



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**DETECCIÓN DE RNA DE VHE EN PACIENTES CON
HEPATITIS CRÓNICA DE ETIOLOGÍA INDETERMINADA
DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
DEL AÑO 2004 AL 2014**

TESIS:

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:
PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. MIRIAM TAMARA MATUS ROMAN

TUTORES:

Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero

Dr. Carlos Alberto Serrano Bello



Ciudad de México, Febrero 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE FIRMAS

DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO



DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO
JEFE DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PATOLOGÍA EXPERIMENTAL
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.
MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES NIVEL I



DR. CARLOS ALBERTO SERRANO BELLO
MIEMBRO ADSCRITO AL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

DEDICATORIAS

A dios por ayudarme día con día

A mi madre por su amor y apoyo, a pesar de la distancia.

Al Dr. Francisco Arenas Huertero por creer en mí para realizar este proyecto.

Al Dr. Carlos Alberto Serrano Bello por su paciencia y enseñanzas.

A la QFB. Tayde López Santaella por su apoyo incondicional.

A la Dra. C. Beatriz Caballero Rodríguez por impulsarme a crecer.

A mis compañeros Atzin, Luis, Rosario, Christian, Fernando y Rosalba por su amistad y apoyo incondicional.

INDICE

1.-RESUMEN.....	5
2.-INTRODUCCIÓN.....	6
3.-MARCO TEORICO.....	7
4.- ANTECEDENTES	16
5.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
6.-PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
7.-JUSTIFICACIÓN.....	19
8.-OBJETIVOS	20
9.- HIPOTESIS	20
10. METODOS.....	21
A) DISEÑO DEL ESTUDIO.....	21
B) POBLACION DEL ESTUDIO	21
C) CRITERIOS DE INCLUSION.....	21
D) CRITERIOS DE EXCLUSION	21
E) VALIDEZ INTERNA Y EXTERNA	21
F) MÉTODOS.....	21
G) TAMAÑO DE LA MUESTRA	22
11.-CONSIDERACIONES ETICAS	22
12) PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO	23
13) DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES.....	23
14.-RESULTADOS.....	24
15.-DISCUSIÓN	28
16.- CONCLUSIONES.....	29
17.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO	29
18.- CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	30
19.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA.....	31
20.-ANEXOS.....	33
20.1.-ANEXO 1	33
20.2.- ANEXO 2	34
20.3 ANEXO 3.....	35

1.-RESUMEN

Objetivo: Determinar la presencia de VHE en biopsias de hígado de pacientes con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada en un periodo de 10 años.

Pacientes: veinte (10 varones y 10 mujeres) atendidos entre el 2004 al 2014 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada. El diagnóstico se realizó en biopsias de hígado las cuales reunieran características histológicas de la misma, a quienes se les ha descartado la presencia de otros tipos de virus como VHA, VHB, VHC, VHD y otros tipos de hepatitis posteriormente se realizó PCR punto final en dichas biopsias definiéndose como positivo la presencia de ARN DE VHE en geles de poliacrilamida.

Resultados: se encontró entre los servicios mayormente afectados son: gastroenterología y trasplantes. El intervalo de presentación fue de 0-10 años principalmente en niñas y el 40% de la población estudiada (20 casos) fueron positivos a la presencia por el VHE, considerándose un hallazgo asociado a la hepatopatía crónica de etiología indeterminada.

Discusión: Al encontrar la presencia del VHE en las muestra analizada se puede concluir que si bien este no es el factor etiológico si es un factor asociado al desarrollo de la cronicidad, abriendo nuevas líneas de investigación.

2.-INTRODUCCIÓN.

La hepatitis aguda E fue caracterizada en 1980 a partir de muestras de un gran brote de hepatitis aguda de transmisión por aguas fecales que se produjo en India (Nueva Delhi) entre 1955 y 1956. En ese brote, las características clínicas y demográficas y la presencia de anti-VHA descartaron al virus de la hepatitis A (VHA) como causa de la epidemia, apuntando hacia un nuevo agente etiológico. Su agente causal, el «virus de hepatitis entérica no-A», fue identificado en 1983 y denominado virus de la hepatitis E (VHE) (E por entérica y epidémica). Su genoma fue secuenciado en 1991. La hepatitis E representa una proporción significativa de las enfermedades hepáticas de transmisión entérica y constituye un importante problema de salud pública, especialmente en los países en vías de desarrollo, aunque también parece endémica en países industrializados de Europa y en Estados Unidos. En los países en desarrollo, el VHE se asocia principalmente a epidemias debidas a la contaminación de los suministros de agua y a las malas condiciones de saneamiento. En este sentido, se ha especulado sobre la hepatitis E como posible causa de brotes epidémicos de características análogas al brote de India que ocurrían regularmente en Europa en la segunda mitad del siglo XIX y principios del XX, cuando las condiciones sanitarias en Europa eran muy deficientes. Desde el punto de vista clínico, el VHE es responsable de infecciones hepáticas agudas autolimitadas y casos fulminantes de transmisión oral-fecal. Sin embargo, recientemente se han comunicado casos de infección crónica por este virus principalmente en pacientes trasplantados hepáticos y renales, sumándose a los virus B, C y D como agente causal de infección hepática crónica, abriendo una línea de estudio de gran interés en el futuro. La tasa de mortalidad de la infección por VHE (1-4%, o 1-15% en epidemias, o 20-30% en embarazadas) es mayor que la de la hepatitis A (0,1-2%).

Aunque la vía de transmisión fecal-oral para el VHE está bien establecida, se han observado casos de pacientes infectados por transfusión sanguínea en Japón o ingestión de alimentos, por lo que hay que valorar otras posibles vías de transmisión del VHE como la vertical, transfusión sanguínea, contacto persona a persona, y zoonótica.^{1, 7,9,8.}

3.-MARCO TEORICO.

VIROLOGIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E.

El VHE está formado por una partícula icosaédrica sin envoltura de unos 32 nm, resistente a la inactivación por las condiciones ácidas y alcalinas leve del tracto intestinal, facilitando la vía de transmisión fecal-oral. El genoma viral está formado por una sola cadena de RNA de sentido positivo de ~7,2 kb con 3 regiones codificantes de proteínas o marcos de lectura abierta (ORF): ORF1, ORF2 y ORF3, flanqueadas en 5' y 3' por dos regiones no traducidas (NTR). La región 5 NTR junto a una secuencia conservada de 58 nucleótidos del ORF1 y una secuencia homóloga a alfavirus del centro del RNA, que se pliegan en forma de estructuras «tallo-asa», son esenciales para la replicación y la transcripción del VHE. El ORF1 se traduce a partir de un transcrito genómico completo (el propio RNA-VHE que actúa como mensajero) y las proteínas codificadas por los ORF2 y ORF3 (superpuesta con ORF2) se traducen a partir de un único RNA subgenómico bicistrónico con dos codones AUG localizados en la región central del genoma, homóloga a alfavirus. El ORF1, en posición 5' del genoma viral, ocupa dos tercios del mismo y codifica una gran poliproteína, de 1 693 aminoácidos proORF1 que presenta varios motivos estructurales y funcionales responsables de la replicación viral: metiltransferasa (MetTrf), cisteín-proteasa análoga a la papaína (Cys-Prot), helicasa para RNA (Helic) y RNA-polimerasa dependiente de RNA (RNA-pol). La MetTrf se justifica por la presencia un residuo de 5'-metil-guanosina en 5' del RNA (modificación CAP) esencial para la infectividad y replicación del VHE. El motivo esencial GDD de la región RNA-Pol parece ser el centro activo de esta enzima. La región ORF2, en posición 3 del genoma viral, codifica la proteína proORF2 de 660 aminoácidos glucosilada en las asparaginas 137, 310 y 562, componente de la cápside viral 11; dímeros de proORF2, al interactuar con el extremo 5' del genoma viral por su región N terminal, rica en argininas (aa:1- 101), forman la cápside (180 moléculas proORF2 por partícula viral). La proteína proORF2 contiene 3 dominios lineales: el dominio S (aa:119-319), que forma la cápside, y los dominios M (aa:320-454) y P (aa:320-606), que se relacionan con la interacción virus-célula huésped. El dominio P queda expuesto al exterior de la cápside y es el posible sitio de unión de anticuerpos neutralizantes, y el blanco de las vacunas que están en desarrollo 11. La región ORF3 codifica una fosfoproteína (proORF3) de 114 aminoácidos, que es traducida del RNA mensajero subgenómico a partir de un tercer codón AUG con cambio del campo de lectura (+1) respecto al codón AUG de ORF2, por lo tanto casi totalmente superpuesta

