

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

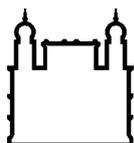
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DA  
HEPATITE E (HEV) EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV**

ANDREZA SALVIO LEMOS

Orientadora: Dra Vanessa Salete de Paula

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*ANDREZA SALVIO LEMOS*

Detecção e diagnóstico molecular do vírus da hepatite E (HEV) em pacientes infectados pelo HIV

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Vanessa Salete de Paula

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2015

L557 Lemos, Andreza Salvio

Detecção e diagnóstico molecular do vírus da Hepatite E (HEV) em pacientes infectados pelo HIV / Andreza Salvio Lemos. – Rio de Janeiro, 2015.

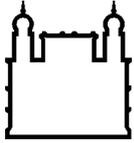
xiii, 63 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 65-72

1. Hepatite E. 2. HIV. 3. HEV. 4. Hepatites virais. I. Título.

CDD 616.3623



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: ANDREZA SALVIO LEMOS***

### **DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E (HEV) EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Vanessa Salete de Paula**

**Aprovada em: 22/12/2015**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Otacílio da Cruz Moreira - IOC/Fiocruz - Presidente**

**Profa. Dra. Debora Regina Lopes dos santos -UFRRJ**

**Prof. Dr. Tulio Machado Fumian – IOC/Fiocruz**

**Profa. Dra. Caroline Cordeiro Soares – IOC/Fiocruz**

**Profa. Dra. Claudia Lamarca Vitral - UFF**

Rio de Janeiro, 22 de dezembro de 2015

Dedico este trabalho à minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais pelo apoio e suporte “fora de casa”, sem o qual não teria tido oportunidade de sequer me graduar.

Agradeço à Dra. Vanessa De Paula por todas as conversas, aprendizado, correções, apoio, enfim, aprendi muito e cresci muito sendo sua aluna.

Também sou muito grata a todo o grupo do LDTV, pelo companheirismo e apoio, especialmente, a Dra Jaqueline Mendes, Dr. Marcelo Alves, Msc Noemi Gardinali, Amanda Lopes e Camilla Rodrigues por acompanharem o projeto em todos os seus momentos.

Ao Dr. Adilson, agradeço pela colaboração com Hospital Universitário Graffré e Guinle da UniRio.

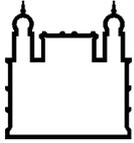
Meus agradecimentos também se estendem a todo o Instituto Oswaldo Cruz e à Pós-graduação em Biologia Parasitária pelos recursos para maior conhecimento e desenvolvimento desta dissertação.

Além disso, agradeço aos professores participantes da banca e ao revisor pelas sugestões e críticas construtivas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo auxílio de recursos financeiros.

Por fim, agradeço aos meus amigos, às minhas famílias, ao meu namorado por toda a paciência, compreensão, apoio, amizade durante todo o período de desenvolvimento deste projeto.

“Na vida, não existe nada a se temer  
apenas a ser compreendido.”  
(Marie Curie)



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

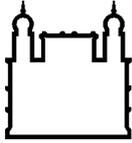
### **DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E (HEV) EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV**

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**Andreza Salvio Lemos**

O vírus da hepatite E (HEV) é responsável por infecções, em geral, agudas e autolimitantes. No entanto, quando se trata de pacientes imunossuprimidos, a infecção por este vírus pode levar a quadros crônicos e persistentes. Entre os pacientes imunossuprimidos, destacam-se os pacientes HIV positivos – uma população consideravelmente grande, sobre a qual há poucos estudos relacionando a coinfeção HEV/HIV. A hepatite E pode ser causada pelos genótipos 1, 2, 3 e 4 em humanos. O genótipo 3 (HEV-GT3) deve ser destacado por ser tanto o único genótipo circulante relatado no Brasil quanto por ser o que acomete pacientes HIV positivos, levando à cronicidade da doença. Portanto, devido à carência de informações e dados sobre estes pacientes coinfectados e sobre o perfil da hepatite E no Brasil, principalmente devido às dificuldades no diagnóstico, o trabalho buscou aperfeiçoar a técnica de detecção de RT-qPCR e determinar a prevalência da coinfeção HEV/HIV em pacientes do Hospital Universitário Gaffre e Guinle, no Rio de Janeiro para melhor compreensão da coinfeção nesta população. Para tanto, 280 amostras de soro sabidamente positivas para HIV foram coletadas entre os anos de 2012 e 2014, extraídas e testadas por RT-qPCR aperfeiçoado com curva sintética de dsDNA e, posteriormente, com curva sintética de ssRNA, para detecção da ORF3, e controle interno (IPC) para confirmação da coinfeção. As 10 amostras positivas na PCR em tempo real foram testadas em triplicata e por PCR convencional para sequenciamento das regiões das ORFs 1 e 2 e para detecção sorológica de anticorpos anti-HEV IgM e IgG. Porém nenhuma foi positiva para detecção por PCR convencional nem por sorologia, devido a baixa carga viral e ausência de anticorpos anti-HEV IgG e IgM. Nos pacientes em que foi detectado o HEV-RNA, foi observada uma taxa de CD4 e CD8 menores que 1038 e 1254, respectivamente, porém, ainda consideradas normais para indivíduos infectados pelo HIV. A PCR em tempo real foi útil para a detecção de coinfeção HEV/HIV em pacientes com baixa carga viral.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

DETECTION AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) IN HIV INFECTED PATIENTS

### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**Andreza Salvio Lemos**

The hepatitis E virus (HEV) is generally responsible for acute self-limiting infections. However, when it comes to immunocompromised patients the HEV infection may lead to chronic and persistent diseases. Among immunosuppressed patients, the HIV positive patients are highlighted – a considerably large population, on which there are few studies relating to HEV/HIV coinfection. Hepatitis E can be caused by genotypes 1, 2, 3 and 4 in humans. The genotype 3 of HEV (HEV-GT3) must be emphasized by being both the only reported circulating genotype in Brazil and the responsible for chronic disease in HIV positive patients. Therefore, due to lack of information and data on these co-infected patients and the profile of hepatitis E in Brazil, mainly due to difficulties in diagnosis of hepatitis E, the study aimed at the optimization of RT-qPCR detection technique and the determination of HEV/HIV co-infection prevalence on patients from the Gaffrée & Guinle Hospital, in Rio de Janeiro, for a better comprehension of this coinfection in this population in Rio de Janeiro city. For that, 280 known HIV positive serum samples were collected between 2012 and 2014, the nucleic acid was purified and tested by RT-qPCR technique which was optimized with a synthetic dsDNA standard curve and, later a synthetic ssRNA standard curve, for detection of HEV-RNA ORF3, and internal positive control (IPC) for the co-infection confirmation. The 10 HEV/HIV positive samples for RT-qPCR were tested in triplicate and for qualitative PCR for ORFs 1 and 2 regions detection and to antibodies anti-HEV IgM and IgG serological detection, but none was positive for either qualitative PCR or serological tests due to low viral titers in serum and lack of antibodies anti-HEV IgM and IgG. In patients which were positive for HEV-RNA detection, it was observed a CD4 and CD8 rates lower than 1038 and 1254, respectively, but still considered normal for HIV positive people. The real time PCR was useful for HEV/HIV coinfection detection in patients with low viral rates.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.1:</b> Esquemática do vírus da hepatite E, mostrando o RNA viral no interior e seu capsídeo de simetria icosaédrica _____	17
<b>Fig. 1.2:</b> Esquemática do genoma do vírus da Hepatite _____	18
<b>Fig. 1.3:</b> Modelo simplificado de replicação do vírus da hepatite E dentro da célula _____	19
<b>Fig. 1.4:</b> Árvore filogenética construída a partir de sequências de HEV de humanos e suínos depositadas no GenBank agrupadas em seus respectivos genótipos _____	21
<b>Fig.1.5:</b> Esquemática simplificada das formas de transmissão entre humanos (HEV-GT1 e HEV-GT2) e de origem zoonótica (HEV-GT3 e HEV-GT4) _____	23
<b>Fig. 1.6:</b> Gráfico A representa o desenvolvimento e resolução de uma infecção aguda. Gráfico B representa o desenvolvimento de uma infecção crônica _____	26
<b>Fig. 1.7:</b> Distribuição dos genótipos de HEV encontrados no mundo _____	27
<b>Fig. 1.8:</b> Prevalência da hepatite no Brasil, conforme estudos realizados até o momento _____	28
<b>Fig. 1.9:</b> Países endêmicos para Hepatite E _____	29
<b>Fig. 1.10:</b> Comparação entre etapas por RT-PCR convencional (A) e por RT-qPCR (B) _____	35
<b>Fig. 4.1:</b> Curva padrão sintética de dsDNA para detecção do vírus da Hepatite E e sua quantificação (n=3) _____	51
<b>Fig. 4.2:</b> Curva padrão sintética de ssRNA para detecção do vírus da Hepatite E e sua quantificação (n=3) _____	52
<b>Fig 4.3:</b> Curva padrão fornecida pela Organização Mundial da Saúde e sua quantificação (n=3) _____	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1:</b> Sequências utilizadas para RT-qPCR _____	42
<b>Tabela 3.2:</b> Condições do processo de RT-PCR em tempo real _____	42
<b>Tabela 3.3:</b> Ciclo de temperaturas para RT-qPCR _____	46
<b>Tabela 3.4:</b> Ciclos de temperatura para PCR1 da ORF1 _____	46
<b>Tabela 3.5:</b> Ciclos de temperatura para nested-PCR da ORF1 _____	47
<b>Tabela 3.6:</b> Ciclos de temperatura para PCR1 da ORF2 _____	48
<b>Tabela 3.7:</b> Ciclos de temperatura para nested-PCR da ORF2 _____	48
<b>Tabela 4.1:</b> Teste de precisão da curva sintética de dsDNA para RT-qPCR _____	53
<b>Tabela 4.2:</b> Comparação entre as curvas sintéticas de dsDNA e de ssRNA em relação à curva padrão da OMS _____	54
<b>Tabela 4.3:</b> Infecção artificial de amostras positivas para HIV e negativas para HEV _____	54
<b>Tabela 4.4:</b> Distribuição dos pacientes HIV reagentes de acordo com data da coleta, sexo, média de idade e detecção do HEV-RNA _____	55
<b>Tabela 4.5:</b> Dados dos pacientes HIV coinfectados com HEV _____	56

## **ANEXOS**

**Anexo I:** Justificativa da dispensa do TCLE \_\_\_\_\_ 73

**Anexo II:** Parecer do Comitê de ética em pesquisas com seres humanos \_\_\_\_\_ 74

## Lista de Siglas e Abreviaturas

µL	Microlitro
µM	Micromolar
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CD8	Grupamento de diferenciação 8
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
HAV	Vírus da Hepatite A
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HDV	Vírus da Hepatite Delta
HEV	Vírus da Hepatite E
HEV-GT1	Genótipo 1 do Vírus da Hepatite E
HEV-GT2	Genótipo 2 do Vírus da Hepatite E
HEV-GT3	Genótipo 3 do Vírus da Hepatite E
HEV-GT4	Genótipo 4 do Vírus da Hepatite E
HEV-RNA	Ácido ribonucleico genômico do Vírus da Hepatite E
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IPC	Controle Interno Positivo ( <i>Internal Positive Control</i> )
IU/mL	Unidades internacionais/ mililitro
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	Quilobase
MAP	( <i>Mitogen Activated Protein</i> )
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde

ORF	Região de leitura aberta ( <i>Open reading frame</i> )
pb	Pares de bases
pmol	Picomoles
pORF 3	Proteína da ORF 3
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	PCR quantitativa de transcrição reversa
RT-PCR	PCR de transcrição reversa
TAE	Tampão Tris / Ácido Acético /EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Hepatites Virais

As hepatites virais são caracterizadas por inflamações no fígado com semelhantes quadros clínicos. Porém, podem ser causadas por diferentes agentes etiológicos que, em comum, apresentam hepatotropismo. Dentre as hepatites descritas, encontram-se como as mais comuns as hepatites de etiologia viral, causadas pelos vírus da hepatite A (HAV), da hepatite B (HBV), da hepatite C (HCV), da hepatite delta (HDV) e da hepatite E (Donalísio, 2002), com cerca de 20 milhões de novas infecções por ano (OMS, 2015).

Dentre os vírus hepatotrópicos causadores de hepatite, o vírus da hepatite E foi o mais recentemente descoberto com seu genoma identificado apenas em 1991 (Tam *et al.*, 1991), sendo ainda considerada uma doença emergente em diversos países (Sclair & Shiff, 2013).

## 1.2 Histórico da hepatite E

Nos anos de 1950, já se sabia da existência de uma hepatite que não era A, não era B, mas tinha seus sintomas parecidos com a hepatite A. Também já se sabia que a transmissão do agente etiológico se dava de forma fecal-oral, com ênfase na veiculação hídrica como principal meio de se contrair a infecção. Além disso, a epidemiologia e características clínicas da infecção se diferenciavam das mesmas já descritas para as hepatites A e B, mesmo que se assemelhando da hepatite A na transmissão entérica e manifestação clínica (Mushahwar, 2008).

Estas diferenças epidemiológicas foram observadas em grandes surtos de hepatite aguda, como o surto ocorrido na Somália, no continente africano em 1988. Este surto foi de grande importância para que estudos fossem realizados em busca da descoberta de seu agente etiológico, no qual 11.413 indivíduos desenvolveram quadro de hepatite aguda, com maior incidência em jovens adultos, principalmente, mulheres. Dentre eles, ocorreram 146 óbitos (13%), principalmente gestantes. Como a maioria da população infectada vivia em vilas abastecidas por um mesmo rio, foi sugerido que sua transmissão tenha sido entérica. Sem agente causador definido. Apenas 5 anos após o surto, seus dados e amostras foram reanalisados e

publicados, demonstrando que o vírus da hepatite E foi o agente etiológico do surto (Bile *et al.*, 1994).

A descoberta do vírus da hepatite E, conforme já mencionado, foi considerada recente, ocorrendo apenas em 1983, por Balayan, durante uma investigação de um surto prévio de hepatite não-A, não-B, semelhante a hepatite A, com etiologia até então desconhecida. Para isto, foi induzida uma infecção aguda por HEV em um voluntário humano saudável. Para que ocorresse a infecção, o voluntário ingeriu um *pool* de fezes extraídas de pacientes deste surto mencionado acima. As amostras do paciente voluntário foram testadas para marcadores de hepatite A e B, já descritos na época, e tiveram resultados negativos para ambos. Porém, partículas *virus-like* foram visualizadas nas amostras de fezes do voluntário coletadas em fases pré-clínica e pós-clínica, por microscópio eletrônico (27 nm – 32 nm), confirmando a etiologia viral da infecção (Balayan *et al.*, 1983).

No mesmo estudo, Balayan e colaboradores também realizaram infecção experimental em primatas *Cynomolgus* com a utilização de extratos de fezes humanas contaminadas contendo o vírus, até então conhecido apenas como vírus da hepatite não-A não-B. Nos animais infectados também foi observado desenvolvimento de quadro agudo, que foi confirmado por estudos histológicos e enzimáticos. Além disso, os pesquisadores também detectaram a liberação de partículas virais nas fezes pelos animais infectados e a produção de anticorpos por estes animais (Balayan *et al.*, 1983).

Apenas, em 1990, ocorreu a clonagem do último dos vírus hepatotrópicos, o HEV, por Reyes e seus colaboradores, porém ainda era reconhecido como vírus da hepatite não-A não-B no período contemporâneo à sua clonagem. Assim, a descoberta do vírus em si, ocorreu através da clonagem molecular e transmissão experimental em primatas não humanos (Reyes *et al.*, 1990).

Em 1991, o primeiro teste sorológico foi desenvolvido e produzido por Yarbough e seus colaboradores, nesta época, já reconhecido como o Vírus da hepatite E (Yarbough *et al.*, 1991).

Após isso, em 1991 e 1992, vários grupos se dedicaram ao estudo e publicações sobre a organização genômica e estratégias de expressão do vírus da hepatite E. Só, então, com a melhor compreensão sobre este vírus, foi possível isolá-lo em outros diferentes animais, como suínos, sugerindo origem zoonótica da transmissão deste vírus (Chiao-Chain *et al.*, 1992; Goldsmith *et al.*, 1992).

Recentemente, ainda há ocorrência de surtos relacionados carência de infraestrutura sanitária, de saneamento e de medidas de higiene, como o surto de 2013 que ocorreu no Sudão, com alto grau de mortalidade e morbidade (CDC, 2013).

Em estudos mais recentes, o vírus da hepatite E tem sido apontado como agente responsável por causar hepatite crônica em pacientes imunossuprimidos, seja por transplante de órgãos ou por coinfeção com HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana). Com este objetivo, o estudo realizado por Aggarwal, em 2008, consistia em 14 casos identificados de infecção aguda por HEV entre pacientes transplantados (3 sofreram transplante hepático, 9 sofreram transplante renal e 2 sofreram transplantes duplos de pâncreas e rins). Nas amostras de todos os pacientes foi detectada reatividade de RNA genômico do vírus da hepatite E (RNA-HEV). Com o acompanhamento dos pacientes, foi observado desenvolvimento de infecção crônica em 8 deles, a qual foi confirmada por níveis persistentes e elevados de aminotransferases, presença contínua de RNA-HEV no soro dos pacientes e em estudos histológicos foi detectada também a infecção crônica, para confirmação (Aggarwal, 2008).

### **1.3 O vírus da hepatite E**

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), após alteração, ficou definido que o Vírus da Hepatite E (Hepatitis E-like Virus) pertence à família *Hepeviridae* e ao gênero *Hepevirus* (Emerson *et al.*, 2004). Ele é um vírus não envelopado considerado de tamanho pequeno, com apenas 24-37 nm de diâmetro (Yamashita *et al.*, 2009) e, conforme visto por microscopia eletrônica de transmissão, apresenta partículas esféricas com simetria, possivelmente, icosaédrica em sua superfície, sendo morfologicamente semelhante ao Norovírus (fig. 1.1) (Stapleton & Lemon, 1994; Harrison, 1999).

O genoma do HEV é constituído por molécula de RNA (Ácido Ribonucleico) de fita simples de com polaridade positiva, composto por 7,2 kb (quilobases) de comprimento. Além disso, nesta fita simples de RNA genômico há presença de cap(7-metilguanossina) e de uma cauda poli-A, com uma região 5-terminal “encapada”, o que é essencial para a infectividade deste vírus (fig. 1.2; Tam *et al.*, 1991; Kabrane-Lazizi *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 2011).

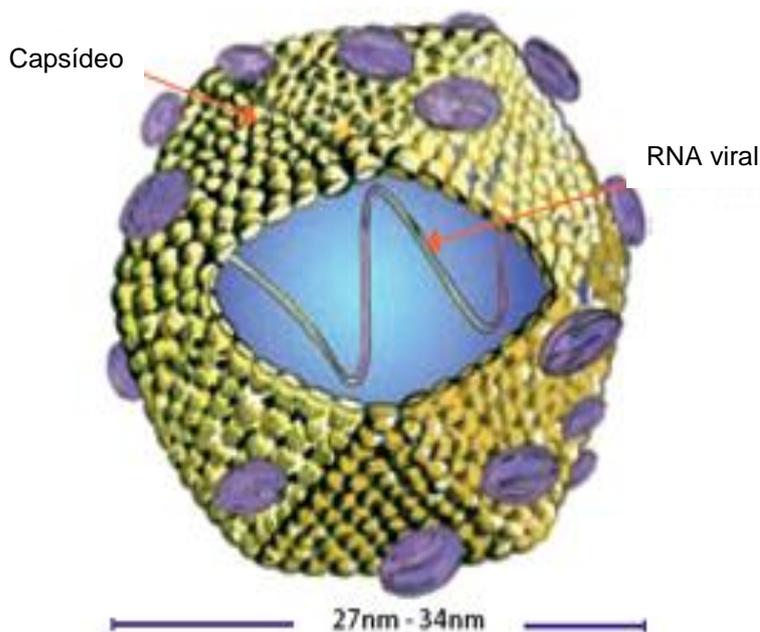


Fig. 1.1: Esquemática do vírus da hepatite E, mostrando o RNA viral no interior e seu capsídeo de simetria icosaédrica (Adaptado de: Ministério da Saúde, disponível em <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-e>).

O RNA genômico do vírus da hepatite E pode ser dividido em 3 ORFs (Open Reading Frame – Fase de Leitura Aberta) sobrepostas: ORF1, ORF2 e ORF3 (Ahmad *et al.*, 2011).

A ORF1, com 5kb, se localiza em direção à terminação 5' do RNA genômico e codifica uma poliproteína de 1690 aminoácidos, a qual possivelmente sofrerá clivagem pós-traducional em múltiplas proteínas não-estruturais necessárias à replicação viral, entre elas, encontra-se a metiltransferase, uma cisteína protease supostamente semelhante à papaína, a RNA helicase e a RNA polimerase RNA-dependente (Lemon *et al.*, 1995; Purcell *et al.*, 1995; He *et al.*, 1997; Harrison, 1999).

