

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LILIAN GONÇALVES DE CARVALHO

**Macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) como Modelo Experimental
para Infecção com Vírus da Hepatite E (genótipo 3)**

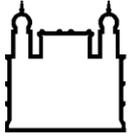
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Parasitária.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

RIO DE JANEIRO

2011

Trabalho realizado no Laboratório de Desenvolvimento
Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz /
Fiocruz, sob orientação do Dr. Marcelo Alves Pinto.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LILIAN GONÇALVES DE CARVALHO

**Macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) como Modelo Experimental
para Infecção com Vírus da Hepatite E (genótipo 3)**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Aprovada em: 29 / 03 / 2011

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ) - Presidente

Dra. Lia Laura Lewis-Ximenez de Souza Rodrigues (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ)

Prof. Dra. Cláudia Lamarca Vitral (Universidade Federal Fluminense/RJ)

SUPLENTE:

Prof. Dra. Rita de Cássia Nesser Cubel Garcia (Universidade Federal Fluminense/RJ)

Dr. Renato Sergio Marchevsky (Biomanguinhos – Fiocruz/RJ)

Rio de Janeiro

2011

Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível.

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcelo Alves Pinto, pela orientação, oportunidades, voto de confiança e incentivo à minha carreira científica.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC / Fiocruz), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) pelo suporte financeiro ao estudo desenvolvido.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

Aos membros da banca e suplentes, Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ), Dra. Lia Laura Lewis-Ximenez (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ), Prof. Dra. Cláudia Lamarca Vitral (Universidade Federal Fluminense), Dr. Renato Sergio Marchevsky (Bio-Manguinhos / Fiocruz) e Prof. Dra. Rita de Cássia Nesser Cubel Garcia (Universidade Federal Fluminense) pela contribuição científica.

Aos Dr. Renato Sergio Marchevsky (Bio-Manguinhos / Fiocruz), Dr. Julio Moran (Lab. Julio Moran – Suíça), Dr. Wim van der Poel (*National Institute of Public Health and the Environment* – Holanda), Miguel Angelo Brück (Dirac / Fiocruz) e Dr. Jorge Enrique González (Lab. Nacional de Referência INEI ANLIS "Dr. C. G. Malbran", Argentina) por contribuírem com a qualidade dos trabalhos realizados.

Aos colaboradores, Ana Carolina dos Reis Albuquerque Cajaraville (Bio-Manguinhos / Fiocruz) e Felipe Carvalho Resende (Biotério de Experimentação de Primatas não Humanos / Fiocruz), pelo apoio constante.

À Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar, pelo estímulo, confiança e respeito ao meu trabalho.

Às Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira e Prof. Dra. Cláudia Lamarca Vitral, pela contribuição técnico-científica e amizade.

À Dra. Débora Regina Lopes dos Santos, pelos ensinamentos, confiança, conselhos, carinho e amizade.

À Renata Tourinho dos Santos, pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

À equipe e alunos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia por renovarem diariamente minha crença em minhas escolhas.

À equipe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, em especial, ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pela amizade e estímulo.

Ao ex-chefe do Serviço de Primatologia / Cecal, Dr. Antônio da Mota Marinho, pelo apoio e incentivo durante esse período.

A todos os amigos e colegas do Serviço de Primatologia / Cecal, pelo apoio e crescimento profissional.

Aos meus pais, namorado e familiares, por todo incentivo, apoio, compreensão e carinho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - Histórico	01
1.2 - O Vírus da hepatite E	02
1.2.1 - Taxonomia	02
1.2.2 - Propriedades do vírion	02
1.2.3 - Organização e Estrutura genômica	04
1.2.4 - Genótipos e Heterogeneidade genotípica	05
1.2.5 - Ciclo replicativo do HEV	07
1.3 - Epidemiologia	08
1.3.1 - Modos de transmissão	08
1.3.2 - Distribuição geográfica	09
1.4 - HEV em animais	11
1.5 - A infecção pelo HEV em humanos	13
1.6 - Diagnóstico laboratorial	15
1.7 - Prevenção e Controle	17
1.8 - Modelos de infecção: animais e cultura celular	18
1.8.1 - Macacos cynomolgus como modelo de infecção experimental pelo HEV	18
2 - JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	20
3 - OBJETIVOS	21
3.1 - Objetivo geral	21
3.2 - Objetivos específicos	21
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 - Desenho experimental	22
4.1.1 - Animais	22
4.1.2 - Enriquecimento ambiental	22
4.1.3 - Comitê de ética	23
4.1.4 - Grupos e inóculos	23
4.1.5 - Coleta de amostras	25

4.2 - Testes bioquímicos	27
4.3 - Hematimetria e Leucometria	27
4.4 - Testes imunoenzimáticos	27
4.4.1 - Teste imunoenzimático (EIA) para pesquisa de anticorpos para o HEV	27
4.5 - Testes moleculares	29
4.5.1 - Suspensão fecal	29
4.5.2 - Extração do RNA viral	29
4.5.3 - Síntese do DNA complementar (cDNA)	29
4.5.4 - Detecção e Quantificação do HEV RNA pela reação em cadeia da polimerase (<i>PCR em tempo real</i>)	29
4.6 - Processamento histológico	30
5 - RESULTADOS	32
5.1 - Sinais clínicos	32
5.2 - Cinco grupos experimentais	32
5.2.1 - Grupo 1: Infectado com suspensão fecal de suíno – Brasil	32
5.2.2 - Grupo 2: Infectado com amostras biológicas humanas – Argentina	35
5.2.3 - Grupo 3: Infectado com suspensão fecal de suíno – Holanda	38
5.2.4 - Grupo 4: Infectado com soro humano – Brasil	41
5.2.5 - Grupo 5: Controle negativo	42
6 - DISCUSSÃO	46
7 - CONCLUSÕES	51
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALT – alanina aminotransferase
- anti-HEV – imunoglobulina total contra o vírus da hepatite E
- AST – aspartato aminotransferase
- cDNA – fita de DNA complementar, do inglês “complementary DNA”
- CO – valor de corte, do inglês “cut off”
- DO – densidade óptica
- dpi – dias pós-inoculação
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”
- EIA – ensaio imunoenzimático, do inglês “Enzyme immunoassay”
- EUA – Estados Unidos da América
- GGT – gama glutamil transferase
- HAV – vírus da hepatite A, do inglês “hepatitis A virus”
- HBV – vírus da hepatite B, do inglês “hepatitis B virus”
- HCV – vírus da hepatite C, do inglês “hepatitis C virus”
- HEV – vírus da hepatite E, do inglês “hepatitis E virus”
- HEV RNA – genoma do tipo RNA do vírus da hepatite E
- ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia Viral
- IEM – Imunomicroscopia eletrônica
- IF – inflamação focal
- IgA – imunoglobulina tipo A
- IgA anti-HEV – imunoglobulina tipo A contra a vírus da hepatite E
- IgG – imunoglobulina tipo G
- IgG anti-HAV – imunoglobulina tipo G contra a vírus da hepatite A
- IgG anti-HEV – imunoglobulina tipo G contra a vírus da hepatite E
- IgM – imunoglobulina tipo M
- IgM anti-HEV – imunoglobulina tipo M contra a vírus da hepatite E
- IHA – insuficiência hepática aguda
- IP – inflamação portal
- NANB-ET – não-A e não-B entericamente transmitido
- NCR – região não codificante, do inglês “non coding region”
- nsP – proteína não estrutural, do inglês “non structural protein”
- nt – nucleotídeos
- ORF – Fase de leitura aberta, do inglês “open read frame”

pi – pós-inoculação

RdRp – RNA polimerase RNA dependente

Real time PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA – ácido ribonucléico

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa

SPF – livre de patógeno específico, do inglês “specific pathogen free”

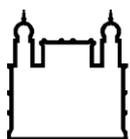
VLPs – partículas semelhantes a vírus, do inglês “Virus-like Particles”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Reclassificação do HEV baseado em análises filogenéticas comparativas entre as famílias <i>Caliciviridae</i> , <i>Picornaviridae</i> e <i>Togaviridae</i>	02
Figura 1.2 – Micrografia e criomicroscopia eletrônica de partículas do HEV	03
Figura 1.3 – Diagrama esquemático da organização genômica do HEV	05
Figura 1.4 – Árvore filogenética representando 52 sequências completas de genomas do HEV	07
Figura 1.5 – Distribuição geográfica dos genótipos do HEV de isolados humanos e suínos	11
Figura 1.6 – Curso clínico da infecção pelo HEV em humanos.	17
Figura 4.1 – Macaco cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	22
Figura 4.2 – Dispositivo Orasure® para coleta de transudato oral	26
Figura 5.1 – Perfil individual dos achados decorrentes da infecção pelo HEV em <i>Macaca fascicularis</i> do Grupo 1 (suspensão fecal de suíno/Brasil)	33-34
Figura 5.2 – Cortes de achados histopatológicos de biópsias e necrósia hepática do animal X15 corados pela técnica de hematoxilina-eosina	35
Figura 5.3 - Perfil individual dos achados decorrentes da infecção pelo HEV em <i>Macaca fascicularis</i> do Grupo 2 (suspensão fecal de humanos/Argentina)	36-37
Figura 5.4 – Perfil individual dos achados decorrentes da infecção pelo HEV em <i>Macaca fascicularis</i> do Grupo 3 (suspensão fecal de suíno/Holanda)	39-40
Figura 5.5 – Perfil individual dos achados decorrentes da infecção pelo HEV em <i>Macaca fascicularis</i> do Grupo 4 (amostra de soro humano/Brasil)	41
Figura 5.6 - Perfil individual dos achados em <i>Macaca fascicularis</i> do Grupo 5 (controles negativos)	42-43

LISTA DE QUADROS E TABELA

Quadro 4.1 – Resumo das características dos inóculos utilizados na infecção experimental em macacos cynomolgus por grupo de animais.	25
Quadro 5.1 – Contagem de leucócitos (mil/mm ³) / linfócitos (%) por animal durante o período estudado.	44
Tabela 5.2 – Sumário de todos os eventos bioquímicos, virológicos, sorológicos e histopatológicos em macacos cynomolgus inoculados intravenosamente com inóculos de diferentes origens do HEV	45



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

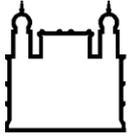
Macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) como Modelo Experimental para Infecção com Vírus da Hepatite E (genótipo 3)

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lilian Gonçalves de Carvalho

Evidências sorológicas e moleculares da infecção pelo vírus da hepatite E (HEV) em diferentes espécies animais de regiões endêmicas e não endêmicas, apontam para a possível transmissão zoonótica desse vírus. O conteúdo da presente dissertação é o resultado do estudo da infecção experimental em macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) com o HEV, genótipo 3. A pesquisa baseou-se na avaliação da infecção com inóculos de diferentes origens geográficas, no estadiamento clínico da infecção do hospedeiro de origem bem como o emprego de um ensaio imunoenzimático para detecção de IgA anti-HEV como um teste confirmatório adicional. Tal ensaio foi utilizado uma vez que ainda não existe um “padrão ouro” de diagnóstico para identificação de casos agudos de infecções causadas pelo vírus da hepatite E. Um total de 12 animais foram divididos em grupos e inoculados com diferentes amostras de HEV pertencentes ao genótipo 3 provenientes de suínos do Brasil e da Holanda, de casos humanos da Argentina e um do Brasil, incluindo dois controles negativos. Os animais foram acompanhados por 67 dias, durante os quais foram coletados amostras semanais de sangue, saliva, fezes e tecido hepático por biópsia. A detecção do genoma viral foi realizada pela técnica de PCR em tempo real nas amostras de soro e fezes. As amostras de soro foram também avaliadas para quantificação bioquímica (método enzimático colorimétrico) de ALT, AST, GGT e bilirrubina total, e para sorologia de IgG, IgM e IgA anti-HEV. As amostras de saliva foram coletadas utilizando o coletor OraSure® e testadas para detecção de IgA anti-HEV. Seis animais dos dez inoculados tiveram o genoma detectado nas fezes e dentre estes, quatro também tiveram o genoma detectado no soro, o que ocorreu na ausência de evidências bioquímicas correspondentes as lesões hepáticas, que foram discretas a moderadas. A replicação viral precoce sem hepatite clínica seguida de soroconversão e início da hepatite histológica com infiltrados linfocíticos no fígado com baixa alteração de ALT indicam o caráter imunomediado da doença, não relacionado ao efeito direto da replicação viral. O estudo demonstra também que o vírus circulante em granjas suínas brasileiras foi capaz de desenvolver infecção em primatas não humanos reforçando a hipótese do potencial zoonótico do vírus da Hepatite E.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) como Modelo Experimental para Infecção com Vírus da Hepatite E (genótipo 3)

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lilian Gonçalves de Carvalho

Evidences of infection of hepatitis E virus in different animal species of endemic and non endemic areas, point towards a possible zoonotic transmission of this virus. This study investigated experimental infection of HEV in cynomolgus monkeys (genotype 3) to assessing the course of infection with inocula from different geographical origins and clinical manifestations in the host of origin. Since there is still no gold standard for diagnosis to identify cases of acute hepatitis E, an enzyme immunoassay for detection of anti-HEV IgA was evaluated as an additional confirmatory test. A total of twelve animals were divided into groups and inoculated with different samples of HEV belonging to genotype 3 from pigs from Brazil and Holland, human cases from Argentina and Brazil, including two negative controls. The animals were monitored for 67 days, during which samples of blood, saliva, feces and liver biopsy were collected weekly. The detection of viral genome was performed by real-time PCR in serum and feces. Serum samples were evaluated to quantify biochemical (enzymatic colorimetric method) of ALT, AST, GGT and total bilirubin, and serology for anti-HEV IgG, IgM and IgA. Saliva samples were collected using the OraSure collector and tested for anti-HEV IgA. A total of six of the ten animals inoculated had the viral genome detected in the feces and of these, four also had the genome detected in the serum, which occurred in the absence of the corresponding biochemical evidence of liver injury, which were mild to moderate. The elimination of the virus in feces and viremia characterize infection and low ALT change confirms the status of an immune-mediated disease. The study also shows that the virus circulating in swine herds in Brazil was able to develop infection in nonhuman primates, suggesting that human acute cases of hepatitis E infection can occur in Brazil.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Histórico

O vírus da hepatite E (HEV, do inglês “hepatitis E virus”) causa uma infecção viral com características clínicas e morfológicas de hepatite aguda e, em muitos aspectos, semelhante à hepatite A. De fato, até a identificação do HEV, diversos casos esporádicos e até mesmo epidemias de hepatite E tinham sido atribuídas ao vírus da hepatite A (HAV). Por exemplo, um grande surto de hepatite ocorrido em Nova Déli em 1955-1956 foi, por muitos anos, considerado como “surto de Hepatite A”. Nesse caso, a contaminação da principal rede urbana de abastecimento de água foi responsável pela veiculação hídrica do agente etiológico (Vishwanathan, 1957).

Em um estudo retrospectivo de soros provenientes de Nova Déli, e de outros surtos em Ahmedabad (1975-1976) e Pune (1978-1979) na região oeste da Índia, Wong e colaboradores (1980) confirmaram a presença de um vírus não-A e não-B entericamente transmitido (NANB-ET). A partir de um surto de hepatite viral ocorrido em Kashmir, Índia, entre os anos 1978 e 1979, caracterizado por uma alta taxa de ataque da doença e mortalidade entre mulheres grávidas, Khuroo (1980) admitiu tratar-se de um vírus não relacionado aos conhecidos vírus de transmissão entérica (vírus da hepatite A) ou parenteral (vírus da hepatite B).

Mikhail Balayan, virologista russo, voluntariou-se para ingerir um extrato aquoso de material fecal de pacientes de uma epidemia de hepatite de causa desconhecida e desenvolveu a infecção. Neste estudo, partículas esféricas semelhantes a vírus (VLPs) foram identificadas nas fezes pela técnica de imunomicroscopia eletrônica (IEM) (Balayan et al., 1983). Segundo o mesmo autor, a infecção foi reproduzida experimentalmente em macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) pela suspensão fecal. Subsequentemente, outros trabalhos também demonstraram transmissão da infecção pelo novo agente NANB-ET em primatas não humanos e excreção de VLPs nas fezes (Bradley et al., 1987; Arankalle et al., 1988).

Em 1990, o genoma do vírus NANB-ET foi clonado e, em seguida, seqüenciado, permitindo a identificação e a caracterização como vírus da hepatite E (Reyes et al., 1990; Tam et al., 1991; Ticehurst, 1991). Atualmente, testes de diagnóstico e estudos epidemiológicos demonstram que a hepatite E é uma doença endêmica em muitos países da África e da Ásia (Arankalle et al., 1993; Kuhroo et al., 1983).

1.2 – O vírus da hepatite E

1.2.1 – Taxonomia

O vírus da Hepatite E (HEV) pertence à família *Hepeviridae*, gênero dos *Hepevirus* (Emerson et al., 2004). O HEV foi originalmente classificado como um membro da família *Caliciviridae*, por apresentar semelhanças morfológicas e genômicas características desta família (Tam et al., 1991). Os motivos funcionais das proteínas não estruturais previstos do HEV (Figura 1.1) também são semelhantes àqueles do vírus da rubéola e dos alfavírus da família *Togaviridae* (Koonin et al., 1992).

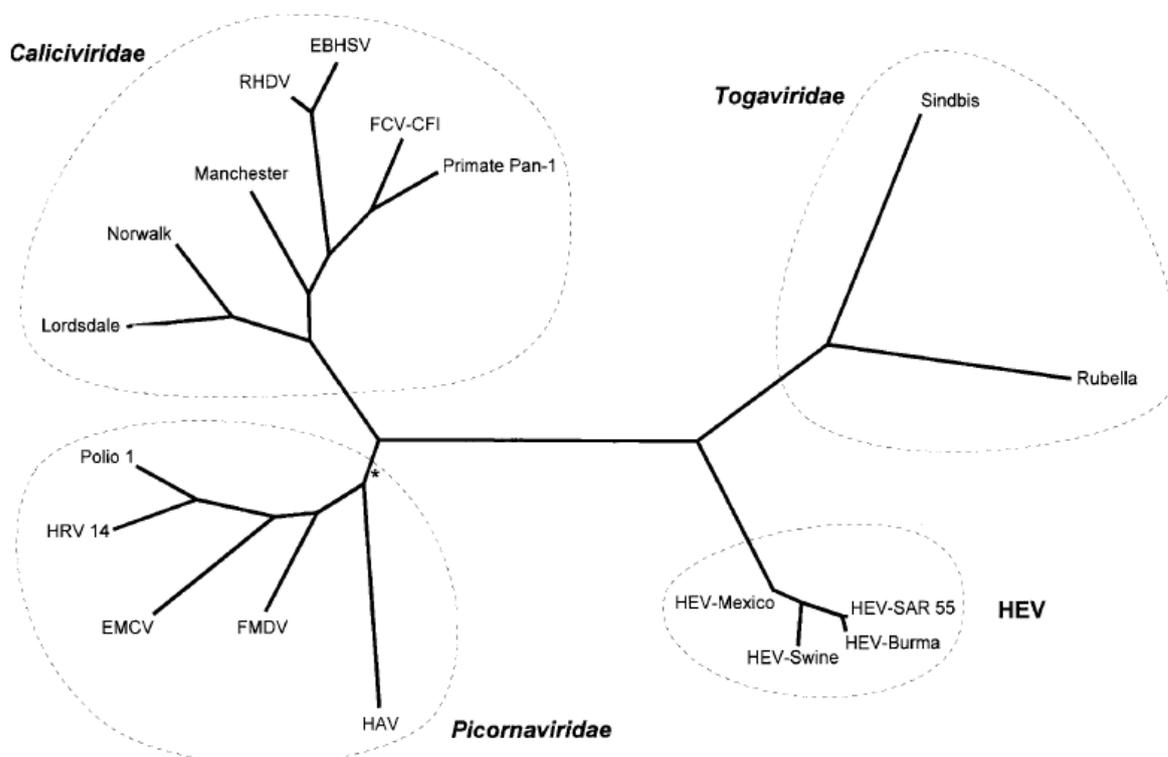


Figura 1.1 – Reclassificação do HEV baseado em análises filogenéticas comparativas entre as famílias *Caliciviridae*, *Picornaviridae* e *Togaviridae*. (Berke e Matson, 2000).

1.2.2 – Propriedades do vírion

O HEV é uma partícula viral icosaédrica, não envelopada e esférica, com diâmetro de aproximadamente 32-34 nm de tamanho, com protusões proeminentes na sua superfície, compostas por proteínas do capsídeo (ORF2) reunida em um multímero altamente estruturado (60 cópias) (Purcell e Emerson, 2001). Imagens obtidas por criomicroscopia eletrônica de VLPs recombinantes (Figura 1.2), produzidas em culturas de células de inseto transfectadas com baculovírus recombinante contendo um gene do capsídeo viral truncado, revelaram que

as partículas apresentam morfologia icosaédrica. As moléculas de proteínas do capsídeo contêm um domínio em concha que contribui com a concha icosaédrica semifechada e com um domínio protuso que interage com as moléculas vizinhas das protusões da superfície (Yamashita et al., 2009; Guu et al., 2009; Li et al., 2005a).

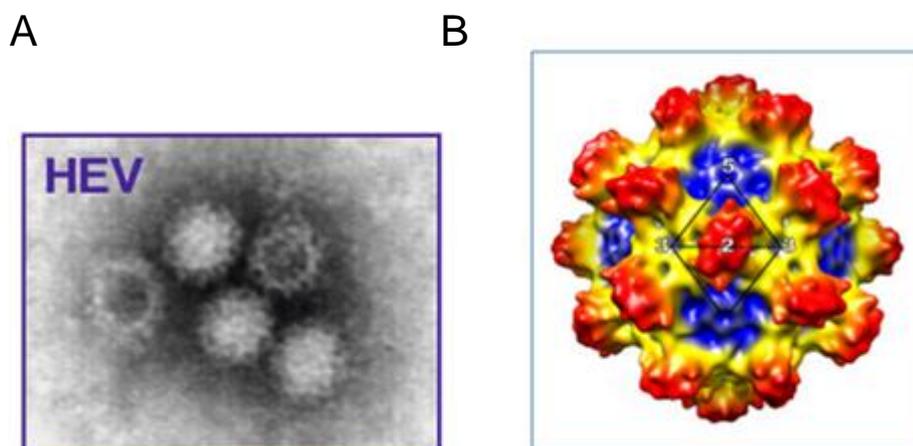


Figura 1.2 – (A) Micrografia eletrônica mostrando partículas do HEV visualizadas nas fezes de um paciente após agregação com soro anti-HEV positivo e coloração negativa (Chandra et al., 2008). B) Estrutura de uma partícula semelhante a vírus de hepatite E (VLP). Reconstrução de uma imagem por criomicroscopia eletrônica numa resolução de 14 Å. A superfície está colorida por indicação de profundidade radial: do azul, amarelo ao vermelho. O domínio de concha está representado em amarelo e azul e o de protusão em vermelho (Guu et al., 2009).

A densidade flutuante dessas partículas, isoladas das fezes de um paciente, situa-se entre 1,39 e 1,40 g/cm³ em CsCl (Li et al., 1997), e 1,29 g/cm³ em tartarato de potássio e glicerol cujo coeficiente de sedimentação é 183S. Emerson e colaboradores (2005) demonstraram que o vírion é mais termolábil que o HAV – que foi somente 50% inativado a 60°C por 1 hora, mas quase totalmente inativado a 66°C. Em oposição, o HEV foi aproximadamente 50% inativado a 56°C e quase totalmente inativado (96%) a 60°C. Tem sido evidenciada que a infectividade do HEV, presente em fígados de suínos, é completamente inativada por meio do cozimento adequado, como fritar ou ferver por 5 minutos (Feagins et al., 2008a). Purcell e Emerson (2001) reportaram que o HEV é resistente à inativação por condições ácidas e alcalinas do trato intestinal, podendo-se admitir a via de transmissão fecal-oral.