con el ORF2. Esta proteína, prescindible para la replicación *in vitro*, parece ser requerida para la infección en simios. Su extremo N terminal, rico en cisteínas, se une al RNA viral formando un complejo con la cápside viral, en cuya superficie se localiza junto a una capa lipídica que transitoriamente recubre la partícula viral durante su salida de la célula infectada 12. La región C terminal de proORF3 tiene varios dominios multifuncionales que interactúan con diferentes proteínas celulares relacionadas con la morfogénesis de las partículas virales y su infectividad: de los dominios hidrofóbicos D1 y D2, D1 se une a una protein-fosfatasa-cinasa, activada por mitógenos con la se localiza en el citoesqueleto y activa la cinasa regulada extracelularmente (ERK), constituyendo una posible señal de supervivencia celular. Mientras que D2 interacciona con hemopexina, una glucoproteína de fase aguda cuyos niveles plasmáticos, así como los de haptoglobina, descienden en infectados por VHE. De esta forma, proORF3 parece inhibir la respuesta innata del huésped atenuando la respuesta inflamatoria de fase aguda. De las 2 regiones ricas en prolinas (P1 y P2), P1 contiene el residuo de serina 80 fosforilado, conservado en todas las cepas del VHE, excepto en la de México, y la región P2 contiene un motivo PxxPxxP que se une varias proteínas que contienen dominios homología-src 3 (SH3) y que se asocia con la salida del virus. La proORF3 parece regular el medio ambiente de la célula huésped a través de su interacción con diversas vías intracelulares. Activa la ERK uniéndose (e inhibiendo) a la fosfatasa que la inhibe. La activación prolongada de ERK generaría una señal de supervivencia y proliferación celular. Las interacciones de proORF3 con componentes celulares pueden favorecer la replicación viral, alargando la vida de las células infectadas al atenuar la vía intrínseca de muerte y regular a la baja la respuesta inmune innata por la reducción de expresión de proteínas de fase aguda y el aumento de la secreción de 1-microglobulina con capacidad inmunosupresora, mecanismos que pueden proteger las células infectadas por VHE. ^{1, 11.}

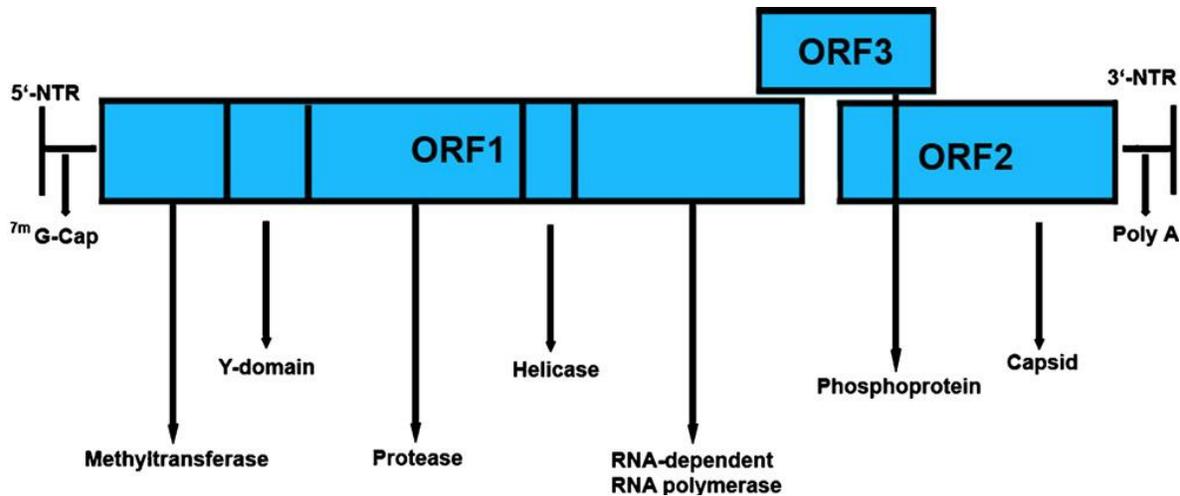


Figura 1 Organización genómica del virus de la hepatitis E. El diagrama representa la organización del genoma . El HEV es un virus ARN con tres marcos de lectura abiertos (ORF 1-3) que codifica proteínas no estructurales y estructurales. S. Kumar et al. / International Journal of Infectious Diseases 17 (2013) e228–e233

CICLO REPLICATIVO DEL VHE

No se conocen ni los receptores celulares para el virus ni el motivo de la cápside que reconoce estos receptores, que podría localizarse en el epítipo neutralizante del dominio P214. Se ha propuesto un modelo para el ciclo replicativo por su homología con otros RNA virus. En este modelo, tras la entrada del VHE en la célula huésped, el RNA genómico, ya sin cápside, es traducido en el citoplasma para producir la poliproteína no estructural proORF1, que por la acción de proteasas celulares se escinde en sus componentes (MetTrf, Cys-Prot, Helic y RNA-Pol) con la colaboración de la propia proteasa Cys-Prot del VHE. La RNA-Pol copia la cadena de RNA-VHE positivo en intermediarios de RNA-VHE negativo, moldes para que la RNA-Pol sintetice nuevas copias del RNA-VHE positivo genómico, para las nuevas partículas virales y mensajero para proORF1, así como el RNA-VHE positivo subgenómico, mensajero para proORF2 (cápside viral) y proORF3. Estas dos proteínas se transcriben a partir del motivo similar a alfa-virus del RNA viral que parece actuar como promotor. La cápside viral empaqueta el genoma viral, en cuya superficie se unirá proORF3 junto a una capa lipídica (eliminada en los viriones circulantes por un mecanismo desconocido). Finalmente, los nuevos viriones saldrán de la célula a través de un camino no bien definido, con la posible intervención de proORF3. Aunque no hay datos experimentales que confirmen este posible ciclo

replicativo¹⁵, se ha detectado RNA VHE de cadena positiva y negativa en hígados de monos y cerdos infectados experimentalmente.

CLASIFICACIÓN Y FILOGENIA DEL VHE

El VHE se clasificó originalmente en la familia Caliciviridae, pero más recientemente ha sido clasificado como un virus RNA de sentido positivo de clase IV perteneciente al género Hepevirus, único miembro de la familia Hepeviridae. Los estudios de diversidad inter e intrapaciente del VHE le confieren una estructura de especie con una tasa de acumulación de mutaciones del RNA-VHE de $1,40-1,72 \times 10^3$ sustituciones de base por sitio y por año, similar a otros virus RNA, con regiones altamente polimórficas en ORF1 (que contiene una región hipervariable), mientras que los 2 extremos de ORF2, gen de la cápside, están bien conservados. Filogenéticamente para el VHE de mamíferos se definen 4 genotipos y al menos 24 subtipos distintos. La relevancia clínica de los diferentes subtipos es desconocida. El genotipo 1 está restringido a humanos, aislado en brotes epidémicos y casos esporádicos de Asia y Norte de África donde son endémicos, y más recientemente en América. Presenta un 90% de homología entre los diferentes aislados. El genotipo 2 está restringido a humanos, incluye una única cepa aislada en una epidemia en México y cepas de epidemias en África Central. Tiene una homología del 75% en nucleótidos y del 86% en aminoácidos con el genotipo. Los genotipos 1 y 2 parecen ser más patogénicos que el 3 y 4, y de estos, el 4 más que el 3. En las infecciones por genotipos 1 y 2 en países en desarrollo, la afectación clínica fue más alta en niños mayores y adultos jóvenes, mientras que la hepatitis E por genotipos 3 y 4 de países desarrollados se observa en promedio a edades más avanzadas y en infectados con VIH, lo que sugiere que los genotipos 3 y 4, «menos patogénicos», es más probable que causen enfermedad en individuos inmunológicamente más débiles, como ancianos o inmunodeprimidos.

Aunque los aislados de VHE porcino, de genotipo 3 o 4, son homólogos a los aislados humanos, en países como Suecia y Holanda las cepas porcinas son sensiblemente diferentes de las humanas (en Holanda las cepas humanas son subgenotipo 3f y las porcinas 3c).