Já a ORF2 está localizada na região terminal 3', não se sobrepondo à ORF1. Ela codifica a principal e provavelmente, única proteína estrutural: a proteína estrutural formadora do capsídeo, com 660 aminoácidos (Lemon *et al.*, 1995; Purcell *et al.*, 1995; He *et al.*, 1997; Tsarev *et al.*, 1997; Harrison, 1999).

A ORF3 é uma unidade pequena e subreposta com a ORF 2 no RNA genômico, que codifica uma pequena proteína imunogênica fosforilada, a pORF3. Esta proteína está envolvida na morfogênese e liberação do vírion. É proposto que pORF3 interage com várias proteínas celulares, como a MAP-quinase fosfatase (Mitogen Activated Protein) e outras quinases reguladas extracelulares, o que

permite a sobrevivência celular através da ativação das vias intracelulares de sinalização (Korkaya *et al.*, 2001).

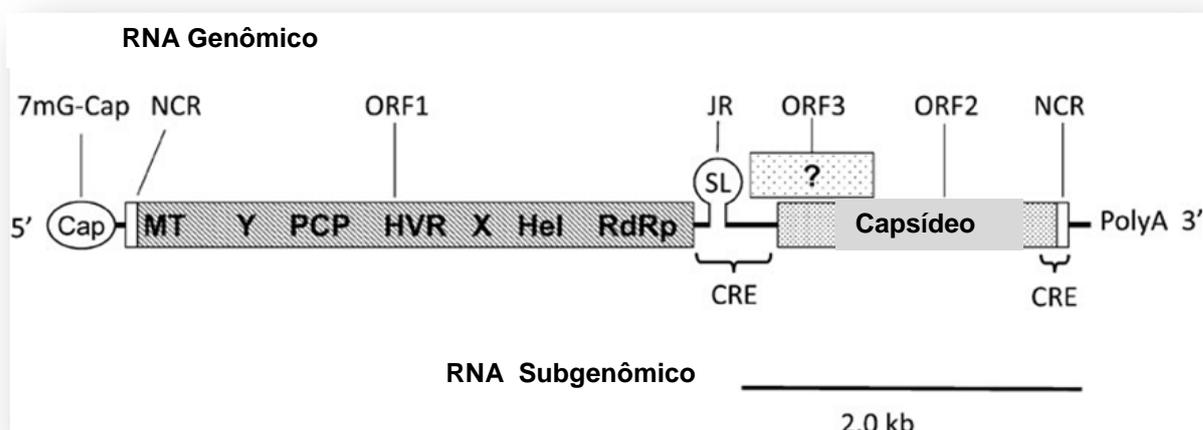


Fig. 1.2: Esquemática do genoma do vírus da Hepatite (Adaptado de Cao & Meng, 2012).

### 1.3.1 Replicação

O vírus da hepatite E é um vírus muito difícil de ser replicado em culturas de células. Portanto, é importante que se conheça como ocorre a replicação *in vivo* (Okamoto, 2011).

A replicação do HEV ocorre no interior dos hepatócitos (fig. 1.3). A entrada no hepatócito ocorre provavelmente por intermédio dos receptores HSPGs e HSC70. Após esta entrada, o HEV inicia um processo de desencapsulamento no citoplasma realizado por enzimas celulares e, em sequência ocorre a liberação do RNA genômico viral de polaridade positiva (Varma *et al.*, 2011).

A já citada ORF1 é traduzida em um precursor de uma proteína inativada não-estrutural que será processada por proteases virais e celulares transformando-a em unidades maduras ativadas caracterizadas por atividades de metil-transferases, proteases, helicases e RNA-polimerase (Varma *et al.*, 2011).

O sítio de replicação mais provável do HEV no hepatócito é no retículo endoplasmático, onde o Complexo RdRp replicase sintetiza a fita de RNA de polaridade negativa a partir da fita de polaridade positiva de RNA genômico (Varma *et al.*, 2011).

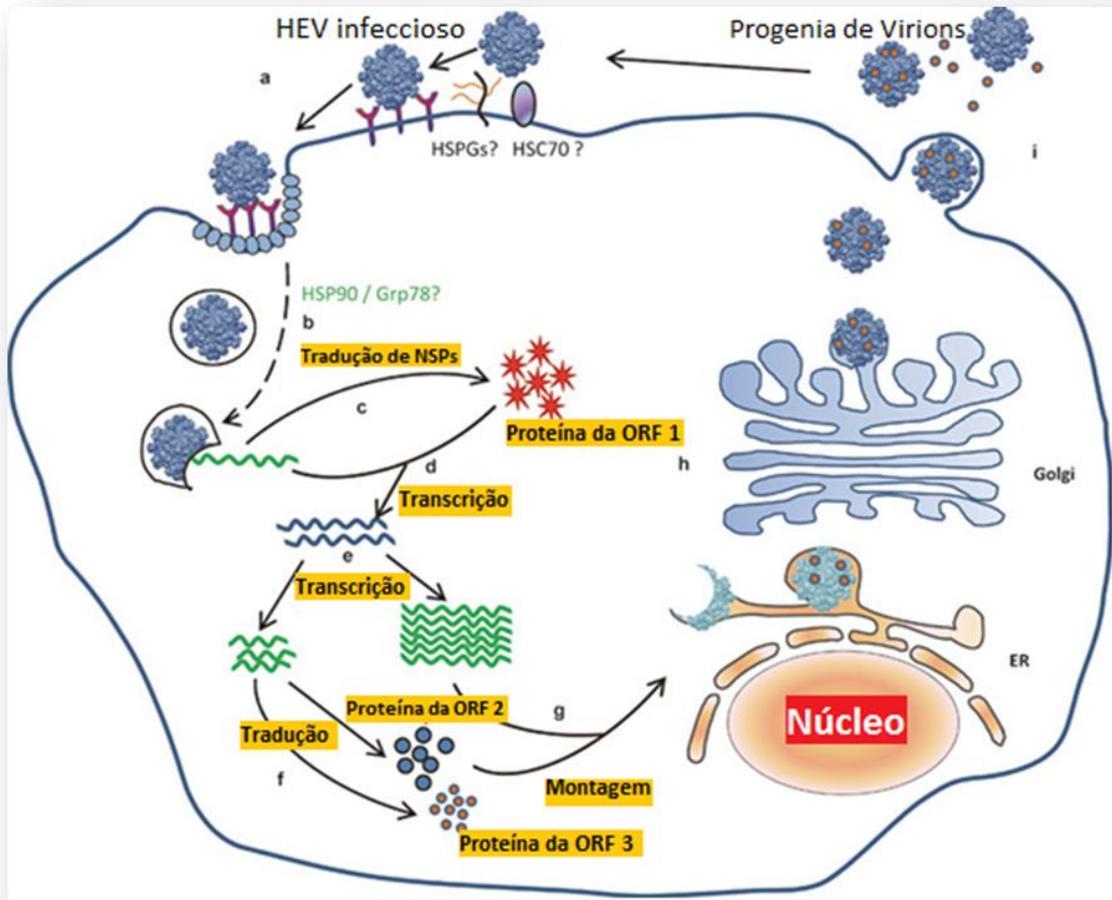


Fig. 1.3: Modelo simplificado de replicação do vírus da hepatite E dentro da célula (Cao & Meng, 2012).

A seguir, a fita negativa de RNA serve como um molde para a transcrição futura da fita de RNA genômico de polaridade positiva, além da transcrição da fita de RNA subgenômico de polaridade positiva e de RNA mensageiro bicistrônico que codificam para as proteínas das ORF2 e ORF3 que estão envolvidas no reencapsulamento do RNA genômico formando novos virions. Assim, as novas partículas recém-formadas de HEV serão secretadas para os canalículos biliares através da membrana apical dos hepatócitos. Destes canalículos, as partículas seguem pela bile para o intestino delgado (Ahmad *et al.*, 2011). Em concordância com esta liberação de HEV dos hepatócitos, uma pequena quantidade deste vírus pode ser detectada no plasma sanguíneo do paciente durante a infecção aguda (Varma *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Genótipos

Existe uma grande diversidade entre os genótipos do vírus da hepatite E entre amostras isoladas ao redor do mundo, com diferentes graus de variabilidade, podendo atingir 12% de variação dentro do próprio genótipo e cerca de 19% entre genótipos diferentes do HEV (fig. 1.4) (Okamoto, 2007).

Desta forma, há 5 genótipos definidos para o vírus da hepatite E, sendo 4 deles descritos por infectarem seres humanos. São eles os genótipos 1, 2, 3 e 4 isolados em humanos e o genótipo 5 apenas descrito em aves, conforme sequenciamento completo do genoma do HEV. Dentre eles, os genótipos 3 e 4 tem sido cada vez mais reconhecidos como agentes causadores de infecção em países desenvolvidos (Purcell & Emerson, 2008; Dalton *et al.*, 2013).

Estes quatro genótipos são subdivididos em subgenótipos, sendo o genótipo 1 subdividido em 5 subgenótipos (1a – 1e), o genótipo 2 subdividido em 2 subgenótipos (2a e 2b), o genótipo 3 subdividido em 10 subgenótipos (3a – 3j) e o genótipo 4 subdividido em 7 subgenótipos (4a – 4g) (Wedemeyer *et al.*, 2012).

Além disso, embora haja heterogeneidade significativa entre as linhagens de HEV, a evidência é de que haja heterogeneidade sorológica limitada, definindo, desta forma, que todas elas pertencem a um único sorotipo. Isto é determinado no que diz respeito aos genótipos dos vírus da hepatite E de isolados humanos estudados (Wedemeyer *et al.*, 2012).

Os genótipos 1 e 2 são tradicionalmente reconhecidos como genótipos cujos únicos reservatórios seriam os humanos, sem reservatórios descritos em outras espécies. Desta forma, sua transmissão ocorre de pessoa a pessoa apenas (Purcell & Emerson, 2008; Geng *et al.*, 2011).

O potencial zoonótico do vírus da hepatite E é muito claro e bem estabelecido para os genótipos 3 e 4 que também são amplamente detectados em suínos e outros animais silvestres como cervos, morcegos, mangustos, roedores e molusco, conforme descrito por Said e colaboradores, durante um surto em um cruzeiro em 2009. Estes genótipos podem ser encontrados nas Américas, Europa e Ásia em regiões mais desenvolvidas (Goens *et al.*, 2004; Bouwknecht *et al.*, 2007; Feagins *et al.*, 2007; Kaci *et al.*, 2008; Said *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2010; Berto *et al.*, 2012a; Kamar *et al.*, 2012b).

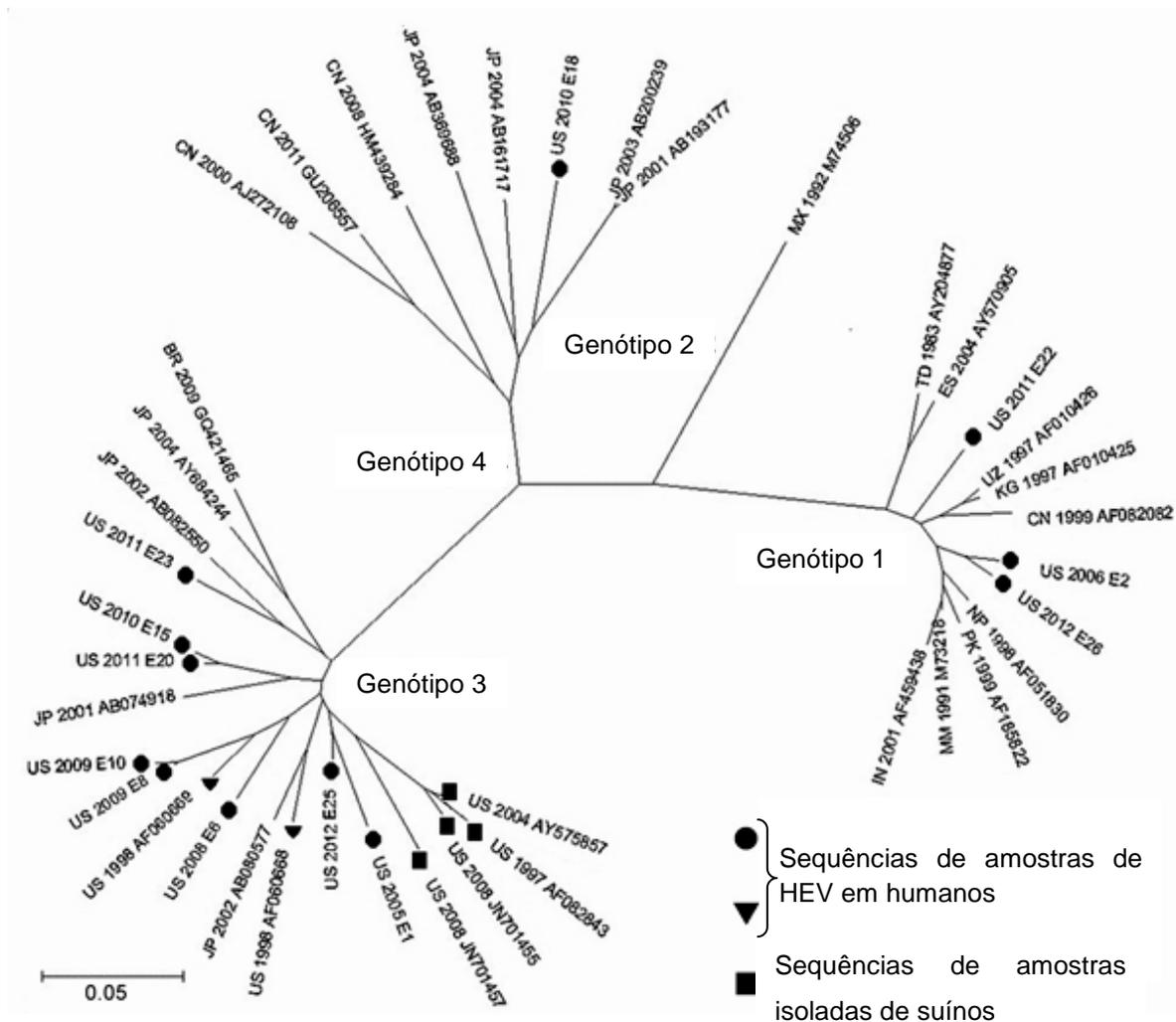


Fig. 1.4: Árvore filogenética construída a partir de seqüências de HEV de humanos e suínos depositadas no GenBank agrupadas em seus respectivos genótipos (Adaptado de Drobeniuc *et al.*, 2013).

Quanto às amostras de suínos, produtos comercializados derivados de suínos, como salsichas e embutidos, tem sido reportados como potenciais fontes de contaminação por diversos estudos. A rota do vírus da hepatite E até este tipo de alimento processado permanece indefinida, porém, é sugerido que ocorra devido a baixas condições de higiene no manuseio destes produtos durante seu processamento (Christensen *et al.*, 2008; Colson *et al.*, 2010; Wenzel *et al.*, 2011).

Além disso, a própria circulação entre os suínos e entre suínos e tratadores ainda pode ocorrer de forma fecal-oral, conforme as condições sanitárias e de controle de qualidade aos quais matadouros e criadouros de suínos são submetidos. No Brasil, é descrita a circulação do genótipo 3 do HEV entre populações de suínos de criadouros de diferentes regiões, com prevalência variando entre 4,8% na Amazônia e 9,6% no Rio de Janeiro (Santos *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012)

Além das amostras de suínos que apresentam alta homologia com as amostras de alguns genótipos circulantes em humanos já mencionados, também foram encontrados, em isolados de amostras de coelhos, ratos e javalis, a presença do vírus da hepatite E sem genótipos definidos, mas com homologia superior a 80% em relação a genótipos circulantes em humanos (Wedemeyer *et al.*, 2012).

### **1.3.3 Genótipos 3 e 4**

Em regiões não endêmicas, primeiramente, os casos relatados de hepatite E consistiam em infecções adquiridas em regiões endêmicas por viajantes, que contraíram HEV-GT1 ou HEV-GT2. Porém, durante as últimas décadas, este panorama tem mudado, com a ocorrência de casos esporádicos autóctones causados pelos genótipos 3 e 4 em países desenvolvidos em que os pacientes não apresentaram histórico de viagens a regiões endêmicas (Bader *et al.*, 1991; Teshale *et al.*, 2010).

Estas infecções zoonóticas têm sido relacionadas ao consumo de carne crua ou mal-passada, não só de origem suína, como de porcos e javalis, mas também de outros animais de caça, como cervos (Tei *et al.*, 2003; Tomiyama *et al.*, 2009; Herremans *et al.*, 2007; Berto *et al.*, 2012; Colson *et al.*, 2010).

Além disso, o genótipo 4 é encontrado em porcos e outros suínos na Ásia, com poucos casos reportados de infecção pro HEV-GT4 em humanos reforçando a ideia de que seja uma infecção de aspecto zoonótico (Zhang *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009).

## **1.4 Transmissão**

O vírus da hepatite E tem como principal via de transmissão interpessoal e entre indivíduos da mesma espécie, como ocorre entre suínos, a rota fecal-oral. Desta forma, os vírus de genótipos 1 e 2 tem transmissão caracterizada como entérica, ocorrendo entre indivíduos por via fecal-oral, através do consumo de água e de alimentos contaminados (fig. 1.5). Este tipo de transmissão está altamente associado a deficiências no sistema de saneamento básico e à carência de medidas de higiene pela população, sendo assim, mais comum em regiões menos desenvolvidas economicamente e com maiores índices de pobreza (Aggarwal & Naik, 2009; Teshale *et al.*, 2010).

Já os genótipos 3 e 4 são majoritariamente transmitidos a humanos por via alimentar, ou seja, pelo consumo de carne de caça e de suínos crua ou mal-passada contaminada e de seus derivados, como linguiças de fígado de porco, constituindo assim e determinando-se como uma infecção zoonótica (fig. 1.5) (Aggarwal & Naik, 2009; Teshale *et al.*, 2010).

Mesmo com estas duas principais vias de transmissão dos diferentes genótipos de HEV, é possível que também ocorram outras rotas para a disseminação do vírus da hepatite E, como a transmissão pessoa a pessoa já descrita (Mansuy *et al.*, 2009).

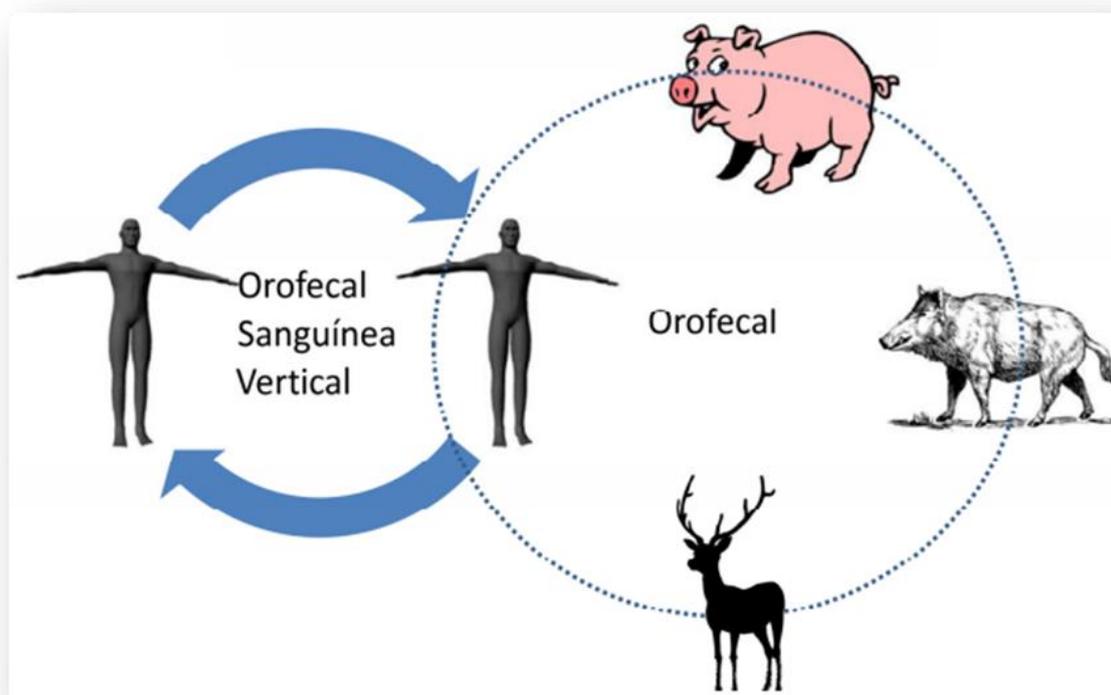


Fig.1.5: Esquemática simplificada das formas de transmissão entre humanos (HEV-GT1 e HEV-GT2) e de origem zoonótica (HEV-GT3 e HEV-GT4) (Santos *et al.*, 2013).