1.2.3 – Organização e Estrutura genômica

O genoma do HEV é constituído por RNA de fita simples com polaridade positiva de aproximadamente 7.200 nucleotídeos (nt), formado por uma pequena região 5' não-codificante (NCR) com CAP, três fases de leituras abertas descontínuas e parcialmente sobrepostas (ORF 1, 2 e 3) e uma 3' NCR com cauda poli-A (Tam et al., 1991; Huang et al., 1992; Reyes et al., 1990). As regiões 5' e 3' são altamente conservadas e possuem 53 e 68-75 nt, respectivamente (Haqshenas e Meng, 2001), as quais acredita-se que estejam envolvidas na regulação da tradução e replicação viral (Tam et al., 1996). Graff e colaboradores (2006) consideram que as proteínas expressas pelas ORF 2 e 3 são codificadas por um mRNA subgenômico bicistrônico.

A ORF1 compreende aproximadamente dois terços de todo genoma e está localizada na extremidade 5' codificando poliproteínas não estruturais que estão envolvidas na replicação viral (Figura 1.3). Apoiado em previsões computacionais e analogias com outros vírus de RNA de fita simples positiva, foram identificados numerosos domínios funcionais, incluindo metil-transferases, proteases cisteína papáína-like, helicases e RNA polimerases RNA-dependentes (Huang et al., 2007).

A ORF2 está localizada na extremidade 3' do genoma e codifica a proteína do capsídeo viral que contém uma sequência peptídica sinal típica e três potenciais sítios de glicosilação (Figura 1.3). Foi demonstrado que mutações dentro dos sítios de glicosilação impedem a formação de partículas virais infecciosas (Graff et al., 2008). A proteína do capsídeo contém epítomos imunogênicos, que induzem a formação de anticorpos neutralizantes e é o alvo para o desenvolvimento de vacinas (Meng, 2008).

A ORF3 codifica uma pequena fosfoproteína associada ao citoesqueleto, que talvez desempenhe um papel na replicação viral e na morfogênese do virion (Yamada et al., 2009). A região N-terminal da ORF3 possui uma região rica em cisteína que participa de um complexo que envolve a proteína do capsídeo. A região C-terminal da proteína da ORF3 possui um domínio multifuncional, que talvez esteja envolvido na patogênese do HEV. Anticorpos monoclonais desenvolvidos contra a proteína da ORF3 são capazes de capturar partículas do HEV no sobrenadante da cultura celular e no soro, mas não em fezes, sugerindo que a proteína da ORF3 esteja presente na superfície dos virions recém liberados de células infectadas (Takahashi et al., 2008). Os antígenos da ORF3 têm sido utilizados em ensaios sorológicos para detectar anticorpos anti-HEV (Herremans et al., 2007a), assim como antígenos da ORF2 (Mikrogen).

de origem humana e animal (principalmente de suínos), tem sido descrito a partir de casos esporádicos de hepatite E aguda na China, Taiwan, Japão e Vietnã (Lu et al., 2006; Wang et al., 1999). A maior variabilidade entre as amostras foi observada para os genótipos 3 e 4, cujos vírus de origem humana e animal estão relacionados, indicando uma fonte infecciosa comum ou antropozoonose (Lu et al., 2006). Guo e colaboradores (2006) relataram que os genótipos compartilham pelo menos um epítipo principal que apresentam, sorologicamente, reação-cruzada e pertencem a um único sorotipo.

Recentemente, um isolado conhecido como “avian HEV”, isolado de galinhas, foi considerado como pertencente a um gênero distinto (Aggarwal, 2011). A princípio sugeriu-se que ele constituiria um quinto genótipo, entretanto é um isolado geneticamente distinto, com genoma menor (6,6 Kb), compartilhando apenas 50% de homologia nucleotídica com os isolados dos mamíferos (Huang et al., 2002). Algumas linhagens geneticamente distintas do HEV aviário (Figura 1.4) têm sido identificadas recentemente em galinhas da Austrália e Europa (Hungria e Espanha), e existem pelo menos três genótipos distribuídos pelo mundo (Billic et al., 2009; Peralta et al., 2009).

Zhao e colaboradores (2009) relataram a descrição de uma nova linhagem do HEV isolada de coelhos de uma fazenda na China, e acrescentaram que o isolado é mais relacionado ao genótipo 3 do HEV com aproximadamente 82% de similaridade na sequência nucleotídica, e que este novo isolado talvez seja uma variante do genótipo 3. Johne e colaboradores (2009) descreveram um novo vírus “hepatite E-like”, identificado nas fezes de ratos selvagens na Alemanha, e na análise parcial das sequências foi revelado que o HEV do rato compartilha aproximadamente 59,9% e 49,9% com o HEV humano e com o “avian HEV” respectivamente. Os autores acrescentaram ainda que o HEV do rato talvez represente um novo genótipo dentro do gênero.

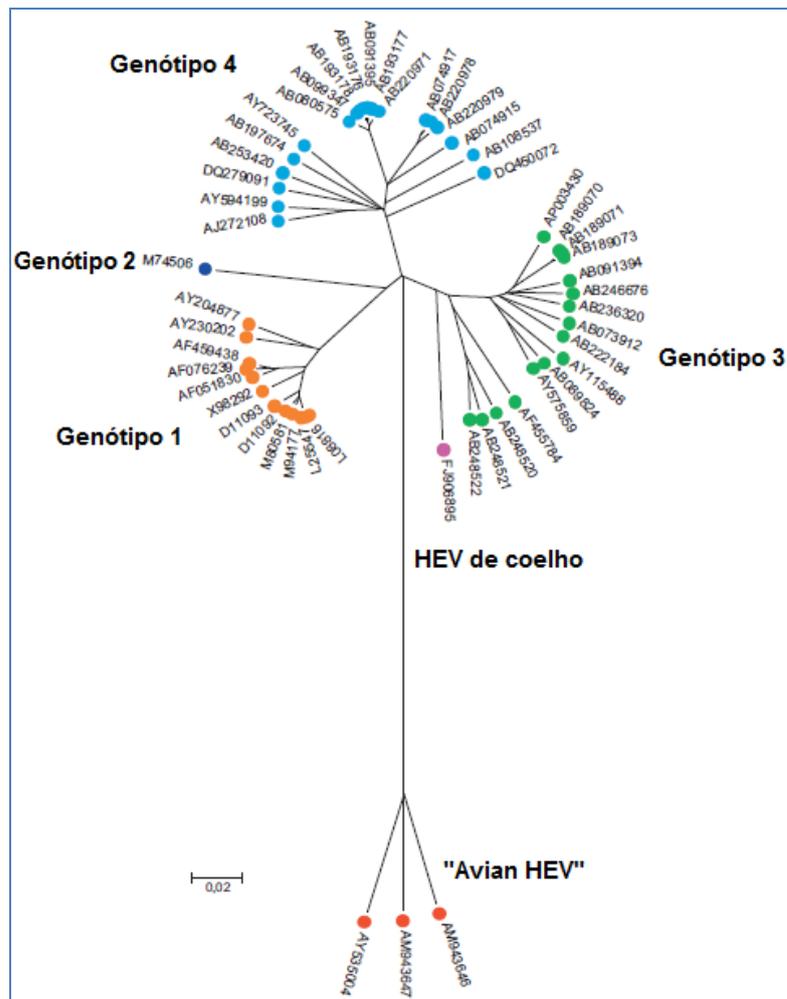


Figura 1.4 – Árvore filogenética representando 52 sequências completas de genomas do HEV retiradas do GeneBank (números de acesso indicados). O alinhamento foi realizado utilizando Clustal W no programa MEGA 3.1. e a árvore foi construída utilizando o método *neighbor joining* com 1.000 réplicas de bootstrap. Adaptado de Pavio et al. (2010).

1.2.5 – Ciclo replicativo do HEV

Pouco se sabe sobre os receptores celulares para o HEV, bem como o processo de entrada na célula. Um estudo revelou que o peptídeo truncado p239, abrangendo a região entre os aminoácidos 368-606 da ORF2, forma partículas de 23 nm que se ligam e penetram em células HepG2, Huh-7, PLC/PRF-5 (linhagens de hepatocarcinoma humano) e A549 (linhagem de células de pulmão humano) impedindo-as de sofrer infecções devido ao bloqueio de alguns sítios dos receptores para o HEV (He et al., 2008).

Um modelo para replicação e expressão gênica foi proposto com base em semelhanças e homologia com as sequências de vírus com genoma tipo RNA com polaridade positiva que são mais bem caracterizados (Reyes et al., 1993; Jameel, 1999). Após a entrada em células permissivas, o RNA genômico viral perde o capsídeo e é traduzido no citoplasma para produção de poliproteínas não estruturais codificadas pela ORF-1 (nsP) que são clivadas pelas proteases celulares possivelmente com auxílio de uma protease viral. A replicase viral (RdRp)

produz então replicativos intermediários negativos a partir da fita positiva, que servirão como molde para síntese de fitas positivas e de RNAs subgenômicos positivos, estes últimos, traduzidos em proteínas estruturais (ORF2 e ORF3). Em infecções experimentais de macacos Rhesus (Nanda et al., 1994) e suínos (Meng et al., 1998) foram observados RNAs de polaridade positiva e negativa no fígado. Uma vez que transcritos *in vitro* de clones de cDNA são infecciosos para primatas não humanos e suínos, os RNAs subgenômicos não são necessários para iniciar uma infecção, e provavelmente são sintetizados como parte do processo replicativo (Panda et al., 2000; Emerson et al., 2004).

1.3 – Epidemiologia

1.3.1 – Modos de transmissão

A maioria dos surtos de hepatite E em áreas de alta endemicidade está relacionada ao consumo de água contaminada, envolvendo desde algumas centenas a milhares de pessoas (Khuroo, 1980; Vishwanathan, 1957; Naik et al., 1992). Estes surtos podem ser de curta duração (algumas semanas) ou prolongados, podendo durar mais de um ano (Vishwanathan, 1957; Naik et al., 1992), causados por constante contaminação da água. Esses surtos frequentemente ocorrem após um período de muitas chuvas, o que facilita a contaminação das fontes de água com dejetos humanos (Khuroo, 1980; Vishwanathan, 1957). Às vezes, os surtos ocorrem durante períodos quentes e secos do verão, quando o nível de água dos rios diminui, acarretando um aumento da concentração de contaminantes fecais (Naik et al., 1992). Os adultos jovens são os mais acometidos nessas áreas (3–30%); a taxa de ataque em crianças é provavelmente menor em razão da maior proporção de infecções assintomáticas do que a menor frequência de infecção (Aggarwal, 2011).

Em discordância com outras doenças transmitidas entericamente, a transmissão pessoa-a-pessoa do HEV parece ser incomum (Aggarwal e Naik, 1992; Somani et al., 2003). As taxas de ataque secundário entre membros da mesma residência que convivem com paciente infectado com HEV são de 0,7% a 2,2%; enquanto que, para hepatite A, esse índice é de 50% a 75%. Mesmo quando múltiplos casos ocorrem na mesma família, o intervalo de ocorrência entre os casos é pequeno, indicando uma infecção adquirida por compartilhar a mesma fonte de água contaminada (Aggarwal e Naik, 1992).

Evidência direta de transmissão do HEV por transfusão de sangue tem sido descrita em alguns países (Arankalle e Chobe, 2000; Khuroo et al., 2004; Mitsui et al., 2004; Abe et al., 2006; Colson et al., 2007). Foi verificado em um estudo de soroprevalência que 0,1 a 3% dos doadores de sangue já tiveram exposição prévia ao HEV (Gotanda et al., 2007).

Embora a transmissão vertical do HEV via intrauterina e perinatal seja considerada de menor importância em países em desenvolvimento, alguns casos têm sido documentados na Índia (Khuroo et al., 1995; Kumar et al., 2001 e 2004; Singh et al., 2003). A transmissão vertical encontrada tem variação de 23,3% (Kumar et al., 2004) a 50% (Singh et al., 2003) na Índia e 33,3–50% na Argentina (Sookoian, 2006). Kumar e colaboradores (2004) testaram 469 gestantes para marcadores de infecção pelo HEV. Vinte e oito casos foram positivos para detecção do HEV RNA e dois evoluíram para óbito durante o estudo. Foi observado que, de 26 crianças nascidas dessas mães, todas desenvolveram hepatite E aguda e eram HEV RNA positivas.

Em áreas não endêmicas, a ocorrência de casos raros autóctones de hepatite E se deve à transmissão zoonótica a partir de reservatórios animais, principalmente suínos (Dalton et al., 2008b). No Japão, foram descritos casos de pessoas que haviam consumido carne de cervo mal cozida algumas semanas antes do aparecimento dos sinais da doença (Tei et al., 2003). A análise da sequência genômica dos isolados do HEV desses casos foram idênticas àsquelas das carnes restantes congeladas, sugerindo transmissão zoonótica por alimentação; esses isolados também apresentaram alta percentagem de similaridade com a sequência genômica (99,7%) de javalis e cervos, sugerindo ocorrência de transmissão entre esses animais (Takahashi et al., 2004). Foi verificado que uma proporção dos embutidos de fígado de porco vendidos nos EUA e no Japão continham o genótipo 3 e 4 do HEV, respectivamente, e estes isolados compartilhavam um alto grau de identidade com isolados de casos humanos notificados nessas regiões (Feagins et al., 2007; Yazaki et al., 2003).

Em áreas endêmicas ainda não foram identificados os reservatórios do HEV responsáveis pela manutenção da doença. Supõe-se que indivíduos com infecção subclínica possam contaminar periodicamente as fontes de água através da contínua eliminação viral (Aggarwal e Naik, 2010). Isolados de animais e de casos humanos esporádicos na China e em Taiwan pertencem ao mesmo genótipo (4). Entretanto, na Índia, os isolados animais até o momento são pertencentes ao genótipo 4, enquanto os dos humanos são do genótipo 1 (Arankalle et al., 2002).

1.3.2 – Distribuição geográfica

A infecção pelo HEV é a mais frequente hepatite viral aguda em áreas endêmicas. O impacto global real causado pela infecção do HEV ainda não está estabelecido, mas, conforme relatório da Organização Mundial de Saúde, estima-se que um terço da população mundial já tenha tido exposição ao HEV (WHO, 2009). A prevalência global do HEV está

relacionada ao estado sócio-econômico das populações, de maneira que a soroprevalência é maior em países onde o saneamento básico é precário. Cada genótipo do HEV parece apresentar uma distribuição geográfica específica (Figura 1.5). As áreas de alta endemicidade, associadas ao genótipo 1, são: (i) áreas central e sudoeste da Ásia, com soroprevalência para anti-HEV >20% entre a população geral da China, 45% em áreas rurais da Malásia e >20% na Índia (Chandra et al., 2008; Das et al., 2000); e (ii) meio oeste e norte da África, com mais de 26% no Egito e 17% na Arábia Saudita (Gomatos et al., 1996). Em países ocidentais, a soroprevalência da população em geral é de 1–3% na Europa e de ~ 2% nos EUA (com mais de 20% em alguns grupos étnicos). A infecção nesses países é relacionada ao histórico de viagens para áreas endêmicas ou casos autóctones agudos esporádicos, classificados quase sempre como genótipo 3, sugerindo transmissão zoonótica (Borgen et al., 2008; Renou et al., 2008a; Dalton et al., 2008c; Meng, 2010).

Villalba Mde e colaboradores (2008) relataram pela primeira vez um surto nas Américas (Cuba) envolvendo o genótipo 1. No México, em 1986 foi descrito um surto envolvendo genótipo 2. Na Argentina, dois casos de hepatite E aguda não tipados foram relatados (Schlauder et al., 2000; Velazquez et al., 1990). Estudos de soroprevalência demonstraram que Bolívia, Chile, Cuba e México são endêmicos para o HEV (Alvarez-Munoz et al., 1999; Bartoloni et al., 1999; Ibarra et al., 1994).

No Brasil, apesar das condições ambientais favoráveis, surtos de hepatite E ainda não foram descritos (Focaccia et al., 1995). A prevalência de IgG anti-HEV em populações normais é de 6,1% em mineradores na Bacia Amazônica (Pang et al., 1995), 3,3% na população em geral (Souto e Fontes, 1998), 2,0-7,5% em doadores de sangue (Parana et al., 1997; Trinta et al., 2001; Gonçales et al., 2000), 1% em gestantes (Trinta et al., 2001) e 4,5% em crianças (Assis et al., 2002), sem diferenças entre as regiões. Em populações de risco, a prevalência de hepatite E varia muito. Na região Nordeste, as hepatites virais agudas constituem a maior causa de morbidade. Lyra (2003) e Lyra e colaboradores (2002) em trabalho descritivo de 94 amostras de pacientes com hepatite aguda, em Salvador no estado da Bahia, relataram positividade concomitante para IgG anti-HEV em 38% de 40 casos de hepatite A, 10% de 42 com hepatite B e 17% de 12 com hepatite C aguda. Na pesquisa por IgM anti-HEV, verificou-se coinfeção em quatro pacientes com hepatite A aguda e em um paciente com hepatite aguda não-A, não-B e não-C. Focaccia e colaboradores (1998) observaram no estado de São Paulo, em um estudo envolvendo 1.059 pacientes, que 10% dos casos foram positivos simultaneamente para HEV e HBV e 5% para HEV e HCV. De acordo com Santos e colaboradores (2002), no estado do Rio de Janeiro a prevalência de IgG anti-HEV entre 699 indivíduos de uma comunidade carente de Mangueiras revelou uma taxa de

positividade de 2,4%. Trinta e colaboradores (2001) registraram, em 102 usuários de drogas injetáveis, que 11,8% eram IgG anti-HEV positivos. Segundo os autores, no Centro de Referência Nacional de Hepatites Virais/Fiocruz/RJ, entre os anos de 1994 e 1996, diagnosticaram-se 147 casos de hepatite viral aguda não A-C, com prevalência de 2,1% de IgG anti-HEV. Foi descrito, pela primeira vez no Brasil, o primeiro caso humano autóctone de hepatite E aguda no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia/Fiocruz/RJ, em colaboração com o Laboratório de Hepatites Virais/Fiocruz/RJ por Santos e colaboradores (2010). A confirmação ocorreu através da detecção de IgM /IgG anti-HEV e presença de HEV RNA no soro; o caso foi classificado como pertencente ao genótipo 3 após análise da sequência nucleotídica da região ORF1. A análise filogenética desta amostra sugeriu uma origem zoonótica de infecção.

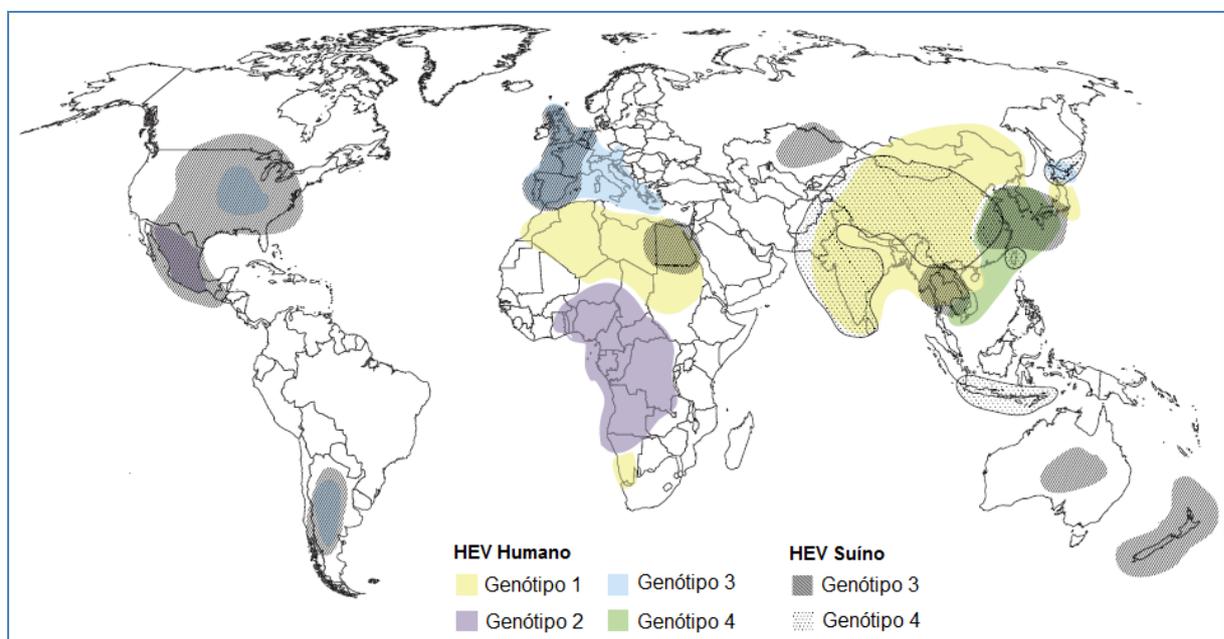


Figura 1.5 – Distribuição geográfica dos genótipos do HEV de isolados humanos e suínos.

Adaptada de Purcell e Emerson, 2008.

1.4 – HEV em animais

A identificação dos primeiros isolados de HEV em suínos ocorreu nos EUA em 1997 (Meng et al., 1997). Desde então, o HEV suíno tem sido identificado em praticamente todas as granjas no mundo (Meng, 2003; Meng e Halbur, 2006). Os vírus identificados em suínos pertencem aos genótipos 3 ou 4 (Meng, 2010), ambos responsáveis por causar hepatite esporádica em humanos e, em alguns casos, são geneticamente relacionados ou idênticos a amostras de HEV recuperadas de pacientes (Mizuo et al., 2002; Yazaki et al., 2003;

Takahashi et al., 2002; Nishizawa et al., 2003). Considera-se que os genótipos 3 e 4 são HEV de origem suína que infectam humanos. Meng e colaboradores (1998) observaram que os suínos não sofrem infecção quando inoculados com os genótipos 1 e 2 de humanos. Meng e colaboradores (1997) salientam que o HEV infecta suínos em todos os países do mundo geralmente nos primeiros quatro meses de vida. Aproximadamente 90% dos porcos de granjas comerciais estão infectados com o HEV (Meng et al., 1997). Os suínos infectados permanecem sem alterações clínicas, embora se tenha observado evidências microscópicas de lesões histopatológicas de hepatite em suínos experimentalmente infectados com genótipo 3 do HEV humano (Halbur et al., 2001). Em um estudo realizado por Santos e colaboradores (2009) em duas granjas comerciais na região sudeste do Brasil, verificou-se que a maioria dos animais estava infectado aos seis meses de idade e que os isolados circulantes são classificados como genótipo 3.

Em 1999, um vírus relacionado ao HEV foi identificado em galinhas da Austrália como vírus BLSD – vírus da doença do fígado e baço grandes (“big liver and spleen disease” – BLSD), responsável por causar hepatoesplenomegalia. Esse vírus compartilha 62% de similaridade nucleotídica com o HEV (Payne et al., 1999). Em 2001, o HEV aviário foi, pela primeira vez, isolado de amostras de bile de galinhas com síndrome da hepatite-esplenomegalia (HS) nos EUA (Haqshenas et al., 2001). Tal síndrome era caracterizada por aumento na mortalidade, redução na produção de ovos e pelo aumento do fígado e baço de galinhas infectadas (Meng, 2010; Meng et al., 2008). Meng e colaboradores (2008), reportaram que o HEV de aves compartilha 80% de identidade na sequência nucleotídica com o vírus BLSD identificado em galinhas da Austrália (Payne et al., 1999; Haqshenas et al., 2001). Os autores admitem que o vírus BLSD seja uma linhagem variante do mesmo vírus HEV aviário. Os hospedeiros do HEV aviário parecem ser limitados, embora seja possível infectar perus (Sun et al., 2004). Segundo Huang e colaboradores (2004) o vírus HEV aviário não infecta suínos e macacos Rhesus (Huang et al., 2004). Guo e colaboradores (2006) e Zhou e colaboradores (2008) reportaram que a distância filogenética observada entre o HEV aviário e o HEV de mamíferos impede a infectividade interespecies, pois compartilham aproximadamente 50% de identidade na sequência nucleotídica. Assim como o HEV suíno, o HEV aviário também é muito difundido, cerca de 71% das granjas comerciais e 30% das galinhas nos EUA são IgG HEV aviário positivas (Huang et al., 2002).

