell, R., Miller, K., Davey, R. y Emerson, S.** (2001). Acute hepatitis caused by novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains. *J. Gen. Virol.*, 82, 1687-1693.

**Khuroo, M.S., Saleem, M., Teli, MR. y Sofi, M.A.** (1980). Failure to detect chronic liver after epidemic Non-A, Non B hepatitis. *Lancet.*, 2, 97-98.

**Khuroo, M.S., Kamili, S., Dar, D., Moeckli, R. y Jameel, S.** (1993). Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet.*, 341, 1355.

**Khuroo, M.S., Kamili, S. y Jameel, S.** (1995). Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet.*, 345, 1025-1026.

**Krugman, S.** (1992). Viral hepatitis. *Pediatr. Rev.*, 13, 203-212.

**Maneerat, Y., Clayson, E., Myint, K., Young, D. y Bruce, I.** (1996). Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J. Med. Virol.*, 48, 121-128.

**Mansuy, J., Peron, J., Abravanel, F., Poirson, H., Dubois, M., Miedouge, M., Vischi, F., Alric, L., Vinel, J. y Igopot, J.** (2004). Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J. Med. Virol.*, 74, 419-424.

**Medina, B., Olea, A. y Aguilera, X.** (2003). Situación epidemiológica de hepatitis en Chile. *Rev. Chil. Infect.*, 20, 262-267.

**Medina, B.** (2004). Hepatitis A y hepatitis aguda viral sin especificación. *El Vigía* 21., 8, 37-38.

**Meng, XJ., Purcell, R., Halbur, P., Lehman, J., Webb, D., Tsareva, T., Haynes, J., Thacker, B. y Emerson, S.** (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 9860-9865.

**Meng, XJ., Halbur, P., Haynes, J., Tsareve, T., Bruna, J., Royer, R., Purcell, R. y Emerson, S.** (1998). Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine VHE), but not with human strains of VHE. *Arch. Virol.*, 43, 1405-1415.

**Meng, XJ.** (2000). Zoonotic and xenozoonotic risks of the hepatitis E virus. *Infect. Dis. Rev.*, 2, 35-41.

**Meng, XJ., Wiseman, B. y Elvinger, F.** (2002). Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 117-122.

**Mitsui, T., Tsukamoto, Y., Yamazaki, C., Masuko, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T. y Okamoto, H.** (2004). Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: Evidence for infection with a genotype 3 VHE by blood transfusion. *J. Med. Virol.*, 74, 563-572.

**Nishizawa, T. y Masaharu, T.** (2003). Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome *J. Gen. Virol.*, 84, 1245-1251.

**Navarro, J.M. y Winter, J.E.** (1982). Ingestion rate, assimilation efficiency and balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentrations. *Mar. Biol.*, 67, 255-266.

**Navarro, J.M., Labarta, U., Fernández-Perez, M.J. y Velasco, A.** (2003). Feeding and differential absorption of biochemical components by the infaunal bivalve *Mulinia edulis* and the epidenthic *Mytilus chilensis* in response to changes in food regimes. *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, 287, 13-35.

**Paul, D., Knigge, M., Ritter, A., Gutierrez, R., Pilot-Matias, T., Chau, K. y Dawson, G.** (1994). Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombination fusion proteins and synthetic peptides. *J. Infect. Dis.*, 169, 801-806.

**Peña, A.** (2002). Hepatitis viral aguda. *Rev. Chil. Pediatr.*, 73, 173-175

**Qi, Z., Cui, D., Pan, W., Yu, Ch., Song, Y., Cui, H. y Arima, T.** (1995). Synthesis and application of hepatitis E virus peptides to diagnosis. *J. Virol. Meth.*, 55, 55-66.