Além disso, em países desenvolvidos, já foram descritas outras vias de transmissão não usuais, como transmissão vertical ou por transfusão sanguínea, como relatado por Huzly e colaboradores (2014) na Alemanha. Em diversos outros países como Índia, Hong Kong e Japão, em que anticorpos anti-HEV IgG foram detectados em pacientes que receberam transfusões sanguíneas nessas regiões (Arankalle *et al.*, 2000; Matsubayashi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

Incluindo todos os modos de transmissão, os de via zoonótica por consumo de carne suína e por transplante de sangue permanecem como as majoritárias, ou

seja, as principais para este vírus, o HEV, na maior parte do mundo (Colson *et al.*, 2007).

## 1.5 Hepatite E

Como já mencionado, a hepatite E é caracterizada por uma infecção causada pelo vírus da hepatite E e apresenta quadros clínicos e sintomas semelhantes com os de outras hepatites de etiologia viral. Desta forma, a infecção por HEV pode se apresentar de forma aguda e crônica, além de também poder ocorrer de modo assintomático e fulminante em casos raros (Bader *et al.*, 1991; Torresi & Johnson, 2011).

Além disso, a infecção pode seguir estes diferentes cursos de desenvolvimento conforme os genótipos contraídos do vírus e imunocomprometimento ou não do paciente. Em países em que não há infecções constantes ou autóctones, os casos são, em geral, provenientes de viajantes que visitaram regiões endêmicas, contraíram os genótipos 1 e 2 (que serão melhor comentados em breve) e retornaram com infecções de agudas autolimitantes a fulminantes, como ocorre em mulheres grávidas, por exemplo (Bader *et al.*, 1991; Torresi & Johnson, 2011). Contudo, a maioria das infecções adquiridas mais recentemente tem sido autóctones, ou seja, adquiridas localmente, no país ou região do paciente infectado. Com isso, não apenas aumentam as infecções agudas como também as infecções crônicas nos pacientes imunossuprimidos (Colson *et al.*, 2009; Kamar *et al.*, 2012b).

Pacientes infectados pelo vírus da hepatite E podem apresentar sintomas comuns às hepatites virais em geral, mas também podem ocorrer casos assintomáticos. Estes sintomas mais comuns são mal-estar, icterícia, fezes claras e urina escurecida, febre, dores nas articulações e no abdômen, além de outros sintomas gastrointestinais como náuseas e vômitos (Davern *et al.*, 2011).

Porém, em países mais desenvolvidos, os pacientes infectados por HEV-GT3 (Genótipo 3 do vírus da hepatite E) e HEV-GT4, devido à baixa endemicidade, estes sintomas raramente são associados a infecções por HEV. Desta forma, para que os diagnósticos desses pacientes sejam realizados, é necessário que sejam analisadas e detectadas elevadas taxas de bilirrubina e de enzimas hepáticas, como AST (Aspartato Aminotransferase) e ALT (Alanina Aminotransferase) no soro, como um

auxílio na investigação da etiologia da infecção nesses pacientes (Davern *et al.*, 2011).

Já HEV-GT1 e HEV-GT2 podem causar o quadro clínico de hepatite fulminante, que leva a altas taxas de mortalidade em mulheres grávidas, principalmente. Atualmente, casos de hepatite fulminante causada por HEV-GT3 já foram reportados. O HEV-GT3 também foi associado a infecções fulminantes em pacientes com doença hepática crônica prévia, levando a óbito em aproximadamente 70% dos casos. Porém, ainda não foram encontrados pacientes com este quadro clínico infectados por HEV-GT4. Infecções fulminantes em gestantes possivelmente resultam das características hormonais e imunológicas durante a gravidez. A redução da expressão de receptores de progesterona também pode estar relacionada a ocorrências fatais de hepatite E em mulheres grávidas, assim como a respostas mais fracas de linfócitos T neste grupo de pacientes fulminantes (Kumar *et al.*, 2004; Dalton *et al.*, 2008; Navaneethan *et al.*, 2008; Bose *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2011; Anty *et al.*, 2012).

Além dos quadros já descritos de hepatite E, aguda, assintomática e fulminante, há também os quadros crônicos desenvolvidos por pacientes, geralmente, imunocomprometidos como pacientes transplantados e HIV positivos. Esta infecção crônica é caracterizada pela persistência do vírus, ainda detectável, no soro dos pacientes por mais de 6 meses, além de um aumento persistente de níveis de ALT, significante atividade histológica e fibrose após um período médio de 12 meses (10-18 meses) (fig 1.6). Estas infecções apresentam significantes taxas de mortalidade e morbidade, uma vez que a infecção crônica por HEV está associada ao surgimento de cirrose e fibrose e seu diagnóstico é, em geral, realizado tardiamente. Isto ocorre pois um paciente crônico pode permanecer apresentando apenas leves sinais enzimáticos e manifestações extra-hepáticas e não específicas para hepatite (Pischke *et al.*, 2010; Sclair & Schiff, 2013).

Além disso, apesar de raros, podem ocorrer manifestações extra-hepáticas como desordens neurológicas, entre elas estão a paralisia oculomotora, as polirradiculopatias, como a síndrome de Guillain-Barré, a neutrite branquial bilateral, as convulsões, glomerulonefrite, crioglobulinemia e anomalias hematológicas (Kamar *et al.*, 2011; Kamar *et al.*, 2012b; Shah *et al.*, 2012).

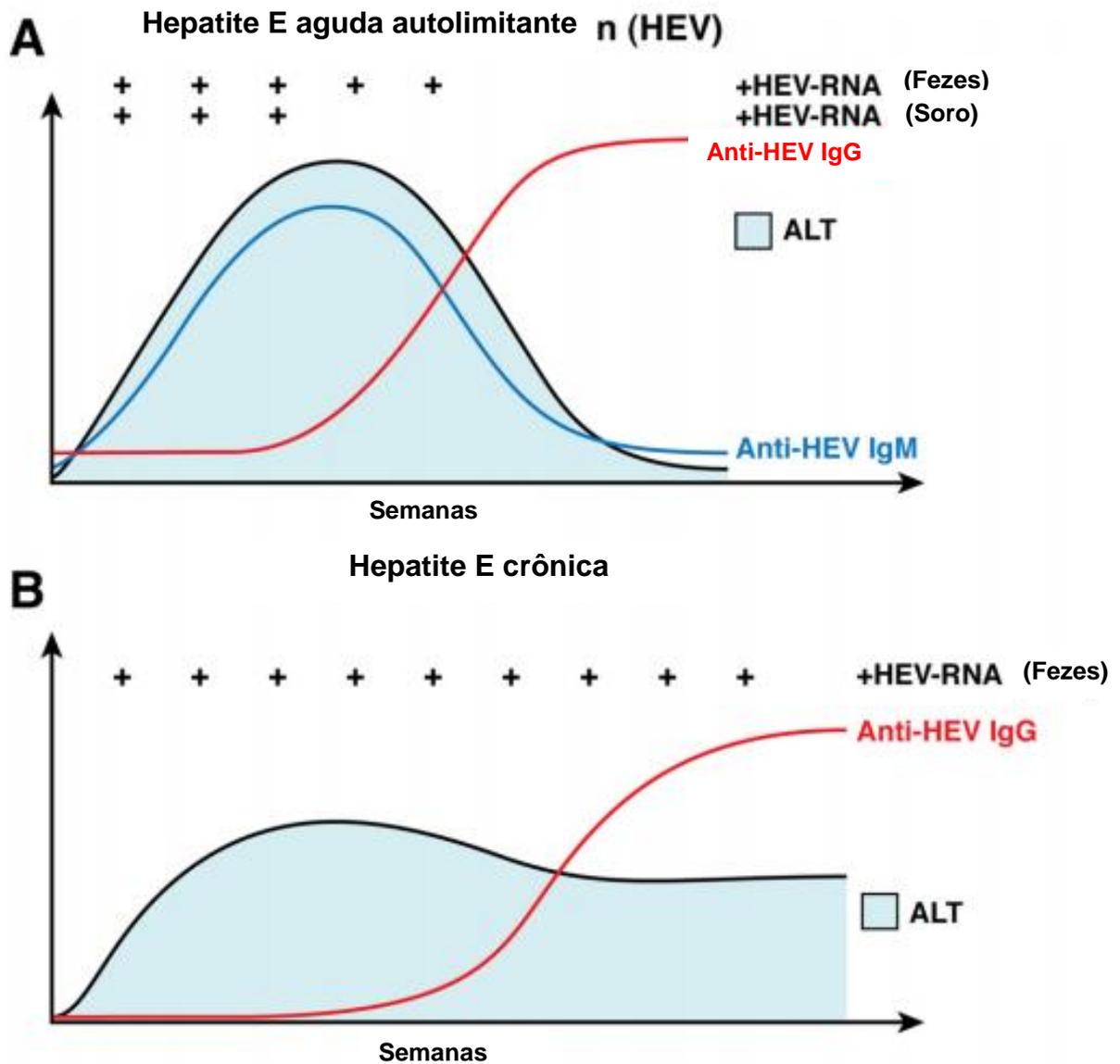


Fig. 1.6: Gráfico A representa o desenvolvimento e resolução de uma infecção aguda. Gráfico B representa o desenvolvimento de uma infecção crônica (Adaptado de: Wedemeyer *et al.*,2012).

## 1.6 Epidemiologia

Em países desenvolvidos, casos de transmissão autóctone são raros, com a maioria dos infectados tendo contraído a infecção pelos genótipos 1 e 2 ao viajar para regiões de alta endemicidade para HEV. Em geral, estes casos autóctones representam infecções agudas causadas pelos genótipos 3 e 4 e podem ocorrer até de modo assintomático em paciente saudáveis, mas podem se desenvolver infecções crônicas e fulminantes em pacientes imunocomprometidos. Os continentes considerados de baixa endemicidade para HEV são Europa, América do Norte e do Sul e Oceania. São nessas regiões que as situações acima citadas ocorrem. Nessas

regiões, o número de casos esporádicos autóctones causados por transmissão zoonótica vem aumentando com o passar do tempo, o que provavelmente se deve ao aumento de atenção e utilização de testes mais eficientes de detecção revelando o real panorama da infecção por HEV nestas regiões de baixa endemicidade. Enquanto em países de índices de desenvolvimento e econômicos mais baixos, nos continentes da África, Ásia e América Central, tendem a haver surtos mais frequentes de HEV dos genótipos 1 e 2, transmitidos pela via fecal-oral (Dalton *et al.*, 2007; Meng, 2010; Davern *et al.*, 2011; Anty *et al.*, 2012; Halac *et al.*, 2012; Hoerning *et al.*, 2012; Junge *et al.*, 2013; Arends *et al.*, 2014).

Como pode-se observar na figura 1.7, há poucos dados sobre a circulação de HEV no Brasil, embora seja estabelecido o genótipo 3 como circulante. O mapa emitido pela OMS, em 2015, mostra a distribuição dos genótipos de HEV pelo mundo demonstrando a distribuição dos genótipos do vírus da HEV reportados.

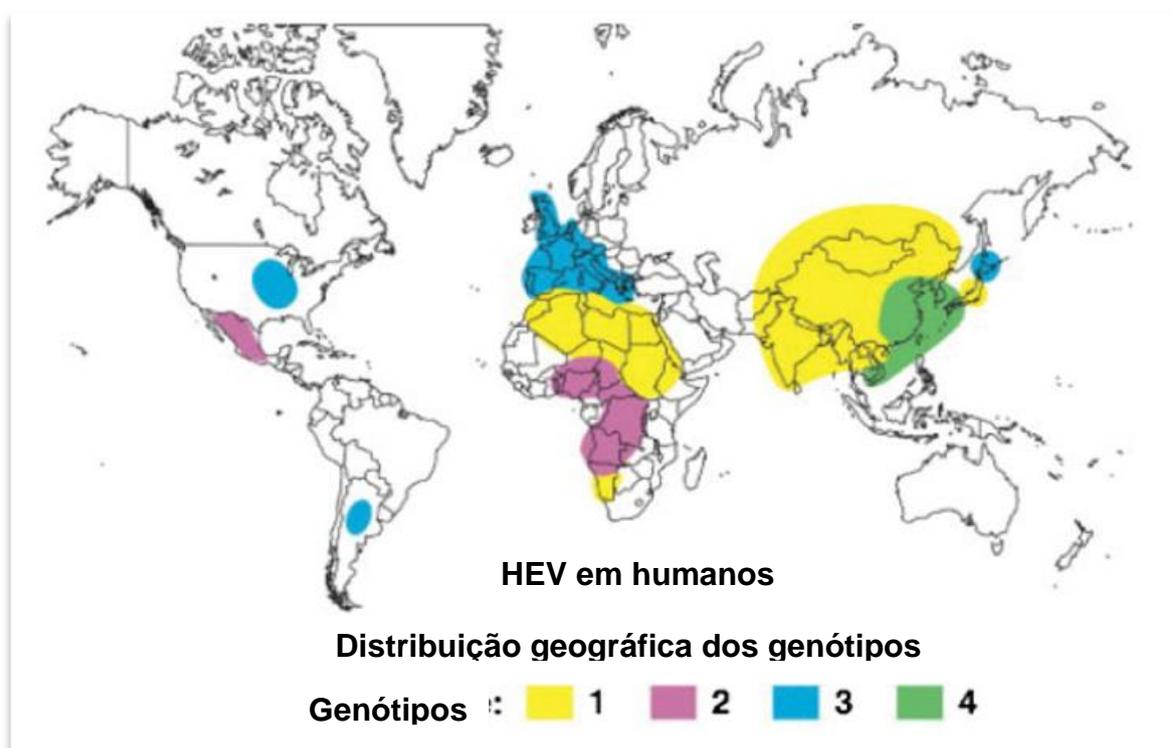


Fig. 1.7: Distribuição dos genótipos de HEV encontrados no mundo (Adaptado de: OMS, 2015).

Já no Brasil (fig. 1.8), localizado em região considerada de baixa endemicidade para HEV, já foram realizados diversos estudos sorológicos nos quais foram detectados anticorpos anti-HEV em diversos grupos populacionais de diversas regiões do país, que tem suas proporções continentais. Assim, é importante que

sejam levantados dados dos mais diversos pontos e populações do Brasil. As taxas de soroprevalência encontradas foram de 6,1% em populações ribeirinhas da Amazônia, de 4,9% entre pacientes que passam por hemodiálise em São Paulo, SP, de 2% entre doadores de sangue e de 29% entre os casos de hepatite aguda reportados em Salvador, BA, de 2,4% em Manguinhos, no Rio de Janeiro, RJ, de 11,8% e 6,5% em usuários de drogas injetáveis e não-injetáveis. Além disso, também foi relatada a presença de anti-HEV em pacientes diagnosticados com hepatite A, em 4 pacientes em um estudo realizado em Londrina, indicando que é possível que haja coinfeções entre os vírus da hepatite A e E (Focaccia *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1995; Parana *et al.*, 1999; Trinta *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002; Lyra *et al.*, 2005).

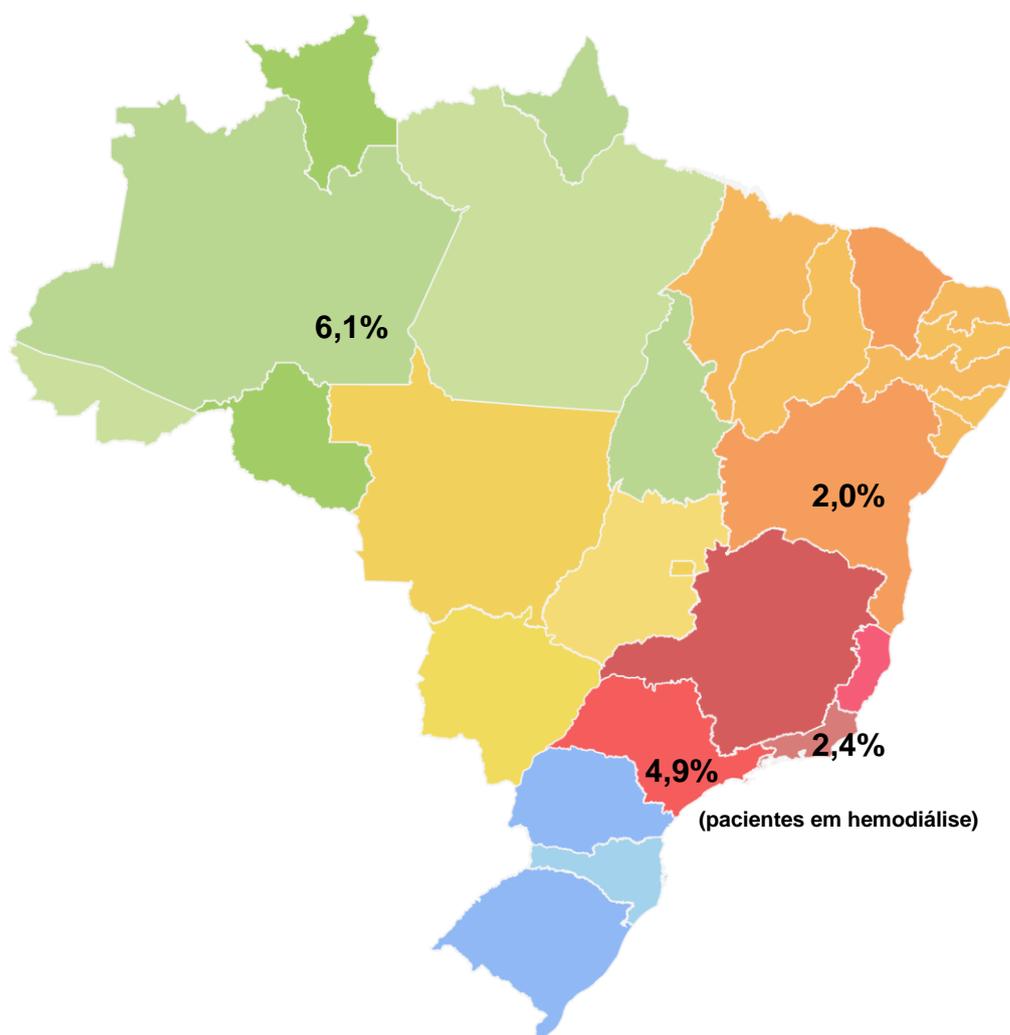


Fig. 1.8: Prevalência da hepatite no Brasil, conforme estudos realizados até o momento (Salvio, AL)

Em 2012, no Mato Grosso, Silva e colaboradores encontraram baixa prevalência de anti-HEV em pacientes expostos ao vírus da hepatite E de origem suína, demonstrando que a circulação do vírus entre tratadores e animais não ocorre como anteriormente sugerido, provavelmente devido a medidas de higiene adequadas no contato com o rebanho suíno.

Na região do Rio de Janeiro, Santos e colaboradores detectaram prevalência de anti-HEV IgG na comunidade de Manguinhos, em 2002.

É importante também que seja conhecida a soroprevalência de anti-HEV em suínos, uma vez que a transmissão zoonótica é importante em países de baixa endemicidade como o Brasil. Desta forma, em um estudo realizado no Brasil, com animais de 13 municípios do estado do Mato Grosso que eram abatidos em 2 matadouros, em que foram constatados níveis de soroprevalência de 81% de anti-HEV IgG nos animais estudados, índices considerados altos (Guimarães *et al.*, 2005). Em 2011, o vírus da hepatite E foi detectado em amostras de abatedouros e de efluentes próximos, no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Santos *et al.*, 2009).



Fig. 1.9: Países endêmicos para Hepatite E (Adaptado de: Wedemeyer *et al.*, 2012)

A falta de ensaios diagnósticos e de detecção leva a um grande número de potenciais casos de infecção por HEV não investigados e negligenciados, o que dificulta a identificação, planejamento e estabelecimento de uma visão epidemiológica clara do padrão de distribuição da infecção pelos diferentes genótipos do vírus da hepatite E pelo mundo (Teshale *et al.*, 2010).

Na figura 1.9, encontra-se um mapa do mundo mostrando a variação na distribuição das infecções pelo vírus da hepatite E nas diferentes regiões de alta, média e baixa endemicidade.

## 1.7 Profilaxia

Conforme observado, é possível compreender que para a prevenção da hepatite E em países endêmicos, é importante que haja melhorias no sistema de saneamento básico e conscientização da população quanto às medidas higiênicas que devem ser tomadas, devido à natureza entérica da transmissão nessas regiões. Assim, é importante que medidas socioeconômicas sejam levadas em consideração para a adaptação de infraestrutura sanitária e divulgação de informações corretas para que surtos sejam evitados nestas regiões (Ippagunta *et al.*, 2007; Rodriguez-Manzano *et al.*, 2010).