Descobriram-se outras espécies, tais como cervos, javalis e mangustos, como soropositivos para anticorpos do HEV e cujos isolados pertencem ao genótipo 3 (Takahashi et al., 2004; Nakamura et al., 2006; Meng et al., 2009; Nishizawa et al., 2005; Tei et al., 2003). Foi demonstrado que o HEV encontrado em cervos e javalis é capaz de infectar humanos, fato

observado na transmissão zoonótica pelo consumo de carne mal cozida desses animais (Takahashi et al., 2004; Tei et al., 2004; Tei et al., 2003). Zhao e colaboradores (2009) identificaram o HEV em coelhos na China, geneticamente distinto dos outros genótipos do HEV de mamíferos, onde aproximadamente 57% desses lagomorfos são soropositivos para HEV.

A observação de positividade para IgG anti-HEV em ratos, tanto de áreas urbanas como rurais tem crescido: nos EUA em Louisiana atingiu 44%, em Maryland 77% e no Havaí 90% (Kabrane-Lazizi et al., 1999). A maior prevalência foi encontrada no gênero *Rattus* (59,7%) (Favorov et al., 2000). Jhone e colaboradores (2009) consideram que o HEV do rato é geneticamente distinto dos quatro genótipos conhecidos do HEV que infectam mamíferos. Assim como os HEV identificados em coelhos, estes isolados vêm sendo propostos como novos genótipos na classificação do HEV.

Meng (2010) e Ropp e colaboradores (2000) encontraram cães, gatos, ovelhas, cabras, gado e primatas não humanos soropositivos para anticorpos do HEV sugerindo que estes animais tenham sido expostos ao HEV ou a um agente relacionado.

No Brasil, um estudo de soroprevalência de infecção pelo HEV, envolvendo 271 amostras de soro de diferentes espécies de animais foi realizado por Vitral e colaboradores (2005). Neste trabalho verificou-se a positividade para IgG anti-HEV em 1,42% das vacas, 6,97% dos cães, 20% das galinhas, 24,3% dos porcos e 50% dos ratos, sugerindo que esses animais podem ser importantes reservatórios para transmissão do vírus ao homem.

1.5 – A infecção pelo HEV em humanos

As manifestações clínicas da infecção pelo HEV vão desde casos assintomáticos até quadros com insuficiência hepática aguda (IHA) e elevada morbidade (Purcell e Emerson, 2008). O período de incubação da infecção pelo HEV varia de duas semanas a dois meses, com uma média de 40 dias, a viremia é transiente e ocorre principalmente durante a fase prodrômica, desaparecendo com o fim das manifestações clínicas, tais como icterícia, anorexia, náusea, hepatomegalia, colúria, dor abdominal, acolia fecal, vômito e febre. A eliminação viral nas fezes começa dentro de cinco dias em média, antes do aparecimento dos sinais clínicos e do aumento das aminotransferases, e termina dentro de duas a três semanas (Aggarwal et al., 2000). Em um estudo realizado com amostras seriadas de um paciente que desenvolveu hepatite aguda esporádica, observou-se que os níveis séricos de IgM e IgA anti-HEV foram maiores no 6º dia após o início da doença e permaneceram detectáveis por mais de seis meses. Segundo Tokita e colaboradores (2003) e Takahashi e colaboradores (2005), a

partir do 9º dia da infecção ocorre a detecção de IgG anti-HEV, que pode persistir por mais de 8 anos.

Em regiões industrializadas, tem sido descrita uma alta prevalência de indivíduos soropositivos para anticorpos anti-HEV, embora nunca tenham tido histórico de doença hepática (Drobeniuc et al., 2001; Meng et al., 2002). Purcell e Emerson (2001) sugerem que a hepatite E é uma doença inóculo-dependente: pacientes expostos a maiores inóculos do HEV desenvolvem com maior frequência sinais e sintomas clínicos, enquanto pacientes expostos a menor carga viral geralmente apresentam infecções subclínicas. Bhatia e colaboradores (2008) observaram que a hepatite grave com IHA é observada em cerca de 1% dos casos, considerando todas as áreas de alta e baixa endemicidade, e acrescentam que as maiores taxas de morbidade e mortalidade são verificadas em gestantes. A taxa de mortalidade atinge cerca de 20% em gestantes em algumas áreas endêmicas, como nas regiões norte e central da Índia e no Paquistão (Hussaini et al., 1997; Khuroo et al., 1995). Em outros países, como Egito e região sul da Índia, as gestantes não possuem alto risco de desenvolver falência hepática fulminante (FHF) (Navaneethan et al., 2008; Stoszek et al., 2006). Em um estudo retrospectivo sobre a associação do HEV na gestação com falência hepática aguda revelou que a mortalidade de pacientes gestantes é similar a de não gestantes (Bhatia et al., 2008). Entretanto, vários fatores como linhagem do HEV (genótipo e subtipo), carga viral, e outras co-infecções podem desempenhar um papel na patogênese (Renou et al., 2008b). No Egito e região sul da Índia, onde o genótipo 1 é prevalente, são observadas baixas taxas de mortalidade durante a gestação, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos em algumas regiões onde são verificadas altas taxas de mortalidade, tais como fatores hormonais e imunológicos (Navaneethan et al., 2008). Até o momento nenhum caso fulminante de hepatite E associado ao genótipo 3 durante a gestação foi reportado (Andersson et al., 2008). A infecção pelo HEV na gravidez também está associada a nascimentos prematuros com baixo peso, bem como um aumento no risco de mortalidade perinatal (Pal et al., 2005; Navaneethan et al., 2008; Kar et al., 2008).

Casos de infecção persistente associada a doenças hepáticas crônicas, com raros casos de evolução para cirrose têm sido descritos em pacientes imunossuprimidos infectados pelo genótipo 3 do HEV (Kamar et al., 2008; Gerolami et al., 2008; Haagsma et al., 2008). Casos de hepatite fulminante foram descritos em crianças, pacientes com outros comprometimentos hepáticos, renais crônicos e recém-transplantados (Haagsma et al., 2008; Pischke et al., 2010). Na Argentina, foram descritos três casos de crianças com hepatite fulminante infectados pelo genótipo 3 (Mune et al., 2006).

No Japão, observou-se que a gravidade da hepatite E está relacionada ao genótipo. Pacientes infectados com o genótipo 4 tendem a apresentar um quadro mais grave do que os infectados com o genótipo 3, com desenvolvimento de hepatite fulminante e maior aumento de alanina aminotransferase (ALT) (Mizuo et al., 2005). A taxa de mortalidade por hepatite E em países em desenvolvimento, onde o genótipo 1 prevalece, é de aproximadamente 1% (Purcell e Emerson, 2001) e, para o genótipo 2, nenhum caso fulminante foi até o momento descrito. Em um paciente coinfestado com os genótipos 3 e 4, foi verificado que a maior carga viral na circulação correspondia ao genótipo 4. Esses dados indicam que o genótipo 4 pode estar mais associado ao desenvolvimento de hepatite fulminante do que qualquer outro genótipo do HEV (Takahashi et al., 2002).

1.6 – Diagnóstico laboratorial

As manifestações clínicas da hepatite E são indistinguíveis das hepatites virais agudas das demais etiologias. Dessa forma, um diagnóstico preciso deve incluir testes laboratoriais sorológicos, visando a detecção de anticorpos das classes IgM e IgG e a presença de RNA viral nas fezes ou no soro, este último, considerado “padrão ouro” para confirmação de casos agudos em áreas não endêmicas (Mushahwar, 2008).

Em áreas reconhecidamente endêmicas para o HEV, os testes sorológicos possuem alta aplicabilidade no diagnóstico de pacientes com quadro de hepatite aguda esporádica. Em oposição, em regiões não endêmicas, considera-se suspeito de infecção esporádica pelo HEV aqueles que viajaram para áreas endêmicas ou pacientes que se mostraram negativos para o teste de outros vírus de hepatite e de agentes virais também relacionados à dano hepático, tais como: hepatites A, B e C, citomegalovírus, vírus Epstein Barr, HSV-2, entre outros (Fogeda et al., 2009; Renou et al., 2009; Jesse et al., 2011).

Os primeiros testes sorológicos utilizavam uma variedade de antígenos derivados dos genótipos 1 e 2 do HEV, que incluíam peptídeos sintéticos (Dawson et al., 1992; Coursaget et al., 1994; Favorov et al., 1994) ou proteínas estruturais e não estruturais codificadas pelas regiões ORF2 e ORF3 (Dawson et al., 1992; Anderson et al., 1999). Esses testes, entretanto, possuíam uma alta variação na sensibilidade, apesar de apresentarem excelente especificidade (Mast et al., 1998). Atualmente, ensaios imunoenzimáticos (EIA) para detecção de anticorpos do HEV, tais como MP Biomedicals, Diagnostics Systems e Mikrogen, estão disponíveis comercialmente para detecção de anticorpos contra proteínas recombinantes do capsídeo altamente conservadas e imunogênicas da ORF2 e ORF3, com sensibilidade e especificidade superiores a 92% para detecção dos 4 genótipos (Drobeniuc et al., 2011). Outros EIA

disponíveis comercialmente podem apresentar resultados muito discrepantes e duvidosos, especialmente em áreas não endêmicas, o que torna a detecção do genoma viral uma ferramenta fundamental na confirmação de casos agudos. Estudos do HEV em doadores de sangue de áreas não endêmicas revelaram uma prevalência de 1-20%, taxa considerada alta (Clemente-Casares et al., 2003; Mast et al., 1998). Segundo Mast e colaboradores (1998), a infecção subclínica, a reatividade cruzada com outros vírus, resultados falsos positivos ou uma combinação de todos esses fatores podem determinar percentuais significativos de prevalência com doadores de sangue de áreas não endêmicas.

Outro marcador sorológico de infecção aguda pelo HEV, o IgA anti-HEV, vem sendo utilizado em alguns estudos como um teste confirmatório adicional em combinação ou não com a presença de IgM anti-HEV, aumentando a especificidade do diagnóstico, especialmente nos casos subclínicos e em áreas não endêmicas (Chau et al., 1993; Mushahwar et al., 1996; Tian et al., 2006; Tokita et al., 2003; Takahashi et al., 2005). De acordo com Tian e colaboradores (2006), Tokita e colaboradores (2003) e Takahashi e colaboradores (2005), o maior tempo de duração do IgA anti-HEV no soro quando comparado ao IgM anti-HEV e HEV RNA, permite uma vantagem adicional na detecção de infecção pelo HEV entre pacientes com hepatite aguda. Para Herremans e colaboradores (2007b), o ensaio para detecção de IgA anti-HEV pode variar de acordo com o genótipo testado e com o tipo de antígeno utilizado no teste.

O período de incubação do HEV varia de duas semanas a dois meses, com uma média de 40 dias. A viremia é transiente e ocorre principalmente durante a fase prodrômica, desaparecendo com o fim das manifestações clínicas, tais como icterícia, anorexia, náusea, hepatomegalia, colúria, dor abdominal, acolia fecal, vômito e febre. A eliminação viral nas fezes começa dentro de cinco dias em média, antes do aparecimento dos sinais clínicos e do aumento das aminotransferases, e termina dentro de duas a três semanas (Tokita et al., 2003; Takahashi et al., 2005). O anticorpo da classe IgM anti-HEV torna-se detectável pouco antes do pico de ALT, declinando rapidamente em seguida, tornando-se indetectável cerca de 5 ou 6 meses após o início da doença. O anticorpo da classe IgG anti-HEV surge logo após o IgM anti-HEV aumentando seus títulos durante as fases aguda e de convalescença, e permanecendo detectável, na maioria dos pacientes, um ano após a infecção aguda (Figura 1.6). Em alguns casos de pacientes com infecção subclínica, a presença de genoma viral parece ser a única evidência de infecção por HEV (Caudill et al., 1994; Clayson et al., 1995; Nicandi et al., 2001).

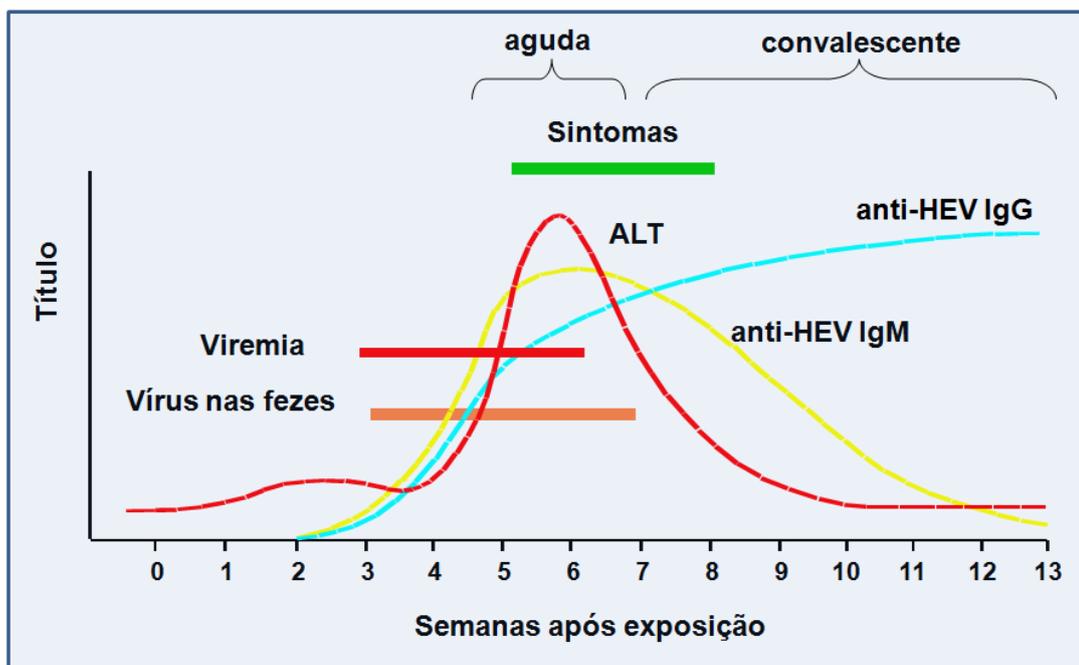


Figura 1.6 – Curso clínico da infecção pelo HEV em humanos. Fonte: <http://www.cdc.gov>

Erker e colaboradores (1999b) descreveram ensaios com oligonucleotídeos (*primers*) universais, que são designados para sequências conservadas dos protótipos do HEV de Burma, México e EUA para gerar amplicons dentro de cada uma das três ORFs. Mizuo e colaboradores (2002) reportaram um teste qualitativo capaz de amplificar todos os quatro genótipos do HEV. A detecção de HEV RNA pode ser realizada por meio de testes que utilizam PCR em tempo real (Orru et al., 2004; Ahn et al., 2006; Enouf et al., 2006; Jothikumar et al., 2006; Gyarmati et al., 2007). Jothikumar e colaboradores (2006) desenvolveram um protocolo para detecção dos quatro principais genótipos de HEV tendo como alvo uma região conservada da ORF3. Esses autores demonstraram que o ensaio foi capaz de detectar corretamente todos os isolados do HEV representados pelos quatro genótipos, e possui uma sensibilidade de detecção de quatro cópias de genoma equivalente de DNA plasmidial do HEV.

1.7 – Prevenção e Controle

Duas vacinas candidatas para hepatite E estão em desenvolvimento, uma delas utiliza uma proteína recombinante truncada de 56 kDa da região ORF2 e, em um estudo clínico de fase II/III, num esquema de três doses de 20 µg cada (0, 1 e 6 meses), com dois mil voluntários, verificou-se a eficácia de 95% após um acompanhamento por mais de dois anos (Shrestha et al., 2007). Outra vacina em desenvolvimento na China, denominada p239, é constituída por uma proteína do capsídeo do HEV (correspondendo aos aminoácidos 368-

606) (Li et al., 2005b). Zhu e colaboradores (2010) descreveram um estudo de fase III realizado na China recentemente, envolvendo 97 mil participantes, num esquema de três doses de 30 µg cada (0, 1 e 6 meses), no qual foi verificada eficácia de proteção em 100% dos casos para os genótipos 1 e 4 durante o ano seguinte.

1.8 – Modelos de infecção: animais e cultura celular

Okamoto (2010) desenvolveu um sistema de cultura celular eficiente para o HEV em linhagens celulares de hepatocarcinoma (PLC/PRF/5) e de células de carcinoma de pulmão humano (A549). Acrescentou que os inóculos de suspensão fecal humanos com altos títulos de HEV (10^7 cópias/mL), pertencentes aos genótipos 3 e 4, foram propagados e o sobrenadante obtido possuía altos títulos virais, com 10^8 cópias/mL, com bons resultados por seis ou mais gerações em passagens seriadas. O autor descreveu que, embora esse sistema permita que a replicação do HEV seja mais bem compreendida, a patogênese desse vírus só pode ser avaliada em modelos de infecção animal.

Suínos são hospedeiros naturais dos genótipos 3 e 4 do HEV, e foi demonstrado que suínos livres de agentes patogênicos (*Specific Pathogen Free*) podem ser infectados eficientemente com os genótipos humanos 3 e 4 (Meng et al., 1998; Halbur et al., 2001; Feagins et al., 2008b), apresentando eliminação viral, soroconversão, poucas lesões histológicas hepáticas, aumento moderado das aminotransferases hepáticas e ausência de sinais clínicos de doença (Halbur et al., 2001). Meng e colaboradores (1998) demonstraram por ensaios experimentais que os suínos não são susceptíveis à infecção pelos genótipos 1 e 2 do HEV, encontrados somente em humanos.

1.8.1 – Macacos cynomolgus como modelo de infecção experimental pelo HEV

Os macacos cynomolgus são apontados como o melhor modelo animal para infecção experimental pelo HEV (Bradley et al., 1987; Longer et al., 1993; Tsarev et al., 1993; Aggarwal et al., 2001). A suscetibilidade do modelo é comprovada nos achados virológicos, bioquímicos, imunológicos e histopatológicos semelhantes aos observados em humanos com infecção aguda por HEV (Bradley et al. 1987; Krawczynski, 1991; Uchida et al., 1990 e 1991; Balayan et al., 1983; Andjaparidze et al., 1986; Soe et al., 1989). Resumidamente, o curso da infecção observada em macacos cynomolgus é caracterizado por uma infecção inicial com replicação do HEV nos hepatócitos, eliminação viral nas fezes seguida de detecção da viremia e discreta elevação das aminotransferases. Em seguida, o aparecimento de anticorpos, que geralmente acompanha a eliminação dos vírus nas fezes e no soro, está relacionado com a

resolução da doença, sem ocorrência de lesões hepáticas graves (Longer et al., 1993; Tsarev et al., 1994; Tsarev et al., 1993).

A patogênese da hepatite E tem sido avaliada em outros modelos de primatas não humanos: macacos-da-noite (*Aotus trivirgatus*), saguis (*Saguinus mystax*), macacos verdes africanos (*Chlorocebus aethiops*), chimpanzés (*Pan troglodytes*) e macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), que também desenvolvem um quadro de hepatite moderada e fazem soroconversão, porém é mais difícil detectar o genoma viral nesses animais, apesar de todos serem susceptíveis à infecção pelos quatro genótipos do HEV encontrados nos mamíferos (Bradley et al., 1988; Ticehurst, 1991; Balayan et al., 1991; Krawczynski, 1991; Arankalle et al., 1988; Andjaparidze et al., 1986; Bradley et al., 1987; Meng, 2010).

2 – JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ, possui como uma de suas linhas de pesquisa o estudo do vírus da hepatite E. Este agente infeccioso está relacionado a casos de hepatite aguda cuja transmissão ocorre principalmente pela via entérica assim como o vírus da hepatite A. Inicialmente o Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia desenvolveu trabalhos com o objetivo de estabelecer o perfil soropidemiológico do HEV no Brasil, trabalhando com amostras de sangue humano obtido a partir de banco de sangue e amostras humanas de regiões com baixa taxa de saneamento básico. Até a segunda metade da década de 90 dados sobre a circulação do HEV no Brasil eram desconhecidos. Com as publicações nacionais no início de 2000 e os surtos de hepatite E aguda ao redor do mundo (Trinta et al., 2001; Gonçalves et al., 2000; Mizuo et al., 2002) e a forte tendência mundial a caracterização do HEV como uma zoonose, nossas pesquisas convergiram para identificação do agente infeccioso em fezes e soro de animais domésticos com estreito contato com seres humanos (Vital et al., 2005). A espécie de maior soroprevalência encontrada foi a suína, na qual aprofundou-se os estudos culminando na identificação do HEV (genótipo 3) circulando entre suínos em fazendas comerciais de criação (Santos et al., 2009). Durante o mesmo período surgiram casos suspeitos de hepatite E causando quadro fulminante de falência hepática em crianças em Buenos Aires na Argentina (Mune et al., 2006). A falta de dados concretos sobre a doença no Brasil e o aparecimento de casos de elevada gravidade na Argentina sugestionou os grupos de pesquisadores brasileiros e argentinos o estabelecimento de uma metodologia experimental para a comparação das virulências dos isolados brasileiros com argentinos, estes últimos sabidamente virulentos. A escolha da *Macaca fascicularis* como modelo experimental para estudo da infecção pelo HEV genótipo 3 foi baseada no potencial zoonótico do agente infeccioso que atualmente já possui sua descrição em casos de hepatite aguda humana no Brasil (Santos et al., 2010).

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Avaliar aspectos clínicos e laboratoriais em macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) infectados com amostras de HEV pertencentes ao genótipo 3 e provenientes de suínos e de casos humanos.

3.2 – Objetivos específicos

1. Comparar a patogenia das diferentes amostras do HEV usadas nesse estudo.
2. Detectar e quantificar o HEV em amostras de fezes e soro pela metodologia de PCR em tempo real.
3. Detectar anticorpos anti-HEV das classes IgM, IgG e IgA em amostras de soro e saliva dos animais estudados e avaliar o papel da IgA anti-HEV na identificação da infecção aguda em cynomolgus.
4. Comparar as lesões hepatocelulares com aquelas descritas em infecções agudas pelo vírus em suínos e no homem.
5. Caracterizar o potencial zoonótico do vírus da hepatite E isolado de suínos do Brasil e da Holanda.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Desenho experimental

4.1.1 – Animais

Foram utilizados neste estudo 12 macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (Figura 4.1), cedidos pelo Serviço de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fiocruz. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável com parede interna corrediça (*squeeze-back* - sistema para facilitar a contenção do animal), alimentados diariamente com ração comercial para primatas não humanos, frutas, vegetais e água fornecida *ad libitum*. Os animais foram alojados em dois contêineres NB2 do Centro de Experimentação de Primatas não Humanos do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz – RJ, com temperatura de aproximadamente 25°C e período de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Seis macacos em cada contêiner com a presença de um macaco controle negativo. O acompanhamento clínico por médico veterinário ocorreu durante os 67 dias de infecção experimental.



Figura 4.1 – Macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*).