Esta disociación entre cepas humanas y porcinas es más patente en algunos países endémicos para la infección por VHE: en India las cepas porcinas son genotipo 4 y las humanas de genotipo 1 y en China las cepas humanas y porcinas pertenecen a diferentes subgenotipos del 4.

Estos datos parecen indicar que la infección cerdo-humano no es frecuente en estos países. Los brotes de infección por VHE indican que los genotipos 1 y 2 infectan más eficientemente por vía fecal-oral entre humanos, mientras que las cepas del VHE de genotipo 3 y 4 se mantienen entre las especies animales e infectan solo ocasionalmente a humanos por transmisión zoonótica, como por ingesta de hígado de cerdo mal cocido. La distribución de los genotipos parece cambiar rápidamente con el tiempo. Así, por ejemplo, en China el genotipo 4, registrado por primera vez en el año 2000, aumenta su presencia, mientras que el 1, responsable de uno de los mayores brotes e hepatitis E registrados en China entre 1986 y 1988, parece disminuir.^{1,7,9,10}

PATOGÉNESIS DE LA HEPATITIS E

El VHE entra en el huésped principalmente a través de la vía oral, pero no hay suficientes datos clínicos de su posible replicación extrahepática. No obstante, se ha detectado RNA-VHE en células mononucleares. En voluntarios, el VHE se detectó en heces una semana antes de la aparición de la enfermedad y hasta 2 semanas después. El RNA-VHE se detecta en el suero de casi todos los pacientes en las 2 semanas tras el inicio de la enfermedad y puede ser positivo de 4-16 semanas. A nivel hepático, en experimentos con primates los antígenos del VHE, indicativos de replicación viral, pueden visualizarse a los 7 días de la infección, y en el 70 al 90% de los hepatocitos en el pico de la replicación viral, simultáneamente con la aparición del VHE en bilis y heces, antes o con el inicio de la elevación de la alaninaminotransferasa (ALT) y los cambios morfológicos en el hígado, sugiriendo que el VHE es liberado de los hepatocitos a la bilis, y por tanto a las heces, antes del pico de ALT y los cambios morfológicos hepáticos. Los niveles del RNA-VHE en suero y heces son muy elevados desde el comienzo de la infección y caen bruscamente al final de esta, simultáneamente a la respuesta enérgica de anticuerpos antivirales. La concordancia entre hallazgos patológicos, virológicos y serológicos en hepatitis E sugiere que el mecanismo patogénico de la enfermedad puede ser inmune, no relacionado con el efecto citopático del VHE. El tamaño de la dosis infecciosa puede ser decisivo para la extensión de las secuelas virológicas, inmunológicas y patológicas de infección por VHE; así, primates infectados con dosis bajas de VHE presentan infecciones subclínicas pero pueden transmitir la infección. Se desconocen los mecanismos patogénicos de la altísima tasa de mortalidad por insuficiencia hepática fulminante en mujeres embarazadas (20-30%), que no se ha podido reproducir experimentalmente.

Las lesiones hepáticas graves en el ser humano se asocian a una alta frecuencia de coagulación intravascular diseminada, relacionada con los cambios inmunológicos y hormonales durante el embarazo. En este sentido se ha observado un cambio hacia Th2 en el equilibrio Th1/Th2 en las mujeres embarazadas infectadas por el VHE en comparación con mujeres no gestantes. Sin embargo, su influencia en la gravedad de la infección por VHE no está bien establecida. En humanos voluntarios se observa un periodo de incubación de 4-5 semanas, que es más variable, de 2-10 semanas, en los brotes de hepatitis E. Se han comunicado 5 posibles vías de transmisión del VHE, que en orden decreciente de importancia son: a) fecal-oral, por contaminación de los suministros de agua potable; b) por alimentos contaminados, crudos o poco cocidos; y de forma menos frecuente c) por transfusión de productos sanguíneos infectados; d) por transmisión vertical (materno-fetal), y e) por contacto directo con sujetos infectados. En algunos casos, sobre todo en regiones no endémicas y casos esporádicos de regiones endémicas, no es posible establecer la ruta de adquisición de la infección.

Se han confirmado molecularmente casos de hepatitis E relacionados con transfusiones sanguíneas en regiones no endémicas como Japón, Reino Unido y Francia; en uno de estos casos el donante había contraído la infección por VHE mediante el consumo de carne de cerdo asada y otro paciente que compartió esta comida con el donante también adquirió una hepatitis aguda.

Todos los casos de transfusión relacionados con la hepatitis E han sido causados por cepas del VHE de los genotipos 3 y 4, sugiriendo un potencial de transmisión parenteral de estos genotipos «zoonóticos». De esta manera, la contribución de la transmisión sanguínea a las infecciones por VHE humano debe ser valorada en el futuro como posible riesgo de infección postransfusional. La transmisión persona-persona es muy ineficiente (solo el 1-2% de casos del entorno familiar de pacientes con infección aguda por VHE).^{1, 3, 4, 8,6.}

ASPECTOS CLÍNICOS DE LA INFECCIÓN POR VHE

Hepatitis aguda por VHE

La presentación clínica de la infección por VHE es esencialmente indistinguible de la observada en otros virus hepatotropos. La etiología más común de esta infección es en forma de hepatitis aguda, que afecta habitualmente a individuos de 15 a 40 años de forma autolimitada y sin secuelas, que se manifiesta de 3 a 6 semanas después del contacto.

La infección aguda cursa con formas que van de subclínica (anictérica) a hepatitis colestásica severa con ictericia, anorexia, náuseas, vómitos y ocasionalmente fiebre que

duran de 1 a 6 semanas. El fallo hepático fulminante (FHF) puede ocurrir en ~1% de los casos, con mayor morbimortalidad en pacientes con hepatopatías crónicas y mujeres embarazadas.

Estas muestran mayores tasas de mortalidad (15-20%) y peor pronóstico obstétrico y fetal que las infectadas con otras hepatitis virales. Los acontecimientos que conducen al FHF son desconocidos, y ninguno de los test diagnósticos disponibles en la actualidad permite establecer el pronóstico de la enfermedad. A nivel epidemiológico se pueden observar diferencias entre zonas endémicas y no endémicas:

Zonas con infección por VHE endémica

En estas áreas la infección por VHE, fundamentalmente de genotipos 1 y 2, ocurre principalmente en adultos jóvenes con formas clínicas muy variadas, sobre todo hepatitis aguda icterica autolimitada, indistinguible de la causada por otros virus hepatotropos. La proporción de casos severos de insuficiencia hepática aguda es superior a la observada en otros virus como el VHA, con tasas de mortalidad del 0,5 al 4% (0,07-0,6% en los brotes epidémicos). La alta prevalencia de anticuerpos anti-VHE en regiones endémicas y la ausencia de síntomas de hepatitis aguda apuntan a una infección preferentemente asintomática o con evidencias de laboratorio de hepatitis E anictérica (elevación de enzimas hepáticas [ALT] y valores normales de bilirrubina en el suero. La sobreinfección por VHE de pacientes con enfermedad hepática crónica de cualquier etiología puede provocar lesiones hepáticas agudas superpuestas y un cuadro clínico de infección hepática aguda que puede empeorar su pronóstico

Áreas no endémicas para infección por VHE

En países no endémicos, la infección por VHE, causada por los genotipos 3 y 4, suele detectarse mediante pruebas serológicas en casos con hepatitis inexplicables, sobre todo en pacientes de más de 60 años.

Hepatitis crónica por VHE

Hasta hace poco se creía que el VHE, como el VHA, solo causaba infecciones hepáticas agudas autolimitadas y casos de fallo hepático fulminante, sin que se asociara a procesos de cronificación. Sin embargo, recientemente se han descrito casos de infección por VHE con enfermedad hepática crónica, e incluso progresión a cirrosis, en pacientes inmunosuprimidos, como receptores de trasplante de órganos sólidos, pacientes hematológicos o en quimioterapia o infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Inicialmente se comunicaron 14 receptores de trasplante de órganos sólidos con ALT elevada y evidencias de infección por VHE, 8 de ellos con viremia (ARN-VHE) y elevación de ALT persistentes, posteriormente se han comunicado casos análogos, también en pacientes trasplantados (hígado, riñón o páncreas).