Já nas regiões não endêmicas, é importante que haja constante vigilância de abatedouros e criadouros de suínos, além de controle de animais de caça que também podem transmitir o vírus da hepatite E. Além disso, medidas sanitárias no manuseio e preparo de carnes e derivados destes animais, evitando contaminação através da alimentação são necessárias. Isto ocorre uma vez que não só carnes contaminadas cruas ou mal passadas são as responsáveis pelas infecções, mas também alimentos derivados e embutidos contaminados, com diversos relatos de infecções autóctones em países desenvolvidos causadas pelo consumo de salsichas e outros derivados suínos. Assim, todo alimento que tenha origem suína ou qualquer outra carne de caça deve ser corretamente cozido e preparado com higiene. Desta forma, conscientização da população quanto ao manuseio de alimentos também é importante em regiões de baixa endemicidade (Ippagunta *et al.*, 2007; Rodriguez-Manzano *et al.*, 2010).

Como medida profilática contra infecções pelos 4 genótipos do HEV, há também a vacina desenvolvida em 2011, na China, que se mostrou eficaz na prevenção de hepatite E em região endêmica, porém a mesma ainda não se encontra globalmente distribuída (Jun *et al.*, 2015).

## 1.8 Tratamento

A infecção aguda pelo vírus da hepatite E é uma doença auto limitante nos pacientes imunocompetentes. Desta forma, em geral, o tratamento segue de acordo com os sintomas apresentados pelo pacientes.

Porém, em casos de pacientes com doenças hepáticas prévias à infecção por HEV ou pacientes imunocomprometidos, é indicada a utilização de ribavirin no tratamento (Alric *et al.*, 2011; Gerolami *et al.*, 2011; Peron *et al.*, 2011; Goyal *et al.*, 2012).

Para pacientes imunossuprimidos, é indicado que a primeira medida seja reduzir as doses de medicamentos imunossupressores de modo que seja possível que as células T se recuperem e respondam à presença do vírus no organismo do paciente, embora esta diminuição nas doses de imunossupressores possa levar a rejeição do órgão sólido transplantado (Suneetha *et al.*, 2012).

## 1.9 Diagnóstico

Testes para a detecção de infecção pelo vírus da hepatite E podem ser realizados de forma direta, ou seja, através da detecção do genoma viral em amostras biológicas, como soro e fezes, por testes moleculares ou de forma indireta por testes sorológicos, para detecção de IgG e IgM anti-HEV (Baylis *et al.*, 2011).

### 1.9.1 Diagnóstico sorológico

Para a utilização e compreensão de um teste sorológico é importante entender que em infecções causadas pelo vírus da hepatite E, a titulação de IgM (Imunoglobulina M) atinge seu máximo juntamente com o pico de ALT, podendo permanecer assim por até cinco meses após o início da doença, mesmo que, no geral, esses níveis apenas se mantenham até o terceiro mês (Drobeniuc *et al.*, 2010; Khudyakov & Kamili, 2011).

Logo após o início da liberação de IgM no organismo do paciente, IgG já começa se desenvolver e ser produzido durante toda a fase aguda da infecção e período de convalescência, podendo persistir no soro do paciente por até um ano antes de começar a decair sua titulação. Desta forma, é possível utilizar a presença de IgG anti-HEV como marcador para detecção de exposição prévia ao HEV.

Porém, ainda há discussão a respeito do período de permanência e soroconversão, uma vez que já foram reportados casos de reinfecção por HEV (Kamar *et al.*, 2012b).

Para a detecção, então, por sorologia do HEV, há kits comerciais disponíveis. Entre eles, há diferenças quanto a diversos fatores, principalmente quanto à sensibilidade e especificidade para diagnóstico de infecções agudas causadas pelo vírus da hepatite E. No geral, estes kits apresentam sensibilidade de cerca de 90% (Legrande-Abravanel *et al.*, 2009; Drobeniuc *et al.*, 2010). Porém, quando imunoenaios mais antigos para detecção de anticorpos de HEV são analisados, há considerável variabilidade de resultados, com concordância de apenas 49%, atingindo concordância de 94% quando comparados aos pares (Mast *et al.*, 1998).

Além disso, a variabilidade genética do vírus da hepatite E leva a variações antigênicas que acarretam importantes implicações para a detecção de anticorpos para HEV e, conseqüentemente, a maiores dificuldades na elaboração e desenvolvimento de imunoenaios que sejam específicos, sensíveis e confiáveis (Mushahwar, 2008).

Devido à já mencionada possibilidade de resultados falso-positivos para IgM anti-HEV, há necessidade de confirmação destes resultados seja através de testes moleculares, para a detecção do genoma do HEV, ou da utilização de outros imunoenaios mais específicos para anticorpos contra epítomos da ORF2.1 e da ORF3. Estes testes adicionais são recomendáveis, principalmente em regiões de baixa prevalência para HEV (Arends *et al.*, 2014).

Por outro lado, existe a possibilidade de resultados falso-negativos nos ensaios disponíveis atualmente. Com isso, algumas questões são levadas em consideração, entre elas, a de que se todos os pacientes com suspeita de hepatite E, ou seja, todos os pacientes com hepatite não-A não-B sem etiologia comprovada, deveriam ser testados para o RNA de HEV. Isto demandaria laboratórios diagnósticos mais especializados, assim como equipes treinadas para tais técnicas, além de maior custo para detecção do RNA de HEV, em relação a ensaios sorológicos (Arends *et al.*, 2014).

### **1.9.2 Testes moleculares e RT-qPCR**

Ensaio moleculares para diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite E consistem na detecção do RNA deste vírus nas amostras biológicas, sejam elas de fezes ou soro, por exemplo. Além disso, constituem o padrão-ouro utilizado e

recomendado de confirmação e diagnóstico de hepatite E aguda pela Organização Mundial da Saúde (Sarin *et al.*, 2006).

Em amostras de fezes, o RNA de HEV já pode ser detectado uma semana antes do início dos sintomas e até 6 meses após o início da doença caracterizada. Já no soro, o RNA de HEV pode ser detectado ao início da apresentação de sintomas, podendo persistir por até 4 semanas (Sarin *et al.*, 2006).

Ainda assim, concentrações muito baixas de HEV na amostra podem ser baixas demais para serem detectadas, levando a taxas de positividade menores. Desta forma, a sensibilidade do teste e, conseqüente confiabilidade nos resultados, será de acordo com o tempo de início dos sintomas no paciente e forma correta e ágil de coleta da amostra no início dos sintomas, quando, geralmente, há títulos mais altos de HEV sendo liberados, além de transporte adequado e manuseio cuidadoso das amostras. Contudo, a não detecção de RNA de HEV não descarta a possibilidade de infecção recente (Kamar *et al.*, 2012b).

Em pacientes imunocomprometidos, assim como portadores de HIV e transplantados, o diagnóstico de hepatite E se dá pela detecção do RNA viral, uma vez que ensaios sorológicos podem levar a resultados falso-negativos devido à imunossupressão. Neste contexto, tanto a detecção quanto a quantificação de RNA do HEV pode levar a dados para monitoramento clínico de resposta a terapias antivirais (Kamar *et al.*, 2008).

Dentro dos testes moleculares, a RT-PCR quantitativa (Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa) tem sido amplamente utilizada com protocolos específicos que variam de acordo com as equipes e laboratórios em testes. Logo, estas metodologias têm apresentado alto grau de variabilidade de desempenho entre si, sem que alguma seja definida como padrão (Baylis *et al.*, 2011). Devido a isto, a Organização Mundial da Saúde tem proposto a padronização e determinação da utilização de uma metodologia para detecção e quantificação de RNA do HEV (Baylis *et al.*, 2011b).

Ainda assim, os imunoenaios são os testes mais utilizados para detecção de infecção por HEV, mesmo com as limitações de sensibilidade e impossibilidade de detecção de genótipos (Innis *et al.*, 2002).

Até então, não há ensaio diagnóstico de RNA de HEV por RT-PCR em tempo real licenciado para diagnóstico, apenas para fins de pesquisa, entre testes comerciais e *in house* (protocolos desenvolvimentos em laboratórios de pesquisa). Os testes comerciais até então utilizados detectam a região da ORF2 do genoma do

HEV, como o ViPrimePLUS Hepatitis E Virus RT-qPCR Kit (Vivantis - Subang Jaya, Malásia) e o qPCR Kit for Hepatitis E virus (Techne - Stone, Staffordshire, United Kingdom) (Sclair & Schiff, 2013).

Diferente do que ocorre com imunoensaios, a detecção de RNA de HEV e determinação de genótipo do vírus por PCR convencional de transcrição reversa é possível. Porém, a RT-PCR em Tempo Real apresenta grande importância em relação à RT-PCR convencional para detecção de RNA de HEV, uma vez que esta técnica apresenta maior sensibilidade e permite detecção viral superior quando os títulos de vírus na amostra encontram-se baixos ou muito baixos. Além disso, RT-PCR em tempo real requer menor tempo de processamento para que se obtenha resultados, em comparação à utilização de RT-PCR convencional com o mesmo objetivo, como pode ser observado no esquema abaixo (fig. 1.10) (Gyarmati *et al.*, 2007).

Entre as metodologias de RT-qPCR, encontra-se o protocolo descrito por Jothikumar que permite a inserção de controles internos na reação, minimizando resultados falso-negativos e é capaz de detectar os quatro genótipos do vírus da hepatite E. Assim, através da realização da técnica de qPCR TaqMan multiplex, mais de um filtro é utilizado para detecção tanto da ORF 3 do HEV (Sonda FAM) quanto da região descrita conforme o fabricante do controle interno (Soda VIC, por exemplo) ao mesmo tempo. A ORF3 não é utilizada para a determinação de genótipos, como as ORFs 1 e 2, uma vez que a ORF3 constitui uma região muito conservada dentro da espécie. Enquanto isso, as regiões das ORFs 1 e 2 apresentam grande variabilidade, sendo úteis para determinações dos genótipos de HEV e não sendo as mais indicadas para detecção e diagnóstico por PCR quantitativa. Além disso, este protocolo de Jothikumar e colaboradores, que detecta a ORF3, é considerado um dos melhores métodos para detecção do HEV quando comparado a outras metodologias moleculares disponíveis, inclusive as que utilizam de outras regiões genômicas para detecção do HEV (Jothikumar *et al.*, 2006; Mokhtari *et al.*, 2013).

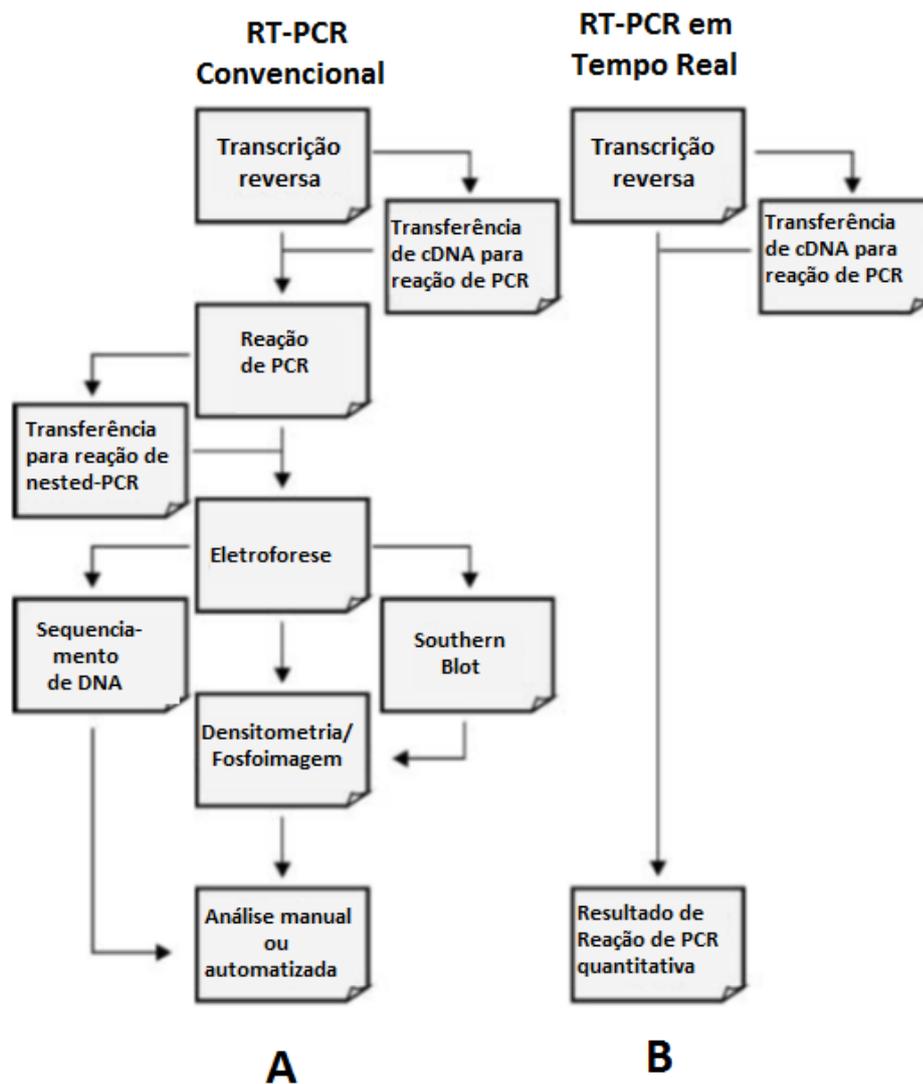


Fig. 1.10: Comparação entre etapas por RT-PCR convencional (A) e por RT-qPCR (B) (Bustin, 2000).

### 1.10 Infecção crônica em pacientes imunocomprometidos

Em primeiro lugar, é importante definir se as infecções crônicas causadas pelo vírus da hepatite E em pacientes imunocomprometidos são adquiridas através da ingestão de carne suína crua ou mal-passada ou de outros produtos suínos-derivados. Os estudos até o momento, descrevem o genótipo 3 como associado a ingestão tanto de carne crua, como descrito por Takahashi e Okamoto (2013) no Japão, quanto a ingestão de derivados como a linguiça de fígado de porco, como descrito por Colson e colaboradores (2010), por Berto e colaboradores (2013) e por Renou e colaboradores (2014) na França.

Isto é devido a falta de registros de casos de hepatite E crônica em pacientes imunocomprometidos, sejam eles portadores de HIV ou pacientes transplantados,

com apenas casos causados pelo genótipo 3 do HEV relatados (Dalton *et al.*, 2009; Naik *et al.*, 2013). Isto ocorre mesmo em regiões endêmicas para os genótipos 1 e 2 do HEV, onde os casos crônicos de hepatite E em pacientes imunocomprometidos relatados também são causados pelo genótipo 3 do vírus (Kamar *et al.*, 2012a).

Uma das primeiras investigações realizada com o intuito de determinar a soroprevalência de HEV em pacientes HIV positivos ocorreu em 1999, na Argentina. Neste estudo, Fainboim e seus colaboradores detectaram prevalência de 6,6% nos pacientes HIV positivos em comparação com 1,8% de prevalência encontrada entre doadores de sangue.

Além disso, infecção crônica por HEV-GT3 em pacientes HIV positivos pode estar associada a cirrose em casos raros, geralmente, quando a contagem de CD4 no soro do paciente está abaixo de  $200/\text{mm}^3$  (Naik *et al.*, 2013).

Uma infecção crônica por HEV em pacientes HIV positivos podem permanecer assintomáticas a maior parte do tempo, mas já pode ser caracterizada por taxas elevadas constantes de AST e ALT, em cerca de 100–300 IU/mL. Desta forma, um paciente crônico pode permanecer apenas apresentando manifestações extra-hepáticas e sinais enzimáticos levemente alterados por longos períodos de tempo até que a infecção gere grave dano hepático e seja devidamente diagnosticada (Agrawal *et al.*, 2012).

Em pacientes que passaram por transplantes renais e/ou hepáticos, o vírus da hepatite E pode causar infecção crônica inflamatória e de progressão rápida levando, geralmente, à cirrose, com lesões histológicas similares às encontradas em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C que desenvolveram cirrose (Agrawal *et al.*, 2012).

### **1.11 Justificativa**

A infecção pelo vírus da hepatite E frequentemente ocorre de forma aguda autolimitante com baixas taxas de mortalidade no ocidente, onde o HEV consiste em um alto risco de desenvolvimento de hepatite crônica em pacientes imunocomprometidos com taxas de mortalidade substanciais.

Na maioria dos casos, a infecção pelo HEV é assintomática e autolimitante. Porém, ao contrário dos genótipos 1, 2 e 4, o genótipo 3 pode ser responsável pela hepatite crônica, podendo levar a cirrose em pacientes imunossuprimidos. No Brasil,

até o momento, apenas o genótipo 3, foi descrito; o mesmo genótipo que vem sendo associado aos casos de hepatite crônica em pacientes imunocomprometidos.

Com o uso de diferentes testes sorológicos de baixa sensibilidade, a soroprevalência de IgG anti-HEV entre pacientes HIV positivos varia entre 1,5% e 11,2%, com baixa detecção de RNA do HEV no soro destes pacientes, entre 0 e 1,3%. Além disso, a mortalidade em pacientes coinfectados HEV e HIV pode chegar a 10%. Essa taxa pode refletir a seleção de casos e a alta taxa de morbidade em pacientes sintomáticos.

Entre os portadores de HIV, existe uma grande variabilidade na prevalência da hepatite E, provavelmente porque estes pacientes contraíram HEV na infância ou na adolescência, e o vírus só é detectado quando o paciente está infectado pelo HIV.

A hepatite E é uma doença considerada subdiagnosticada devido à carência de métodos de diagnósticos sensíveis o suficiente para a determinação de uma prevalência verdadeira, principalmente, entre grupos especiais de pacientes imunocomprometidos. Apenas os testes sorológicos não são suficientes para diagnosticar a infecção pelo HEV em pacientes infectados com HIV com baixas contagens de CD4, uma vez que a soroconversão pode ocorrer tardiamente ou não ocorrer. O período de viremia do HEV é breve e um resultado negativo na PCR convencional não exclui a possibilidade do paciente estar infectado. Além disso, uma segunda infecção pelo HEV pode ocorrer. Sendo assim, em pacientes com infecção crônica, apenas a sorologia não é confiável, e o diagnóstico deve ser estabelecido por técnicas moleculares.

A PCR em tempo real se tornou uma técnica de diagnóstico essencial em virologia que proporciona vantagens como menor tempo para detecção, maior sensibilidade e especificidade, e a possibilidade de detectar e quantificar o material viral presente na amostra. A inclusão de um controle interno de amplificação (IPC) nas amostras descarta os resultados falso-negativos devido à extração incompleta de RNA ou à presença de inibidores na reação de PCR.

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho será aperfeiçoar a técnica de PCR em tempo real, com a utilização de controle interno e controles sintéticos, a fim de estabelecer a prevalência do HEV em portadores de HIV no Rio de Janeiro.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Aperfeiçoar a técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da hepatite E em portadores de HIV e sua quantificação.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Aperfeiçoar a técnica de PCR em tempo real para detecção e quantificação do HEV em amostras de pacientes HIV positivos através da utilização de controle interno e utilização de curva sintética
- Estabelecer a utilização de curva sintética de DNA e de RNA para quantificação e detecção do HEV em pacientes HIV positivos
- Determinar a prevalência do HEV RNA nos portadores de HIV no Rio de Janeiro
- Avaliar os fatores associados com a detecção da coinfeção HEV/HIV, como sexo, idade e taxas de linfócitos T CD4 e T CD8

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto tratou-se de um estudo retrospectivo que foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) em colaboração com o Hospital Gaffrée e Guinle da Universidade Federal do Estadual do Rio de Janeiro (UNIRIO).

#### **3.1 Aspectos éticos da pesquisa**

O projeto foi submetido como um adendo ao projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos CAAE 46165015.4.0000.5258.

#### **3.2 Seleção de pacientes**

O estudo compreendeu 280 amostras que foram coletadas de pacientes HIV positivos, com sua etiologia confirmada, atendidos e em tratamento com terapia antirretroviral por, pelo menos, um ano no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle entre os anos de 2012 (114 amostras), 2013 (105 amostras) e 2014 (61 amostras).

As amostras selecionadas foram submetidas a triagem para a confirmação da infecção pelo HIV, permitindo sua inclusão no estudo. Além disso, amostras que apresentaram coinfeção com outros vírus causadores de hepatites, como HAV (Vírus da hepatite A), HBV(Vírus da hepatite B), HCV(Vírus da hepatite C) e HDV(Vírus da hepatite Delta) foram excluídas do estudo.

#### **3.3 Coleta de amostras**

Amostras de sangue dos pacientes portadores de HIV foram coletadas por punção venosa 5mL em tubos tipo Vacutainer com EDTA K<sub>2</sub>(Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA). Após centrifugação, o plasma foi separado e congelado a -20°C.