4.1.2 – Enriquecimento ambiental

De modo a minimizar o estresse dos animais, durante todo o período do estudo estes foram submetidos a um programa de enriquecimento ambiental, que consiste em uma série de medidas que modificam aspectos físicos e sociais, aprimorando a qualidade de vida dos

animais cativos. Os itens de enriquecimento ambiental estão relacionados aos estímulos, podendo ser auditivos, olfativos, visuais, gustativos e táteis.

- *Espelho de aço inoxidável* – Confeccionado em aço inoxidável polido, preso à grade frontal gaiola, permitindo ao animal movimentá-lo para explorar o ambiente.

- *Bandeja de forrageamento* – Confeccionado em aço inoxidável, contendo um tapete plástico com reentrâncias, preso à gaiola, permitindo ao animal manipular alguns itens (fragmentos de barra de cereais, passas, sementes de girassol e outros) dispostos sobre a bandeja.

- *Bandeja de Atividades* – Confeccionado com caixa de polipropileno, contendo vários dispositivos plásticos e de cloreto de polivinila (PVC), preso à gaiola permitindo ao animal manipular alguns itens (trinco metálico, corrente de plástico, tapetes de plástico, correntes metálicas e elos de PVC) dispostos sobre a bandeja.

- *Mordedores de madeira* - Confeccionado em madeira (eucalipto e goiabeira).

- *Mordedores de PVC* – Confeccionados com tubos de PVC, com perfurações em sua extensão e tampões rosqueados nas extremidades, que permitem a colocação de itens (fragmentos de barra de cereais, passas, grãos de arroz integral, etc.).

- *Som ambiente* – Músicas clássicas - utilizando-se equipamento eletrônico.

- *Pipoca de Microondas* - Oferta de pipoca em ao menos 1 dia da semana.

- *Ervas Mediciniais* – Oferta de ervas medicinais diversas em ao menos 1 dia de semana (hortelã, erva cidreira, macela e calêndula).

4.1.3 – Comitê de ética

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-Fiocruz L-0033/07) com validade até 9 de outubro de 2011 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-Fiocruz) protocolo 0002.0.011.000-06.

4.1.4 – Grupos e inóculos

Antes da inoculação por via endovenosa, todos os animais foram testados para a reatividade contra os vírus da hepatite A e E (IgG anti-HAV e anti-HEV) (Vide item “testes imunoenzimáticos”).

Os animais foram divididos em cinco grupos, conforme resumido no Quadro 4.1:

Grupo 1: Três macacos machos: Q11 (8 anos; 5,760kg; 1mL de inóculo e denominado 1A), X15 (2 anos; 1,680kg; 1,5mL de inóculo e denominado 1B) e I3 (15 anos; 5,300kg; 1mL de inóculo e denominado 1C). Cada animal foi inoculado uma suspensão fecal reconhecidamente positiva para a detecção do genoma do HEV de uma cepa proveniente de “pool” de fezes de suíno de uma fazenda comercial do Estado do Rio de Janeiro pertencente ao genótipo 3, com título viral de 10^5 cópias de RNA/mL quantificado por PCR em tempo real (Santos et al., 2009).

Grupo 2: Três macacos machos: U3 (5 anos; 3,600kg; 1mL de inóculo e denominado 2A), R5 (7 anos; 3,700kg; 1mL de inóculo e denominado 2B) e R7 (7 anos; 4,300kg; 1,7mL de inóculo e denominado 2C). Cada animal foi inoculado com três “pools” de diferentes amostras biológicas provenientes de casos de hepatite fulminante, sendo apenas um deles (inóculo do animal R7) confirmado pelo PCR qualitativo no LDTV-IOC/ Fiocruz, como sendo causado pelo vírus da hepatite E (genótipo 3). Todos ocorridos na Argentina.

Grupo 3: Três animais machos: F3 (19 anos; 5,900kg; 0,5mL de inóculo e denominado 3A), G3 (17 anos; 6,540kg; 0,8mL de inóculo e denominado 3B) e O1 (11 anos; 4,700kg; 1mL de inóculo e denominado 3C). Os animais foram inoculados com uma suspensão fecal sabidamente positiva para a detecção do genoma do HEV de suínos provenientes da Holanda, genótipo 3, com título viral de 10^6 cópias de RNA/mL (gentilmente cedido pelo Dr. Wim van der Poel - *National Institute of Public Health and the Environment (RIVM, Bilthoven, Holanda)*).

Grupo 4: Grupo formado por apenas um animal macho: J3 (14 anos, 5,760kg, denominado 4A), inoculado com 1mL de uma amostra de soro do único caso humano agudo confirmado no Brasil (genótipo 3), título viral de 10^5 cópias de RNA/mL, identificado pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia – IOC / Fiocruz do Rio de Janeiro (Santos et al., 2010).

Grupo 5: Grupo controle formado por duas fêmeas: Q12 (8 anos, 4,120kg, denominada 5A) e I2 (16 anos, 3,140kg, denominada 5B). Cada animal foi inoculado com 1mL de PBS, pH 7,3 e mantido no mesmo ambiente que os demais (Figura 4.1). As soluções de todos os inóculos foram preparadas a partir de uma solução 10% em tampão fosfato salino (PBS) e filtradas em filtro milipore 0,22 μ m.

Quadro 4.1: Resumo das características dos inóculos utilizados na infecção experimental em macacos cynomolgus por grupo de animais.

Grupos	Tipo de amostra	Sorologia	PCR qualitativo* / PCR quantitativo**	Cynomolgus
1	Pool de fezes de suino - Brasil	–	NT / 10 ⁵ cópias/mL**	1A, 1B e 1C
2	Pool de Fezes (IHF)	–	HEV RNA +* / Indetectável**	2A
	Pool (soro e fezes IHF)	Não reativo	Indetectável* / Indetectável**	2B
	Pool de Fezes (IHF)	–	Indetectável* / 10 ³ cópias/mL**	2C
3	Pool de fezes de suino-Holanda	–	NT / 10 ⁶ cópias/mL**	3A, 3B e 3C
4	Soro humano/ Hepatite aguda-Brasil	IgG anti-HEV + IgM anti-HEV +	NT / 10 ⁵ cópias/mL**	4A
5	Tampão fosfato salino 10%	–	Indetectável**	5A e 5B

Legenda: IHF – Insuficiência hepática fulminante; NT – não testado.

* Serviço de Hepatites e Gastroenterites do Laboratório Nacional de Referência INEI ANLIS "Dr. C. G. Malbran", Argentina.

** LADTV.

4.1.5 – Coleta de amostras

No período pré-inoculação foram coletadas amostras de sangue para determinar o valor basal das aminotransferases e coleta de fígado por biópsia hepática para certificar a ausência de hepatopatia preexistente. Durante todo o período de estudo foram realizadas coletas semanais de: (1) *sangue* (3 mL) por punção venosa periférica da veia femoral utilizando seringa descartável de 5 mL e agulha 22G, com acondicionamento em tubo de coleta para bioquímica com gel separador e em tubo de coleta com EDTA; (2) *saliva* de um total de seis animais (Q11, I3, J3, G3, F3 e Q12) – devido a ausência de coletores suficientes para todos, utilizando o coletor OraSure® (OraSure Technologies Inc., Pensilvania, EUA), que consiste de um algodão absorvente tratado fixado a um bastão de plástico e uma solução preservativa presente em um frasco plástico, que impede o crescimento de microrganismos (Figura 4.2). O algodão é impregnado de uma mistura de sais e gelatina que cria um meio hipertônico, produzindo um gradiente osmótico sobre a mucosa bucal e gengival. O coletor foi colocado entre os molares e a gengiva por cerca de 5 minutos e em seguida, eluído em 800 µL do próprio fluido do teste; (3) *fígado*, com realização punção-biópsia hepática semanalmente com agulha de Menghini (16G) (Biomedical, MDI, SrI. Firenze, Itália) na

região correspondente à intersecção entre a linha horizontal abdominal passando pela borda subcostal direita e a linha vertical passando pelo mamilo direito, procedimento guiado por ultrassonografia (Pinto e Marchevsky, 2001) sendo uma parte acondicionada em formol tamponado a 10% (pH 7,0) em PBS e outra em criotubo de 2 mL, envolvida por papel de filtro, com congelamento imediato em gelo seco. Posteriormente, todas as amostras acima foram estocadas em freezer -70°C para futura análise. (4) *Fezes* (coletadas duas vezes por semana), acondicionadas em tubo de poliestireno de 50 mL para congelamento em freezer a -20°C até o momento da realização da suspensão fecal.



Figura 4.2 - Dispositivo Orasure® para coleta de transudato oral.

Todos os procedimentos foram precedidos de anestesia com cloridrato de quetamina (20 mg/kg) (Vetarnacol® - König, Argentina) associado a cloridrato de xilazina 0,1 mg/kg (Xilazin® - Syntec do Brasil, São Paulo) ambos associados na mesma seringa (3 mL) e administrados por via intramuscular, na musculatura da coxa. Ao final do período de estudo (67 dias), todos os animais foram submetidos à eutanásia por meio de anestesia barbitúrica (tiopental sódico 2,5%) por via intraperitoneal na dose de 10mg/kg. Após o aprofundamento anestésico, foi realizada sangria total por punção cardíaca. Depois da constatação do óbito, os animais foram necropsiados e amostras de língua e amígdalas palatinas, glândula salivar submandibular, fígado, baço, rins, bexiga, coração, pulmões, timo, intestinos e linfonodos mesentéricos foram fixadas em formol 10% tamponado em PBS (pH 7,0) para estudo histopatológico.

4.2 – Testes bioquímicos

Um total de 200µL de soro de cada amostra foram avaliadas para quantificação bioquímica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT) e bilirrubina total através de método enzimático colorimétrico, realizado imediatamente após a coleta semanal do sangue, pelo Laboratório de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz. O valor utilizado como referência da faixa de normalidade foi o resultado da média obtida de todos os animais no período pré-inoculação (25UI/L).

4.3 – Hematimetria e Leucometria

Um total de 0,5 mL de sangue foi utilizado para avaliação hematológica nos períodos pré e pós-inoculação. Esses exames foram realizados semanalmente pelo Laboratório de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz, utilizando o analisador hematológico veterinário pocH-100iV Diff (Sysmex, Roche Diagnóstica, Brasil).

4.4 – Testes imunoenzimáticos

4.4.1 – Ensaio imunoenzimático (EIA) para pesquisa de anticorpos para o HEV

As amostras de soro foram testadas por dois ensaios imunoenzimáticos diferentes para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-HEV. Um deles, realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia / IOC, Fiocruz – RJ, utilizando testes comerciais para soro e plasma humano e o outro, realizado na Suíça, em colaboração com Dr. Julio Moran no Laboratório Julio Moran, onde foi padronizado um ensaio “*in house*” para o genótipo 3 utilizando conjugados IgG γ , IgA α e IgM μ anti-macaco (*Fitzgerald Industries International, Inc.*, Massachusetts, EUA). As amostras de soro e saliva também foram testadas para detecção de anticorpos IgA anti-HEV na Suíça.

Para detecção de IgG anti-HEV utilizou-se o kit comercial HEV ELISA IgG (MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd., Cingapura, Ásia) segundo recomendações do fabricante. Este teste utiliza antígenos recombinantes do HEV, oriundos da região estrutural do genoma viral. O valor de corte (para o HEV ELISA IgG e o HEV ELISA IgM 3.0) é calculado como sendo $0,500 + a$ absorvância média do controle não reativo.

Para detecção de IgM anti-HEV utilizou-se o kit comercial HEV ELISA IgM 3.0 (MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd., Cingapura, Ásia) segundo recomendações do fabricante.

Este é um imunoenensaio indireto que utiliza um epítopo conformacional (Riddle e Anderson, 2000) altamente conservado derivado da região de leitura aberta 2 (ORF 2) do vírus.

Otimização do ensaio sorológico realizado em colaboração com o Dr. Julio Moran

O teste no qual as amostras de saliva e soro dos cynomolgus foram adaptadas é um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos humanos das classes IgA, IgM e IgG anti-HEV, individualmente (DIACHECK IgA, IgM e IgG anti-HEV, Suíça). Este ensaio baseou-se na detecção indireta dos anticorpos presentes nas amostras através da ligação dos mesmos ao antígeno capturado na microplaca e revelados posteriormente por um anticorpo anti-macaco marcado. Os antígenos utilizados foram das regiões terminais e medianas da ORF 2 (D2 E1 E2) e (D1 D2 E1 E2) e da ORF 3 (E1/E2 E3). As amostras de soro foram testadas para os anticorpos IgM, IgG e IgA anti-HEV e as amostras de saliva para anticorpos IgA anti-HEV. A microplaca foi sensibilizada previamente com o antígeno do HEV. Posteriormente, foram adicionados 200 µL do diluente da amostra em cada poço juntamente com 10 µL de cada amostra correspondente. Em seus respectivos poços, foram adicionados 100 µL dos controles positivo, negativo e diferencial. Em seguida, a placa foi coberta e incubada a 37°C pelo período de 30 min. Após, a microplaca foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem e invertida sobre uma gaze para retirar o resíduo de tampão. Foram aplicados, então, 100 µL do conjugado (pronto para uso) específico para detecção de cada anticorpo, em todos os poços com exceção do branco do substrato, e incubada por 30 min a 37°C. A placa foi novamente lavada e em seguida foram aplicados 100 µL do substrato com o cromógeno TMB (SIGMA, Alemanha). A microplaca foi coberta com papel alumínio e incubada em temperatura ambiente de 10-20 minutos. Para bloquear a reação, foram adicionados 100 µL da solução de bloqueio. Realizou-se a leitura da reação no espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm e filtro de referência de 630 nm. A avaliação dos resultados para cada amostra foi feita após o cálculo do valor do índice, que corresponde a uma normalização dos resultados em relação ao valor obtido para o controle diferencial em cada teste individual e pode ser atribuído como um valor de referência do ensaio. O valor do índice foi obtido dividindo o valor da absorção (DO) de cada exemplar único pelo valor médio do controle de diferencial. As amostras com valores do índice superiores a 1,00 foram consideradas reativas e indicaram a presença de anticorpos IgG, IgM ou IgA. As amostras com valores de índice menor do que 0,90 foram consideradas não reativas e indicaram ausência de anticorpos IgG, IgM ou IgA. Amostras com valores do índice entre 0,90 e 1,00 foram consideradas indeterminadas. A otimização deste ensaio foi realizada no Laboratório Julio Moran localizado em Zurique, Suíça.

4.5 – Testes moleculares

4.5.1 – Suspensão fecal

As amostras foram diluídas a partir da adição de 1g de fezes em 10 mL de tampão fosfato salino (PBS, 0,01M, pH 6,8) com pérolas de vidro de 3 mm e agitação por 2 min em tubo de poliestireno de 15 mL ou 50 mL utilizando equipamento agitador tipo vortex. A seguir, as suspensões foram clarificadas por centrifugação a 4.800g por 45 min (ou 20 min a 4°C), e em seguida, esterilizadas por filtração, utilizando filtro de 0,45 µm, obtidas alíquotas e a seguir estocadas a – 20°C em criotubo de 2 mL.

4.5.2 – Extração do RNA viral

O RNA foi extraído a partir de 140 µL de amostra de soro e/ou de suspensão fecal utilizando o kit de extração comercial *Qiamp Viral RNA kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA). Neste kit, tampões lisam a amostra e degradam as RNases para que o RNA viral se ligue a uma membrana de sílica-gel. O precipitado final é suspenso em 60 µL de tampão e estocado a - 20°C até o momento do teste.

4.5.3 – Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para cada tubo Eppendorf de 0,5 mL identificado, acrescentou-se 2,5 µL de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) (10 mM - Invitrogen, CA, USA), 10 µL de tampão 10x da enzima Superscript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, USA), 1 µL de random primers (50 mMol, Invitrogen, Escócia), 1 µL de RNAsin (inibidor de RNA) (20U/µL, Invitrogen, Escócia), 9,5 µL de água ultrapura para PCR (Invitrogen, CA, USA), 1 µL da enzima Superscript® III Reverse Transcriptase (200 U/µL - Invitrogen, CA, USA) e 25 µL de RNA eluído em tampão das amostras extraídas com kit comercial. A reação se processou por 1 hora a 50°C, e a enzima foi inativada incubando-se as amostras a 70°C durante 10 min. O material foi armazenado a –20°C

4.5.4 – Detecção e Quantificação do HEV RNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real)

As amostras de cDNA de soro e fezes foram detectadas e quantificadas de acordo com protocolo descrito por Jothikumar (2006) e adaptado por Santos e colaboradores (2008): o RNA do vírus da hepatite E foi quantificado e detectado numa reação de PCR em tempo real

com o marcador TaqMan® utilizando o equipamento *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que possui uma sensibilidade de detecção de até 10¹ cópias de RNA/mL. Um clone de um plasmídeo de uma linhagem suína do Brasil previamente caracterizada (Santos et al., 2009) foi construída com TOPO® TA cloning® Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e primers descritos (Jothikumar et al., 2006). O plasmídeo de DNA foi purificado utilizando o kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN, CA, USA) e quantificado com Nanodrop ND-1000 de acordo com instruções do fabricante (Wilmington, DE). Curvas padrão foram geradas utilizando 10-10⁹ cópias do plasmídeo de DNA. Os títulos genômicos equivalentes foram determinados baseados na curva padrão.

4.6 – Processamento histológico

Após 24 horas imersos em formalina tamponada a 10% em PBS, amostras de língua e amígdalas palatinas, glândula salivar submandibular, fígado, baço, rins, bexiga, coração, pulmões, timo, intestinos e linfonodos mesentéricos foram lavados em água corrente por 30-90 minutos antes da clivagem. Depois de clivados, foram processados: lavados em água corrente, para remoção do formol; desidratados em gradiente crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 100% e 100%), com agitação constante 1 hora cada; clarificados com xilol, com 3 trocas por uma hora em cada e finalmente impregnados em parafina (3 trocas com 1 hora cada). Todo esse procedimento foi realizado com o equipamento AutoTécnico (Citadel 2000 Shandon, Inc). Seguiu-se a inclusão em parafina, realizada no aparelho Histocentre 2 (Shandon Inc.). Cortes de 4 µm de espessura foram realizados com um micrótomo semiautomático Leica RM2145 utilizando-se navalhas MB35 descartáveis (Shandon, Inc.). A seguir, os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (Luna, 1968). Os procedimentos histotécnicos e avaliações histopatológicas foram desenvolvidos no Laboratório de Neurovirulência (Laneu), Bio-Manguinhos/Fiocruz. Realizaram-se os diagnósticos histopatológicos e documentação fotomicrográfica por captação de imagens, com microscópio óptico DMRXA (Leica®), utilizando o programa Leica® Qwin Standard de análise de imagens. A avaliação semi-quantitativa dos níveis de intensidade de lesão inflamatória obedeceu aos critérios descritos por Halbur e colaboradores (2001) para cortes de fígado obtidos durante a necrópsia pois, exige a avaliação de no mínimo 10 lóbulos hepáticos. Tal score possui variação de 0 a 4, onde (0) significa ausência de inflamação; (1) presença de 1 a 2 infiltrados focais linfocitários/10 lóbulos hepáticos; (2) presença de 2 a 5 infiltrados focais linfocitários/10 lóbulos hepáticos; (3) presença de 6 a 10 infiltrados focais linfocitários/10 lóbulos hepáticos e (4) >10 infiltrados focais linfocitários/10 lóbulos

hepáticos. Já a avaliação dos pequenos fragmentos de tecido hepático obtidos por biópsia com agulha de Menghine, obedeceu os critérios descritos por Perón e colaboradores (2007), no qual, as inflamações portal e focal são classificadas, em escala semiquantitativa, em três graus: (0) nenhuma inflamação; (1) inflamação discreta e (2) inflamação moderada.

5 – RESULTADOS

5.1 – Sinais clínicos

Sinais clínicos de doença tais como icterícia, febre e prostração não foram observados, entretanto, o animal F3 apresentou diarreia nos dias 17 a 20 e no dia 40 pi (fato que coincidiu com a elevação sérica da enzima ALT). O macaco R5 apresentou inapetência nos dias 15 a 16 e 40 a 41, período que foi verificado o início da elevação da ALT, mesmo sem que o animal tenha tido níveis séricos detectáveis de IgM ou IgG anti-HEV ou carga viral detectável pelo PCR em tempo real. Nenhum animal inoculado apresentou alterações significativas nos níveis de AST ou GGT, de modo que esses resultados foram considerados irrelevantes e não foram apresentados nesta dissertação.

5.2 - Cinco grupos experimentais

5.2.1 – *Grupo 1: Infectado com suspensão fecal de suíno – Brasil* (Figuras 5.1 e 5.2, quadro 5.1 e tabela 5.2)

Os três animais do grupo 1 apresentaram excreção de HEV RNA nas fezes, com início de 7 - 21 dias após inoculação intravenosa, persistindo até os dias 21 - 56. Dois animais apresentaram-se virêmicos, 1A e 1C, sendo o vírus detectável no 14º dia pós-inoculação (dpi) para o primeiro e do 39º ao 53º dpi para o segundo. O título viral do HEV detectado nas suspensões fecais para o animal 1A foram 10^3 , 10^5 , 10^5 e 10^3 cópias de RNA/mL nos dias 7, 14, 18 e 21 pi respectivamente; e a carga viral no soro foi de 10^3 cópias de RNA/mL no dia 14. Os títulos das suspensões fecais para o animal 1C foram 10^3 cópias de RNA/mL nos dias 21 a 32, 10^4 cópias de RNA/mL nos dias 35 a 53 e novamente 10^3 cópias de RNA/mL no 56º dpi; e, no soro, 10^2 , 10^3 , 10^3 cópias de RNA/mL nos dias 39, 46 e 53 respectivamente. O animal 1B apresentou 10^4 , 10^3 e 10^4 cópias de RNA/mL nas fezes nos dias 14, 18 e 21 respectivamente, sem detecção de viremia. Os animais 1A e 1B soroconverteram para IgG anti-HEV no 18º dpi. Também foi detectado simultaneamente IgM e IgA anti-HEV no soro no 15º dpi para o 1A e no 18º dpi para o 1B. Todos os anticorpos permaneceram detectáveis até o fim do estudo. Dos animais que tiveram IgA anti-HEV testado na saliva (1A e 1C), somente o 1C apresentou quantidades detectáveis nos dias 7, 46 e 67 pi. Deste grupo, o animal 1B apresentou elevação de ALT no 46º dpi, considerando a média do valor basal obtida no período pré-inoculação de todos os animais ($25 \text{ U/L} \pm 7 \text{ DP}$ – desvio padrão). Nenhuma alteração foi verificada no hemograma com relação à série eritróide, entretanto, quanto à série branca, apenas no animal 1C, os linfócitos periféricos tornaram-se indetectáveis

em dois períodos avaliados: 25 e 53 dpi. As amostras de biópsia hepática revelaram alterações histopatológicas focais e portais com escore variando de discreto a moderado, coincidindo com aumento das imunoglobulinas nos animais 1A e 1B. Microesteatoses discretas também foram observadas para estes animais. Nos animais 1A e 1C foi evidente a presença de células de Ito em nível discreto a moderado. Os três animais apresentaram tumefação discreta dos hepatócitos. Outros achados de necrópsia revelaram infiltrado inflamatório linfocitário no interstício renal e no miocárdio do animal 1C.