Los pacientes con infección crónica por hepatitis E presentaban niveles inferiores de linfocitos CD2, CD3 y CD4E que los casos de infecciones por VHE auto limitadas resueltas, y un patrón histológico de hepatitis portal con infiltrado linfocitario denso y diferentes grados de fibrosis, incluso con progresión a la cirrosis, requiriendo retrasplante en algún caso.

Se han observado infecciones crónicas por VHE de genotipo 3 con cirrosis hepática en trasplantados renales, lo que sugiere que la infección por VHE puede progresar a cirrosis. Todos estos casos de infección crónica por VHE se presentan en personas inmunodeprimidas y son de genotipo 3; esto último puede ser debido a que este genotipo es el mayoritario de las zonas en que se han observado los casos. Se necesitan más estudios para determinar si el genotipo 1 de VHE, predominante en las zonas endémicas para el VHE, puede causar infección persistente

En un estudio retrospectivo, Kamar et al.⁵⁹ han observado que el 60% de 85 casos de receptores de órganos sólidos infectados por VHE desarrollaron una hepatitis crónica por este agente, sugiriendo la inmunosupresión mediante tacrolimus como un factor fuertemente relacionado con la cronificación y la reducción de la dosis de este inmunosupresor asociada con el aclaramiento del virus²

En conjunto, estos datos han cambiado nuestra visión sobre la historia natural de la infección por VHE y apuntan hacia la existencia de una forma de infección persistente por VHE con daño hepático crónico y progresivo que puede evolucionar hacia la cirrosis. Esta situación, aun siendo todavía un acontecimiento poco frecuente, es clínicamente significativa en pacientes inmunosuprimidos, y en futuros estudios se debe valorar su impacto. ^(1,2,7,8,9)

MARCADORES SEROLÓGICOS Y VIROLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR EL VHE

La respuesta serológica anti-VHE en pacientes presenta un patrón serológico clásico de anti-VHE IgM e IgG detectable generalmente en el momento de la aparición de la enfermedad. La IgM anti-VHE aparece durante la fase aguda de la enfermedad tan precozmente como a los 4 días del inicio de la ictericia. Se detecta en > 90% de los pacientes en las 2 primeras semanas tras la aparición de la enfermedad, con el pico en el

periodo sintomático, y permanece detectable 4-5 meses, constituyendo un marcador muy adecuado para el diagnóstico de la infección aguda.

Recientemente se ha estudiado la posible utilidad de la detección de IgA anti-VHE en el diagnóstico de la infección aguda, y se ha observado que la detección de IgA anti-VHE aislada o conjuntamente con IgM anti-VHE tiene una mayor especificidad y duración que la detección del RNA-VHE en el diagnóstico de infección aguda E. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para establecer la verdadera utilidad de este nuevo marcador. La respuesta de IgG anti-VHE es muy precoz, y comienza a desarrollarse poco después o incluso simultáneamente a la respuesta de IgM.

La IgG anti-VHE aumenta a lo largo de la fase aguda y en la etapa de convalecencia, permaneciendo años después de la infección, aunque sus niveles disminuyen con el tiempo. No obstante, es posible que la diferente duración de la persistencia de IgG anti-VHE esté relacionada con el diferente rendimiento de los métodos de evaluación utilizados. Así, algunos ensayos comerciales de IgG anti-VHE disponibles muestran concordancias que van del 40 al 70%⁴².

Por lo tanto, la aparición de IgM anti-VHE sin IgG indica una infección muy reciente, mientras que la presencia de IgG anti-VHE sin IgM apunta a una infección pasada. No obstante, como los anticuerpos IgG anti-VHE aparecen muy temprano, ambos tipos de anticuerpos, IgG e IgM, pueden detectarse en la fase aguda.

El RNA-VHE es el único marcador virológico útil, aunque con un valor limitado, como se indica más adelante. Se puede detectar en suero y heces durante la fase aguda de la infección e incluso antes de la elevación de ALT mediante RT-PCR. La detección de RNA-VHE permite establecer la replicación viral y su caracterización genotípica posterior. No obstante, el RNA-VHE tiene un valor limitado para el diagnóstico de infección aguda por los breves que son los periodos de viremia (unas 2 semanas en suero y unas 4 en heces, con casos de 8 a 12 semanas), por lo que su ausencia no permite descartar el diagnóstico de infección aguda por VHE. Por lo tanto, el diagnóstico de laboratorio de la hepatitis E aguda se basa en la presencia de IgM anti-VHE en suero y/o la detección de RNA del VHE en suero o heces. Desde el punto de vista puramente serológico, una infección aguda por el VHE es en general positiva para IgM (e IgA si lo confirman más estudios) e incluso IgG anti-VHE, mientras que solo este último es positivo para infección pasada y tiene más valor en estudios de seroprevalencia. En pacientes inmunosuprimidos, de seroconversión tardía o incluso ausente, se debe incluir la detección del RNA-VHE. En cualquier caso, y como se ha dicho anteriormente, hay que tener en cuenta que la

detección de IgM-VHE presenta problemas tanto de especificidad como de sensibilidad (1,3,4,6)

CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS DE VHE.

La infección por VHE puede causar hepatitis de interface caracterizada por inflamación lobular y portal principalmente por células plasmáticas, proliferación ductular, esteatosis graduada en (leve, moderada y severa) y fibrosis (ausente, portal, portal con septos incompletos, en puentes y cirrosis. Los hepatocitos muestran degeneración balonoide, multinucleación, daño a los ductos biliares, prominencia de las células de Kupffer, colestasis intracelular e intracanalicular;

y esta puede evolucionar a necrosis del parénquima graduado en ausente, focal, en puentes o multilobularo confluyente o panlobular.). En realidad no existen características histológicas diagnosticas del VHE sin embargo las citadas

anteriormente pueden contribuir a la búsqueda de este agente después de haber descartado otras más comunes. (1, 6,12,14)

4.- ANTECEDENTES

La infección por VHE es probablemente la causa más frecuente de hepatitis aguda a nivel mundial, estimándose que un tercio de la población mundial ha estado infectada por este agente. El VHE es la principal causa de hepatitis aguda en adultos en Centroamérica y en el Sudeste asiático, y la segunda, detrás del virus de la hepatitis B, en Oriente Medio y en África del Norte. En contraste, el VHE es responsable de un número ínfimo de casos en los países industrializados, donde el VHA es la causa mayoritaria. En contraste con la incidencia geográfica de la enfermedad por VHE, la prevalencia geográfica de anticuerpos contra el VHE es mundial, con prevalencias más altas en países en desarrollo, donde la enfermedad clínica es endémica. Los brotes epidémicos solo se producen en países en desarrollo y se asocian con la contaminación de aguas por VHE, mientras que las infecciones esporádicas (no epidémicas) son la presentación habitual en los países desarrollados. De estos casos esporádicos, algunos se explican por transmisión zoonótica por contaminación alimentaria (productos poco cocidos: mariscos o carne) o por contacto directo con animales infectados. Así mismo, las infecciones subclínicas pueden presentar una respuesta inmune limitada contra el VHE, pero con viremia y excreción fecal de VHE, contribuyendo al reservorio de VHE y, por lo tanto, a su transmisión. La infección por VHE

parece seguir 2 patrones claramente diferenciados: un patrón en las regiones donde se producen las epidemias (países subdesarrollados) y otro muy diferente en los países desarrollados.

Patrón epidémico: hepatitis E en regiones endémicas. En estas regiones las epidemias de hepatitis E son frecuentes y afectan a cientos o miles de personas, y se asocian al consumo de agua potable contaminada con materia fecal. Estas epidemias se han observado en India, China, Asia Sudoriental y Central, Oriente Medio y partes del norte y del oeste de África, y 2 brotes únicos (1986-1987) en México.