#### **3.4 Extração de material genético das amostras**

Antes do início da extração de material genético viral, conforme instruções do fabricante do kit de extração de ácidos nucleicos utilizado – Roche

(Penzberg, Germany) – foi preparada a solução de trabalho (*working solution*) que consiste na proporção de 50 µl de transportador de RNA poliA (*polyA RNA carrier*) 2,5mL de tampão de ligação. Esta solução foi preparada a cada extração, não podendo ser armazenada.

A um microtubo de 1,5 mL estéril devidamente identificado, foram adicionados 200 µl de soro, 200 µl de solução de trabalho e 50 µl de solução de proteinase K. A seguir, a reação foi vortexada e incubada a 72°C por 10 minutos em banho aquecido apropriadamente.

Após a retirada dos tubos da incubação, eles foram centrifugados e, em seguida, foi acrescentado 100 µl de tampão de ligação. A seguir, os microtubos foram vortexados e centrifugados novamente.

Para purificação de material genético viral, o conteúdo de cada microtubo foi completamente transferido para tubos de coleta com filtro identificados, ação seguida por centrifugação a 8000xg por 1 minuto dos tubos de coleta.

A seguir, ocorreu o descarte do tubo de coleta, enquanto o filtro foi mantido e re combinado com um novo tubo de coleta. Então, 500 µl de tampão de remoção de inibidores foram acrescentados ao tubo de coleta e nova centrifugação foi realizada a 8000 xg por 1 minuto.

Novamente, o tubo foi descartado enquanto o filtro em seu interior foi re combinado com um novo tubo de coleta. Então, 450 µl de tampão de lavagem foram adicionados o tubo seguido por centrifugação a 8000 xg por 1 minuto e, em sequência o tubo de coleta é substituído por um novo sendo mantido o filtro do interior com recombinação entre eles.

Uma segunda lavagem foi realizada exatamente como a primeira citada no parágrafo anterior. Porém, em vez de o tubo de coleta ser descartado, apenas seu conteúdo foi eliminado. O tubo foi combinado novamente ao filtro interno e foi realizada centrifugação por 10 segundos a 13000 xg ou à velocidade máxima que a centrífuga possa atingir. Apenas então o tubo foi descartado e substituído por um microtubo estéril de 1,5 mL devidamente identificado combinado ao filtro. Esta segunda centrifugação garante melhor remoção de tampão de lavagem residual.

Finalmente, foi realizada a ressuspensão do material genético retido no filtro. Para esta etapa, 50 µl de tampão de eluição foram adicionados ao tubo e ele é centrifugado finalmente à 8000 xg por 1 minuto. O material extraído foi armazenado a -70°C.

### **3.5. Aperfeiçoamento da quantificação viral**

A quantificação do HEV foi realizada de acordo com o protocolo de RT-qPCR descrito por Jothikumar e colaboradores (2006). Este protocolo visa a detecção da região da ORF3, com a utilização de uma sonda FAM e permite a realização de qPCR multiplex. Desta forma, o protocolo permitiu a inclusão de um controle interno na reação e sua possível detecção.

Antes das amostras dos pacientes HIV positivos serem testadas para HEV, as reações foram aperfeiçoadas, com a utilização de um controle interno na reação .

O controle interno foi testado para garantir maior confiabilidade nos resultados e evitar resultados falso-negativos. Além disso, foi utilizada curva sintética de dsDNA em substituição ao uso de curva de plasmídeo para detectar a coinfeção HEV/HIV. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de origem suína (soro ou fezes), previamente detectadas em nosso laboratório e com titulação conhecida. Como controle negativo, foram utilizadas amostras de soro sabidamente negativas e água ultrapura.

A curva plasmidial utilizada para fins de comparação no estudo foi a curva padrão da Organização Mundial da Saúde. Esta curva é constituída por 4 pontos ( $10^2 - 10^5$  UI/ml) e liofilizada. Ela foi ressuspensa em água ultrapura e armazenada a  $-70^\circ\text{C}$ .

#### **3.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) com transcrição reversa (RT) em tempo real sem utilização de controle interno**

Foi utilizado o protocolo de Jothikumar *et al.* (2006) para a detecção da ORF3 do HEV. Para tanto, foi utilizado o kit AG Path-ID one-step RT-PCR kit (Ambion, ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) e preparado 20  $\mu\text{l}$  mix sendo constituído de 5,5  $\mu\text{l}$  de água ultrapura livre de nucleases, 12,5  $\mu\text{l}$  de tampão para RT-PCR 2x, 0,25  $\mu\text{l}$  de iniciadores senso (JHEVF) e 0,25  $\mu\text{l}$  de iniciadores antissenso (JHEVR) ambos à concentração de 0,25  $\mu\text{M}$ , além de 0,5  $\mu\text{l}$  de sonda específica para a região da ORF3 do HEV a 0,2  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{l}$  de mix da enzima para RT-PCR 25x por amostra a ser testada incluindo a curva sintética e controles negativos. A seguir, o mix foi aplicado à placa específica para o equipamento a ser utilizado para realização da RT-PCR em tempo real. Na tabela 3.1, é possível ver as sequências dos iniciadores e da sonda utilizados.

Tabela 3.1: Sequências utilizadas para RT-qPCR.

Iniciadores	Sequência
<b>Iniciador senso</b>	5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'
<b>Iniciador antissenso</b>	5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'
<b>Sonda</b>	FAM5'-TGATTCTCAGCCCTTCGC-3'BHQ1
<b>Curva sintética</b>	5'-TTCGTAGGGGTTGGTTGGATGAACGTAGCG AAGGGCTGAGAATCAATGCGTGTCACCCCAGAA ACCACCTTCGT-3'

Em seguida, foi acrescentado 5 µl de amostra à placa onde mix foi aplicado anteriormente. Cada placa testada passou por breve centrifugação e foi colocada no equipamento para que ocorra a reação de RT-PCR em tempo real. O equipamento utilizado foi o 7500 Real Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Para que a reação ocorra corretamente é importante que os ciclos assim como as sondas a serem detectadas sejam devidamente indicados no 7500 Software v2.0.6 programa que fez a leitura dos resultados obtidos. Para detecção da sonda utilizada deve-se programar a máquina para reconhecer no filtro para sonda FAM os sinais emitidos durante a reação. Os ciclos foram definidos conforme a tabela 3.2.

Tabela 3.2: Condições do processo de RT-PCR em tempo real.

Atividade	Temperatura	Tempo
Ativação da UNG	45°C	30 minutos
Desnaturação e Ativação da enzima	95°C	15 minutos
Desnaturação	95°C	10 segundos
Hibridização e Extensão	55°C	1 minuto

} 40 vezes

### 3.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) com transcrição reversa (RT) em tempo real com utilização de controle interno

As amostras positivas para HIV foram testadas segundo protocolo de Jothikumar *et al.* (2006), com a utilização de controle interno para confirmação em caso de amostras negativas para HEV.

Para a realização da reação de RT-PCR em tempo real, foi utilizado o kit AG Path-ID one-step RT-PCR kit (Ambion, ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) e preparado mix com controle interno conforme protocolo do fabricante.

O mix que inclui o Controle Interno *Exogenous Internal Positive Control* (IPC) Taqman (Life Technologies, Carlsbad, EUA) consistiu em 2,5 µl de água ultrapura livre de nucleases, 12,5 µl de tampão para RT-PCR 2x, 0,25 µl de iniciadores senso (JHEVF) e 0,25 µl de iniciadores antissenso (JHEVR) ambos a 0,25 µM, além de 0,5 µl de sonda específica para a região da ORF3 do HEV a 0,2 µM, 1 µl de mix da enzima para RT-PCR 25x, 2,5 µl de mix do IPC 1x e 0,5 µl de DNA do IPC Exógeno 1x por amostra incluindo controles negativos e curva sintética. A seguir, o mix foi aplicado à placa específica para o equipamento a ser utilizado para realização da RT-PCR em tempo real.

Para que a reação ocorra corretamente é importante que os ciclos assim como as sondas a serem detectadas sejam devidamente indicados no 7500 Software v2.0.6 programa que fez a leitura dos resultados obtidos. Os mesmos ciclos utilizados para a RT-PCR em tempo real sem controle interno foram utilizados também para reações com controle interno.

### **3.5.3 Validação da Curva Sintética**

A curva sintética correspondente à região da ORF3 do HEV que foi utilizada para detecção e quantificação de HEV nas amostras positivas foi validada antes de seu uso para diagnóstico. Com 6 pontos principais, ela foi aliqüotada e aplicada em placa em duplicata, três vezes para confirmação de sua estabilidade e capacidade de ser quantificada e, assim, validada. Todas as quantificações realizadas em cópias/mL foram convertidas também para IU/mL, conforme proporção de 1 cópia/mL = 5,6 IU/mL.

### **3.5.4 Transcrição da curva sintética de ssRNA**

Além da utilização da curva sintética de DNA, a mesma foi transcrita para que fosse confirmado que o método utilizado não apresenta falhas de detecção na parte de transcrição reversa do processo. Para tanto, foi utilizado o kit MAXI Script T7 (Ambion, ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA).

Com a incorporação da região T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA -3') ao iniciador senso (T7-JHEVF), foi utilizado para o processo de transcrição da curva sintética o iniciador senso alterado cuja sequência é 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'.

Para a transcrição da sonda, foi preparado mix contendo 19,75 µl de água ultrapura livre de nucleases, 1 µg do DNA molde, neste caso, do ponto mais concentrado da curva sintética ( $10^7$ ), 1 µl de tampão de transcrição 10x – que só deve ser acrescentado após a água e o DNA molde, 1 µl de ATP a 10 nM, 1 µl de CTP a 10 nM, 1 µl de GTP a 10 nM, 1 µl de UTP a 10 nM, 2 µl de mix da enzima para T7 1x e 0,25 µl de iniciador senso modificado (T7-JHEVF) a 25 µM. Todos os reagentes devem ser mantidos em gelo durante o preparo da reação exceto o tampão de transcrição que deve ser mantido à temperatura ambiente.

Após a reação ser preparada, ela foi minuciosamente misturada, centrifugada e, em seguida, incubada a 37°C por 1 hora.

Com a transcrição realizada, foi preparada placa de RT-PCR em tempo real com a utilização da curva sintética de RNA para HEV conforme protocolo de Jothikumar e colaboradores (2006) com a utilização de um controle interno. Esta reação foi realizada para determinação do limite de detecção da curva sintética de RNA e sua comparação com a curva sintética de DNA e com a curva plasmidial.

### **3.5.2 Limite de detecção das curvas sintéticas e teste de precisão**

O controle positivo de concentração conhecida passou por diluições seriadas de 1:10 para que seja determinado o limite de detecção do teste. A diluição também foi realizada para o controle negativo para fins de comparação de detecção do controle interno.

Além disso, a curva padrão da OMS foi utilizada como parâmetro de comparação com as curvas sintéticas de dsDNA e de ssRNA, sendo cada curva sintética testada em duplicata e a curva padrão da OMS testada 7 vezes para confirmação do limite de detecção.

Para o teste de precisão, controle positivo de concentração conhecida passou 5 diluições 1:10 cada, para que fosse determinada a precisão da quantificação da reação em comparação com a concentração real de cada alíquota. O teste foi realizado em duplicata.

### **3.5.3 Teste de detecção em coinfeção**

Também com objetivo de aperfeiçoamento da detecção de HEV em pacientes infectados por HIV, foi realizada infecção artificial de amostras de HIV com HEV para que seja determinado se há presença de inibidores para a detecção de HEV nos casos de coinfeção. Esta infecção artificial foi realizada com a adição de 5 µl de controle positivo de HEV em 5 diferentes concentrações a 5 µl de amostra positiva para HIV e negativa para HEV. Em seguida, foi realizada RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) em tempo real dessas amostras coinfectadas. Uma vez estabelecido o aperfeiçoamento da PCR em tempo real, as amostras de pacientes HIV positivos foram testadas para a detecção do HEV com a utilização da curva sintética de dsDNA.

### **3.7 PCR Qualitativa de amostras positivas**

As amostras que foram positivas quando testadas por RT-PCR em tempo real foram submetidas a PCR convencional com amplificação para duas regiões: as ORFS 1 e 2. As amostras que se mantiveram positivas foram sequenciadas para confirmação da coinfeção pelo vírus da hepatite E.

#### **3.7.1 Preparo de cDNA por RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)**

Para a realização da RT-PCR foi preparado o seguinte mix: 7,5 µl de água ultrapura livre de nucleases, 10 µl de tampão FS 5x, 2 µl de DTT (Ditioneitol) a 3,5 mM, 2,5 µl de dNTP (Desoxirribonucleotídeos fosfatados) a 0,2 mM, 1 µl de iniciadores randômicos (Promega) a 0,6 µM, 1 µl de RNAsin (Inibidor de RNase) a 0,6 µM e 1 µl da enzima SuperScript III RT (Invitrogen) para preparo de 25 µl de mix por amostra.

A este mix, 25 µl de amostra extraída dos pacientes positivos para HIV serão acrescentados. Em seguida, a reação é colocada no termociclador onde estará submetida ao seguinte ciclo de temperaturas apresentado na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Ciclo de temperaturas para RT-qPCR.

Temperatura	Tempo
25°C	5 minutos
50°C	1 hora
70°C	20 minutos

### 3.7.2 PCR e nested-PCR para ORF1 de HEV

Para a amplificação da ORF 1, região conservada e bastante utilizada para detecção do vírus da hepatite E, foi realizada PCR1 a fim de alcançar o amplicon de 418 pb, seguida por nested-PCR a fim de alcançar amplicon de 287 pb referente à região de interesse, segundo protocolo de Wang e colaboradores (1999). O kit da Taq Platinum (Invitrogen) foi utilizado para amplificação desta região tanto para PCR1 quanto para a nested-PCR para a ORF1.

Para a PCR1, foi preparado mix contendo 26 µl de água ultrapura livre de nucleases, 7,5 µl de tampão para PCR 10x, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> a 3,5 mM, 4 µl de dNTP a 0,4 mM, 1 µl do iniciador senso (ORF1-F1) a 0,6 µM (5'-CTGGCATYACTACTGTCYATTGAGC-3'), 1 µl do iniciador antissenso (ORF1-R1) a 0,6 µM (5'-CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG-3') e 0,5 µl da enzima Taq Platinum Polimerase. O mix apresentou volume final de 42 µl ao qual foi acrescentado 8 µl de cDNA obtido a partir da RT-PCR já descrita.

Na tabela 3.4, pode-se observar os ciclos de temperatura aos quais a reação deve ser submetida no termociclador.

Tabela 3.4: Ciclos de temperatura para PCR1 da ORF1.

Atividade	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94°C	2 minutos
Desnaturação	94°C	1 minuto
Anelamento	50°C	1 minuto
Extensão	72°C	1 minuto
Extensão final	72°C	7 minutos

} 40 vezes

Para a realização da nested-PCR para ORF1, foi preparado mix contendo 33,5 µl de água ultrapura livre de nucleases, 5 µl de tampão para PCR 10x, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> a 3,5 mM, 4 µl de dNTP a 0,2 mM, 1 µl do iniciador senso (ORF1-F2) a 0,6 µM (5'- CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC-3'), 1 µl do iniciador antissenso (ORF1-R2) a 0,6 µM (5'- GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC-3') e 0,5 µl da enzima Taq Platinum Polimerase. O mix apresentou volume final de 47 µl ao qual foi acrescentado 3 µl do produto da PCR1 para ORF1.

Na tabela 3.5, pode-se observar os ciclos de temperatura aos quais a reação deve ser submetida no termociclador.

Tabela 3.5: Ciclos de temperatura para nested-PCR da ORF1.

<b>Atividade</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	
Desnaturação inicial	94°C	2 minutos	} 30 vezes
Desnaturação	94°C	1 minuto	
Anelamento	50°C	1 minuto	
Extensão	72°C	1 minuto	
Extensão final	72°C	7 minutos	

### 3.7.3 PCR e nested-PCR para ORF2 de HEV

Para a amplificação da ORF 2, região conservada e bastante utilizada para detecção do vírus da hepatite E, foi realizada PCR1 a fim de alcançar 731 pb, seguida por nested-PCR a fim de alcançar o amplicon de 348 pb referente à região de interesse, segundo protocolo de Huang e colaboradores (2002). O kit da Taq Platinum (Invitrogen) foi utilizado para amplificação desta região tanto para PCR1 quanto para o nested-PCR para a ORF2.

Para a PCR1, foi preparado mix contendo 26 µl de água ultrapura livre de nucleases, 7,5 µl de tampão para PCR 10x, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> a 3,5 mM, 4 µl de dNTP a 0,2 mM, 1 µl do iniciador senso (3516N) a 0,6 µM (5'- AATTATGCYCAGTAYCGRGTTG-3'), 1 µl do iniciador antissenso (3517N) a 0,6 µM (5'- CCCTTRTCYTGCTGMGCATTCTC-3') e 0,5 µl da enzima Taq Platinum Polimerase. O mix apresentou volume final de 42 µl ao qual foi acrescentado 8 µl de cDNA obtido a partir da RT-PCR já descrito.

Na tabela 3.6, pode-se observar os ciclos de temperatura aos quais a reação deve ser submetida no termociclador.

Tabela 3.6: Ciclos de temperatura para PCR1 da ORF2.

<b>Atividade</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	
Desnaturação inicial	94°C	2 minutos	} 40 vezes
Desnaturação	94°C	1 minuto	
Anelamento	42°C	1 minuto	
Extensão	72°C	1 minuto	
Extensão final	72°C	7 minutos	

Para a realização da nested-PCR para ORF2, foi preparado mix contendo 33,5 µl de água ultrapura livre de nucleases, 5 µl de tampão para PCR 10x, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> a 3,5 mM, 4 µl de dNTP a 0,2 mM, 1 µl do iniciador senso (3518N) a 0,6 µM (5'-GTWATGCTYTGATWCATGGCT-3'), 1 µl do iniciador antissenso (3519N) a 0,6 µM (5'-AGCCGACGAAATCAATTCTGTC -3') e 0,5 µl da enzima Taq Platinum Polimerase. O mix apresentou volume final de 47 µl ao qual foi acrescentado 3 µl do produto da PCR1 para ORF2.

Na tabela 3.7, pode-se observar os ciclos de temperatura aos quais a reação deve ser submetida no termociclador.

Tabela 3.7: Ciclos de temperatura para nested-PCR da ORF2.

<b>Atividade</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	
Desnaturação inicial	94°C	2 minutos	} 30 vezes
Desnaturação	94°C	1 minuto	
Anelamento	42°C	1 minuto	
Extensão	72°C	1 minuto	
Extensão final	72°C	7 minutos	

### 3.7.4 Confirmação de amplificação das regiões de interesse por eletroforese

Para confirmação da amplificação das ORFS 1 e 2, foram preparados géis de agarose para eletroforese nas concentrações de agarose a 1,5% com 0,5% de brometo de etídio, onde foram aplicados em cada orifício do gel, 8,0 µl do produto da reação de PCR e 2,0 µl do tampão da amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol) e 10 µl padrão de peso molecular 100 pb (Gibco, Seaforth, Canada) tanto para amplicons da ORF1 quanto para amplicons da ORF2.

O produto amplificado foi visualizado em luz ultravioleta no transiluminador após corrida em gel de eletroforese, em tampão TAE 1x, na presença de brometo de etídio para a visualização das bandas de DNA de 287 pb para ORF1 e 348 pb para ORF2 do HEV. Em seguida, o produto da PCR foi armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.9 Testes sorológicos**

Para confirmação e comparação de resultados, as amostras positivas para os testes moleculares foram testadas também para a detecção de anticorpos anti-HEV IgM e IgG, com a utilização do kit RecomWell HEV IgG/IgM (Mikrogen - Neuried, Germany) conforme instruções do fabricante. Este kit permite a detecção de anticorpos anti-HEV IgG e IgM em uma mesma reação através da utilização de proteínas recombinantes da ORF2 fixadas para que anticorpos específicos anti-HEV fiquem aderidos.

Antes da realização do teste, o tampão de lavagem foi preparado. Para tanto, o tampão foi diluído na proporção 1 para 9 com água deionizada. Para cada 8 poços utilizados, 5ml de concentrado foi misturado a 45ml de água deionizada e armazenado a  $+2^{\circ}\text{C}$ .

Além disso, a solução do conjugado também foi preparada previamente. Para cada tira de 8 poços da placa, 1ml de tampão de diluição e 10  $\mu\text{l}$  de conjugado de peroxidase anti-IgG humana ou de conjugado de peroxidase anti-IgM, na relação de 1 para 10.