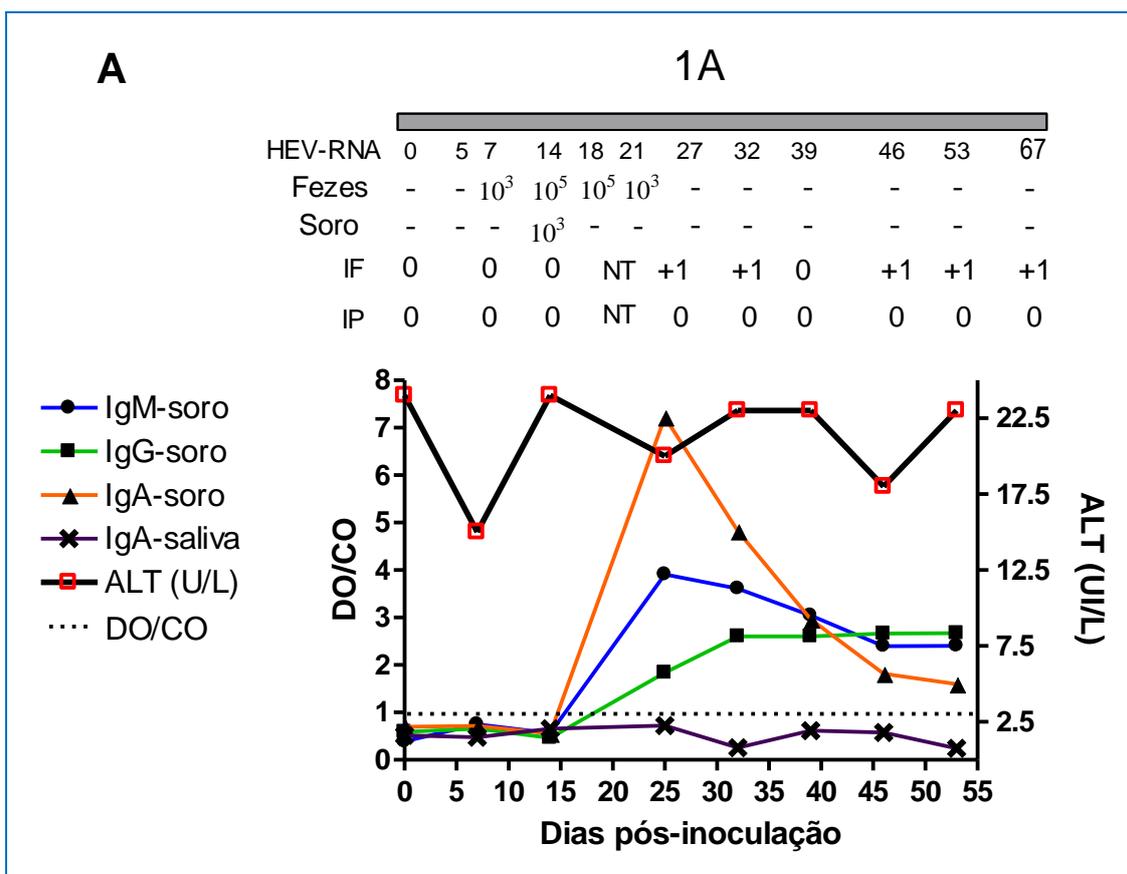
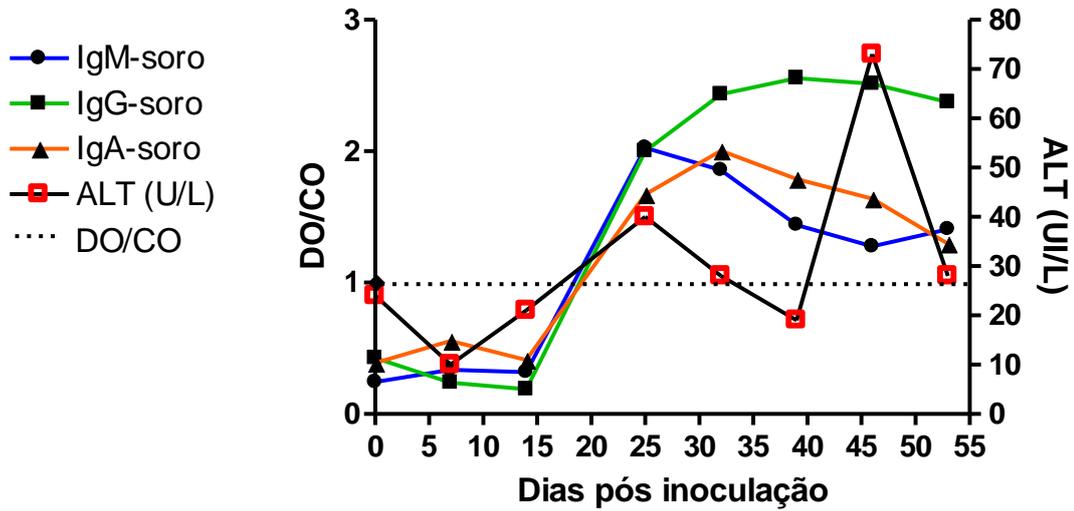


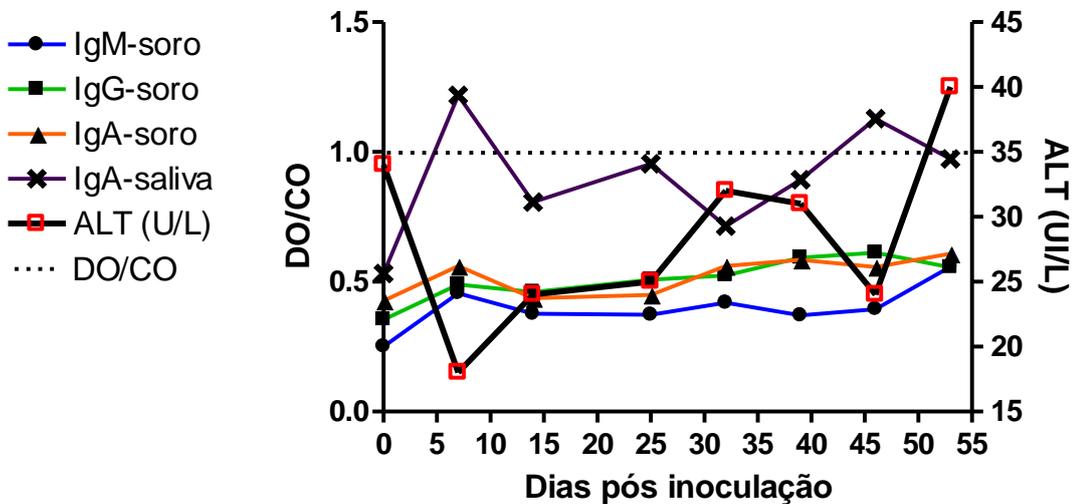
Figura 5.1 – Perfil individual dos achados decorrentes da infecção pelo HEV em *Macaca fascicularis*. Grupo inoculado com suspensão fecal (HEV RNA: 10⁵ cópias/mL) proveniente de suínos de fazendas comerciais do Brasil. A ordenada (y) da esquerda representa valores da relação densidade óptica/cut off obtidos por teste imunoenzimático, e a linha pontilhada indica que resultados acima de 1,0 são amostras reativas; a ordenada da direita mostra os níveis séricos de ALT (UI/L); o eixo das abscissas mostra os dias após inoculação. Acima do gráfico em ordem cronológica de aparecimento, representou-se a quantificação de HEV RNA nas fezes e no soro. As escalas das ordenadas estão diferentes nos três animais. A intensidade da inflamação focal (IF) e portal (IP) resultou de análise subjetiva, classificada em escala semi-quantitativa na inflamação: grau 0=nenhuma inflamação, grau +1=discreta, grau +2=moderada, grau +3=grave, dos cortes histológicos provenientes de biópsias hepáticas obtidas durante o período de infecção estudado. (NT - não testado).

B**1B**

	0	5	7	14	18	21	27	32	39	46	53	67
HEV-RNA	0			10^4	10^3	10^4	-	-	-	-	-	-
Fezes	-	-	-	10^4	10^3	10^4	-	-	-	-	-	-
Soro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IF	+1	0	0	NT	+2	+1	+2	0	0	0	0	+1
IP	0	0	0	NT	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+2

**C****1C**

	0	5	7	14	18	21	27	32	39	46	53	67	
HEV-RNA	0						10^3	10^4	10^4	10^4	10^4	10^3	-
Fezes	-	-	-	-	-	10^3	10^4	10^4	10^4	10^4	10^3	-	
Soro	-	-	-	-	-	-	-	-	10^2	10^3	10^3	-	
IF	+1	+1	0	NT	0	0	0	0	0	0	+1	+2	
IP	0	0	0	NT	0	0	0	0	0	0	0	0	



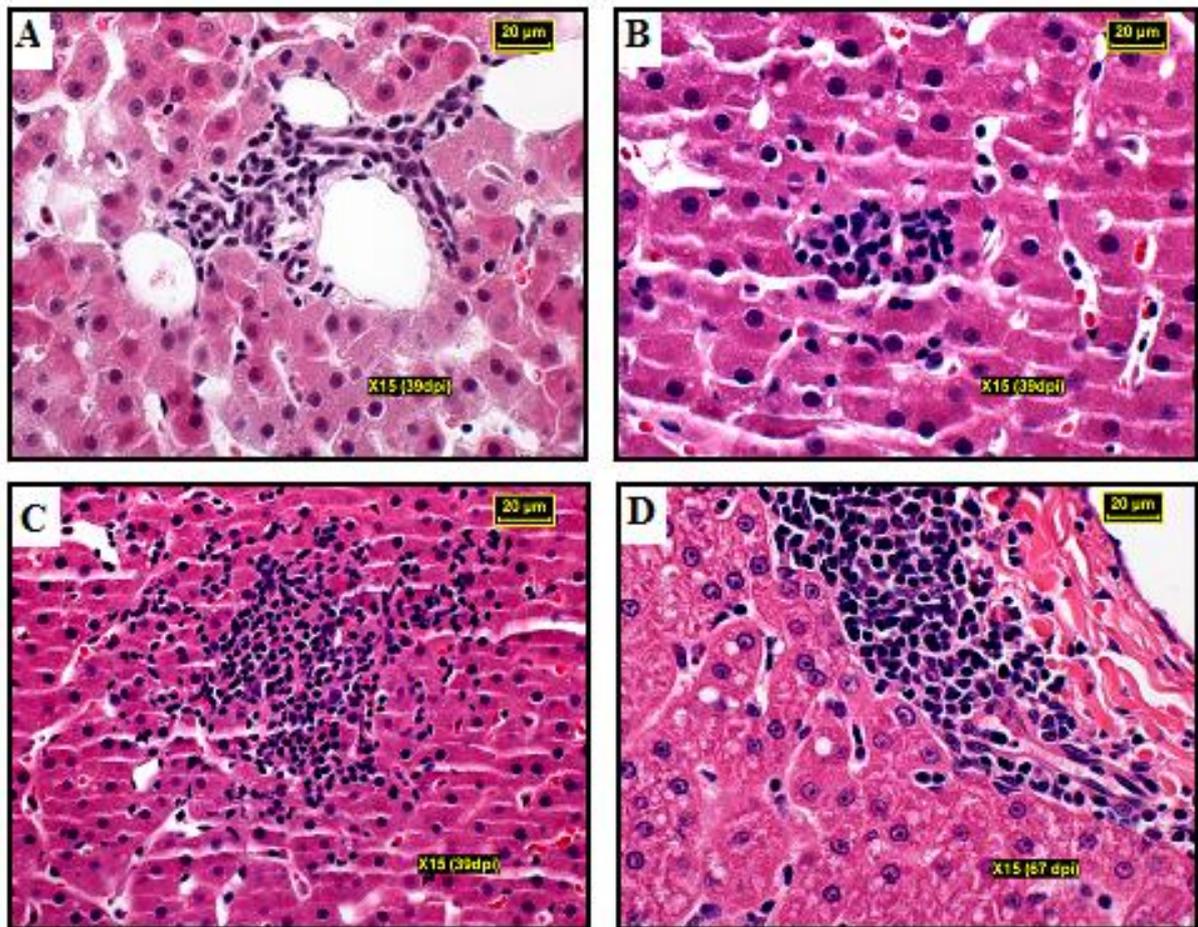


Figura 5.2 – Cortes de achados histopatológicos de biópsia e necrósia hepática do animal 1B corados pela técnica de hematoxilina-eosina (Luna, 1968). Em A, B e C, biópsia hepática do 39º dpi demonstrando inflamação portal grau +1 (discreto) com predominância de histiócitos (A), inflamação lobular grau +1 (discreto) com presença de linfócitos e histiócitos (B) e inflamação lobular grau +2 (moderado) com presença de linfócitos e histiócitos (C). Em D, achado de necrósia do 67º dpi demonstrando inflamação portal grau +2 (moderado) com presença de linfócitos e histiócitos.

5.2.2 – Grupo 2: infectado com amostras biológicas humanas – Argentina (Figura 5.3, quadro 5.1 e tabela 5.2)

Dos três cynomolgus deste grupo, dois não tiveram evidência virológica e sorológica de infecção pelo HEV. Somente o animal 2C apresentou HEV RNA nas fezes, com início no dia 14 e término no dia 27 pi, sem detecção de viremia. Os títulos virais observados foram: 10^3 , 10^2 , 10^3 , 10^3 e 10^3 cópias de RNA/mL nos dias 14, 18, 21, 25 e 27 pi respectivamente. Houve soroconversão para IgG anti-HEV no 25º dia pi detectável até o fim do estudo e de IgM nos dias 39 a 46 pi. Não houve aumento significativo de ALT para o animal 2C. Entretanto, o macaco 2B apresentou aumento significativo de ALT no 46º dpi. Nenhuma alteração significativa foi verificada no hemograma para este grupo. As amostras de biópsia hepática dos três animais revelaram alterações histopatológicas discretas envolvendo

inflamação portal e focal, microesteatose, tumefação hepatocitária e presença de células de Ito. No dia da necrópsia, o animal 2C apresentou microesteatose moderada e esteatose discreta. Outros tecidos coletados na necrópsia revelaram que o animal 2B apresentou células multinucleadas nos túbulos renais e aumento da população celular do interstício alveolar e o macaco 2A células multinucleadas nos túbulos renais e presença de *Balantidium coli*. evidente à microscopia de campo claro.

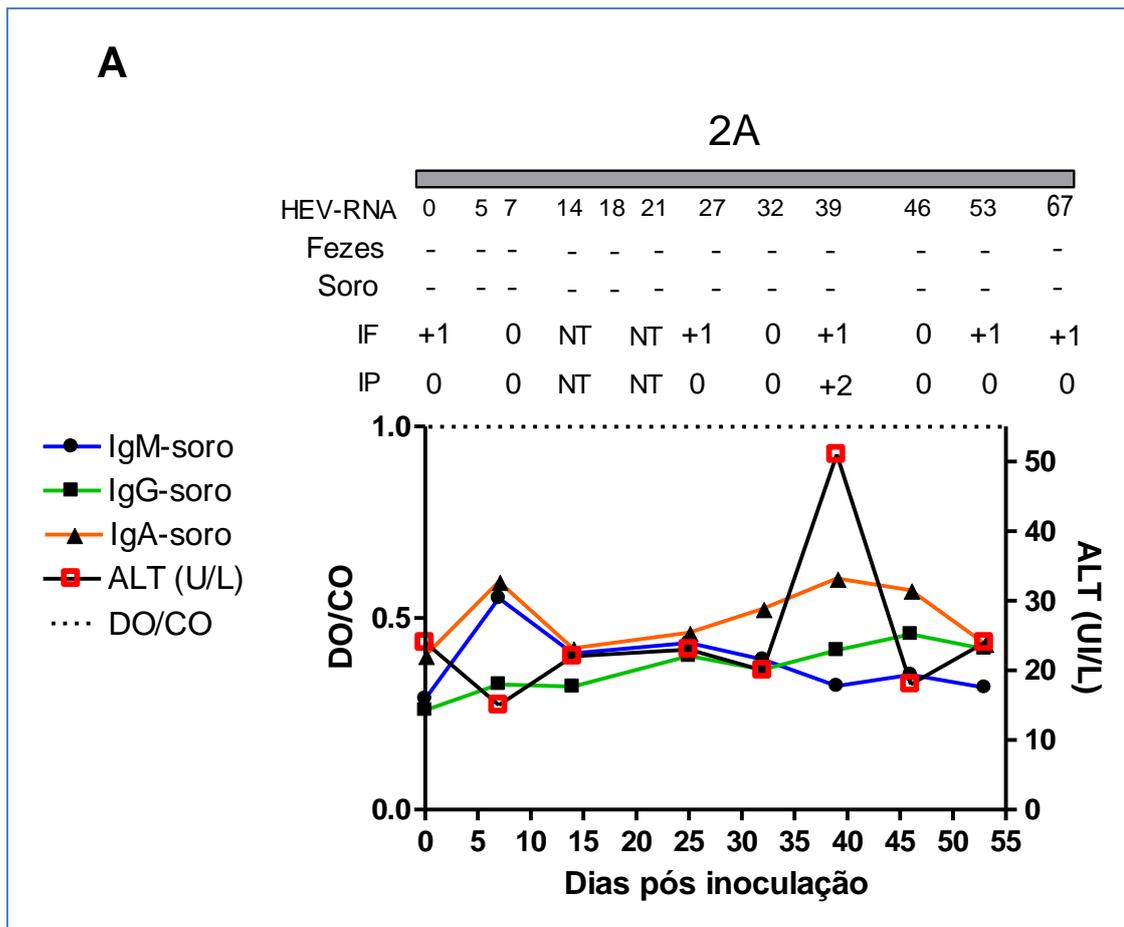
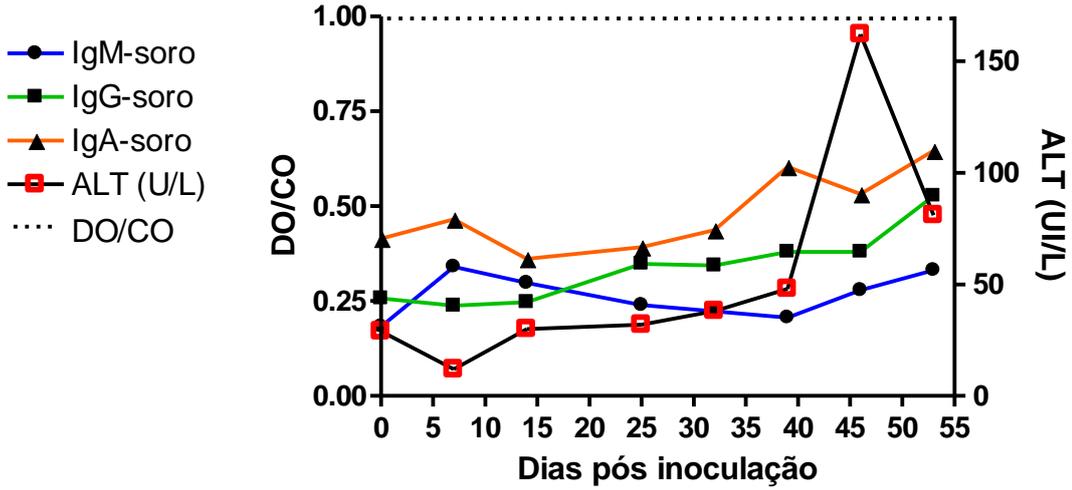


Figura 5.3 – Perfil individual dos achados decorrentes da infecção pelo HEV em *Macaca fascicularis*. Grupo inoculado com amostras biológicas provenientes de três casos de hepatite fulminante ocorridos na Argentina. A ordenada (y) da esquerda representa valores da relação densidade óptica/cut off obtidos por teste imunoenzimático, e a linha pontilhada indica que resultados acima de 1,0 são amostras reativas; a ordenada da direita mostra os níveis séricos de ALT (UI/L); o eixo das abscissas mostra os dias após inoculação. Acima do gráfico em ordem cronológica de aparecimento, representou-se a quantificação de HEV RNA nas fezes e no soro. As escalas das ordenadas estão diferentes nos três animais. A intensidade da inflamação focal (IF) e portal (IP) resultou de análise subjetiva, classificada em escala semi-quantitativa na inflamação: grau 0=nenhuma inflamação, grau +1=discreta, grau +2=moderada, grau +3=grave, dos cortes histológicos provenientes de biópsias hepáticas obtidas durante o período de infecção estudado. (NT - não testado).

B

2B

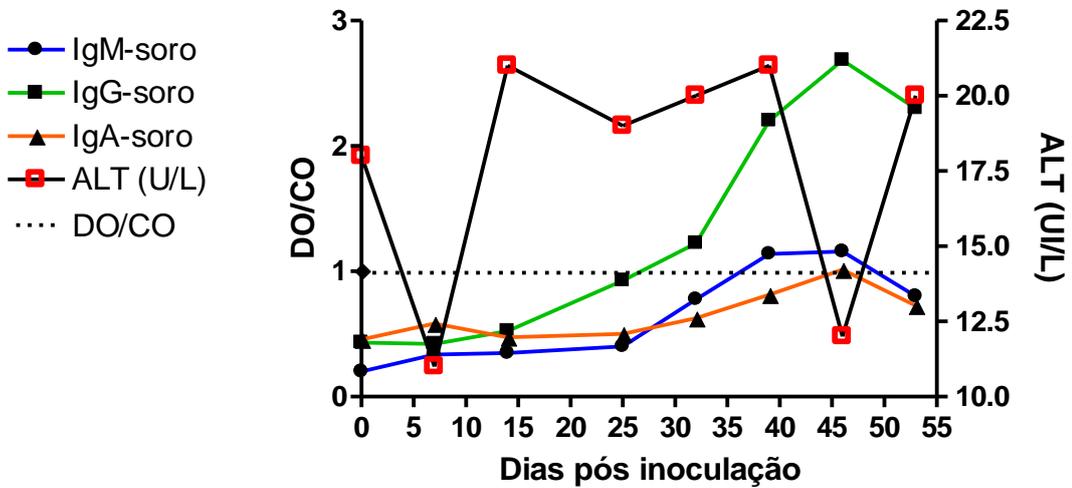
HEV-RNA	0	5	7	14	18	21	27	32	39	46	53	67
Fezes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IF	+1	NT	0	NT	0	0	0	+1	0	+1	+1	
IP	0	NT	0	NT	0	0	0	0	0	+1	+1	



C

2C

HEV-RNA	0	5	7	14	18	21	27	32	39	46	53	67
Fezes	-	-	-	10 ³	10 ²	10 ³	10 ³	-	-	-	-	-
Soro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IF	0	0	0	0	NT	0	+1	0	0	0	+1	+1
IP	0	0	0	0	NT	0	0	0	+1	0	0	+1



5.2.3 – Grupo 3: infectado com suspensão fecal de suíno – Holanda (Figura 5.4, quadro 5.1 e tabela 5.2)

Dos três animais deste grupo, o HEV RNA foi detectado nas fezes dos animais 3B e 3C, com início de 5 a 7 dias após inoculação intravenosa e término no 18° dia respectivamente; ambos tornaram-se virêmicos, sendo o 3B do 7° ao 14° dpi, e 3C no 14° dpi. Os títulos virais das amostras de fezes para o 3B foram 10^4 , 10^5 , 10^4 e 10^6 cópias de RNA/mL nos dias 7, 12, 14 e 18 respectivamente e a carga viral no soro foi de 10^3 e 10^4 cópias de RNA/mL nos dias 7 e 14. Para o animal 3C, os títulos das suspensões fecais foram 10^5 , 10^6 , 10^5 , 10^6 e 10^4 cópias de RNA/mL nos dias 5, 7, 12, 14 e 18 respectivamente, e 10^3 cópias de RNA/mL no soro no dia 14. Todos os animais deste grupo soroconverteram para IgG e IgM anti-HEV, sendo 3C e 3B no 18° dpi para ambas as imunoglobulinas, com detecção de IgG até o fim do estudo e de IgM até o 53° dia pi. A detecção de IgA no soro foi verificada para 3A e 3B, sendo detectável para 3B de 21 - 45 dpi e para 3A durante todo o estudo (assim como para IgM e IgG). Somente 3A apresentou elevação significativa de ALT nos dias 46 a 53 pi respectivamente. Nenhuma alteração significativa foi verificada no hemograma para este grupo. As amostras de biópsia hepática dos três animais revelaram alterações histopatológicas discretas envolvendo inflamação focal, microesteatose, tumefação e presença de células de Ito. No dia da necrópsia, os animais 3A e 3B apresentaram vacuolização da Zona 3 em grau moderado, e o animal 3C apresentou um nível discreto de hepatócitos apoptóticos. Outros tecidos coletados na necrópsia revelaram que o animal 3B apresentou infiltrado inflamatório linfocitário no interstício renal e que o macaco 3C exibiu células multinucleadas nos túbulos renais, cariomegalia e infiltrado linfocitário na glândula salivar.