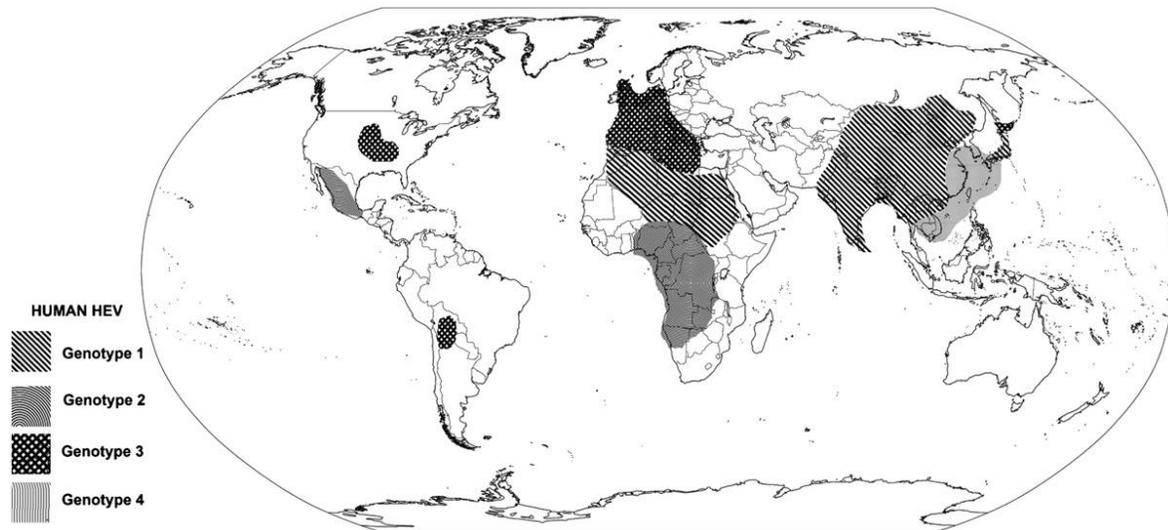


FIGURA 2. Distribución geográfica de la hepatitis humana genotipos del virus E. Mapa que muestra la distribución geográfica de los genotipos del VHE entre los humanos. VHE humanos aislados se dividen en cuatro genotipos principales (1-4), y cada uno tiene su propia localización geográfica. S. Kumar et al. / International Journal of Infectious Diseases 17 (2013) e228–e233

La duración de los brotes va de pocas semanas a más de un año, habitualmente tras periodos de lluvias torrenciales con inundaciones, que favorecen la mezcla de excrementos humanos con las fuentes de agua potable. Las tasas de morbilidad durante los brotes de hepatitis E van del 1 al 15%, y afectan sobre todo a adultos jóvenes, más varones que mujeres. Es remarcable que los brotes de hepatitis E se asocian a una alta morbilidad y mortalidad en embarazadas (19% en embarazadas, frente al 2,1% en no

embarazadas o el 2,8% en hombres), con un alto riesgo obstétrico de prematuridad y riesgo de mortalidad perinatal.

En estas zonas también se observa que una gran proporción de los casos de hepatitis aguda esporádica (70% en India) son causados por el VHE, con un perfil clínico similar a los casos epidémicos. La presencia de ARN-VHE en muestras de aguas residuales indica que el VHE circula ampliamente entre la población, incluso en ausencia de un brote de la enfermedad, causando posiblemente las infecciones esporádicas. Recordemos que, a diferencia de otras infecciones de transmisión entérica, la transmisión de persona a persona del VHE es poco común, incluso durante los brotes epidémicos (0,7-2,2% entre familiares de pacientes con hepatitis E vs. 50-75% en la hepatitis A). El corto intervalo de tiempo en infecciones en una misma familia indica una causa común de infecciones primarias (por ejemplo, por el agua) en lugar de la infección de persona a persona. La infección zoonótica del VHE en estas regiones parece improbable, puesto que los aislados de VHE de animales y humanos pertenecen a genotipos diferentes (por ejemplo, en India los aislados animales pertenecen al genotipo 4, mientras que los aislados de humanos son de genotipo 1)¹⁸. En estas regiones es poco probable la existencia de un reservorio animal responsable de mantener la enfermedad. La importante población de individuos con infección subclínica por VHE podría actuar como reservorio principal, manteniendo de forma continua la infección mediante contaminación fecal

Patrón no-endémico:

En regiones sin brotes epidémicos la hepatitis E representa solo una minoría de las hepatitis virales agudas, y hasta hace unos años la mayoría de ellos estaban relacionados con viajes a zonas endémicas para la infección por VHE. Sin embargo, en los últimos años se han comunicado casos de transmisión autóctona de hepatitis E en Estados Unidos, Europa y los países desarrollados de Asia-Pacífico (Japón, Taiwán, Hong Kong, Australia). No se ha identificado la vía de infección en la mayoría de los casos esporádicos, pero la transmisión de cepas de VHE humanas a cerdos, y de estos a primates, sugiere la zoonosis como causa más probable. ^{7,10,11,15}

5.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se realizará la búsqueda de todos los casos diagnosticados como hepatitis crónica de etiología indeterminada del 2004 al 2014 en los libros de reporte de diagnósticos quirúrgicos, se corroborarán por un patólogo para confirmar el diagnóstico histológico y posteriormente se realizará PCR de punto final para determinar la presencia o ausencia de RNA de VHE así como el servicio más susceptible a esta infección y la distribución de acuerdo a edad y sexo en pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México.

6.-PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de VHE en biopsias de hígado de pacientes pediátricos con diagnóstico de hepatitis crónica en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

7.-JUSTIFICACIÓN

La hepatitis aguda ocasionada por infección por VHE, es una de las causas más comunes de esta infección, estimándose que un tercio de la población ha sido infectada por este agente, causando la presentación subclínica con una respuesta inmune limitada, contribuyendo esto a ser un reservorio para su posterior transmisión. Actualmente se considera que el VHE evoluciona a una hepatopatía crónica o a una respuesta clínica fulminante, sabiendo lo anterior, es importante plantearse la búsqueda intencionada de este agente en biopsias hepáticas con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada, con el objetivo de determinar la presencia de este agente y con esto encaminar una vigilancia más estrecha y planes de prevención; cabe hacer hincapié que la mayoría de los estudios se han hecho en la población adulta; sin embargo, en nuestro medio, la población infantil es muy susceptible a dicha infección, motivo por el cual se realizará la búsqueda intencionada de RNA de virus de hepatitis E en biopsias de hígado con hepatitis crónica.

8.-OBJETIVOS

Objetivo general.

- Determinar la presencia de VHE en biopsias de hígado de pacientes con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada

Objetivos específicos.

- Determinar la frecuencia del VHE en biopsias de hígado con diagnóstico de hepatitis crónica.
- Determinar las frecuencias de la presencia del VHE por variables demográficas (edad y género).

9.- HIPOTESIS

En los pacientes con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada documentada histopatológicamente, se podría encontrar presencia de VHE que puede afectar su evolución y pronóstico en la población del Hospital infantil de México Federico Gómez.

10. METODOS

A) DISEÑO DEL ESTUDIO

- Se realizó estudio transversal, descriptivo y observacional.

B) POBLACION DEL ESTUDIO

Se revisó el banco de biopsias y se localizarán los casos con diagnóstico histopatológico de hepatitis crónica de etiología indeterminada, casos contenidos en el periodo entre el 2004 al 2014.

C) CRITERIOS DE INCLUSION

- Biopsias con diagnóstico de hepatitis crónica de etiología indeterminada.
- Contar con bloques de parafina de los casos y expediente clínico.

D) CRITERIOS DE EXCLUSION

- Casos en los que no exista el material suficiente para realizar la extracción de RNAm
- Casos en los cuales se encuentra el RNAm degradado.

E) VALIDEZ INTERNA Y EXTERNA

La calidad del RNAm se comprobará primero mediante la amplificación de un gen constitutivo por RT-PCR de punto final. El gen es gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.

Todos los casos localizados en las libretas de reporte de diagnósticos quirúrgicos, se corroborarán por 2 patólogos para confirmar el diagnóstico.

F) MÉTODOS

1.-Extracción total del RNAm total de cortes de parafina de cada uno de los casos seleccionados anteriormente. Se comprobó la integridad del RNAm mediante amplificación de un fragmento del gen GAPDH por RT-PCR de punto final.

2.- Posteriormente se realizó la amplificación de un fragmento de 250 nucleótidos de un segmento de genoma del VHE cepa México. La secuencia de los iniciadores fue la siguiente:

VHE F: GAC AGA ATT AAT TTC GTC GGC TGG Posición: 6265-6288

VHE R: CTT GTT CAT GCT GGT TGT CAT AAT Posición: 6437-6461

Estos iniciadores se utilizaron en otro estudio realizado en el Laboratorio de Investigación en Patología Experimental, en la detección de VHE en suero de pacientes de diversos servicios (resultados no publicados).