Para o início do teste sorológico, todos os reagentes foram mantidos a temperatura ambiente ( $18 - 25^{\circ}\text{C}$ ) por, pelo menos, 30 minutos. A seguir, 10  $\mu\text{l}$  de soro das amostras a serem testadas foram pipetados e homogeneizados em 1ml de tampão de diluição, mantendo a proporção de 1:100.

Então 100  $\mu\text{l}$  de cada amostra diluída foram pipetados em cada poço. Após a pipetagem, a placa foi coberta com película aderente e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora.

Em seguida, foi realizada a lavagem da placa. Para tanto, após a película aderente ser cuidadosamente retirada, os poços foram esvaziados e preenchidos com 300  $\mu\text{l}$  de tampão de lavagem. Este procedimento foi repetido 4 vezes.

A seguir, foi realizada a incubação com a solução do conjugado através do acréscimo de 100  $\mu\text{l}$  de solução do conjugado (de anti-HEV IgG ou IgM) previamente diluído. A incubação foi realizada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos com a placa protegida por uma nova película aderente.

Após a incubação com o conjugado, foi realizado novo processo de lavagem idêntico ao primeiro, com utilização de 300 µl de tampão de lavagem em 4 repetições.

Para a reação do substrato, 100 µl de solução de substrato foram pipetados em cada poço, seguido por incubação a temperatura ambiente (18 – 25°C) por 30 minutos. Então, 100 µl de solução de paragem foram pipetados em todos os poços.

As absorvâncias dos diferentes poços foram, então, medidas por um fotômetro para placas de microtitulação a 450 nm com um comprimento de onda de referência de 650 nm e valores de absorvância e *Cut Off* foram analisados.

### **3.10 Análise de dados obtidos**

Os dados como sexo, idade, carga viral, CD4, CD8 foram digitalizados em um banco de dados no Excel e foram utilizados para as análises de resultados. Estes dados foram utilizados para fins de comparação e determinação de correlação entre taxas de Linfócitos T CD4+ e T CD8+ em relação à presença da coinfeção HEV/HIV.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Aperfeiçoamento da quantificação viral

Para o aperfeiçoamento da detecção viral por RT-qPCR, o controle interno IPC foi utilizado em todas as reações para certificação de que a técnica funcionou, evitando resultados falso-negativos. O controle interno IPC (Internal Positive Control - TaqMan® - Life Technologies) foi detectado em todas as amostras testadas. A média do valor de Ct do controle interno encontrado em amostras negativas foi de 28,67, variando entre 28,16 e 29,45. Já com as amostras positivas, os valores de Ct do controle interno variaram entre 28,17 e 36,62 com média de 32,20.

Além disso, visando o aperfeiçoamento da técnica de RT-qPCR, foi realizada diluição e padronização da curva sintética de dsDNA. A curva sintética de DNA, utilizada em substituição à curva plasmidial, apresentou parâmetros adequados à detecção e quantificação de RNA do HEV, apresentando valores de slope de -3,20;  $R^2$  com valor de 0,998 e E igual a 105,31%. Na figura 4.1 é possível observar a linearidade da curva sintética com diferentes Cts. Ela foi testada em triplicata antes de ser utilizada com as amostras HIV positivas.

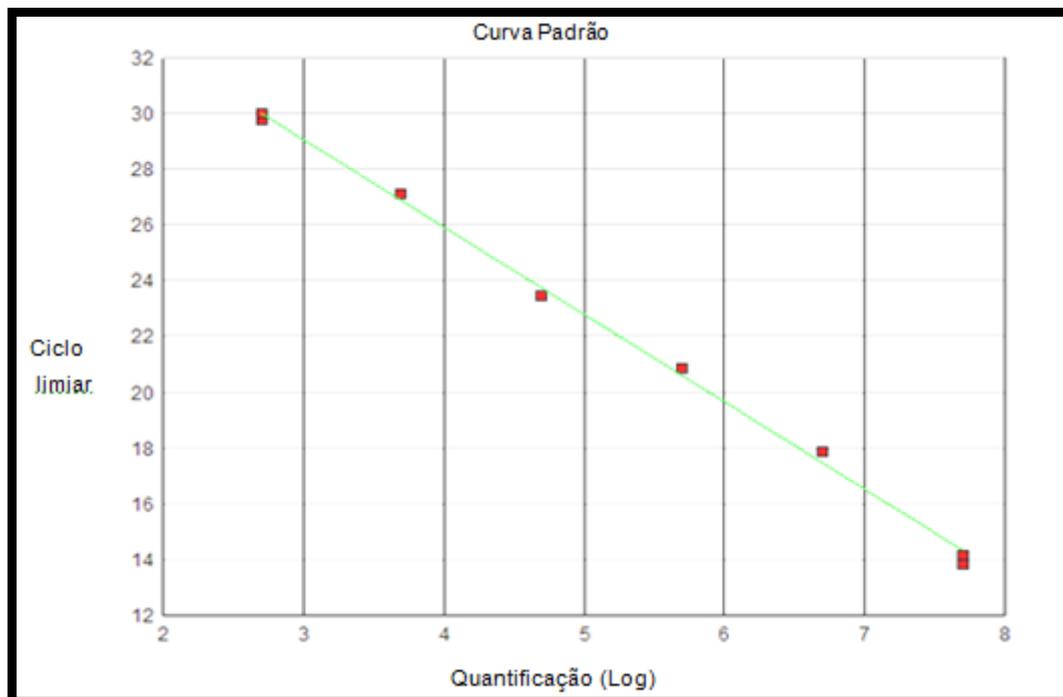


Fig. 4.1: Curva padrão sintética de dsDNA para detecção do vírus da Hepatite E e sua quantificação (n=3).

Após, a curva sintética de ssRNA (fig 4.2) foi transcrita e testada em comparação com a curva plasmidial da OMS (fig 4.3), obtendo slope de -3,31,  $R^2$  com valor de 0,99 e E igual a 99,75%.

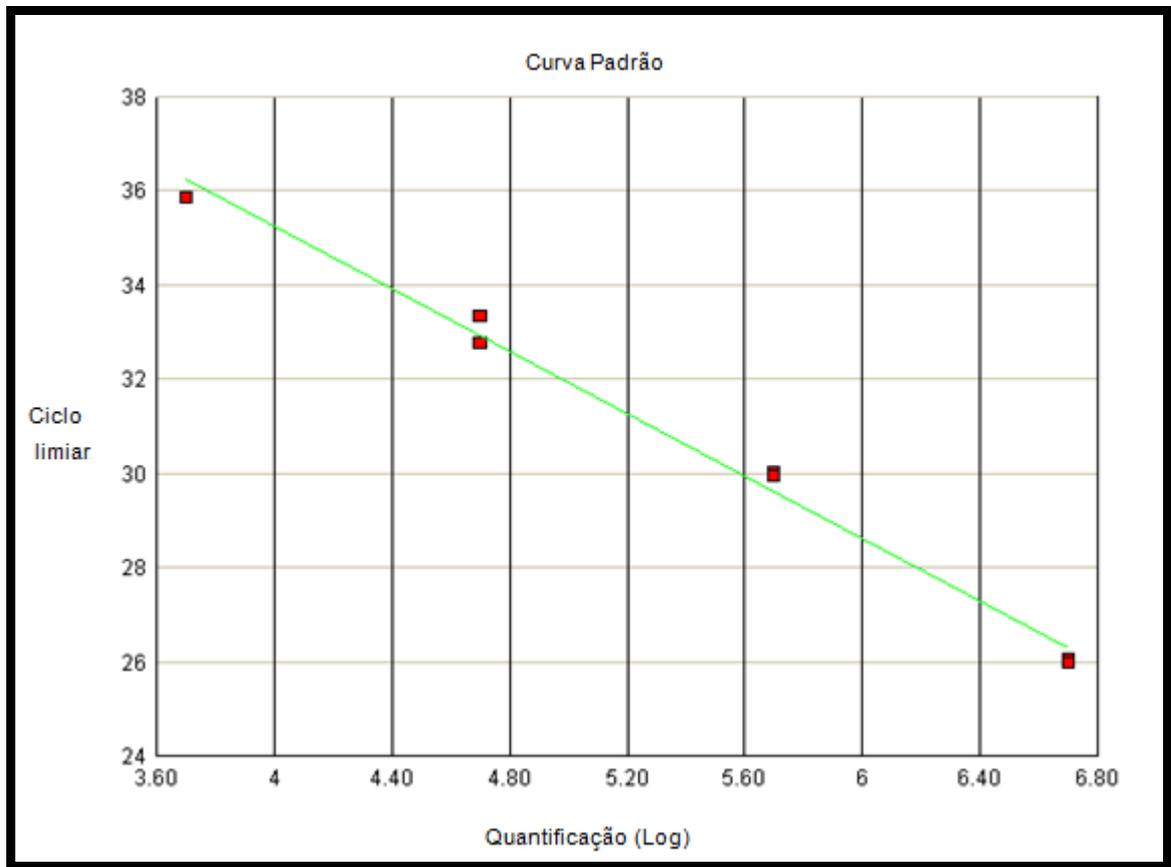


Fig. 4.2: Curva padrão sintética de ssRNA para detecção do vírus da Hepatite E e sua quantificação (n=3).

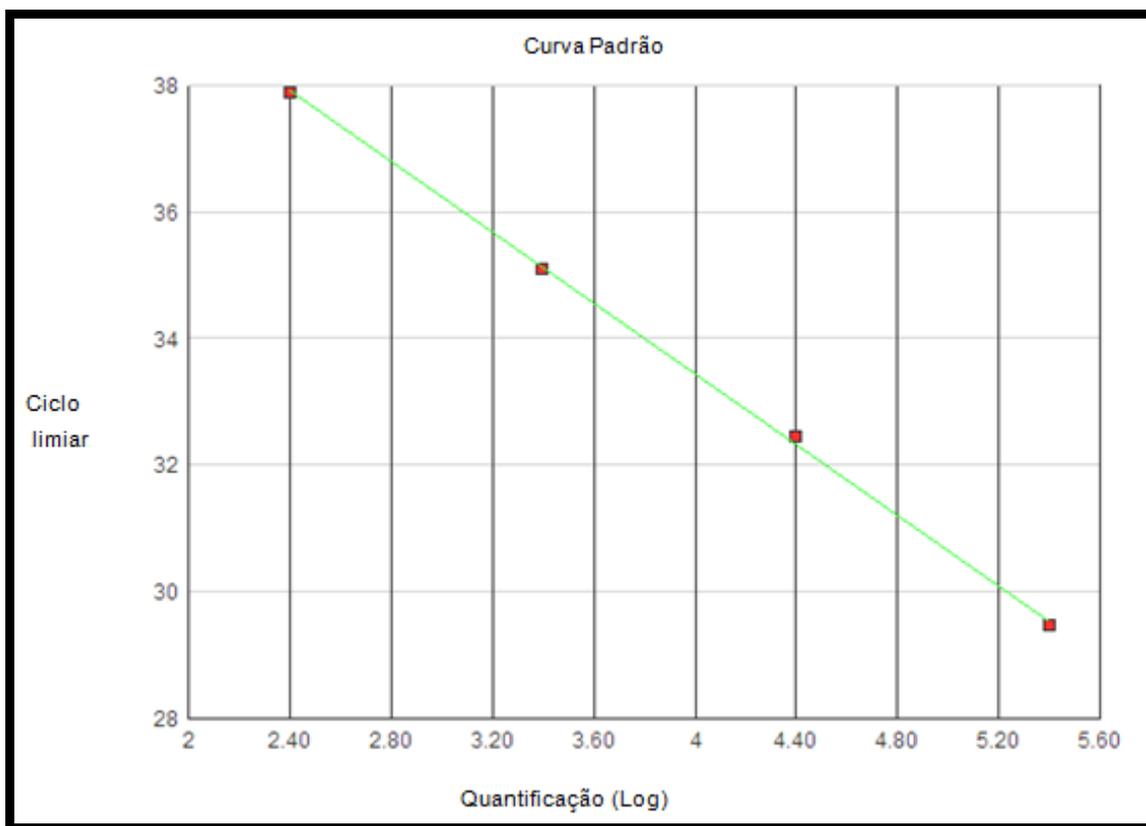


Fig. 4.3: Curva padrão fornecida pela Organização Mundial da Saúde para detecção do vírus da Hepatite E e sua quantificação (n=3).

A seguir, foi realizado teste de precisão da curva sintética de dsDNA (Tabela 4.1). Através de diluição seriada de controle positivo para HEV ( $10^2$  cópias/mL a  $10^6$  cópias/mL).

Tabela 4.1: Teste de precisão da curva sintética de dsDNA para RT-qPCR.

<b>Diluição do controle positivo (cópias/mL)</b>	<b>Quantificação obtida Média (cópias/mL) e Desvio Padrão</b>
$10^6$	$4,99 \times 10^6 (\pm 1,605132393)$
$10^5$	$4,66 \times 10^5 (\pm 1,513208512)$
$10^4$	$4,56 \times 10^4 (\pm 2,001112191)$
$10^3$	$3,94 \times 10^3 (\pm 0,403050865)$
$10^2$	$4,53 \times 10^2 (\pm 0,509116882)$

Posteriormente, a curva padrão estabelecida pela OMS (Organização Mundial da Saúde) foi utilizada como parâmetro de comparação para a curva sintética de dsDNA para determinação do limite de detecção de 100 cópias/mL (17,85 IU/mL). Para tanto, cada ponto da curva foi testado 7 vezes em relação às duplicatas das

curvas sintéticas de dsDNA e de ssRNA transcrita. Na tabela 4.2, pode-se observar os parâmetros das curvas analisadas e limite de detecção de cada uma.

Tabela 4.2: Comparação entre as curvas sintéticas de dsDNA e de ssRNA em relação à curva padrão da OMS.

<b>Curva Padrão</b>	<b>Slope</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>E&gt;</b>	<b>Limite de detecção</b>
<b>Curva Sintética de DNA</b>	3,20	0,98	105,31	100 cópias/mL
<b>Curva Sintética de RNA</b>	3,31	0,99	99,75	50 cópias/mL
<b>Curva OMS</b>	3,45	0,97	102,60	250 cópias/mL

Foi também realizada infecção artificial de amostras positivas para HIV e negativas para HEV com utilização de diferentes pontos de concentração da curva sintética de dsDNA para avaliar se a presença do HIV poderia inibir a detecção de HEV na presença de HIV. As 6 amostras testadas, em duplicata, foram positivas para HEV na concentração esperada e positivas também para o controle interno IPC (Tabela 4.3), mostrando assim, que a presença de RNA do HIV não interfere na detecção de HEV pela técnica de RT-PCR em tempo real.

Tabela 4.3: Infecção artificial de amostras positivas para HIV e negativas para HEV

<b>Nº de amostras de HIV infectadas artificialmente por HEV</b>	<b>Positivas para Controle Interno IPC</b>	<b>Negativas para Controle Interno IPC</b>
Positivas para HEV	6 (100,0%)	0 (0,0%)
Negativas para HEV	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<b>Total</b>	<b>6 (100,0%)</b>	<b>0 (0,0%)</b>

## 4.2 Grupo estudado

Após o aperfeiçoamento da técnica de RT-PCR em tempo real, 280 amostras de pacientes HIV positivos em tratamento no Hospital Gaffrée & Guinle foram testadas com utilização de controle interno IPC e curva sintética de dsDNA. Foram coletados os dados de idade, sexo, ano de coleta das amostras (2012, 2013 ou 2014) e taxas de CD4 e CD8 dos pacientes envolvidos no estudo. Na tabela 4.4, é possível acompanhar a distribuição das amostras estudadas entre os anos que oram

coletadas, a taxa de amostras positivas para HEV e sexo e idade média dos pacientes.

Tabela 4.4: Distribuição dos pacientes HIV reagentes de acordo com data da coleta, sexo, média de idade e detecção do HEV-RNA.

Ano	Nº de amostras HIV positivas	Sexo		Idade	HEV/HIV
		Feminino	Masculino		
2012	114 (40,5%)	58 (51,0%)	56 (49,0%)	37 (17 – 69 anos)	9 (7,89%)
2013	105 (37,5%)	53 (50,5%)	52 (49,5%)	44 (20 – 67 anos)	1 (0,95%)
2014	61 (22,0%)	28 (44,0%)	33 (56,0%)	34 (20 – 61 anos)	0
<b>Total</b>	<b>280 (100%)</b>			<b>Média ± DP: 41,2 ± 11,6</b>	<b>Valor de p &lt;0,0001*</b>

\*Teste T-Student (não pareado)

DP: Desvio Padrão

#### 4.3 Amostras positivas para infecção pelo Vírus da Hepatite E

Entre as 280 amostras coletadas no estudo, 10 foram positivas na detecção do RNA de HEV por técnica de RT-PCR em tempo real aperfeiçoada, sendo 9 amostras de 2012 e 1 amostra de 2013. Na tabela 4.5, observa-se que, em sua maioria, a relação entre valores de CD4 e CD8 encontrava-se abaixo da faixa considerada normal (CD4+ normal > 400 células/mm<sup>3</sup> e CD4/CD8 > 0,8), indicando possível imunodeficiência do paciente no período em que a amostra foi coletada. No entanto, em relação à infecção por HEV, os pacientes HIV positivos estudados se comportaram como a população imunocompetente. Uma vez que um paciente só é considerado em AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida) quando sua taxa de células T CD4+ encontra-se inferior a 200 células/mm<sup>3</sup>. Neste caso, o paciente em acompanhamento inicia o tratamento apresentando ou não sintomas.

Além disso, todas as amostras foram testadas por sorologia para detecção de anticorpos anti-HEV IgM e IgG, porém foram todas negativas para os testes sorológicos.

As amostras positivas foram testadas por PCR qualitativo para detecção das ORFs 1 e 2, porém, os resultados foram negativos.

Tabela 4.5: Dados dos pacientes HIV coinfectados com HEV.

N.I. = Dados não informados (M= Masculino, F= Feminino).

Identificação	Ano	Gênero	Idade	CD4+	CD8+	CD4/CD8	Carga viral de HEV	Anti-HEV IgM	Anti-HEV IgG	Ct
HEV12725	2012	M	56	274	1254	0.22	0.96 IU/mL	-	-	38,84
HEV12268	2012	M	36	698	883	0.79	0.61 IU/mL	-	-	38,63
HEV12224	2012	M	28	569	771	0.73	3.92 x 10 IU/mL	-	-	33,20
HEV12165	2012	M	52	N.I.	N.I.	N.I.	0.85 IU/mL	-	-	38,03
HEV12995	2012	F	36	218	1015	0.21	8.55 x 10 <sup>7</sup> IU/mL	-	-	04,09
HEV12998	2012	F	28	428	709	0.60	9.16 IU/mL	-	-	35,16
HEV12265	2012	M	54	343	971	0.35	7.59 x 10 <sup>3</sup> IU/mL	-	-	27,03
HEV12993	2012	F	N.I.	223	1190	0.19	3.10 IU/mL	-	-	35,26
HEV12112	2012	M	22	1038	739	1.40	4.52 IU/mL	-	-	34,78
HEV13674	2013	F	54	193	761	0.25	1.43 x 10 <sup>2</sup> IU/mL	-	-	30,61

## 5. DISCUSSÃO

A hepatite E apresenta-se como importante problema de saúde pública, principalmente entre populações especiais, como pacientes gestantes e imunossuprimidos e imunocomprometidos, conforme relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015, no qual a OMS se posiciona em relação à importância da doença e à necessidade de desenvolvimento de estudos que elucidem questões relacionadas ao diagnóstico, tratamento e vacina contra infecção pelo vírus da hepatite E (HEV).

O HEV é responsável por infecções desde agudas autolimitantes a fulminantes, variando conforme fatores do hospedeiro e genótipo viral, assim, podem ocorrer casos de infecções agudas em populações imunocompetentes; casos graves em pacientes idosos ou com doença hepática prévia; quadro agudo grave ou crônico em pacientes imunocomprometidos, sendo associada a alta morbidade e mortalidade; além de quadro de hepatite fulminante em gestantes, que pode levar a óbito (Labrique *et al.*, 2010; Robbins *et al.*, 2014; Rivero-Barciela *et al.*, 2015; WHO, 2015).

Devido ao aumento de casos autóctones de hepatite E em países de baixa endemicidade e, com cada vez menos casos de hepatites A e B – devido a tratamentos e vacinas estabelecidos – é possível que, em alguns anos, a hepatite E seja a infecção viral hepática mais recorrente (Aggarwal & Naik, 2010).