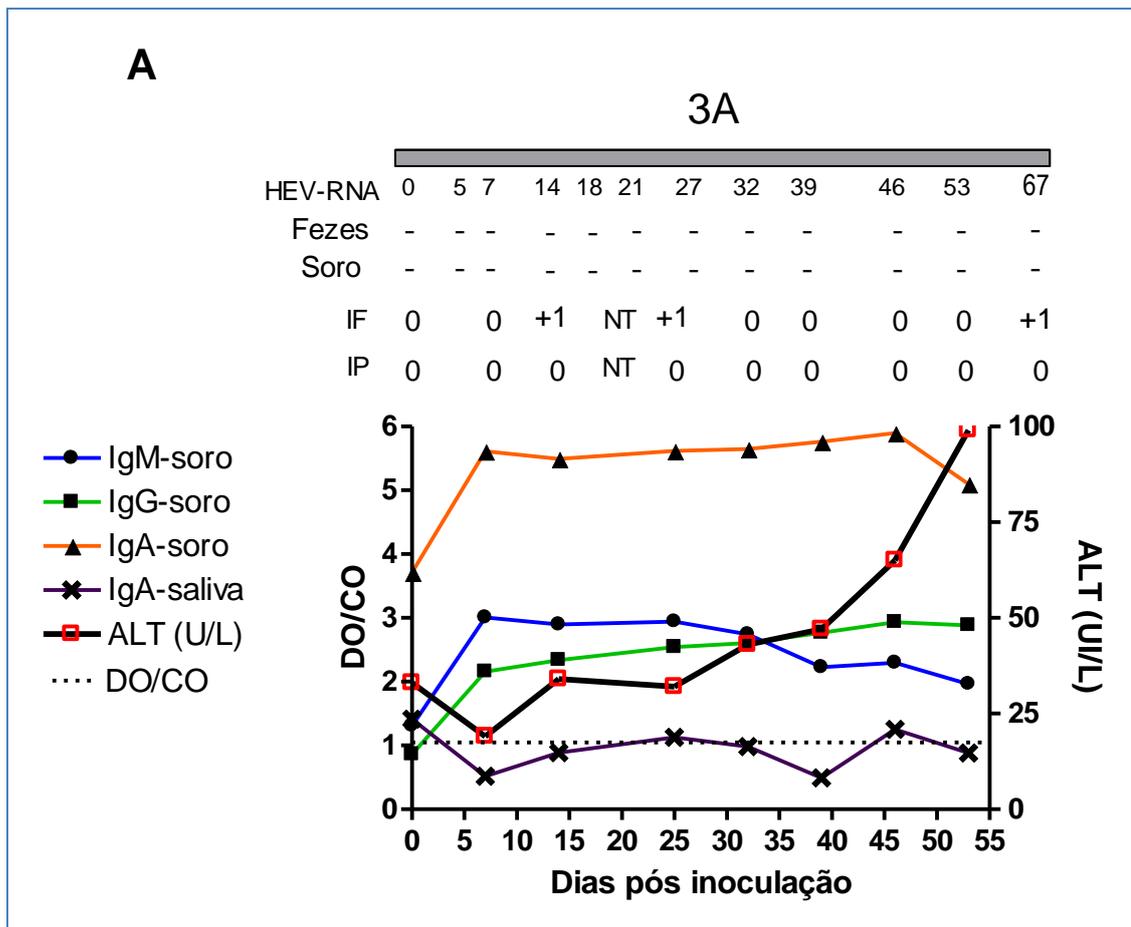
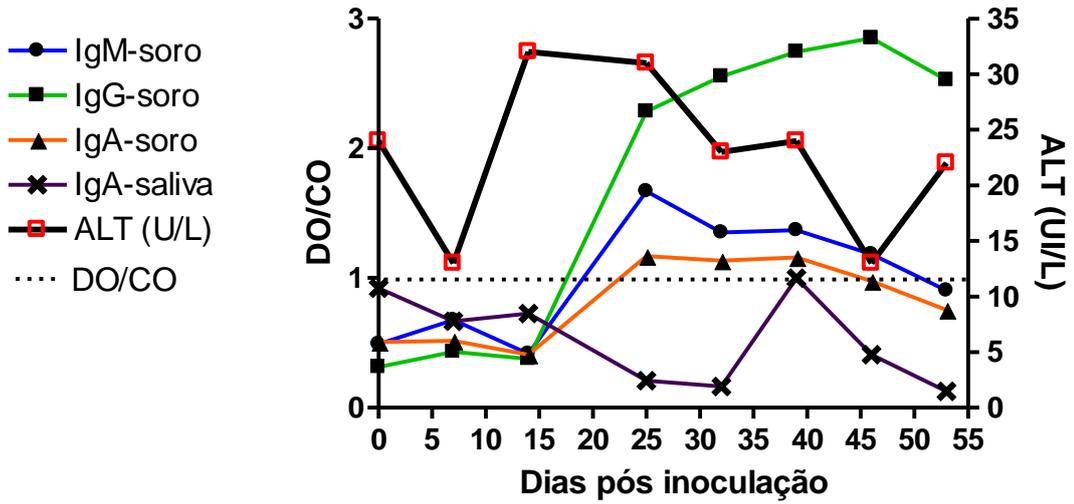


Figura 5.4 – Perfil individual dos achados decorrentes da infecção pelo HEV em *Macaca fascicularis*. Grupo contendo três animais machos (F3, G3 e O1), inoculados com uma suspensão fecal sabidamente positiva para a detecção do genoma do HEV de suínos provenientes da Holanda, genótipo 3, com título viral de 10^6 cópias/mL. A ordenada (y) da esquerda representa valores da relação densidade óptica/cut off obtidos por teste imunoenzimático, e a linha pontilhada indica que resultados acima de 1,0 são amostras reativas; a ordenada da direita mostra os níveis séricos de ALT (U/L); o eixo das abscissas mostra os dias após inoculação. Acima do gráfico em ordem cronológica de aparecimento, representou-se a quantificação de HEV RNA nas fezes e no soro. As escalas das ordenadas estão diferentes nos três animais. A intensidade da inflamação focal (IF) e portal (IP) resultou de análise subjetiva, classificada em escala semi-quantitativa na inflamação: grau 0=nenhuma inflamação, grau +1=discreta, grau +2=moderada, grau +3=grave, dos cortes histológicos provenientes de biópsias hepáticas obtidas durante o período de infecção estudado. (NT - não testado).

B

3B

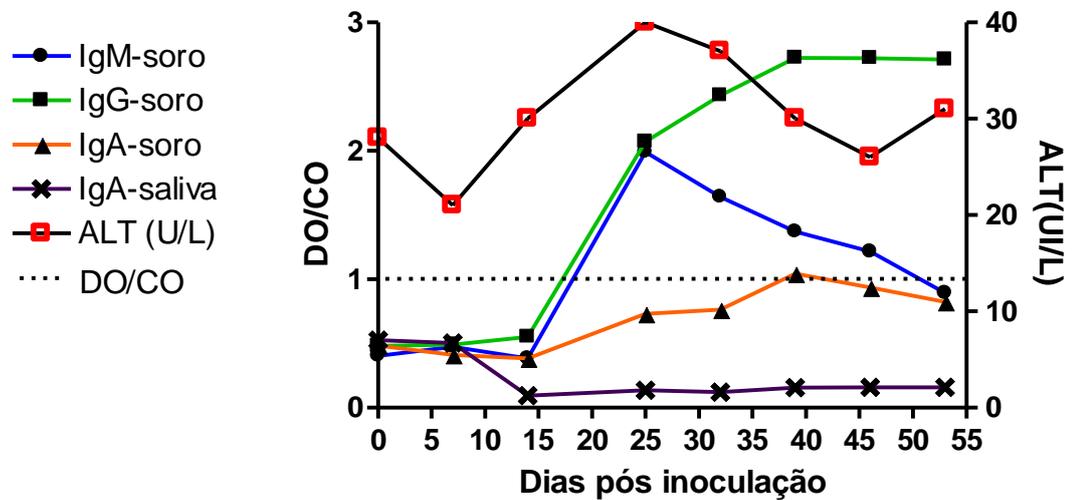
HEV-RNA	0	5	7	14	18	21	27	32	39	46	53	67
Fezes	-	-	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-
Soro	-	-	10 ³	10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
IF	0	0	0	0	NT	0	0	+1	0	0	+1	0
IP	0	0	0	0	NT	0	0	0	0	0	0	0



C

3C

HEV-RNA	0	5	7	14	18	21	27	32	39	46	53	67
Fezes	-	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-
Soro	-	-	-	10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-
IF	+1	+1	0	0	NT	0	+1	+1	0	0	0	0
IP	0	0	0	0	NT	0	0	0	0	0	0	+1



5.2.4 – Grupo 4: infectado com soro humano – Brasil (Figura 5.5, quadro 5.1 e tabela 5.2)

A única evidência de exposição ao vírus da hepatite E, observada no único cynomolgus deste grupo (4A), foi a soroconversão. Anticorpos da classe IgG foram detectados a partir de 39 dpi. Sinais bioquímicos e virológicos de infecção por HEV não foram observados. Nenhuma alteração significativa foi verificada no hemograma. As amostras de biópsia hepática revelaram alterações histopatológicas discretas envolvendo inflamação focal, microesteatose e células de Ito. No 46º dpi verificou-se inflamação portal moderada.

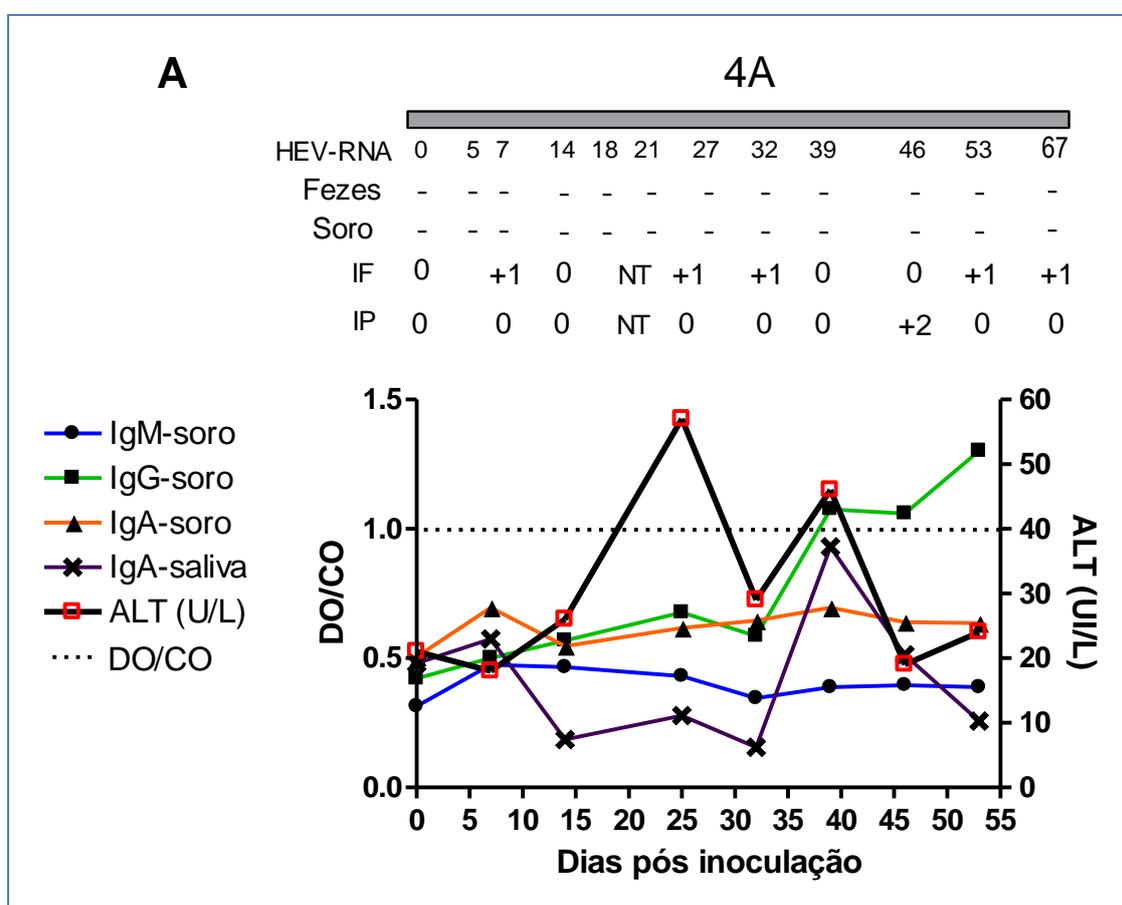


Figura 5.5 – Perfil individual dos achados decorrentes da infecção pelo HEV em *Macaca fascicularis*. Em A, animal inoculado com amostra de soro de um caso humano brasileiro de hepatite aguda, identificado como HEV, genótipo 3, título viral de 10^5 cópias/mL. A ordenada (y) da esquerda representa valores da relação densidade óptica/cut off obtidos por teste imunoenzimático, e a linha pontilhada indica que resultados acima de 1,0 são amostras reativas; a ordenada da direita mostra os níveis séricos de ALT (U/L); o eixo das abscissas mostra os dias após inoculação. Acima do gráfico em ordem cronológica de aparecimento, representou-se a quantificação de HEV RNA nas fezes e no soro. A intensidade da inflamação focal (IF) e portal (IP) resultou de análise subjetiva, classificada em escala semi-quantitativa na inflamação: grau 0=nenhuma inflamação, grau +1=discreta, grau +2=moderada, grau +3=grave, dos cortes histológicos provenientes de biópsias hepáticas obtidas durante o período de infecção estudado. (NT - não testado).

5.2.5 – Grupo 5: Controle negativo (Figura 5.6, quadro 5.1 e tabela 5.2)

Os dois animais deste grupo não apresentaram evidências virológicas, sorológicas e bioquímicas de infecção por HEV. Nenhuma alteração foi verificada no hemograma desses animais. Os tecidos coletados na necrópsia não revelaram alterações histopatológicas compatíveis com hepatite aguda. Foram observadas inflamação focal e portal discretas, as quais foram consideradas como normais para a espécie, células de Ito, microesteatoses e esteatose. O animal 5B apresentou infiltrado linfohistiocitário na glândula salivar.

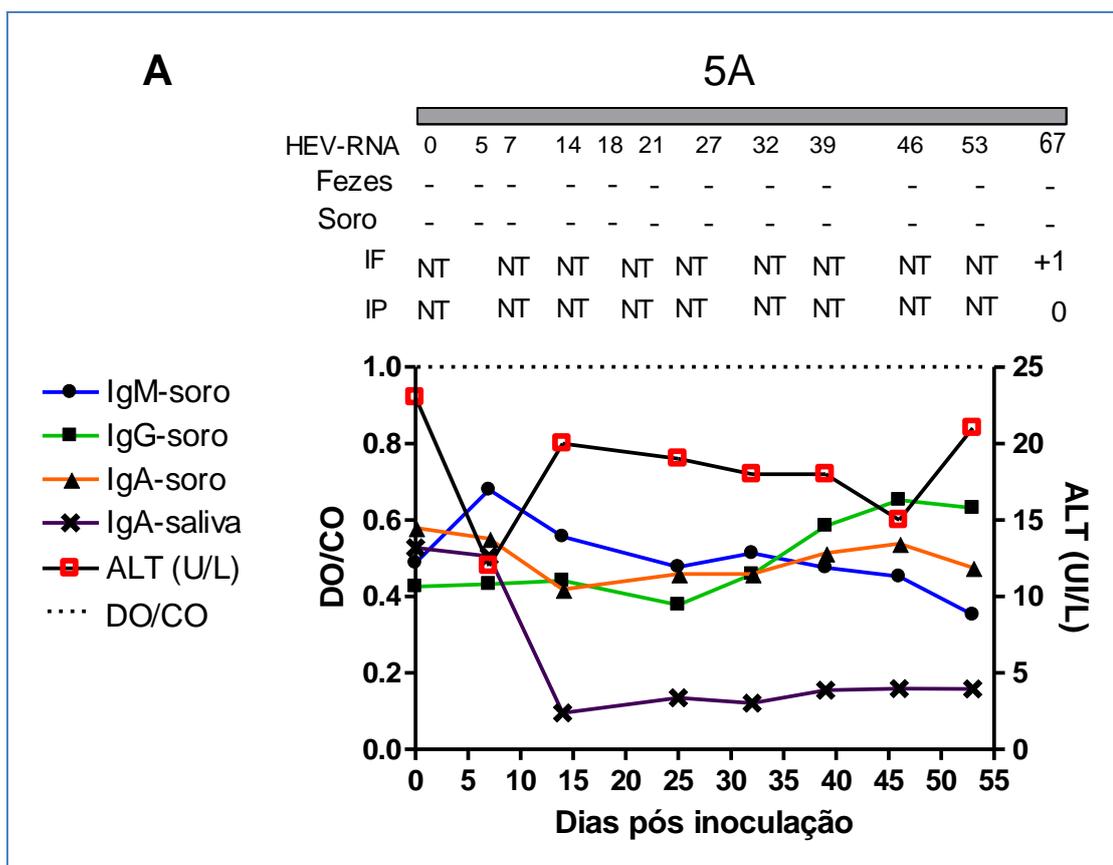
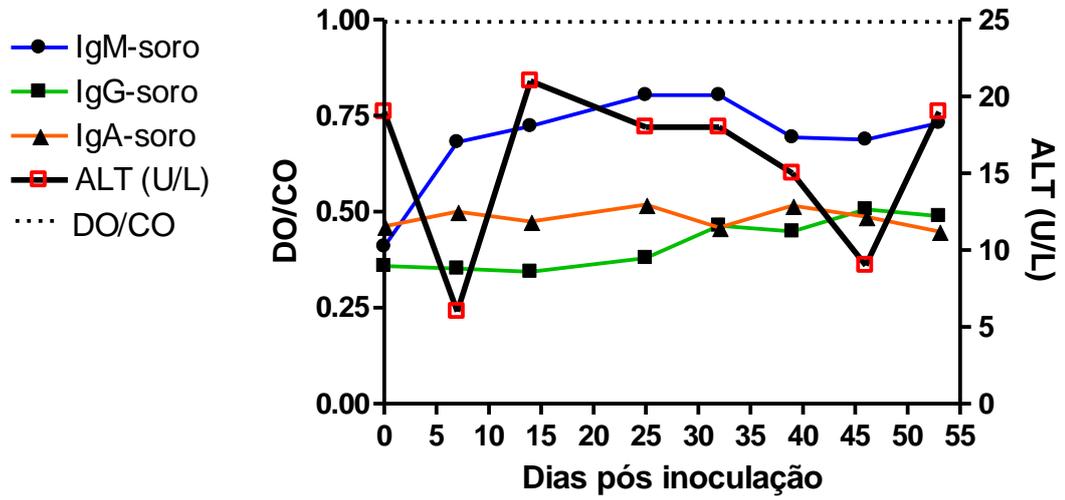


Figura 5.6 – Perfil individual dos achados em *Macaca fascicularis*. Em A e B, animais controle. A ordenada (y) da esquerda representa valores da relação densidade óptica/cut off obtidos por teste imunoenzimático, e a linha pontilhada indica que resultados acima de 1,0 são amostras reativas; a ordenada da direita mostra os níveis séricos de ALT (UI/L); o eixo das abscissas mostra os dias após inoculação (não realizada). Acima do gráfico em ordem cronológica de aparecimento, representou-se a quantificação de HEV RNA nas fezes e no soro. A intensidade da inflamação focal (IF) e portal (IP) resultou de análise subjetiva, classificada em escala semi-quantitativa na inflamação: grau 0=nenhuma inflamação, grau +1=discreta, grau +2=moderada, grau +3=grave, dos cortes histológicos provenientes de biópsias hepáticas obtidas durante o período de infecção estudado. (NT - não testado).

B**5B**

	0	5	7	14	18	21	27	32	39	46	53	67
HEV-RNA	0	5	7	14	18	21	27	32	39	46	53	67
Fezes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IF	NT	+1										
IP	NT	+1										



Quadro 5.1 – Contagem de leucócitos (mil/mm³) / linfócitos (%) por animal durante o período estudado.

Leucócitos (mil/mm³) / Linfócitos (%)												
dpi / animal	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	5A	5B
0	28,5/2	9,0/26	12,7/16	13,0/11	12,5/17	15,0/16	16,4/5	10,0/17	12,3/19	9,5/28	19,7/30	8,3/17
7	9,7/20	11,1/39	10,4/28	7,9/33	16,6/22	11,1/10	10,9/7	9,4/19	9,8/21	9,3/31	9,0/44	5,8/40
14	12,9/9	11,6/18	9,0/12	7,0/34	14,4/8	8,0/22	10,6/6	7,4/13	9,5/24	9,4/30	10,4/25	4,9/9
25	9,4/5	13,3/10	7,8/0	5,7/13	11,0/15	7,4/9	6,7/11	7,6/17	9,1/16	9,8/8	8,7/9	4,8/18
32	NT	14,1/32	7,5/11	5,3/26	10,6/2	8,6/4	16,5/2	6,4/3	9,5/9	13,6/4	8,9/43	6,8/1
39	12,4/12	16,2/14	7,9/44	5,4/28	13,2/32	9,7/9	8,6/29	NT	NT	10,2/11	NT	5,3/6
46	10,3/6	12,8/20	6,7/4	6,5/18	17,0/19	10,4/10	15,9/0	5,8/8	6,9/8	8,8/8	10,6/46	NT
53	9,5/1	10,0/22	7,8/0	5,3/19	21,5/0	9,8/15	5,7/7	6,2/14	9,9/15	8,3/8	6,2/18	6,1/0
67	12,0/29	9,7/36	7,1/55	5,0/53	9,7/29	9,4/28	5,8/53	7,4/39	10,0/3	6,1/38	9,3/28	4,2/29

Legenda: dpi – dias pós-inoculação; NT – não testado.

Tabela 5.2. Sumário de todos os eventos bioquímicos, virológicos, sorológicos e histopatológicos em macacos cynomolgus inoculados intravenosamente com inóculos de diferentes origens do HEV.

Evento	Tipo de inóculo, por animal											
	Susp. Fecal Suíno Brasil (10^5 cópias de RNA/ml) [@]			Amostras biológicas Humanas Argentina			Susp. Fecal Suíno Holanda (10^6 cópias de RNA/ml)			Soro Humano Brasil (10^5 cópias de RNA/ml)	Controles Negativos	
	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	5A	5B
Elevação ALT*	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não
dpi	-	46	-	39	39 -53	-	39 - 53	-	-	25	-	-
HEV nas fezes	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
dpi	7 – 21	14 – 21	21 – 56	-	-	14 – 27	-	7 – 18	5 – 18	-	-	-
HEV no soro	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
dpi	14	-	39 - 53	-	-	-	-	7 - 14	14	-	-	-
Soroconversão anti-HEV	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Escore das lesões hepáticas à necrópsia	1	2	3	0	1	0	1	1	1	1	1	2

[@]Susp., Suspensão; * ALT, alanina aminotransferase; Escore das lesões focais inflamatórias linfocíticas obtidas na necrópsia hepática: 0 – ausente; 1 – discreta; 2 – moderada; 3 – alta; 4 – grave (Halbur et al., 2001).