3.-Se verificó la presencia del VHE mediante un análisis en electroforesis de acrilamida al 12% y tinción de plata. La presencia del amplificado correspondiente confirma la presencia del virus en la biopsia.

G) TAMAÑO DE LA MUESTRA

Será un tamaño de muestra a conveniencia, que estará sujeta al número de casos registrados de hepatitis crónica de etiología indeterminada, en el período entre el 2004 al 2014, de los casos diagnosticados en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

11.-CONSIDERACIONES ETICAS

El presente protocolo es una investigación sin riesgo para los pacientes, la muestra de la población a estudiar son tejidos almacenados en el departamento de Anatomía patológica del Hospital Infantil de México, sin tener contacto directo con los pacientes. El presente estudio no tiene beneficios al dueño de la muestra sin embargo aporta nuevos conocimientos al resto de la población con el fin de ayudar en los tratamientos y con esto mejorar su pronóstico.

Guardaremos confidencialidad de los número de biopsias por lo que se reasignaran números seriados con la finalidad de ocultar la identidad del paciente .

12) PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO

El producto de amplificación del gen MAL2 del VHE contenido en 10 µL en los casos positivos, se separó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 14%, durante 70 min a 110 V. El revelado del producto de 198 pb se realizó mediante tinción de plata y se grabaron las imágenes digitales de los geles. (ver anexos 20)

13) DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	UNIDAD DE MEDICION
SEXO	Fenotipo de los pacientes	Asignado en el expediente	Cualitativa Nominal	Femenino O Masculino
EDAD	Tiempo transcurrido entre el nacimiento y la aparición de la enfermedad	Asignado en el expediente	Cuantitativa discreta	Meses
RNA DE VHE	Expresion en PCR de punto final.	Medición con PCR punto final.	Cuantitativa Discreta	Valor numerico

14.-RESULTADOS.

Distribución de los casos de estudio totales por servicio de atención

Las biopsias de hígado incluidas en este trabajo fueron un total de 20, que correspondieron a pacientes de diferentes servicios. Al RNA de cada una de ellas se realizó la amplificación del fragmento del gen MAL2 del VHE mediante PCR de punto final.

La distribución de las muestras estudiadas de acuerdo al servicio se muestran en la figura 3. Predominaron en mayor número de casos del Servicio de Gastroenterología como era de esperarse.

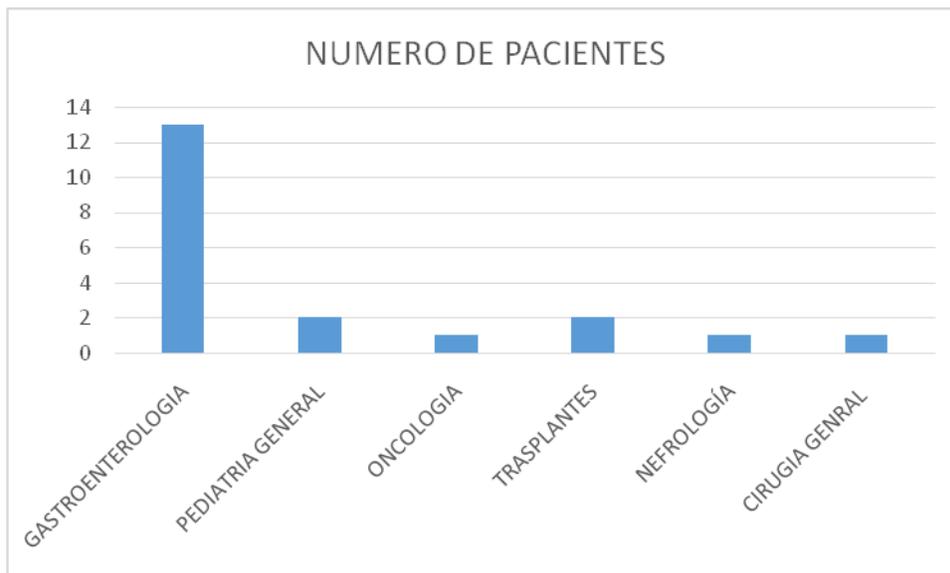


Figura 3.- Distribucion de los casos de acuerdo al servicio de atención.

La distribución de acuerdo a edad y sexo con intervalos de edades, numero de pacientes, a los cuales se realizó la amplificación del fragmento del gen MAL2 del VHE mediante PCR de punto final, semuestra en la figura 4. Predominaron casos del grupo de edades de entre 6 a 10 años.

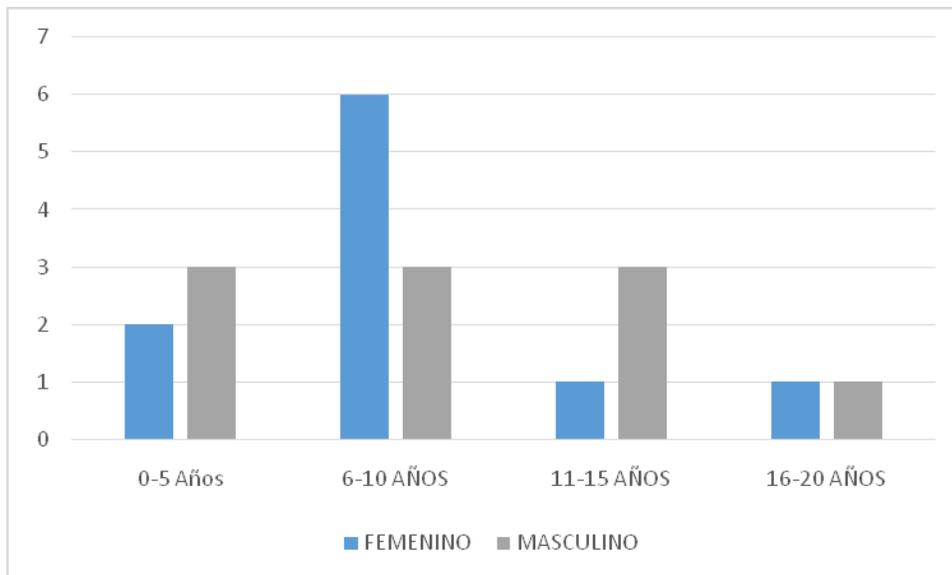


Figura 4.- Distribucion de los casos de acuerdo a la edad y sexo.

De los 20 pacientes analizados se encontro amplificacion de fragmento del gen MAL2 del VHE mediante PCR de punto final los cuales ocho casos fueron positivos como se muestra en la figura 5. Esto corresponde al 40% de la poblacion estudiada.

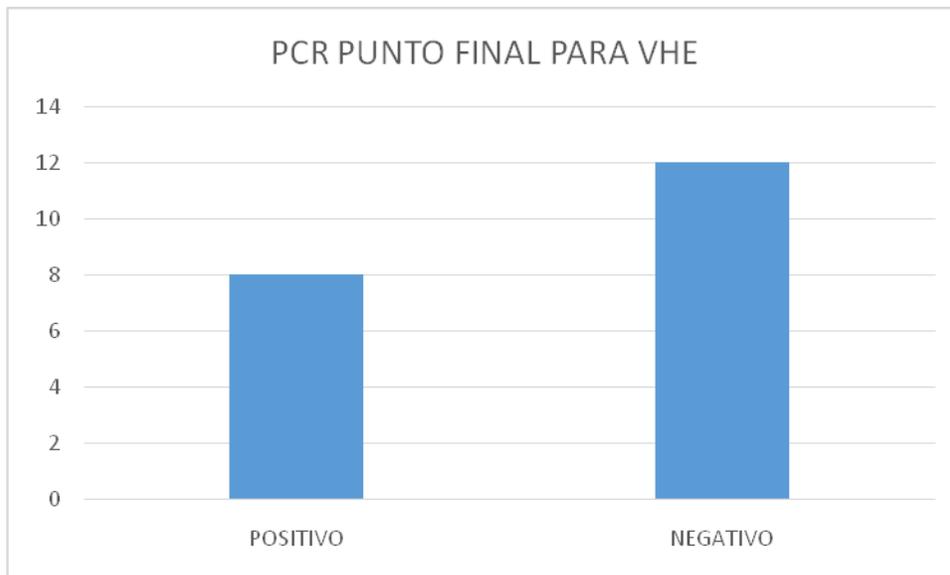


Figura 5.- Número de casos positivos y negativos del gen MAL2 del VHE por PCR Punto final de la poblacion estudiada