**Quintana-Gonzalez, A.** (2003). Virus de la hepatitis E. *Rev. Biomed.*, 14, 165-187.

**Ramos-Soriano, A. y Schwarz, K.** (1994). *Clin. North Am.*, 23, 753 – 767.



**Reinhardt, G., Ibarra, H., Riedemann, S. y Vega, I.** (2003). Estudio serológico preliminar de hepatitis E en cerdos en Chile. *Arch. Med. Vet.*, 35, 233-236.

**Reyes, G., Purdy, M. y Kim, J.** (1990). And now the molecular cloning of hepatitis E virus. *Gastroenterol.*, 99, 560-561.

**Riedemann, S., Hochstein-Mintzel, V. y Reinhardt, G.** (1984). *Rev. Med. Chil.*, 112, 672-674.

**Rose, J., Singh, S., Charles, P., Kelley, G. y L.** (1984). Comparison of microporous filters for concentration of viruses from wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 989-992.

**Safary, A.** (2001). Perspectives of Vaccination against hepatitis E. *Intervirology.*, 44, 162-166.

**Sambrook, J. y Russell, D.** (2001). Molecular cloning a laboratory manual. Ed.3<sup>era</sup> Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp. 5.4 y 7.1.

**Schlauder, G., Desai, S., Zanette, A., Tasopoulos, N. y Mushahwar, I.** (1999). Novel hepatitis E virus (VHE) isolates from Europa: Evidence for additional genotypes of VHE. *J. Med. Virol.*, 57, 243-251.

**Schlauder, G. y Mushahwar, I.** (2001). Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J. Med. Virol.*, 65, 282-292.

**Sobsey, M. y Glass, S.** (1984). Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. *Applied and Environmental Microbiol.*, 47, 956-960.

**Soza, A.** (2004). Hepatitis tóxica: Acetaminofeno y otras. *Gastr. Latinoam.*, 15, 158-162.

**Tsarev, S., Emerson, S., Tsareva, T., Yarbough, P., Lewis, M., Govindarajan, S., Reyes, G., Shapiro, M. y Purcell, R.** (1993). Variation in course of hepatitis E in experimentally infected Cynomolgus Monkeys. *J. Inf. Dis.*, 167, 1302-1306.

**Valdivieso, V.** (2003). Hepatitis viral aguda. *Rev. Chil. Med. Fam.*, 4, 10-13.

**Van Cuyck-Gandré, H., Zhang, H., Tsarev, S., Clements, N., Cohen, S., Caudell, J., Buisson, Y., Coursaget, P. y Longer, Ch.** (1997). Characterization of hepatitis E virus (VHE) from Algeria and Chad by partial genome sequence. *J. Virol.*, 53, 340-347.

**Wang, Y., Zhang, H., Xia, N., Peng, G., Lan, H., Zhuang, H., Zhu, Y., Li, S., Tian, K., Gu, W., Lin, J., Wu, X., Li, H. y Harrison, T.** (2002). Prevalence isolation and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J. Med. Virol.*, 67, 516-521.

**WHO** (2001). Virus hepatitis E. *Department of communicable disease surveillance and response*. WHO/CDS/CSR/EDC, 13.

**Williams, T., Kasorndorkbua, C., Halbur, P., Haqshenas, G., Guenette, D., Toth, T. y Meng, XJ.** (2001). Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microb.*, 39, 3040-3046.

**Wong, D.C., Purcell, R.H., Sreenivan, M.A., Prasad, S.R. y Pavari, K.M.** (1980). Epidemic and endemic hepatitis in India: Evidence for Non-A, Non-B type. *Lancet.*, 2, 876-879.

**Wu, J., Chen, C., Chiang, T., Sheen, I., Chen, J., Tsai, W., Huang, Y. y Lee, S.** (2000). Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E. virus infection. *J. Med. Virol.*, 60, 166-171.

**Wu, J., Chen, C., Chiang, T., Tsai, W., Jeng, W., Jane, S., Lin, C, y Meng, XJ.** (2002). Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan *J. Med. Virol.*, 66, 488-492.

**Yoo, D., Wilson, P. y Pei, L.** (2001). Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 1213-1219.