Pacientes imunocomprometidos por infecção por HIV tendem a desenvolver a forma persistente e até crônica da infecção por HEV, com permanência de níveis detectáveis de vírus no soro e de níveis alterados de enzimas hepáticas por mais de 6 meses, levando a agravamentos como cirrose hepática, em 10% dos casos (Colson *et al.*, 2009; Dalton *et al.*, 2009). Desta forma, em pacientes HIV positivos, a coinfeção por HEV ocorre, principalmente, nos pacientes em estado de imunocomprometimento pelo HIV. Assim, este grupo encontra-se como um grupo mais susceptível a ocorrência de infecções por HEV em relação à população imunocompetente. Além disso, estudos recentes demonstraram que a infecção por HEV nos pacientes portadores de HIV provavelmente ocorre pela ingestão de alimento contaminado, principalmente de origem suína. Desta forma, a infecção é causada pelo genótipo 3, até então, sendo conhecidamente um dos únicos capazes de causar o quadro crônico da infecção (Rivero-Juarez *et al.*, 2015).

Sendo o HEV o vírus causador de hepatite mais recém-descoberto e descrito, há grande discrepância de resultados entre os métodos de diagnóstico existentes para que a doença seja tratada corretamente, e que dados sobre sua prevalência sejam mais exatos em países com baixa endemicidade, devido a diagnósticos falso-positivos e falso-negativos. É importante que haja um método de diagnóstico padronizado com especificidade e sensibilidade adequadas para que possa haver monitoramento de pacientes HIV positivos durante o tratamento, acompanhamento de eficácia do tratamento e levando a maiores informações sobre a infecção por HEV. O método de diagnóstico mais comum é o sorológico através da detecção de anti-HEV IgM e IgG e apresenta sensibilidade e especificidade confiáveis para pacientes imunocompetentes. Porém, estas sensibilidade e especificidade diminuem para pacientes imunocomprometidos, levando a falhas na detecção da infecção por HEV neste grupo. Além disso, as anomalias bioquímicas causadas por infecção por HEV se comparam às ocorridas por infecção de outros vírus causadores de hepatite e os critérios de sensibilidade e especificidade de testes comerciais sorológicos disponíveis são considerados subótimos, uma vez que os títulos de IgG podem permanecer detectáveis no soro por tempo ainda não bem determinado ou pode não correr a soroconversão (Drobeniuc *et al.*, 2010; Khudyakov & Kamili, 2011; Arends *et al.*, 2014; Gerber *et al.*, 2014; Pérez-Gracia *et al.*, 2014; Huzly *et al.*, 2014).

Com o objetivo de desenvolver uma metodologia eficiente, a técnica desenvolvida por Jothikumar e colaboradores em 2006 foi aperfeiçoada. Para tanto, conforme descrito por Tourinho e colaboradores (2015), uma curva sintética de dsDNA para a região da ORF3 do HEV foi diluída e utilizada em substituição à curva plasmidial originalmente utilizada. A curva sintética de dsDNA foi capaz de detectar HEV em amostras artificialmente coinfectadas com HEV/HIV, demonstrando que a presença de HIV não inibiria a detecção de HEV. O limite de detecção com a curva sintética de dsDNA foi de 17,85 IU/mL (100 cópias/mL) e a curva apresentou slope de 3,20 e  $E > 0,99$ . Além disso, a utilização de controle interno IPC foi capaz de confirmar tanto os resultados positivos como verdadeiramente positivos quanto os negativos como verdadeiramente negativos. A utilização de controles internos, além de evitar que resultados falso-negativos ocorram, também permite, durante o estabelecimento de uma metodologia *in house*, a detecção da presença de inibidores de PCR na amostra. Desta forma, diversos autores descrevem a necessidade do uso de controle interno para detecção de diversos vírus, inclusive os

vírus agentes etiológicos de hepatites, como o HBV e o HEV (Garson *et al.*, 2005; Bustin *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2011; Mokhtari *et al.*, 2013).

Entre os métodos moleculares existentes, aqueles que têm como região alvo a região da ORF2/3 apresentam melhores resultados quando testados com amostras de pacientes ou com amostras-referência da OMS em relação aos métodos que tem como alvo outra região, como a ORF2 do genoma do HEV, o que deve-se, provavelmente ao fato de a região da ORF3 ser considerada uma região altamente conservada do genoma viral, permitindo melhor detecção do HEV-RNA.

Além disso, as técnicas de PCR em tempo real apresentaram melhores limites de detecção em relação às técnicas de PCR qualitativo, principalmente quando uma metodologia de RT-PCR (PCR de transcrição reversa) em tempo real foi utilizada, evitando a perda de RNA-HEV com apenas uma etapa de reação, evitando também, contaminação de amostra (Ward *et al.*, 2011; Abravanel *et al.*, 2012; Mokhtari *et al.*, 2013; Gerber *et al.*, 2014; Blasco-Perrin *et al.*, 2015).

Neste estudo, o protocolo desenvolvido por Jothikumar e seus colaboradores (2006) foi utilizado por ser considerado o que apresenta melhor especificidade e sensibilidade pelos autores que compararam as metodologias *in house* e comerciais de detecção de RNA-HEV, com limite de detecção de 250 cópias/mL. Esta comparação foi realizada tanto para amostras de soro quanto de fezes e tanto entre populações imunocompetentes quanto em populações imunossuprimidas. Além disso, o protocolo de Jothikumar e colaboradores permite a utilização de controles internos. Em contraponto, uma vez que a curva utilizada é de DNA, ela é impossibilitada de passar pela fase de transcrição reversa, fase crucial do experimento, e, assim, o limite de detecção tende a ser diferente do encontrado quando a curva sintética de RNA é utilizada (Ward *et al.*, 2011; Troxler *et al.*, 2011; Abravanel *et al.*, 2012; Mokhtari *et al.*, 2013; Gerber *et al.*, 2014; Blasco-Perrin *et al.*, 2015). Portanto, durante este estudo, a curva de DNA sintética foi utilizada como molde para sintetizar a curva de ssRNA através da transcrição utilizando o kit MAXI Script T7 que, através do acréscimo da sequência T7 à região da curva sintética de DNA, permite a transcrição reversa da região. Assim, com utilização de curva sintética de ssRNA, os riscos de resultados falsos são também minimizados, uma vez que, diferente da curva sintética de DNA, esta também passa pela fase de transcrição reversa na reação de RT-qPCR. A curva de RNA apresentou slope de 3,31 e  $R^2 > 0,99$ , sendo capaz de atingir limite de detecção de 50 cópias/ul e 8,9 UI/mL. Além disso, o controle interno IPC foi testado, confirmando os resultados

negativos como verdadeiros, devido a possibilidade de PCR em tempo real multiplex da metodologia. O limite de detecção foi determinado com a utilização da curva sintética de RNA e com amostras-referência de HEV com quantificações pré-estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde. A curva sintética de RNA demonstrou-se aplicável para detecção de HEV em amostras tanto de pacientes imunocompetentes quanto de pacientes positivos para HIV, sem que a presença da coinfeção com HIV impedisse a detecção de HEV.

As metodologias moleculares, com detecção do RNA do HEV, apresentam maior sensibilidade e especificidade em comparação a testes sorológicos anti-HEV IgM, levando a menores taxas de resultados falso-positivos, além de permitir acompanhamento da carga viral durante tratamento do paciente, principalmente em infecções crônicas e graves (Baylis *et al.*, 2011; Abravanel *et al.*, 2012; Arends *et al.*, 2014; Echevarría, 2014; Vollmer *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2015). Neste estudo 280 amostras de pacientes HIV reagentes foram testadas e em 10 foi detectado o RNA do HEV. Apesar das amostras terem sido testadas em triplicata e em diferentes datas, nenhuma amostra foi reagente nos testes sorológico anti-HEV IgM e IgG, devido aos baixos títulos no soro de anticorpos anti-HEV IgG e IgM ou, provavelmente, devido à soroconversão tardia ou inexistente, uma vez que a permanência destes anticorpos no soro é ainda indeterminada (Gerber *et al.*, 2014).

Quanto aos pacientes positivos para a coinfeção HEV/HIV, não foram encontradas relações entre idade ou sexo dos pacientes e a presença da coinfeção, com uma distribuição heterogênea entre estes critérios. Entre os pacientes HIV, foi encontrada a coinfeção HIV/HEV em 3,58%. A prevalência foi considerada média quando comparada com a prevalência da coinfeção HIV/HEV descrita mundialmente, cuja prevalência varia entre os diferentes países e conforme a metodologia utilizada, permanecendo entre 0,5% a 6,0% - 6.6% na Argentina (Fainboim *et al.*, 1999), 0,5% na França (Kaba *et al.*, 2011), 4% nos Estados Unidos (Crum-Cianflone *et al.*, 2011) - reforçando a importância de um teste padronizado e que seja referência para que o verdadeiro panorama de prevalência de infecções por HEV no mundo e no Brasil seja elucidado (Fainboim *et al.*, 1999; Kaba *et al.*, 2011; Crum-Cianflone *et al.*, 2012) .

Em relação à idade dos pacientes, outros autores observaram uma relação entre a idade e a gravidade da doença (Gurmit *et al.*, 2013; Politou *et al.*, 2015).

Neste estudo, foi observado que, devido aos tratamentos recebidos, os pacientes não estavam em estado de imunocomprometimento no momento da

infecção por HEV, não havendo, assim, nenhum caso crônico relatado dentro desta população estudada. Em concordância, tanto Politou e colaboradores (2015) quanto Feldt e colaboradores (2013) também não descreveram relação entre infecção aguda por HEV-GT3 e coinfeção por HIV, uma vez que o dano hepático não foi aumentado pelo imunocomprometimento.

No presente estudo, foram obtidos dados de taxas de CD4 e CD8, permitindo relacionar o imunocomprometimento dos pacientes com a ocorrência da coinfeção HEV/HIV, uma vez que 30% dos pacientes positivos para HEV/HIV estavam com taxa de CD4 inferior a 250. Porém, esta taxa não é baixa o suficiente para acarretar infecção crônica por HEV, uma vez que estes pacientes ainda não são considerados imunocomprometidos. Além disso, também foi possível, através da metodologia aplicada, a detecção da carga viral das amostras positivas, que variou entre 200 cópias/mL (0,31 IU/mL) e  $4,78 \times 10^8$  cópias/mL ( $8,55 \times 10^7$  IU/mL), com baixa carga viral detectada na maioria dos pacientes. Isso provavelmente se deve a baixa carga viral de HEV circulante no soro durante a infecção (Gurmit *et al.*, 2013).

Em contrapartida, Gurmit e colaboradores (2013), Kenfak-Foguena e colaboradores (2011), Jardi e colaboradores (2012) e Robbins e colaboradores (2014), encontraram relação entre a presença da coinfeção e altos níveis de ALT (Alanina Aminotransferase) no fígado, maior progressão de doença hepática chegando a casos crônicos e detecção de RNA-HEV no soro.

A técnica de RT-PCR em tempo real aperfeiçoada evita contaminação na fase pré-PCR em tempo real, uma vez que a etapa de síntese de cDNA e a quantificação viral ocorrem em um mesmo experimento e apresenta melhores limites de detecção que as metodologias clássicas quando a curva sintética de RNA é utilizada, provavelmente devido à maior semelhança com o genoma viral por sua conformação em ácido ribonucleico em vez de DNA.

Desta forma, é possível concluir que a utilização de metodologia molecular aperfeiçoada de RT-PCR em tempo real para detecção de HEV em amostras de soro de pacientes HIV positivos é eficaz e confirma amostras positivas, como verdadeiramente positivas, e negativas, como verdadeiramente negativas. Com utilização da técnica foi ainda possível determinar a carga viral das amostras coinfectadas, demonstrando baixos títulos de RNA-HEV, o que leva a resultados falso-negativos em testes menos sensíveis.

Mais estudos são necessários e questões em relação ao HEV e à sua infecção precisam ser elucidadas para que uma metodologia padrão de diagnóstico

seja estabelecida e para que os pacientes positivos para HEV sejam devidamente diagnosticados e possam receber o tratamento adequado e monitoramento, tanto para pacientes imunocompetentes como pacientes imunocomprometidos, imunossuprimidos e gestantes que sofrem com os quadros mais graves e crônicos da hepatite E.

## 6. CONCLUSÕES

- O controle interno (IPC) utilizado foi amplificado em todas as reações e foi útil para evitar resultado falso-negativo e a curva sintética de DNA foi utilizada como curva padrão para detecção da ORF3, permitindo a detecção de HEV-RNA.
- As curvas sintéticas de DNA e de RNA foram eficientes para quantificar o HEV, e podem ser utilizadas em substituição a curva de plasmídeo.
- Das 280 amostras positivas para HIV testadas, do Hospital Universitário Gaffré e Guinle do Rio de Janeiro 3,58% foram positivas para a coinfeção HIV/HEV o que representa uma prevalência intermediária de coinfeção HIV/HEV.
- Não foi encontrada relação com a presença do HEV-RNA e fatores como idade, sexo dos pacientes ou taxas de linfócitos T CD4 e T CD8 dos pacientes HIV reagentes.

## 7. PERSPECTIVAS

Visto que a população HIV positiva, devido aos tratamentos recebidos, tem se comportado como a população imunocompetente em relação à infecção por HEV, é importante que outras populações imunossuprimidas sejam estudadas para melhor compreensão do mecanismo de infecção do HEV nestes pacientes, entre elas, a população de transplantados. Além disso, é também importante que o panorama das infecções por HEV no Brasil seja estabelecido, uma vez que se trata de uma infecção subdiagnosticada, cujo real perfil pode estar subestimado. O monitoramento da população de transplantados será realizado com a utilização da técnica de RT-qPCR descrita e aperfeiçoada neste estudo. Porém, para determinação de genótipos, é importante que as técnicas de PCR qualitativa para a detecção das ORFs 1 e 2 também sejam aprimoradas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, Dubois M, Mansuy JM, Izopet J. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis e virus RNA. *J Clin Microbiol* 2012; 50:897–902.
- Aggarwal R. Hepatitis E: does it cause chronic hepatitis? *Hepatology* 2008; 48:1328-1330.
- Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24:1484–93.
- Agrawal V, Goel A, Rawat A, Naik S, Aggarwal R. Histological and immuno-histochemical features in fatal acute fulminant hepatitis E. *Indian J PatholMicrobiol* 2012;55:22–7.
- Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res* 2011;161:47–58.
- Ahmed A, Ali IA, Ghazal H, Fazili J, Nusrat S. Mystery of Hepatitis E Virus: Recent Advances in Its Diagnosis and Management. *Int J Hepatol.* 2015; 2015:872431
- Alric L, Bonnet D, Beynes-Rauzy O, Izopet J, Kamar N. Definitive clearance of chronic hepatitis E virus infection with ribavirin treatment. *Am J Gastroenterol* 2011; 106:1562–3
- Anty R, Ollier L, Peron JM, Nicand E, Cannavo I, Bongain A, et al. First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *J Clin Virol* 2012;54:76–8.
- Arankalle VA, Chobe LP. Retrospective analysis of blood transfusion recipients: evidence for post-transfusion hepatitis E. *Vox Sang* 2000;79:72–74.
- Arends JE, Ghisetti V, Irving W, Dalton HR, Izopete J, Hoepelman AIM, Salmon D. Hepatitis E: An emerging infection in high income countries. *J Clin Virol* 2014; 59
- Bader TF, Krawczynski K, Polish LB, Favorov MO. Hepatitis E in a U.S. traveler to Mexico. *N Engl J Med* 1991;325:1659.
- Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 1983;20(1):23–31.
- Baylis SA, Hanschmann KM, Blumel J, Nubling CM. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol* 2011;49:1234–9
- Baylis SA, Mizusawa S, Okada Y, Hanschmann K-MO. Collaborative study to establish as World Health Organization international standard for hepatitis E virus RNA for nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays. *WHO/BS* 2011b; 2175
- Berto A, Martelli F, Grierson S, Banks M. Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 2012a; 18:1358–60.
- Berto A, Backer JA, Mesquita JR, Nascimento MS, Banks M, Martelli F, et al. Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes* 2012b; 5:190–5
- Berto A, Grierson S, Honing RH, Martelli F, Johne R, Reetz J, Ulrich RG, Pavio N, Poel WHM, Banks M. Hepatitis E Virus in Pork Liver Sausage, France. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(2): 264–266.
- Bile K, Isse A, Mohamud O, Allebeck P, Nilsson L, Norder H, Mushahwar IK, Magnus LO. Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Oct;51 (4):466-74.
- Blasco-Perrin H, Madden RG, Stanley A, Crossan C, Hunter JG, Vine L, Lane K, Devooght-Johnson N, Mclaughlin C, Petrik J, Stableforth B, Hussaini H, Phillips M, Mansuy JM, Forrest E, Izopet J,

- Blatchford O, Scobie L, Peron JM, Dalton HR. Hepatitis E virus in patients with decompensated chronic liver disease: a prospective UK/French study. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 42 (5): 574-81.
- Bose PD, Das BC, Kumar A, et al. High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: association with hepatitis E-related poor pregnancy outcome. *J Hepatol* 2011;54: 1107–1113
- Bouwknegt M, Lodder-Verschoor F, van der Poel WH, Rutjes SA, de RodaHusman AM. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in the Netherlands. *J Food Prot* 2007;70:2889–95.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169–193
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chemistry* 2009. 55(4): 611-622.
- Cao D & Meng XJ. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerg Microbes Infect* 2012; 1(8); 17
- Center of Disease Control and Prevention. Investigation of Hepatitis E Outbreak Among Refugees — Upper Nile, South Sudan, 2012-2013. *Weekly* 2013; 62(29);581-586
- Chang Y, Wang L, Geng J, et al. Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): a study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatol Res* 2009;39:1153–1158.
- Chiao-Chain H, Nguyen D, Fernandez J, Yun KY, Fry KE, Bradley DW, Tam AW, Reyes GR. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 1992, 191(2): 550-558
- Christensen PB, Engle RE, Hjort C, et al. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. *Clin Infect Dis* 2008;47:1026–1031.
- Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De MP, Tamalet C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis* 2007;13:648–9
- Colson P, Kaba M, Moreau J, Brouqui P. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol* 2009; 45: 269–271.
- Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 2010; 202:825–34.
- Colson P, Romanet P, Moal V, Borentain P, Purgus R, Benezech A, et al. Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:1361–4
- Dalton HR, Hazeldine S, Banks M, Ijaz S, Bendall R. Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease. *Lancet* 2007; 369:1260.
- Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 2009; 361: 1025–1027.
- Dalton HR, Hunter JG, Bendall RP, Hepatitis E. *Curr Opin Infect Dis* 2013; 26:471–8.
- Davern TJ, Chalasani N, Fontana RJ, Hayashi PH, Protiva P, Kleiner DE, et al. Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology* 2011; 141:1665–72.
- Donalísio MR. Epidemias e endemias brasileiras – perspectivas da investigação científica. *Rev Bras Epidemiol* 2002; 5(3): 226-8.

- Drobeniuc J, Meng J, Reuter G, Greene-Montfort T, Khudyakova N, Dimitrova Z, et al. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin Infect Dis* 2010;51: e 24–7
- Drobeniuc J, Greene-Montfort T, Ngoc-Thao L, Mixson-Hayden TR, Ganova-Raeva L, Dong C, Novak RT, Sharapov UM, Tohme RA, Teshale E, Kamili S, Chong-Gee T. Laboratory-based Surveillance for Hepatitis E Virus Infection, United States, 2005–2012. *Emerg Infect Dis* 2013; 19 (2): 218-222
- Echevarría JM. Light and darkness: prevalence of hepatitis E virus infection among the general population. *Scientifica (Cairo)*. 2014; 2014:481016
- Emerson SU, Anderson D, Arankalle VA, Meng XJ, Purdy M, Schlauder GC, Tsarev S A. Hepevirus. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy*. VIII th Report of ICTV. Londres: Eselvier/Academic Press; 2004. 851-855.
- Fainboim H, González J, Fassio E, Martínez A, Otegui L, Eposto M, Cahn P, Marino R, Landeira G, Suaya G, Gancedo E, Castro R, Brajterman L, Laplumé H. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat*. 1999; 6(1):53-7
- Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* 2007;88:912–7
- Feldt T, Sarfo FS, Zoufaly A, Phillips RO, Burchard G, Lunzen JV, Jochum J, Chadwick D, Awasom C, Claussen L, Drosten C, Drexler JF, Eis-Hübinger AM. *J Clin Virol* 2013; 58: 18– 23
- Focaccia R, Sette Junior H, Conceicao OJ. Hepatitis E in Brazil. *Lancet*. 1995; 346(8983):1165.
- Garson JA, Grant PR, Ayliffe U, Ferns RB, Tedder RS. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. *J Virol Methods* 2005; 126 (1-2): 207-13
- Geng J, Wang L, Wang X, Fu H, Bu Q, Liu P, et al. Potential risk of zoonotic transmission from young swine to human: seroepidemiological and genetic characterization of hepatitis E virus in human and various animals in Beijing, China. *J Viral Hepat* 2011;18: 583–90.
- Gerber PF, Xiao CT, Cao D, Meng XJ, Opriessnig T. Comparison of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection of Swine Hepatitis E Virus in Fecal Samples. *J Clin Microbiol* 2014; 52(4): 1045–51
- Gerolami R, Borentain P, Raissouni F, Motte A, Solas C, Colson P. Treatment of severe acute hepatitis E by ribavirin. *J Clin Virol* 2011;52:60–2
- Goens SD, Perdue ML. Hepatitis E viruses in humans and animals. *Anim Health Res Rev* 2004;5:145–156.
- Goldsmith R, Yarbough PO, Reyes GR, Fry KE, Gabor KA, Kamel M, Amer S, Zakaria S, Gaffar Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children *The Lancet* 1992; 339 (8): 328-331
- Goyal R, Kumar A, Panda SK, Paul SB, Acharya SK. Ribavirin therapy for hepatitis E virus-induced acute on chronic liver failure: a preliminary report. *Antivir Ther* 2012:10.
- Guimarães RF, Saddi T, Pinto M, Vitral CL, Souto FJ. Hepatitis E virus antibodies in swine herds of Mato Grosso state, central Brasil. *Braz J Microbiol*. 2005; 36: 223-226.
- Gurmit K, Singh J, Ijaz S, Rockwood N, Farnworth SP, Devitt E, Atkins M, Tedder R, Nelson M. Chronic Hepatitis E as a cause for cryptogenic cirrhosis in HIV. *J Infect* 2013; 66: 103-06.
- 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 and primer-probe energy transfer. *J virol methods* 146, 226-235.