De los casos positivos se valoró de acuerdo a edad y sexo como se muestra en figura 6

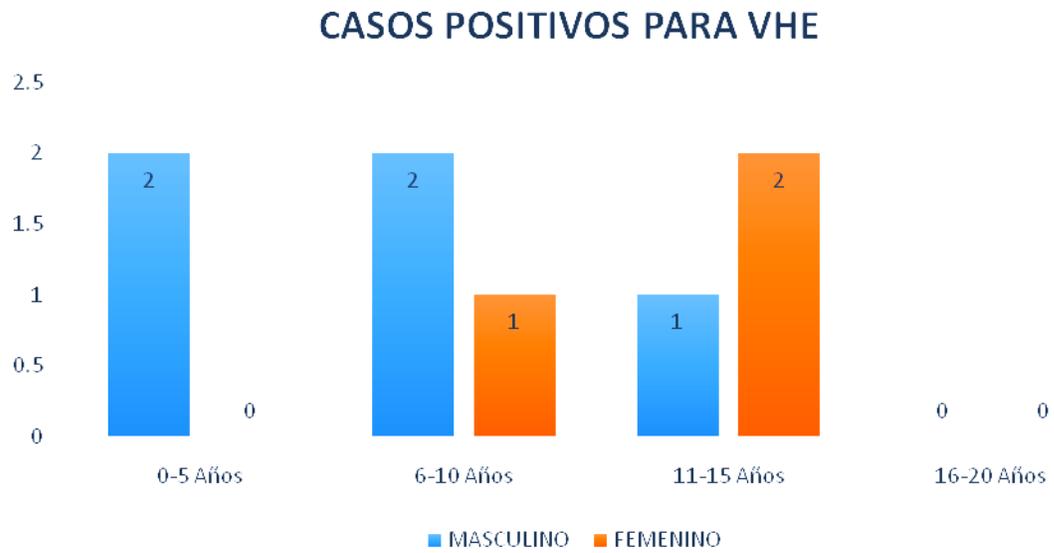


Figura 6.-Distribucion de los casos positivos por PCR punto final de acuerdo a edad

El Hospital Infantil de México Federico Gómez, es un Instituto Nacional de Salud el cual cuenta con el Servicio de Patología, mismo donde se reciben por año de 3000 a 3500 Quirúrgicos en promedio, de las cuales el 3.8% corresponden a biopsias de hígado, donde uno de los diagnósticos es el de hepatitis crónica de etiología indeterminada, el cual corresponde al 14% del total del biopsias por año.

Se hizo un muestreo a conveniencia de 20 pacientes cuyas biopsias fueron previamente analizadas por el Patólogo del Servicio, las cuales reunieron los criterios histológicos de hepatitis crónica de etiología indeterminada. Se descartó la presencia de VHA, VHB, VHC, VHD, posteriormente se realizaron cortes de 10 micras, a las que después se les realizó extracción del RNA, síntesis de cDNA y finalmente el PCR de punto final.

15.-DISCUSIÓN

La información respecto al estado epidemiológico del VHE en nuestro país es escasa principalmente por la evolución autolimitada del cuadro clínico, consecuencia de la viremia, seguido que no existe un registro específico para VHE en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Si no que esta se encuentra dentro de las "otras hepatitis", sin embargo; en el manual de procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Hepatitis Virales, se menciona que la tendencia durante los últimos 10 años, es descendente con una incidencia de 2.3 por 100,000 habitantes. Las entidades con mayor incidencia fueron: Distrito Federal con 5.8, le siguieron Jalisco con 5.7, Guerrero con 4.9, Campeche con 3.8 y Chiapas, Sinaloa, Nuevo León con 3.5. Los grupos de edad más afectados fueron: el de 5 a 9, y el de 1 a 4. ¹⁶

Considerando que la Secretaría de Salud, a través del SUIVE informa de 12 a 14% de hepatitis virales no tienen un diagnóstico específico y debido al número limitado de estudios epidemiológicos del VHE en el país, así como la evolución a hepatopatía crónica y/o cirrosis hepática, se considera la presencia del VHE como factor asociado a este proceso. Con lo anteriormente descrito en la muestra de estudio se encontró que el 40% de los casos son positivos a VHE. Se puede sospechar que la presencia de este virus puede participar en la evolución de las hepatopatías crónicas.

Cuando se investigó el agente etiológico de la cirrosis hepática se observó que 33% de los casos corresponden a aquellos pacientes cuya etiología era desconocida (datos no publicados). No obstante el número limitado de casos analizados, esta información impulsa a seguir estudiando el impacto de “otros” virus en la generación de daño hepático crónico en la población mexicana.

16.- CONCLUSIONES.

- El 40% de la población estudiada (20 casos) fueron positivos a la presencia por el VHE, considerándose un hallazgo asociado a la hepatopatía crónica de etiología indeterminada.
- Del total de pacientes incluidos en este estudio, la población femenina de 6 a 10 años es mayormente diagnosticada como Hepatitis crónica de etiología indeterminada.
- La distribución de acuerdo a edad y sexo es mayor en niños de 0-10 años en las muestras analizadas del Hospital Infantil de México Federico Gómez.
- Se encontró que dos de los servicios con más casos de hepatitis crónicas son gastroenterología y trasplantes del Hospital Infantil de México Federico Gómez comprobando la susceptibilidad descrita en la literatura para el VHE.

17.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- Casos en los que no exista el material suficiente para realizar la extracción de RNAm
- Casos en los cuales se encuentra el RNAm degradado.
- No existan bloques de parafina en buen estado.

18.- CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

CRONOGRAMA DE ESTUDIO	TIEMPO											
	2015							2016				
	Marzo	Abril	3 agosto	4 Septiembre	5 octubre	6 noviembre	7 Diciembre	8 Enero	9 Febrero	10 Marzo	11 Abril	12 Mayo
	ACTIVIDADES											
Revisión de la bibliografía	X	X	X	X								
Recolección de la población de estudio				X	X	X	X					
Estandarización de técnica								X				
Recolección de las muestras								X	X			
Realización de estudios								X	X			
Análisis de estudio									X	X		
Presentación de resultados										X	X	
Elaboración de conclusiones												X

19.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

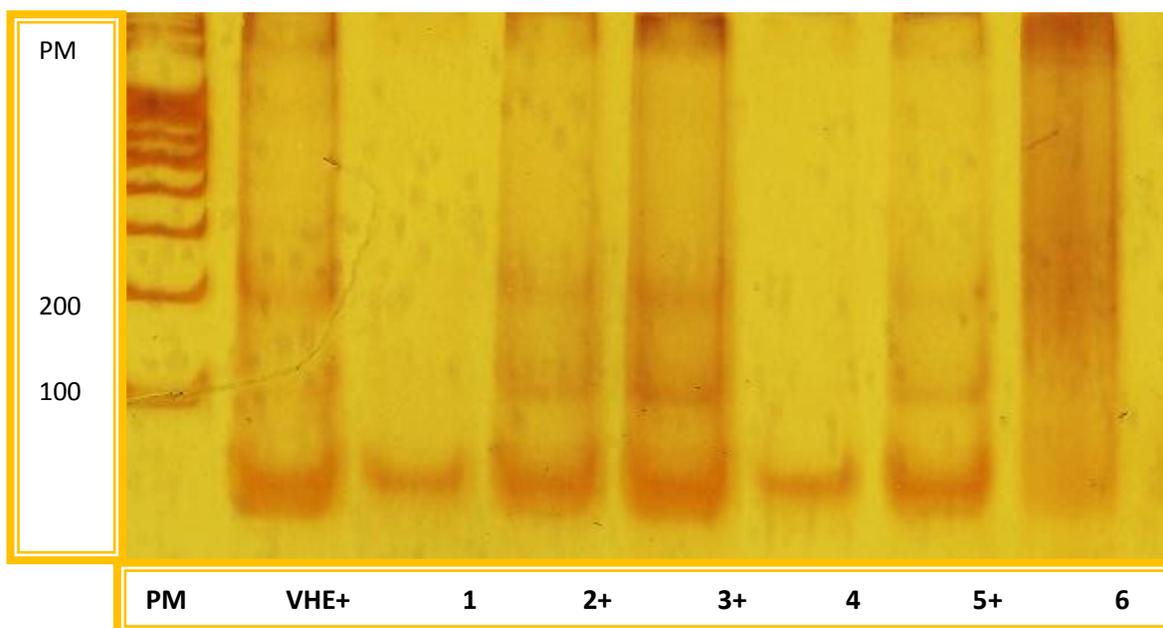
1. Francisco Rodríguez-Frias a,c,*, Rosendo Jardi a,c y María Bu. Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(10):624–634.
2. Kamar N, Selves J, MansuyJm, Ouezzani L, PeronJm, Guitard J, Et Al. Hepatitis E Virus And Chronic Hepatitis In Organ-Transplant Recipients. *N Engl J Med*. 2008; 358:811–7.
3. X. J. Meng Recent Advances In Hepatitis E Virus. *Journal Of Viral Hepatitis*, 2010, Volumen17, 153–161.
4. MariaLuisa Mateos-Lindemann, María Diez-Aguilar, Ana González-Galdamez, Javier Graus-Morales, Ana Moreno-Zamora Y María Teresa Pérez-Gracia. Hepatitis Agudas, Crónicas Y Fulminantes Por Virus De La Hepatitis E: 7 Años De Experiencia (2004-2011). *Enferm. Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(9):595–598.
5. Agrawal V, Goel A, Rawat A, Naik S, Aggarwal R. Histological And Immunohistochemical Features In Fatal Acute Fulminant Hepatitis E. *Indian J Pathol.Microbiol* 2012;55:22-7.
6. Aggarwal R. The global prevalence of hepatitis E virus infection and susceptibility: a systematic review. Geneva: World Health Organization; 2010. http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO_IVB_10.14_eng.pdf (accessed 01 May 2014).
7. Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E. *Hepatology*. 2011;54:2218–26.
8. Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J GastroenterolHepatol*. 2009;24:1484– 93.