6 – DISCUSSÃO

Embora existam modelos de infecção experimental alternativos para o estudo de muitas doenças, como cultura celular, os modelos de infecção animal ainda são fundamentais para melhor compreensão da patogênese de muitas doenças recentemente descobertas, bem como para o desenvolvimento de vacinas. O macaco cynomolgus é considerado o melhor modelo para infecção experimental pelo vírus da hepatite E, pois ele é capaz de reproduzir, de maneira mais fidedigna, os eventos observados em humanos infectados (Bradley et al 1987; Balayan et al., 1983; Aggarwal et al., 2001).

Atualmente, a Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro conta com a criação de algumas colônias de primatas não humanos para utilização na pesquisa, dentre elas a colônia de macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*), com aproximadamente 80 exemplares. Devido ao número reduzido dessa colônia, a disponibilidade de fornecimento desses animais para pesquisa está em torno de 10 animais por ano. A manutenção de uma colônia de criação é muito dispendiosa, sendo o custo de cada animal avaliado em torno de três mil dólares.

Neste estudo, a infecção experimental com HEV (genótipo 3) em macacos cynomolgus demonstrou que animais pertencentes aos diferentes grupos, bem como aqueles dentro do mesmo grupo, apresentaram padrões diferenciados de resposta à infecção. De uma maneira geral, a detecção de HEV RNA nas fezes ocorreu na ausência de elevação da ALT. Além disso, a excreção de vírus pelos animais infectados que tiveram aumento de ALT foi similar em magnitude à observada em animais sem aumento de ALT. Resultados semelhantes também foram observados em dois outros estudos (Aggarwal et al., 2001; Longer et al., 1996). Entretanto, nesses trabalhos, o aumento de ALT estava associado aos animais inoculados com maiores títulos virais em comparação com aqueles que receberam títulos menores. Essa relação não foi observada no presente estudo.

Para 5 animais (Q11, X15, G3, O1 e R7), sendo pelo menos um representante de cada grupo, a primeira evidência de infecção foi a detecção do HEV nas fezes no final da primeira semana ou no início da segunda semana após a inoculação (5° ao 14° dpi). Este dado sugere a hipótese de que o HEV se replica no fígado e é excretado nas fezes através da rota biliar (Ticehurst, 1991). A replicação viral no fígado mantém a viremia, que pôde ser observada pela detecção do genoma viral em 3 desses animais (Q11, O1 e G3) antes da soroconversão. Com o aparecimento dos anticorpos séricos, que ocorreu na segunda semana para quatro animais (Q11, X15, G3 e O1) e na terceira semana para o cynomolgus R7, a eliminação viral nas fezes e a carga viral sérica tornaram-se indetectáveis (Longer et al., 1993). A replicação

viral geralmente causa danos no fígado, frequentemente entre a 3^o-5^o semanas após a infecção, com aumento dos níveis das enzimas hepáticas no soro. Entretanto, em outros estudos realizados com macacos cynomolgus infectados com HEV, os danos no fígado não se apresentaram graves na maioria dos animais. Aggarwal e colaboradores (2001) realizaram um estudo onde 12 animais foram infectados e lesões hepáticas não foram observadas, apesar da elevada excreção de HEV detectada nas fezes. No presente estudo, não foram encontradas lesões histopatológicas extensas em nenhum dos animais inoculados, embora tenham sido observadas diferentes variações na sua intensidade.

Em relação ao restante dos cynomolgus infectados neste estudo (I3, F3, U3, R5 e J3), verificamos diferentes perfis de infecção. Algumas variáveis podem influenciar o perfil da infecção incluindo o título viral no inóculo (McCaustland et al., 2000); a via de inoculação (McCaustland et al., 2000) e fatores relacionados à integridade do sistema imune do hospedeiro, bem como a idade do indivíduo infectado (McCaustland et al., 2000).

Para o animal I3, inoculado com um “pool” de suspensão fecal de um único suíno do Brasil, é sugestivo que a infecção sub-clínica apresentada possa estar associada a uma falha na resposta imune, confirmada pela queda intermitente de linfócitos no sangue periférico observada no 25^o dpi e no 53^o dpi. Este período co-existiu com a não detecção de anticorpos IgG / IgM / IgA anti-HEV séricos, e conseqüente aumento na durabilidade da viremia (14 dias) e de eliminação viral nas fezes (35 dias de eliminação). Este perfil clínico foi distinto dos outros animais do mesmo grupo. Evidências de viremia e eliminação viral em pessoas assintomáticas soronegativas para anti-HEV também foi descrita por Nicand e colaboradores (2001). No animal I3, os achados de lesões inflamatórias no fígado foram mais acentuadas e freqüentes com valor de escore igual a 3 (E=3) (Halbur et al., 2001), decorrentes do maior tempo de replicação viral no fígado. Contudo, estes achados não foram acompanhados pelo aumento da atividade de ALT no período observado. Outros autores também descreveram a viremia persistente acompanhada de lesão hepática em pacientes transplantados imunossuprimidos farmacologicamente (Haagsma et al 2010, Kamar, et al., 2010, Pischke, et al., 2010).

Os animais R5 e U3 pertencem ao grupo que foi inoculado com amostras biológicas de casos humanos de hepatite fulminante sem etiologia definida ocorridos na Argentina. No entanto, a ausência na detecção do HEV RNA nessas amostras se confirmou após a inoculação, pois estes dois foram os únicos animais que não apresentaram evidência virológica de infecção pelo HEV. As únicas alterações verificadas nos cynomolgus R5 e U3 foram aumento de ALT, principalmente para o R5, e alterações histopatológicas discretas nas biópsias, que podem ser um indicativo de infecção por outro agente infeccioso.

O animal J3, único membro do grupo infectado com soro humano (caso de Hepatite E aguda caracterizado e identificado em um paciente do Rio de Janeiro atendido no Núcleo de Hepatites Virais / Laboratório de Hepatites Virais / IOC-Fiocruz no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia), mesmo inoculado com uma amostra com carga viral de 10^5 cópias de RNA/mL, apresentou uma resposta à infecção diferenciada dos demais animais (Q11, X15 e I3) que foram inoculados com amostra de suspensão fecal suína com mesmo título. O animal J3 apresentou soroconversão tardia (quinta semana) sem apresentar HEV RNA nas fezes e no soro. Este perfil pode estar relacionado à presença de partículas virais complexadas a anticorpos neutralizantes do hospedeiro humano (IgM e IgG anti-HEV). A formação desses complexos inibiu a infecciosidade do inóculo, justificando a soroconversão tardia e a ausência de detecção do genoma viral. Outros autores descreveram a infecção em macacos *cynomolgus* utilizando soro de pacientes ou de *cynomolgus* infectados (Erker et al., 1999a; Tsarev et al., 1994).

O animal F3 apresentou um padrão atípico de resposta à infecção, apesar de ter recebido o mesmo inóculo que os outros dois do seu grupo (O1 e G3). O inóculo consistia de um “pool” de fezes de um único suíno proveniente da Holanda. Uma possível explicação para o súbito aparecimento de altos títulos de anticorpos anti-HEV, e ausência de detecção de genoma viral nas fezes e no soro, seria uma exposição prévia ao HEV ou a um agente antigênico relacionado, o que conferiria anticorpos protetores IgG anti-HEV, os quais, no entanto, não foram detectados no teste de triagem utilizado no período pré-inoculação. Um estudo sobre reinfecção com HEV heterólogo em macacos rhesus após um período de 7 anos, confirmou que títulos residuais de IgG anti-HEV foram suficientes para prevenir a reinfecção e até mesmo a replicação viral em alguns animais, inclusive naqueles que possuíam títulos mais baixos de anticorpos não foi possível detectar a eliminação HEV nas fezes (Arankalle et al., 1999). A baixa sensibilidade de testes imunoenzimáticos comerciais em áreas não endêmicas é justificada pela presença de antígenos heterólogos (genótipos 1 e 2) e não específicos para o genótipo 3. O Brasil pode ser considerado uma região de baixa endemicidade, onde títulos residuais de IgG anti-HEV são baixos na população em geral (Santos et al., 2002; Trinta et al., 2001). A não detecção prévia pode estar relacionada à presença de títulos residuais neste animal, que teria sido insuficiente para o limite de detecção nos testes empregados. Em um estudo realizado por Herremans e colaboradores (2007a), foi observado que a menor sensibilidade na detecção de anticorpos anti-HEV obtida nos testes para os pacientes infectados pelo genótipo 3, quando comparado aos infectados pelo genótipo 1, pouco influencia o diagnóstico sorológico pois a reatividade mostrava-se sempre bem acima do valor de *cutoff*. Esse fato pode estar relacionado a outros fatores, como a menor

virulência e menor imunogenicidade do genótipo 3 quando comparado aos outros genótipos (Mizuo et al., 2005). Esses resultados são consistentes com outros estudos, em que foi verificado que antígenos do genótipo 1 são reativos tanto em amostras de soro de primatas não-humanos como de pacientes infectados com os quatro genótipos do HEV (Obriadina et al., 2002; Zhou et al., 2003). Entretanto, é recomendável a utilização de testes complementares confirmatórios quando o resultado sorológico for positivo, fato que justifica a pesquisa de anticorpos da classe IgA no soro e na saliva como teste adicional para confirmação dos casos de infecção pelo HEV.

Considerando os cinco animais que apresentaram infecção aparente, com detecção de genoma viral e soroconversão, somente três (Q11, X15 e G3) apresentaram IgA no soro. Em todos os casos tanto o período de detecção, como a titulação da IgA foi equivalente para IgM. Quanto à sua detecção na saliva (testados em Q11, I3, F3, G3, J3 e Q12), nenhum apresentou positividade. Esses resultados podem estar relacionados a alguns fatores: (1) a infecção do HEV pela via endovenosa não estimula a imunidade de mucosa adequadamente (Herremans et al., 2007b), e conseqüentemente não há estímulo para uma resposta de IgA detectável. Esse fato pode ser uma das causas da não detecção da IgA na saliva, outras causas podem estar relacionadas à inespecificidade do coletor de saliva utilizado para amostras de primatas não humanos ou ao teste sorológico realizado para esta amostra. (2) O estímulo à imunidade de mucosa pelo genótipo 3 é menor, com capacidade patogênica limitada, quando comparada ao genótipo 1 (Herremans et al., 2007b). Dessa maneira, em casos particulares a detecção de IgA anti-HEV pode ser útil, entretanto, em áreas não endêmicas onde prevalece o genótipo 3, a utilização na rotina parece não ter valor adicional, visto que os testes para detecção de IgM e IgG anti-HEV foram satisfatórios e apresentaram período de detecção concomitante com IgA neste estudo.

As alterações histopatológicas observadas nas biópsias hepáticas, tais como inflamação focal e portal, infiltração linfocitária, tumefação e microesteatose têm sido descritas em outros estudos experimentais com HEV. (Bradley et al., 1987, Andzhaparidze et al., 1986; Krawczynski et al., 1989; Longer et al., 1993; Soe et al., 1989; Ticehurst et al., 1992; Tsarev et al., 1993). Esses achados são consistentes, mas não patognomônicos para hepatite E. Recentemente, Chamanza e colaboradores (2010) realizaram um estudo retrospectivo com objetivo de determinar a presença e a frequência de achados histopatológicos espontâneos em 570 macacos cynomolgus não infectados. Desta forma, as alterações encontradas nos animais no período pré-inoculação, no presente estudo, são consideradas dentro dos padrões esperados. Os achados de necrópsia, tais como: infiltrados inflamatórios linfohistiocitários no interstício renal, na glândula salivar e no miocárdio;

células multinucleadas nos túbulos renais e cariomegalia provavelmente não estão associados a hepatite E.

A maior concentração de lesões hepáticas observadas após a soroconversão e/ou aumento de ALT é sugestiva da infecção pelo HEV. Entretanto, nenhum animal apresentou grau grave de lesão hepática (E=3), embora os animais do grupo do Brasil (suíno) tenham desenvolvido um grau moderado (E=2) de infecção, sugerindo uma possível cepa mais patogênica. Peron e colaboradores (2007) também observaram diferentes graus de lesão hepática (moderado a grave) em casos esporádicos de hepatite E aguda em pacientes com aumento de aminotransferases e presença de IgG anti-HEV e/ou detecção de genoma viral nas fezes e/ou no soro.

De uma maneira geral, a presença precoce da replicação viral sem hepatite clínica, com posterior aparecimento de IgG/IgM anti-HEV, seguido do início da hepatite histológica com infiltrados linfocíticos no fígado foi demonstrado neste estudo corroborando outros estudos (Aggarwal et al., 2001; Tsarev et al., 1993), e conferindo um caráter imunomediado à doença, não relacionado ao efeito direto da replicação viral.

Os cynomolgus reproduzem os eventos bioquímicos, sorológicos e virológicos observados na infecção de humanos pelo HEV, confirmando seu papel como modelo de infecção para estudo da patogênese da hepatite E. A manifestação sub-clínica demonstrada neste estudo coincide com o padrão clínico humano freqüente em regiões não endêmicas.

Além disso, a infecção de primatas não humanos com um HEV suíno brasileiro reforça a hipótese deste vírus estar associado a outros casos de hepatite E aguda não identificados no país. A transmissão zoonótica do HEV e a emergência de casos agudos esporádicos de hepatite E vem sendo descritas em países desenvolvidos como os EUA e países da Europa.

7 – CONCLUSÕES

- 1 – Os macacos cynomolgus demonstraram ser um modelo adequado para estudo da patogênese do HEV pelo genótipo 3 por reproduzirem os eventos virológicos, bioquímicos, sorológicos e histopatológicos observados em humanos infectados com esse genótipo.
- 2 – Os anticorpos séricos em resposta à infecção foram eficientes em provocar a redução da carga viral a níveis não detectáveis.
- 3 – A detecção do anticorpo IgA anti-HEV no diagnóstico de casos de hepatite E aguda não demonstrou valor adicional neste estudo.
- 4 – É sugestivo que a cepa proveniente do suíno de origem brasileira seja mais virulenta em relação à lesão hepática quando comparada a cepa suína holandesa.
- 5 – Os inóculos de origem suína do Brasil e da Holanda foram capazes de infectar primatas não humanos, reforçando a hipótese da ocorrência de outros casos esporádicos de hepatite E nessas regiões por transmissão zoonótica.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, T., Aikawa, T., Akahane, Y., Arai, M., Asahina, Y., Atarashi, Y., Chayama, K., Harada, H., et al., 2006. Demographic, epidemiological and virological characteristics of hepatitis E virus infections in Japan based on 254 human cases collected nationwide. *Kanzo*. 47:384–391.
- Aggarwal, R., 2011. Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *J. of Gastroenterology and Hepatology* 26:(1) 72–82.
- Aggarwal, R., Kamili, S., Spelbring, J., Krawczynski, K., 2001. Experimental Studies on Subclinical Hepatitis E Virus Infection in Cynomolgus Macaques. *J. Infect. Dis.* 184:1380–1385.
- Aggarwal, R., Kini, D., Sofat, S., Naik, S.R., Krawczynski, K., 2000. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet*. 356:1081– 1082.
- Aggarwal, R., Naik, S.R., 1992. Hepatitis E: does person-to-person spread occur? *Indian J Gastroenterol* 11:(4) 182.
- Aggarwal, R., Naik, S.R., 1992. Hepatitis E: does person-to-person spread occur? *Indian J. Gastroenterol.* 11:109–112.
- Aggarwal, R., Naik, S.R., 2010. Epidemiology of hepatitis E: Current status. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24: 1484–1493.
- Ahn, J.M., Rayamajhi, N., Gyun, Kang, S., Sang Yoo, H., 2006. Comparison of real-time reverse-transcriptase polymerase-chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56:269–274.
- Alvarez-Munoz, M.T., Torres, J., Damasio, L., Gomez, A., Tapia-Conyer, R., Munoz, O., 1999. Seroepidemiology of hepatitis E infection in Mexican subjects 1 to 29 years of age. *Arch. Med. Res.* 30: 251-254.
- Anderson, D.A., Li, F., Riddell, M., Howard, T., Seow, H.F., Torresi, J., Perry, G., Sumarsidi, D., Shrestha, S.M., Shretha, I.L., 1999. ELISA for IgG class antibody to hepatitis E virus based on highly conserved, conformational epitope expressed in *E. coli*. *J. Virol. Methods* 81: 131–142.

- Andersson, M.I., Hughes, J., Gordon, F.H., Ijaz, S., Donati, M., 2008. Of pigs and pregnancy. *Lancet* 372:1192.
- Andjaparidze, A.G., Balayan, M.S., Savinov, A.P., Braginsky, O.M., Poleschuk, V.F., Zamyatina, N.A., 1986. Non-A. non-B hepatitis transmitted by the fecal-oral mode experimentally produced in monkeys. *Vopr. Virusol.* 31:73-81.
- Arankalle, V.A., Chadha, M.S., Chobe, L.P., 1999. Long-term serological follow up and cross-challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus. *J. Hepatol.* 30: 199–204.
- Arankalle, V.A., Chobe, L.P., 2000. Retrospective analysis of blood transfusion recipients: Evidence for post-transfusion hepatitis E. *Vox. Sang.* 79:72–74
- Arankalle, V.A., Chobe, L.P., Jha, J., et al., 1993. Aetiology of acute sporadic non-A, non-B viral hepatitis in India. *J. Med. Virol.* 40:121–125.
- Arankalle, V.A., Chobe, L.P., Joshi, M.V., Chadha, M.S., Kundu, B., Walimbe, A.M., 2002. Human and swine hepatitis E viruses from Western India belong to different genotypes. *J. Hepatol.* 36:417–425.
- Arankalle, V.A., Ticehurst, J., Sreenivasan, M.A., et al., 1988. Aetiological association of a virus like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1: 550–554.
- Assis, S.B., Souto, F.J.D., Fontes, C.J.F., Gaspar, A.M.C., 2002. Prevalence of hepatitis A and E virus infection in school children of an Amazonian municipality in Mato Grosso State. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35:155-158.
- Balayan, M.S., Andjaparidze, A.G., Savinskaya, S.S., et al., 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20: 23–31.
- Balayan, M.S., Zamyatina, N.A., Ivannikova, T.A., Khaustov, V.I., Andjaparidze, A.G., Poleschuk, V.F., 1991. Laboratory models in the studies of enterically transmitted non-A. non-B hepatitis. In: Shikata, T., Purcell, R.H., Uchida, T., eds. *Viral hepatitis C, D, and E. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers.* 213-220.
- Bartoloni, A., Bartalesi, F., Roselli, M., Mantella, A., Arce, C.C., Paradisi, F., et al., 1999. Prevalence of antibodies against hepatitis A and E viruses among rural populations of the Chaco region, south-eastern Bolivia. *Trop Med in Health* 4:596-601.

- Berke, T.E., Matson, D.O., 2000. Reclassification of the *Caliciviridae* into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* 145:1421-1436.
- Bhatia, V., Singhal, A., Panda, S.K., et al., 2008. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? *Hepatology* 48:1577–1585.
- Bilic, I., Jaskulska, B., Basic, A., Morrow, C.J., Hess, M., 2009. Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes. *J. Gen. Virol.* 90:863–873.
- Borgen, K., Herremans, T., Duizer, E., et al., 2008. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004–2006. *BMC Infect. Dis.* 8: 61.
- Bradley, D.W., Krawczynski, K., Cook, E.H., et al., 1987. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27–34 nm viruslike particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6277–6281.
- Bradley, D.W., Krawczynski, K., Cook, E.H., et al., 1988. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: etiology of disease and laboratory studies in nonhuman primates. In: Zuckerman, A.I., ed. *Viral hepatitis and liver disease*. New York: Alan R Liss. 138-147.
- Caudill, J.D., Malik, I.A., Tsarev, S.A., 1994. Evidence for human hepatitis E virus (HEV) infection without acute antibody response. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:201.
- Chamanza, R., Marxfeld, H.A., Blanco, A.I., Naylor, S.W., Bradley, A.E., 2010. Incidences and range of spontaneous findings in control cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) used in toxicity studies. *Toxicol. Pathology* 38:542-657.
- Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M., Jameel, S., 2008. *Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus*. *J. Biosci.* 33 451–464.
- Chau, K. H., Dawson, G. J., Bile, K. M., Magnus, L. O., Sjogren, M. H., Mushahwar, I. K., 1993. Detection of IgA class antibody to hepatitis E virus in serum samples from patients with hepatitis E virus infection. *J. Med. Virol.* 40:334–338.
- Clayson, E.T., Myint, K.S., Snitbhan, R., Vaughn, D.W., Innis, B.L., Chan, L., Cheung, P., Shretha, M.P., 1995. Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J. Infect. Dis.* 172:927– 933.

- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., et al., 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9:448-454.
- Colson, P., Coze, C., Gallian, P., Henry, M., De Micco, P., Tamalet, C., 2007. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg. Infect. Dis.* 13:648–649.
- Coursaget, P., Depril, N., Buisson, Y., Molinie, C., Roue, R., 1994. Hepatitis type E in a French population: Detection of anti-HEV by a synthetic peptide-based enzyme-linked immuno-sorbent assay. *Res. Virol.* 145:51–57.
- Dalton, H.R., Bendall, R., Ijaz, S., Banks, M., 2008a. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect. Dis.* 8:698–709.
- Dalton, H.R., Stableforth, W., Hazeldine, S., et al., 2008c. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: a comparison with hepatitis A. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 579–585.
- Dalton, H.R., Stableforth, W., Thurairajah, P., et al., 2008b. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20: 784–790.
- Das, K., Agarwal, A., Andrew, R., et al., 2000. Role of hepatitis E and other hepatotropic virus in aetiology of sporadic acute viral hepatitis: a hospital based study from urban Delhi. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 937–940.
- Dawson, G.J., Chau, K.H., Cabal, C.M., Yarbough, P.O., Reyes, G.R., Mushahwar, I.K., 1992. Solid-phase enzyme-linked immunoassay for hepatitis E virus utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J. Virol. Methods* 38:175–186.
- Dobreniuc, J., Meng, J., Reuter, G., Greene-Montfort, T., et al., 2011. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin. Infect. Dis.* 51(3):e24-e27.
- Drobeniuc, J., Favorov, M.O., Shapiro, C.N., Bell, B.P., Mast, E.E., Dadu, A., Culver, D., Iarovoi, P., Robertson, B.H., Margolis, H.S., 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J. Infect. Dis.* 184: 1594–1597.

- Emerson, S. U., Nguyen, H., Graff, J., Stephany, D. A., Brockington, A., Purcell, R. H., 2004. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* 78: 4838–4846.
- Emerson, S.U., Anderson, D., Arankalle, A., Meng, X.J., Purdy, M., Schlauder, G.G., Tsarev, S.A., Hepevirus, in: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., 2004. Virus taxonomy, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, London, United Kingdom pp.851–855.
- Emerson, S.U., Arankalle, V.A., Purcell, R.H., 2005. Thermal stability of hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* 192, 930–933.
- Enouf, V., Dos Reis, G., Guthmann, J.P., Guerin, P.J., Caron, M., Marechal, V., Nicand, E., 2006. Validation of a single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J. Med. Virol.* 78:1076–1082.
- Erker, J.C., Desai, S.M., Mushahwar, I.K., 1999b. Rapid detection of hepatitis E virus RNA by RT-PCR using universal oligonucleotide primers. *J. Virol. Methods.* 81:109–113.
- Erker, J.C., Desai, S.M., Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Mushahwar, I.K., 1999a. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J. Gen Virol.* 80: 681–690.
- Favorov, M.O., Khudyakov, Y.E., Fields, H.A., Khudyakov, N.S., Padhye, N., Alter, M.J., Mast, E., Polish, L., Yashina, T.L., Yarasheva, D.M., et al., 1994. Enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus based on synthetic peptides. *J. Virol. Methods* 46:237–250.
- Favorov, M.O., Kosoy, M.Y., Tsarev, S.A., Childs, J.E., Margolis, H.S., 2000. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States, *J. Infect. Dis.* 181:449–455.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2008a. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 32–37.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2007. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J. Gen. Virol.* 88: 912–917.

- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Huang, Y.W., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2008b. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 80:1379–1386.
- Focaccia, R., Conceição, O.J.G., Sette, H. Jr., Sabino, E., Bassit, L., Nitrini, D.R., et al., 1998. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Braz J Infect Dis.* 2:269-284.
- Focaccia, R., Sette, H. Jr., Conceição, O.J., 1995. Hepatitis E in Brazil. *Lancet.* 346:1165.
- Fogeda, M., De Ory, F., Avellon, A., Echevarria, J.M., 2009. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr infections in patients with suspected hepatitis E. *J. Clin. Virol.* 45:259-261.
- Gerolami, R., Moal, V., Colson, P., 2008. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med.* 358: 859–860.
- Gomatos, P.J., Monier, M.K., Arthur, R.R., et al., 1996. Sporadic acute hepatitis caused by hepatitis E virus in Egyptian adults. *Clin. Infect. Dis.* 23:195–196.
- Gonçales, N.S.L., Pinho, J.R.R., Moreira, R.C., Saraceni, C.P., Spina, A.M.M., Stucchi, R.B., et al., 2000. Hepatitis E virus immunoglobulin G antibodies in different populations in Campinas, Brazil. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7:813-816.
- Gotanda, Y., Iwata, A., Ohnuma, H., Yoshikawa, A., Mizoguchi, H., Endo, K., Okamoto, H., 2007. Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J. Med. Virol.* 79:734–742.
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., Emerson, S.U., 2006. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol.* 80(12): 5919–5926.
- Graff, J., Zhou, Y.H., Torian, U., Nguyen, H., St Claire, M., Yu, C., et al., 2008. Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J. Virol.* 82:1185–1194.
- Guo, H., Zhou, E.M., Sun, Z.F., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006. Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *J. Gen. Virol.* 87: 217–223.

- Guu, T.S., Liu, Z., Ye, Q., et al., 2009. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106: 12992–12997.
- Gyarmati, P., Mohammed, N., Norder, H., Blomberg, J., Belak, S., Widen, F., 2007. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan I and Primer-Probe Energy Transfer. *J. Virol. Methods* 146:226–235.
- Haagsma, E.B., Riezebos-Brilman, A., van den Berg, A.P., Porte, R.J., Niesters, H.G., 2010. Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl.* 16(4):474-477.
- Haagsma, E.B., van den Berg, A.P., Porte, R.J., et al., 2008. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 14: 547–553.
- Halbur, P.G., Kasorndorkbua, C., Gilbert, C., Guenette, D., Potters, M.B., Purcell, R.H., Emerson, S.U., Toth, T.E., Meng, X.J., 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., Meng, X.J., 2001. Determination of the nucleotide sequences at the extreme 5' and 3' ends of swine hepatitis E virus genome. *Arch. Virol.* 146:2461-2467.
- Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Woolcock, P.R., Read, D.H., Meng, X.J., 2001. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* 82: 2449–2462.
- He, S., Miao, J., Zheng, Z., Wu, T., Xie, M., Tang, M., Zhang, J., Ng, M. H., Xia, N., 2008. Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 89: 245–249.
- Herremans, M., Bakker, J., Duizer, E., Vennema, H., Koopmans, M.P., 2007a. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 562–568.
- Herremans, M., Duizer, E., Jusic, E., Koopmans, M.P., 2007b. Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin A in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin. Vaccine Immunol.* 14:276–280.

- Huang, C.C., Nguyen, D., Fernandez, J., Yun, K.Y., Fry, K.E., Bradley, D.W., et al., 1992. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 191:550–558.
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., et al., 2002. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis E virus from chickens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 40:4197–4202.
- Huang, F.F., Sun, Z.F., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Shivaprasad, H.L., Pierson, F.W., et al., 2004. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J. Gen. Virol.* 85:1609–1618.
- Huang, Y.W., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2007. Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo. *J. Virol.* 81, 3018–3026.
- Hussaini, S.H., Skidmore, S.J., Richardson, P., Sherratt, L.M., Cooper, B.T., O’Grady, J.G., 1997. Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J. Viral Hepat.* 4: 51–54.
- Ibarra, H.V., Riedemann, S.G. Siegel, F.G., Reinhardt, G.V., Toledo, C.A., Frosner, G., 1994. Hepatitis E virus in Chile. *Lancet* 344:1501.
- Jameel, S., 1999. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev. Mol. Med.* 1–16.
- Jesse, J., Keller, B.S., Tavakkol, M.D., Andrea Kalus, M.D., 2011. Rare and deadly. *The American J of Medicine* 124(1):32-34.
- Johne, R., Plenge-Bonig, A., Hess, M., Ulrich, R.G., Reetz, J., Schielke, A., 2009. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 91:750–758.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.Y., Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131 (1):65-71.
- Kabrane-Lazizi, Y., Meng, X.J., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1999. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped, *J. Virol.* 73:8848–8850.

- Kamar, N., Abravanel, F., Selves, J., Garrouste, C., Esposito, L., Lavayssière, L., Cointault, O., Ribes, D., Cardeau, I., Nogier, M.B., Mansuy, J.M., Muscari, F., Peron, J.M., Izopet, J., Rostaing, L., 2010. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation* 15;89(3):353-360.
- Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J.M., et al., 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 358: 811–817.
- Kar, P., Jilani, N., Husain, S.A., et al., 2008. Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am. J. Gastroenterol.* 103: 2495–2501.
- Khuroo, M.S., 1980. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.* 68: 818–823.
- Khuroo, M.S., Deurmeyer, W., Zargar, S.A., Ahanger, M.A., Shah, M.A., 1983. Acute sporadic non-A, non-B, hepatitis in India. *Am. J. Epidemiol.* 118: 360–364.
- Khuroo, M.S., Kamili, S., Jameel, S., 1995. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 345:1025–1026.
- Khuroo, M.S., Kamili, S., Yattoo, G.N., 2004. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusion in an endemic area. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19:778–784.
- Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R., Bradley, D.W., 1992. Computer assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89:8259–8263.
- Krawczynski, K., 1991. Antigens and antibodies of hepatitis E virus infection in experimental primate models and man. In: Hollinger, F.B., Lemon, S.M., Margolis, H.S., eds. *Viral hepatitis and liver disease. Baltimore: Williams & Wilkins.* 517-521.
- Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J.B., Murthy, N.S., 2004. Hepatitis E in pregnancy. *Int. Gynaecol. Obstet.* 85:240–244

- Kumar, R.M., Uduman, S., Rana, S., Kochiyil, J.K., Usmani, A., Thomas, L., 2001. Seroprevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus in the United Arab Emirates. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 100:9–15.
- Kwo, P.Y., Schlauder, G.G., Carpenter, H.A., et al., 1997. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin. Proc.* 72: 1133–1136.
- Li, S.W., Zhang, J., Li, Y.M., et al., 2005b. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine* 23: 2893–2901.
- Li, T.C., Takeda, N., Miyamura, T., et al., 2005a. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 79: 12999–3006.
- Li, T.C., Yamakawa, Y., Suzuki, K., Tatsumi, M., Razak, M.A., Uchida, T., et al., 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 71:7207–7213.
- Longer, C.F., Denny, S.L., Caudill, J.D., et al., 1993. Experimental hepatitis E: pathogenesis in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Infect. Dis.* 168:602–609.
- Longer, C.F., Elliott, J.E., Caudill, J.D., et al., 1996. Observations on subclinical hepatitis E virus (HEV) infection and protection against reinfection. In: Buisson Y, Coursaget P, Kane M, eds. Enterically-transmitted hepatitis viruses. Tours, France: La Simare, 362–372.
- Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H., 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med. Virol.* 16:5–36.
- Luna, A., Meister, H.P., Szanto, P.B., 1968. Esophageal varices in the absence of cirrhosis, Incidence and characteristics in congestive heart failure and neoplasm of the liver. *Am. J. Clin. Pathol.* 49(5):710-717.
- Lyra, A.C., 2003. Aspectos virológicos associados a pacientes com hepatite aguda viral [tese doutorado]. São Paulo: Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- Lyra, A.C., Pinho, J.R.R., Silva, L.K., Braga, E.L., Mello, I.M., Saraceni, C.P., et al., 2002. The role of acute hepatitis E, TTV and HGV infection in patients with acute viral hepatitis from a sentinel program in Brazil. *Hepatology.* 36:653A.

- Mast, E.E., Alter, M.J., Holland, P.V., Purcell, R.H., 1998. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology*. 27:857–861.
- McCausland, K.A., Krawczynski, K., Ebert, J.W., Balayan, M.S., A. G. Andjaparidze, A.G., Spelbring, J.E., Cook, E.H., Humphrey, C., Yarbough, P.O., Favorov, M.O., Carson, D., Bradley, D.W., Robertson, B.H., 2000. Hepatitis E virus infection in chimpanzees: a retrospective analysis. *Arch. Virol.* 145: 1909–1918.
- Meng, X. J., Halbur, P. G., Haynes, J. S., Tsareva, T. S., Bruna, J. D., Royer, R. L., Purcell, R. H., Emerson, S. U., 1998. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch. Virol.* 143: 1405–1415.
- Meng, X.J., 2003. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 278:185–216.
- Meng, X.J., 2008. Hepatitis E virus (hepevirus). In: Mahy, B.W.J., van Regenmortel, M.H.V. (Eds.), *Encyclopedia of Virology* (5 vols). 3rd ed. Elsevier, Oxford, pp. 377–383.
- Meng, X.J., 2010. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risks. *Vet Microbiol.* 140:256-265.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006. Swine hepatitis E virus. In: Straw BE et al., eds. *Diseases of Swine*, 9th edn. Ames, IA: *Blackwell Publishing Press* 537–545.
- Meng, X.J., Lindsay, D.S., Sriranganathan, N., 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364(1530): 2697–2707.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., et al., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 94: 9860–9865.
- Meng, X.J., Shivaprasad, H.L., Payne, C., 2008. Hepatitis E virus infections. In: Saif M et al., eds. *Diseases of Poultry*, 12th edn. Ames, IA: *Blackwell Publishing Press*, 443–452.
- Meng, X.J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D.K., Toth, T.E., Engle, R.E., Emerson, S.U., Purcell, R.H., 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., Okamoto, H., 2004. Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: Evidence for infection with a genotype 3 hepatitis E virus by blood transfusion. *J. Med. Virol.* 74:563–572.
- Mizuo, H., Suzuki, K., Takikawa, Y., et al., 2002. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 40(9): 3209–3218.
- Mizuo, H., Yazaki, Y., Sugawara, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2005. Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J. Med. Virol.* 76: 341–349.
- Mune, M.S., Vladimirov, S., Otegui, L., Brajterman, L., Castro, R., Soto, S., et al., 2006. Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 36:125-130.
- Mushahwar, I. K., Dawson, G. J., Reyes, G. R., 1996. Hepatitis E virus: molecular biology and diagnosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8:312–318.
- Mushahwar, I.K., 2008. Hepatitis E virus molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J. Med. Virol.* 80:646-658.
- Naik, S.R., Aggarwal, R., Salunke, P.N., Mehrotra, N.N., 1992. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull. World Health Organ.* 70:597–604.
- Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., et al., 2006. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol. Res.* 34(3):137–140.
- Nanda, S. K., Panda, S. K., Durgapal, H., Jameel, S., 1994. Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected rhesus monkeys: evidence for viral replication. *J. Med. Virol.* 42:237–240.
- Navaneethan, U., Al Mohajer, M., Shata, M.T., 2008. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int.* 28:1190–1199.
- Nicand, E., Grandadam, M., Teyssou, R., Rey, J.L., Buisson, Y., 2001. Viremia and fecal shedding of hepatitis E virus in symptom-free carriers. *Lancet.* 357:68–69.

- Nishizawa, T., Takahashi, M., Endo, K., et al., 2005. Analysis of the fulllength genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J. Gen. Virol.* 86(12):3321– 3326.
- Nishizawa, T., Takahashi, M., Mizuo, H., Miyajima, H., Gotanda, Y., Okamoto, H., 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(5):1245–1251.
- Obriadina, A., Meng, J.H., Ulanova, T., Trinta K., Burkov, A., Fields, H.A., Khudyakov, Y.E., 2002. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17:S360–S364.
- Okamoto, H., 2010. Cell culture system for hepatitis E virus. *Uirusu.* 60(1):93-104.
- Orru, G., Masia, G., Orru, G., Romano, L., Piras, V., Coppola, R.C., 2004. Detection and quantitation of hepatitis E virus in human feces by real-time quantitative PCR. *J. Virol. Methods* 118:77–82.
- Pal, R., Aggarwal, R., Naik, S.R., Das, V., Das, S., Naik, S., 2005. Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20: 1094–1101.
- Panda, S. K., Ansari, I. H., Durgapal, H., Agrawal, S., Jameel, S., 2000. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J. Virol.* 74: 2430–2437.
- Pang, L., Alencar, F.E., Cerutti, C. Jr., Millhous, W.K., Andrade, A.L., Oliveira, R., et al., 1995. Short report: hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 52:347-348.
- Parana, R., Cotrim, H.P., Cortey-Boennec, M.L., Trepo, C., Lyra, L., 1997. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibodies in patients from a referral unit of liver diseases in Salvador, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 57:60-61.
- Pavio, N., Meng, X.J., Renou, C., 2010. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 41:46.
- Payne, C.J., Ellis, T.M., Plant, S.L., Gregory, A.R., Wilcox, G.E., 1999. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet. Microbiol.* 68:119–125.

- Peralta, B., Biarnes, M., Ordonez, G., Porta, R., Martin, M., Mateu, E., et al., 2009. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet. Microbiol.* 137:31–36.
- Peron, J.M., Danjoux, M., Kamar, N., Missouri, R., Poirson, H., Vinel, J.P., Mansuy, J.M., Bureau, C., Izopet, J., Brousset, P., Selves, J., 2007. Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. *Virchows Arch.* 450(4):405-410.
- Pinto, M.A., Marchevsky, R.S., 2001. Serial opened biopsies applied in nonhuman primate model to study the pathogenesis of hepatitis A virus. *Virus Reviews and Research*, Rio de Janeiro. 06(2):26-33.
- Pischke, S., Suneetha, P.V., Baechlein, C., Barg-Hock, H., Heim, A., Kamar, N., et al., 2010. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 16:74-82.
- Pischke, S., Suneetha, P.V., Baechlein, C., Barg-Hock, H., Heim, A., Kamar, N., Schlue, J., Strassburg, C.P., Lehner, F., Raupach, R., Bremer, B., Magerstedt, P., Cornberg, M., Seehusen, F., Baumgaertner, W., Klempnauer, J., Izopet, J., Manns, M.P., Grummer, B., Wedemeyer, H., 2010. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 16(1):74-82.
- Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2001. Hepatitis E virus. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, fourth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 3051–3061.
- Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2008. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* 48:494–503.
- Renou, C., Moreau, X., Pariente, A., et al., 2008a. A national survey of acute hepatitis E in France. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27:1086–1093.
- Renou, C., Nicand, E., Pariente, A., Cadranel, J.F., Pavio, N., 2009. How to detect and diagnose an autochthonous hepatitis E? *Gastroenterol. Clin. Biol.* 33:F27–F35.
- Renou, C., Pariente, A., Nicand, E., Pavio, N., 2008b. Pathogenesis of hepatitis E in pregnancy. *Liver Int.* 28:1466.

- Reyes, G. R., Huang, C. C., Tam, A. W., Purdy, M. A., 1993. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch. Virol. Suppl.* 7:15–25.
- Reyes, G.R., Purdy, M.A., Kim, J.P., et al., 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247:1335–1339.
- Riddle, M.A., Li, F., Anderson, D.A., 2000. Identification of immunodominant and conformational epitopes in the capsid protein of hepatitis E virus by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* 74:8011-8017.
- Ropp, S.L., Tam, A.W., Beames, B., Purdy, M., Frey, T.K., 2000. Expression of the hepatitis E virus ORF1. *Arch. Virol.* 145(7):1321–1337.
- Santos, D.C.M., Souto, F.J.D., Santos, D.R.L., Vitral, C.L., Gaspar, A.M.C., 2002. Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living in a community located in the North area of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97:637-640.
- Santos, D.C.M., Vitral, C.L., de Paula, V.S., Marchevsky, R.S., Lopes, J.F., Gaspar, A.M.C., Saddi, T.M., Júnior, N.C.M., Guimarães, F.R., Júnior, J.G.C., Lewis-Ximenez, L.L., Souto, F.J.D., Pinto, M.A., 2009. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *The Vet. Journal* 182: 474-480.
- Santos, D.R.L., Lewis-Ximenez, L.L., Silva, M.F., Sousa, P.S., Gaspar, A.M., Pinto, M.A., 2010. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J. Clin. Virol.* 47(3):276-279.
- Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Erker, J.C., et al., 1998. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J. Gen Virol.* 79:447–456.
- Schlauder, G.G., Frider, B., Sookoian, S., Castano, G.C., Mushahwar, I.K., 2000. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J. Infect Dis.* 182:294-297.
- Shrestha, M.P., Scott, R.M., Joshi, D.M., et al., 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.* 356:895–903.
- Singh, S., Mohanty, A., Joshi, Y.K., Deka, D., Mohanty, S., Panda, S.K., 2003. Mother-to-child transmission of hepatitis E virus infection. *Indian J. Pediat.* 70:37–39.

- Soe, S., Uchida, T., Suzuki, K., et al., 1989. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in cynomolgus monkeys: morphology and probable mechanism of hepatocellular necrosis. *Liver*. 9:135-145.
- Somani, S.K., Aggarwal, R., Naik, S.R., Srivastava, S., Naik, S., 2003. A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* 10:446–449.
- Sookoian, S., 2006. Liver disease during pregnancy: Acute viral hepatitis. *Ann. Hepatol.* 5:231–236.
- Souto, F.J., Fontes, C.J., 1998. Prevalence of IgG-class antibodies against hepatitis E virus in a community of the southern Amazon: a randomized survey. *Ann Trop Med Parasitol.* 92:623-625.
- Stoszek, S.K., Engle, R.E., Abdel-Hamid, M., Mikhail, N., Abdel-Aziz, F., Medhat, A., et al., 2006. Hepatitis E antibody seroconversion without disease in highly endemic rural Egyptian communities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100:89–94.
- Sun, Z.F., Larsen, C.T., Huang, F.F., Billam, P., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng, X.J., 2004. Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J. Clin. Microbiol.* 42:2658–2662.
- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, N., Mishiro, S., 2004. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330:501–505.
- Takahashi, M., Kosakai, S., Mizuo, H., Suzuki, K., Fujimura, K., Masuko, K., Sugai, Y., Aikawa, T., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2005. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43:49–56.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Yoshikawa, A., Sato, S., Isoda, N., Ido, K., Sugano, K., Okamoto, H., 2002. Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. *J. Gen. Virol.* 83: 1931–1940.
- Takahashi, M., Yamada, K., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Tanaka, T., Okamoto, H., 2008. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV)

- can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch. Virol.* 153:1703–1713.
- Tam, A.W., Smith, M.M., Guerra, M.E., Huang, C.C., Bradley, D.W., Fry, K.E., Reyes, G.R., 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full length viral genome. *Virology* 185:120–131.
- Tam, A.W., White, R., Reed, E., Short, M., Zhang, Y., Fuerst, T.R., Lanford, R.E., 1996. In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 215:1–9.
- Tei, S., Kitajima, N., Ohara, S., et al., 2004. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J. Med. Virol.* 74(1):67–70.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S., 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362:371–373.
- Tian, D. Y., Chen, Y., Xia, N. S., 2006. Significance of serum IgA in patients with acute hepatitis E virus infection. *World J. Gastroenterol.* 12: 3919–3923.
- Ticehurst, I., 1991. Identification and characterization of hepatitis E virus. In: Hollinger FB, Lemon, S.M., Margolis, H.S., eds. *Viral hepatitis and liver disease. Baltimore: Williams & Wilkins.* 501-13.
- Tokita, H., Harada, H., Gotanda, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2003. Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient infected with a genotype 3 hepatitis E virus in 1993. *J Gen Virol* 84:421–427.
- Trinta, K.S., Liberto, M.I.M., De Paula, V.S., Yoshida, C.F.T., Gaspar, A.M.C., 2001. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96:25-29.
- Tsarev, S.A., Emerson, S.U., Tsareva, T.S., Yarbough, P.O., Lewis, M., Govindarajan, S., Reyes, G.R., Shapiro, M., Purcell, R.H., 1993. Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J. Infect. Dis.* 167:1302–1306.
- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., et al., 1994. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (21):10198-10202.

- Uchida, T., Suzuki, K., Iida, F., et al., 1991. Virulence of hepatitis E virus with serial passage to cynomolgus monkeys and identification of viremia. In: Hollinger, F.B., Lemon, S.M., Margolis, H.S., eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore: Williams & Wilkins. 526-527.
- Uchida, T., Win, K.M., Suzuki, K., et al., 1990. Serial transmission of a putative causative virus of enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis to *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*. *Jpn. J. Exp. Med.* 60:13-22.
- van Cuyck-Gandre, H., Zhang, H.Y., Tsarev, S.A., et al., 1997. Characterization of hepatitis E virus (HEV) from Algeria and Chad by partial genome sequence. *J. Med. Virol.* 53:340–347.
- Velazquez, O., Stetler, H.C., Avila, C., Ornelas, G., Alvarez, C., Hadler, S.C., et al., 1990. Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico: 1986-1987. *Jama.* 263:3281-3285.
- Villalba Mde, L., LAY Lde, L., Chandra, V., Corredor, M.B., Frometa, S.S., Moreno, A.G., et al., 2008. Hepatitis E virus genotype 1, Cuba. *Emerg. Infect Dis.* 14:1320-1322.
- Vishwanathan, R., 1957. Infectious hepatitis in Delhi (1955–1956): a critical study: epidemiology. *Indian J. Med. Res.* 45(1):1–29.
- Vitral, C.L., Pinto, M.A., Lewis-Ximenez, L.L., Khudyakov, Y.E., Santos, D.R.L., Gaspar, A.M.C., 2005. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100(2): 117-122.
- Wang, Y., Ling, R., Erker, J.C., et al., 1999. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* 80:169–177.
- WHO. Viral Hepatitis Statement A62/22. http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A62/A62_22-en.pdf (22 de janeiro de 2010, data de acesso).
- Wong, D.C., Purcell, R.H., Sreenivasan, M.A., Prasad, S.R., Pavri, K.M., 1980. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis etiology. *Lancet* 2:876–879.
- Yamada, K., Takahashi, M., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Nagashima, S., et al., 2009. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J. Gen. Virol.* 90:1880–1891.

- Yamashita, T., Mori, Y., Miyazaki, N., *et al.*, 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:12986–12991.
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., *et al.*, 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be foodborne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol.* 84:2351–2357.
- Zhao, C., Ma, Z., Harrison, T.J., Feng, R., Zhang, C., Qiao, Z., *et al.*, 2009. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J. Med. Virol.* 81:1371–1379.
- Zhou, E.M., Guo, H., Huang, F.F., Sun, Z.F., Meng, X.J., 2008. Identification of two neutralization epitopes on the capsid protein of avian hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 89:500–508.
- Zhou, Y.H., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2003. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotype 1, 2, 3, and 4. *Vaccine* 22:2578–2585.
- Zhu, F.C., Zhang, J., Zhang, X.F., *et al.*, 2010. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 376:895–902.