- Halac U, Beland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard J, et al. Cirrhosis due to chronic hepatitis E infection in a child post-bone marrow transplant. *J Pediatr* 2012; 160:871–4
- Harrison TJ. Hepatitis E virus - an update. *Liver*, 1999, 19(3):171-176
- He J, Hoffman SL, and Hayes CG. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structural protein gene induces immune response in mice. *Vaccine*, 1997; 15(4):357-362.
- Hepatitis E - Fact sheet N°280. OMS. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>, Acessado em 13/11/2015.
- Hepatitis E vaccine: WHO position paper – Weekly epidemiological record. OMS. 2015. No. 18, 90, 185–200.
- Herremans M, Vennema H, Bakker J, van der V, Duizer E, Benne CA, et al. Swine-like hepatitis E viruses are a cause of unexplained hepatitis in the Netherlands. *J Viral Hepat* 2007;14:140–6
- Hoernig A, Hegen B, Wingen AM, Cetiner M, Lainka E, Kathemann S, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in pediatric solid organ transplant recipients—a single-center experience. *Pediatr Transplant* 2012; 16:742–7
- Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(4):1326-32.
- Huzly D, Umhau M, Bettinger D, Cathomen T, Emmerich F, Hasselblatt P, Hengel H, Herzog R, Kappert O, Maassen S, Schorb E, Schulz-Huotari C, Thimme R, Unmüssig R, Wenzel JJ, Panning M. Transfusion-transmitted hepatitis E in Germany, 2013. *Euro Surveill* 2014; 19 (21): 1-4.
- Innis BL, Seriwatana J, Robinson RA, Shrestha MP, Yarbrough PO, Longer CF, Scott RM, Vaughn DW, Myint KSA. Quantitation of Immunoglobulin to Hepatitis E Virus by Enzyme Immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(3): 639–648.
- Ippagunta SK, Naik S, Sharma B, Aggarwal R. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J Med Virol*. 2007; 79(12):1827-31.
- Jardi R, Crespo M, Homs M, Eynde EVD, Girones R, Rodriguez-Manzano J, Caballero A, Buti M, Esteban R, Rodriguez-Frias F. HIV, HEV and cirrhosis: evidence of a possible link from eastern Spain. *HIV Med* 2012; 13: 379–383
- Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*. 2006; 131: 65–71
- Jun Z, Xue-Feng Z, Shou-Jie H, Ting W, Yue-Mei H, Zhong-Ze W, Hua W, Han-Min J, Yi-Jun W, Qiang Y, Meng G, Xiao-Hui L, Jing-Xin L, Chang-Lin Y, Quan T, Ren-Jie J, Hui-Rong P, Yi-Min L, Wai-Kuo S, Mun-Hon N, Feng-Cai Z, Ning-Shao X. Long-Term Efficacy of a Hepatitis E Vaccine. *N Engl J Med* 2015; 372:914-922
- Junge N, Pischke S, Baumann U, Goldschmidt I, Manns M, Wedemeyer H, et al. Results of single-center screening for chronic hepatitis E in children after liver transplantation and report on successful treatment with ribavirin. *Pediatr Transplant* 2013; 17:343–7.
- Kaba M, Richet H, Ravaux I, Moreau J, Poizot-Martin I, Motte A, Nicolino-Brunet C, Dignat-George F, Ménard A, Dhiver C, Brouqui P, Colson P. Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Med Virol*. 2011; 83(10):1704-16.
- Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol*, 1999b; 73: 8848-50.
- Kaci S, Nockler K, Johne R. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet Microbiol* 2008; 128:380–385.

- Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008; 358:811–7.
- Kamar N, Bendall RP, Peron JM, Cintas P, Prudhomme L, Mansuy JM, et al. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerg Infect Dis* 2011;17:173–9
- Kamar N, Weclawiak H, Guilbeau-Frugier C, Legrand-Abravanel F, Cointault O, Ribes D, et al. Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplantation* 2012a; 93:617–23.
- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al. Hepatitis E. *Lancet* 2012b; 379(9835):2477–88
- Kenfak-Foguena A, Schoni-Affolter F, Burgisser P, Witteck A, Darling KE, Kovari H et al. Hepatitis E virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(6):1074–1078
- Khudyakov Y, Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res* 2011;161:84–92.
- Korkaya H, Jameel S, Gupta D, Tyagi S, Kumar R, Zafrullah M, et al. The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. *J Biol Chem* 2001;276:42389–400.
- Crum-Cianflone NF, Curry J, Drobeniuc J, et al. Hepatitis E virus infection in HIV infected persons. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:502–506
- Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS. Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2004;85:240–4.
- Labrique AB, Kuniholm MH, Nelson KE. The global impact of hepatitis E: new horizons for an emerging virus. In: Scheld WM, Grayson ML, Hughes JM, eds. *Emerging Infections*. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2010:53–93
- Lee CK, Chau TN, Lim W, et al. Prevention of transfusion-transmitted hepatitis E by donor-initiated self exclusion. *Transfus Med* 2005;15:133–135.
- Legrand-Abravanel F, Thevenet I, Mansuy JM, Saune K, Vischi F, Peron JM, et al. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:772–4.
- Lemon SM. Hepatitis E virus. In: Mandell GL, Bennett JE, and Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:1663-1666.
- Lyra AC, Pinho JR, Silva LK, Sousa L, Saraceni CP, Braga EL, et al. HEV, TTV and GBV-C/HGV markers in patients with acute viral hepatitis. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(5):767-75
- Mansuy JM, Huynh A, Abravanel F, Recher C, Peron JM, Izopet J. Molecular evidence of patient-to-patient transmission of hepatitis E virus in a hematology ward. *Clin Infect Dis* 2009; 48:373–4.
- Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 1998; 27 (3): 857-61
- Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004;44:934–940.
- Meng XJ. Recent advances in Hepatitis E virus. *J Viral Hepat*. 2010; 17(3):153-61
- Mokhtari C, Marchadier E, Haïm-Boukobz S, Jebblaouia A, Tessé S, Savary J, Roque-Afonso AM. Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. *J Clin Virol* 2013; 58: 36–40.
- Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 2008; 80: 646-658.

- Naik A, Gupta N, Goel D, Ippagunta SK, Sharma RK, Aggarwal R. Lack of evidence of hepatitis E virus infection among renal transplant recipients in adisease-endemic area. *J Viral Hepat* 2013; 20:e138–40
- Navaneethan U, Al MM, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understandingthe pathogenesis. *Liver Int* 2008;28:1190–9.
- Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 2007;127:216–28.
- Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res* 2011;161:65–77.
- Pang L, Alencar FE, Cerutti C Jr, Milhous WK, Andrade AL, Oliveira R, et al. Short report: hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 52(4):347-8.
- Parana R, Vitvitski L, Andrade Z, Trepo C, Cotrim H, Bertillon P, et al. Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in Northeastern Brazil: etiology and natural history. *Hepatology.* 1999; 30(1):289-93.
- Paula VS, Arruda ME, Vitral CL, Gaspar AMC. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the wes-tern region of the Brazilian Amazon Basin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 1123-1128.
- Pérez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: an emerging disease. *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 22: 40–59.
- Peron JM, Dalton H, Izopet J, Kamar N. Acute autochthonous hepatitis E inwestern patients with underlying chronic liver disease: a role for ribavirin? *JHepatol* 2011;54:1323–4.
- Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2010;16:74–82.
- Politou M, Boti S, Androutsakos T, Valsami S, Pittaras T, Kapsimali V. Seroprevalence of hepatitis E in HIV infected patients in Greece. *J Med Virol* 2015; 87(9): 1517-20
- Purcell RH. Hepatitis viruses: changing patterns of human disease. In: Roizman B, eds. *Infectious diseases in an age of change.* Washington DC: National Academy Press, 1995: 59-75
- Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 2008;48:494–503.
- Renou C, Afonso AMR, Pavo N. Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus from Raw Pork Liver Sausage, France. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(11): 1945–1947.
- Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1990;247(4948):1335–9.
- Riveiro-Barciela M, Mínguez B, Gironés R, Rodríguez-Frías F, Quer J, Buti M. Phylogenetic Demonstration of Hepatitis E Infection Transmitted by Pork Meat Ingestion *J Clin Gastroenterol* 2015; 49(2): 165–168
- Rivero-Juarez A, Martinez-Dueñas L, Martinez-Peinado A, Camacho A, Cifuentes C, Gordon A, Frias M, Torre-Cisneros J, Pineda JA. High hepatitis E virus seroprevalence with absence of chronic infection in HIV-infected patients. *J Infect* 2015; 70 (6): 624-630.
- Robbins A, Lambert D, Ehrhard F, et al. Severe acute hepatitis E in an HIV infected patient: Successful treatment with ribavirin. *J Clin Virol.* 2014;60(4): 422–423
- Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, et al. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in Eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health.* 2010; 8(2):346-54.
- Said B, Ijaz S, Kafatos G, et al. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1738–1744.

Santos DC, Souto FJ, Santos DRL, Vitral CL, Gaspar AM. 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, RJ, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(5):637-40.

Santos DRL, Vitral CL, De Paula VS, Marchevsky RS, Lopes JF, Gaspar AM, Saddi TM, Júnior NC, Guimarães FR, Júnior JG, Ximenes LL, Souto FJ, Pinto MA. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J* 2009; 182(3): 474-480.

Santos DRL, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol* 2011; 149: 236-241.

Santos DRL, Oliveira Filho EF, Pinto MA. Hepatite E no Brasil e no Mundo: Revisão de Literatura. *Vet. e Zootec*. 2013; 20(3)

Sarin SK, Kumar M. Hepatitis E. *Zakim & Boyer's hepatology: a textbook of liver disease*. 5th ed; 2006. p. 693–724.

Sclair N & Schiff ER. An Update on the Hepatitis E Virus. *Curr Gastroenterol Rep* (2013) 15:304.

Shah SA, Lal A, Idrees M, Hussain A, Jeet C, Malik FA, et al. Hepatitis E virus-associated aplastic anaemia: the first case of its kind. *J Clin Virol* 2012; 54:96–7.

Silva SM, Oliveira JM, Vitral CL, Vieira KA, Pinto MA, Souto FJ. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(3):338-41

Souza AJ, Gomes-Gouvêa MS, Soares MD, Pinho JR, Malheiros AP, Carneiro LA, dos Santos DR, Pereira WL. HEV infection in swine from eastern Brazilian Amazon: evidence of co-infection by different subtypes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012; 35: 477-485.

Srivastava R, Aggarwal R, Sachdeva S, et al. Adaptive immune responses during acute uncomplicated and fulminant hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:306–311.

Stapleton JT and Lemon SM. Hepatitis A and hepatitis E. In: Hoeprich PD, Jordan MC, and Ronald AR, eds. *Infectious Diseases*, 5th ed. Philadelphia, Lippincott Co, 1994:797-800.

Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J, Fytily P, Gronert A, et al. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology* 2012; 55:695–708.

Takahashi M, Okamoto H. Features of hepatitis E virus infection in humans and animals in Japan. *Hepatology Res* 2014; 44(1):43-58.

Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185:120–31.

Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362: 371–373.

Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD. The two faces of hepatitis E virus. *Clin Infect Dis* 2010;51:328–34.

Tomiyaama D, Inoue E, Osawa Y, et al. Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yezoensis*, in Hokkaido, Japan. *J Viral Hepat* 2009;16: 524–528.

Torresi J, Johnson D. Hepatitis a and e infection in international travellers. *Curr Infect Dis Rep* 2011;13:248–55

Tourinho RS, Almeida CR, Lemos AS, Gardinali NR, Vieira YR, Schmidt-Chanasit J, De Paula VS. Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR. *J Genet Genome Res* 2015; 2(1): 1-3.

Trinta KS, Liberto MI, Paula VS, Yoshida CF, Gaspar AM. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(1):25-9.

- Troxler S, Marek A, Prokofieva I, Bilic I, Hess M. TaqMan real-time reverse transcription-PCR assay for universal detection and quantification of avian hepatitis E virus from clinical samples in the presence of a heterologous internal control RNA. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(4):1339-46
- Tsarev SA, Tsarev TS, Emerson SU, Govindarajan S, Shapiro M, Gerin JL, Purcell RH. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine*, 1997, 15(17/18):1834-1838
- Varma SP, Kumar A, Kapur N, Durgapal H, Acharya SK, Panda SK. Hepatitis E virus replication involves alternating negative- and positive-sense RNA synthesis. *J Gen Virol* 2011; 92:572–81
- Vollmer T, Knabbe C, Dreier J. Comparison of real-time PCR and antigen assays for detection of hepatitis e virus in blood donors. *J Clin Microbiol* 2014; 52(6): 2150–2156
- Wang Y, Ling R, Erker JC, Zhang H, Li H, Desai S, Mushahwar IK, Harrison TJ. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol.* 1999; 80 ( Pt 1):169-77.
- Ward P, Poitras E, Leblanc D, Letellier A, Brassard J, Plante D, Houde A. Comparative analysis of different TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 1360–1369.
- Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. *Gastroenterol* 2012; 142 (6): 1388-1397
- Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, et al. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol* 2011;52: 50–54.
- Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12986–91.
- Yarborough PO, Tam AW, Fry KE, et al. Hepatitis E Virus: identification of type-common epitopes. *J Virol.* 1991;65(11):5790–7.
- Zhang W, Shen Q, Mou J, et al. Hepatitis E virus infection among domestic animals in Eastern China. *Zoonoses Public Health* 2008;55:291–298.

## Anexo 1: Justificativa da dispensa de TCLE



CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)  
ESCOLA DE MEDICINA E CIRURGIA (EMC)  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFRÉE E GUINLE (HUGG)  
CLÍNICA MÉDICA B

Rio de Janeiro, 22 de maio de 2015.

---

### JUSTIFICATIVA PARA DISPENSA DO TCLE

Ao: Comitê de Ética em Pesquisa

Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG)

O investigador principal e demais colaboradores envolvidos no Projeto de Pesquisa **“Soroprevalência e detecção do vírus da hepatite E em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana”**, com atribuições de coletar e/ou manejar dados de pacientes (sujeitos de pesquisa) como sexo, idade, carga viral, contagem de células CD4+ e CD8+ e transaminases (TGO e TGP), solicitam ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle – HUGG, a dispensa da aplicação de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A dispensa do uso de TCLE para este Projeto de Pesquisa se fundamenta:

- ✓ Por ser um projeto de testagem sorológica em amostras de pacientes atendidos na instituição armazenadas em Biorrepositório do Laboratório de Pesquisa e Imunologia em Aids (LAPIA) da Clínica Médica B (CMB), com diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV/Aids;
- ✓ Por ser projeto que utilizará apenas parte das amostras selecionadas após aprovação do Projeto de Pesquisa “Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples em pacientes imunocomprometidos” – CAAE 11350212.3.0000.5258, em 20 de dezembro de 2012;
- ✓ Por ser um estudo transversal e retrospectivo, que empregará apenas algumas informações de prontuários médicos, sistemas de informação institucionais e/ou demais fontes de dados e informações clínicas disponíveis na instituição;
- ✓ Porque os dados serão manejados e analisados de forma anônima, sem identificação nominal dos sujeitos de pesquisa;
- ✓ Porque os resultados decorrentes do estudo serão apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação individual dos sujeitos de pesquisa;

O investigador principal e demais colaboradores envolvidos no projeto acima se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos.

Pronto para qualquer esclarecimento adicional,

Atenciosamente,

---

**Prof. Dr. Adilson José de Almeida**

Coordenador do Projeto no HUGG

---

Rua Mariz e Barros, 775 – Setor de Hematologia da Clínica Médica B (Setor Verde B-08 A – Térreo),  
CEP: 20270-004 Tijuca – Rio de Janeiro- RJ  
Tel.: 21 2264-1193 / 2264-1165

## Anexo 2: Parecer do Comitê de ética em pesquisas com seres humanos

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
GAFFREE E  
GUINLE/HUGG/UNIRIO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Soroprevalência e detecção do vírus da hepatite E em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana

**Pesquisador:** Adilson José de Almeida

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 46165015.4.0000.5258

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.223.309

#### Apresentação do Projeto:

Projeto retrospectivo de corte transversal que avaliará a soroprevalência do vírus da Hepatite E em pacientes infectados pelo HIV. Esta análise será feita por meio da detecção dos anticorpos anti-vírus da hepatite E associado a pesquisa PCR para o mesmo vírus, que segundo a literatura é mais sensível. Serão utilizadas as amostras de pacientes HIV de outro projeto que foram armazenadas em biorepositório do laboratório de Pesquisa em Imunologia e AIDS do HUGG, não serão coletadas novas amostras de sangue para a pesquisa, além de se utilizarem os dados epidemiológicos armazenados na pesquisa anteriormente realizada.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Estimar a soroprevalência de anticorpos anti-HEV e otimizar a técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico molecular da hepatite E em

pacientes com HIV/Aids que foram atendidos em uma unidade de saúde no Rio de Janeiro, Brasil.

**Objetivo Secundário:**

1.Estabelecer uma curva sintética para quantificação e detecção de HEV-RNA em amostras de soro de pacientes com HIV/Aids;2.Otimizar a técnica

de PCR em tempo real para detecção e quantificação do HEV-RNA por meio da análise comparativa

**Endereço:** Rua Mariz e Barros nº 775

**Bairro:** Tijuca

**CEP:** 22.270-004

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)1264-5317

**Fax:** (21)1264-5177

**E-mail:** cephugg@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.223.309

de diferentes controles internos para evitar resultados falso-negativos na detecção do HEV-RNA em amostras de soro de pacientes com HIV/Aids.3. Estimar a soroprevalência de anticorpos anti-HEV em amostras de soro de pacientes com HIV/Aids;4. Estimar a prevalência de HEV-RNA em amostras de soro de pacientes com HIV/Aids;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são inerentes a manipulação dos dados coletados anteriormente e os que serão gerados neste trabalho. Não haverá contato dos pacientes com os pesquisadores nesta pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto bastante interessante, versa sobre um ponto obscuro das doenças virais, visto que o vírus da hepatite E é de difícil diagnóstico. O projeto é muito bem estruturado, será feito em conjunto e com a anuência do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As amostras foram coletadas e armazenadas no Biorepositório do LAPIA - HUGG, cujo o regulamento já foi aprovado pelo CEP HUGG. A hipótese é de que se valide a detecção do vírus da Hepatite E e que seja estimada uma soroprevalência entre os pacientes portadores do vírus HIV. O orçamento e o cronograma estão bem descritos, inclusive com a citação da fonte de financiamento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Há justificativa bem fundamentada para a ausência do TCLE.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Parecer_CEP-HUGG_Biorepositorio_LAPIA.jpg	12/06/2015 16:41:36		Aceito
Outros	Justificativa_Dispensa_TCLE_Projeto_HIV-HEV.doc	12/06/2015 16:42:28		Aceito

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775  
Bairro: Tijuca CEP: 22.270-004  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)1264-5317 Fax: (21)1264-5177 E-mail: cephugg@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
GAFFREE E  
GUINLE/HUGG/UNIRIO



Continuação do Parecer: 1.223.309

Outros	Declaracao_Anuencia-LDTV_Projeto_HIV-HEV-2015.PDF	12/06/2015 16:42:57		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP-HUGG_Coinf_HIV-HEV_16-Junho-2015.doc	16/06/2015 07:43:27		Acelto
Folha de Rosto	Folha_rosto_Projeto_HIV-HEV-2015.jpg	16/06/2015 07:46:49		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_537091.pdf	16/06/2015 07:47:20		Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 11 de Setembro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Pedro Eder Portari Filho**  
(Coordenador)