9. Guthmann JP, Klovstad H, Boccia D, Hamid N, Pinoges L, Nizou JY, et al. A large outbreak of hepatitis E.
10. Valsan Philip Verghese and Joan Robinson. A Systematic Review Of Hepatitis E Virus Infection In Children. Clinical Infectious Diseases. Hepatitis Viral Cid 1- 9.
11. Subrat Kumar, Subhra Bhupinder Singh, B.K Panda. Hepatitis E virus. The current scenario. International Journal of Infectious Diseases 17 (2013) e288- e233.
12. María Teresa Perez Gracia, Maria Luisa Mateos Lindemann. Estado actual de la hepatitis E. Medica Clinical(Barc) 2012; 139(9) 404-411.
13. NassimKamar MD, Ph.D. Janick Selves MD, Jean Michel Mansuy MD, Leila Quezzani MD. Hepatitis E. Virus and Chronic Hepatitis in Organ- Transplant Recipients.
14. Arturo Panduro MD, PhD. Griselda Escobedo Meléndez MD, Nora A Fierro, Bertha Ruiz Madrigal, PhD. Epidemiología de las hepatitis virales en México. Salud Publica Mex 2011;53 supl 1:S37-S45.
15. Bartnof HS, Hepatitis E Emerges as Significant Cause of Liver Inflammation Worldwide. 10th International Symposium on Viral. Hepatitis and Liver Diseases, April 9-14, 2000. Atlanta, Georgia.
16. - Programa de Acción Específico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2007- 2012, 1ra edición 2008.

20.-ANEXOS

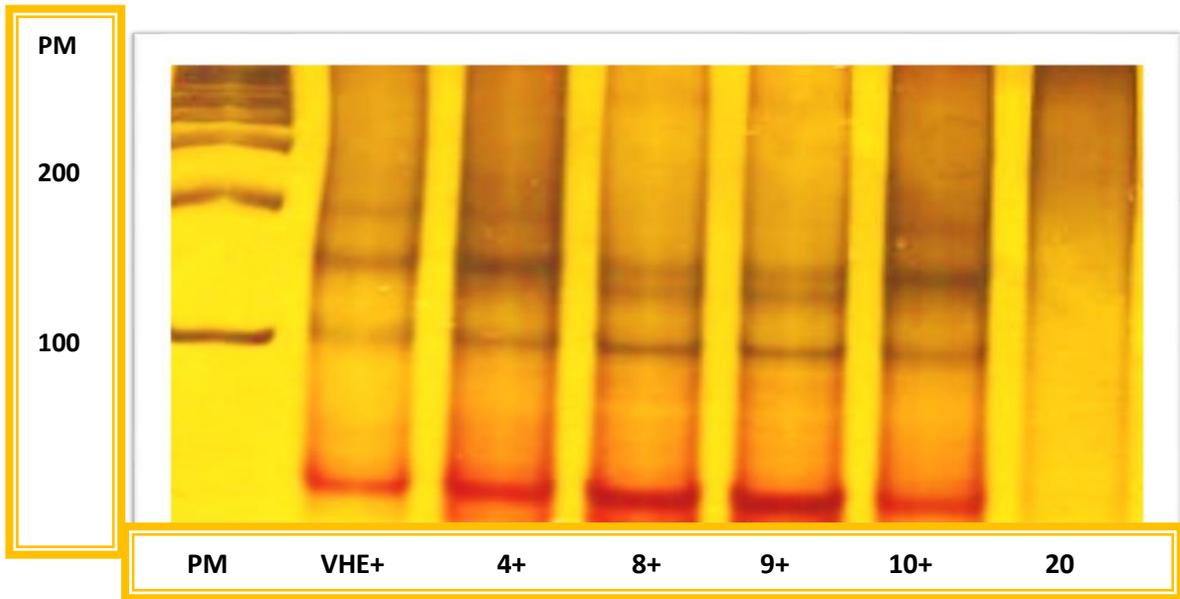
Reporte de los geles de poliacrilamida con resultados positivos

20.1.-ANEXO 1



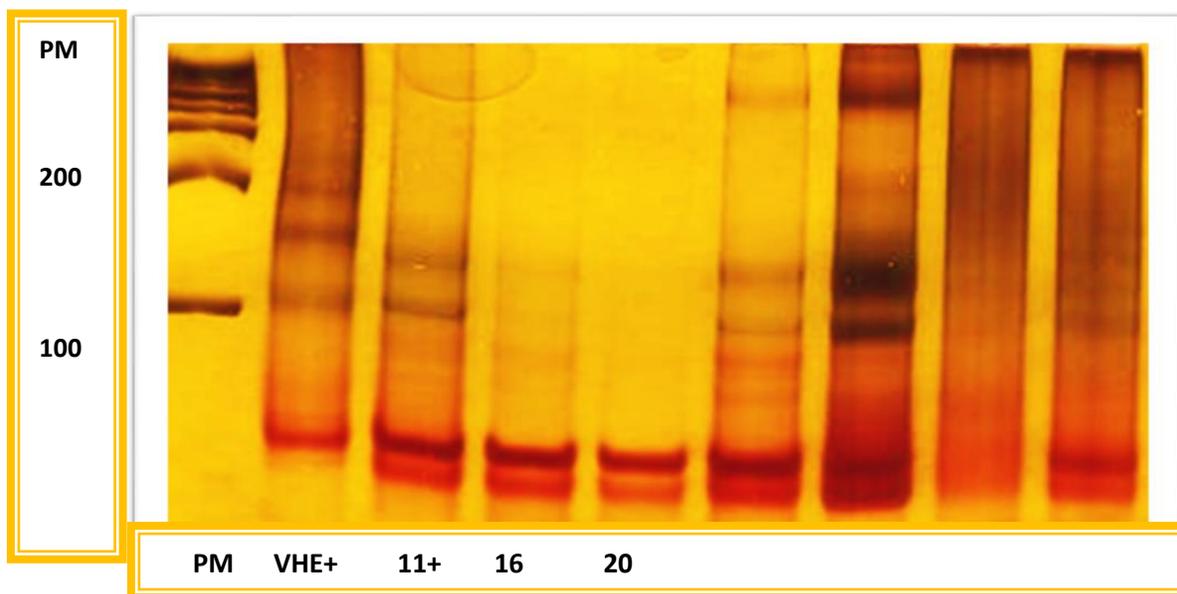
Productos separados en geles de acrilamida al 14%. Tinción con plata.

20.2.- ANEXO 2



Productos separados en geles de acrilamida al 14%. Tinción con plata.

20.3 ANEXO 3



Productos separados en geles de acrilamida al 14%. Tinción con plata.