

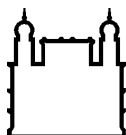
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**HEPATITE E EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E
IMUNOSSUPRIMIDOS**

ANDREZA SALVIO LEMOS

Rio de Janeiro
Dezembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ANDREZA SALVIO LEMOS

HEPATITE E EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOSSUPRIMIDOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2019

Salvio Lemos, Andreza.

Hepatite E em pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos /
Andreza Salvio Lemos. - Rio de Janeiro, 2019.
115 f.

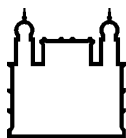
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia
Parasitária, 2019.

Orientadora: Vanessa Salete de Paula.

Bibliografia: f. 83-98

1. hepatite E. 2. Epidemiologia. 3. Virologia. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: ANDREZA SALVIO LEMOS

**HEPATITE E EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E
IMUNOSSUPRIMIDOS**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Cristiana Couto Garcia (IOC/Fiocruz) - Presidente

Profa. Dra. Luciane Almeida Amado (IOC/Fiocruz)

Profa. Dra. Carmen Baur Vieira (UFF)

Profa. Dra. Renata Carvalho de Oliveira Pires dos Santos (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. Rafael Brandão Varella (UFF)

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais pelo apoio e afeto apesar da distância, sempre posso contar com eles. Também à Luana, minha irmã, pelas brigas, conselhos, paciência e ajuda nos momentos mais atarefados, principalmente.

Agradeço à Dra. Vanessa De Paula por me guiar durante toda essa jornada acadêmica até aqui, agradeço também por todas as conversas, aprendizado, apoio, amizade e parceria.

Agradeço também à equipe do LVM, uma família acadêmica cheia de mentes curiosas e agitadas, da qual faço parte. Agradeço pelo apoio e companheirismo em todas as horas e pela amizade, principalmente a Camilla e Amanda, minhas companheiras de ciência desde o IC.

Também sou muito grata a todo o grupo do LDTV, pelo apoio, onde dei início a este projeto, especialmente, ao Dr. Marcelo Alves e a Dra Jaqueline De Oliveira pelos experimentos realizados em conjunto e pelas discussões tão produtivas de artigos.

Agradeço também aos grupos com os quais realizamos colaborações durante o projeto e que foram essenciais para seu desenvolvimento.

Meus agradecimentos também se estendem à FIOCRUZ, a todo o Instituto Oswaldo Cruz, e sua direção, e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária pelos recursos para meu desenvolvimento acadêmico e desenvolvimento desta tese. Além disso, como representante discente da APG eu aprendi muito em parceria com a instituição.

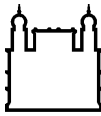
Além disso, agradeço aos professores participantes da banca e à revisora pelas sugestões e críticas construtivas na construção desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, ao IOC e ao PPG-BP pelo auxílio financeiro na bolsa e financiamento de organização e participação em eventos.

Por fim, agradeço aos meus amigos, às minhas famílias materiais e de coração, por toda a paciência, compreensão, apoio, amizade, ombro e ânimo durante todo o período de desenvolvimento deste projeto. Agradeço também aos orixás por não me desampararem mesmo nos momentos de maior tensão. Ashé!

“Nada é estático, nada é definitivo, tudo é mantido provisoriamente.”

(Jocelyn B Burnell)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HEPATITE E EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOSSUPRIMIDOS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Andreza Salvio Lemos

O vírus da hepatite E (HEV) é o agente etiológico de hepatite humana mais recentemente descrito no Brasil, sendo responsável por hepatite crônica e cirrose em indivíduos imunocomprometidos. Como grupos imunossuprimidos relevantes, temos os doentes renais crônicos dependentes de hemodiálise (HD), um grupo cada vez maior e mais exposto a infecções por HEV. Além destes pacientes HD, temos os transplantados renais, um grupo também crescente no Brasil, para o qual o tacrolimo é incluído como protocolo imunossupressor e conhecido por estimular a replicação do HEV em receptores de órgãos. Assim, entender a influência da terapia com tacrolimo na prevalência de infecção por HEV em pacientes transplantados renais é fundamental para a adoção de medidas preventivas específicas. No entanto, dados consistentes não estão disponíveis sobre estas prevalências de HEV em populações imunocomprometidas no Brasil. Assim, a prevalência de HEV foi investigada em amostras de soro de 280 pacientes HIV positivos do Rio de Janeiro e em amostras de plasma de 286 pacientes HD do sudeste e nordeste do Brasil, 316 transplantados renais do Centro-Oeste em colaboração com a Universidade Federal de Goiás e em 50 doadores de sangue do HEMORIO. Além disso, 50 pacientes transplantados renais foram acompanhados durante 01 ano ($t = 0, 3, 6, 9, 12$ meses) após o transplante e início da imunossupressão, totalizando em 250 amostras de plasma. Todas as amostras foram analisadas quanto a presença de anticorpos anti-HEV IgG e à detecção de RNA genômico do HEV (HEV-RNA). A soroprevalência encontrada entre os pacientes em hemodiálise foi de 24,48%, considerada média em relação a pacientes HD descritos na literatura e alta em relação à população geral. Fatores como baixa renda familiar e longos períodos em hemodiálise representaram tendências em relação à presença de anticorpos anti-HEV IgG. Além disso, níveis mais baixos de fósforo foram associados como fatores de risco para positividade para anti-HEV IgG. No grupo de transplantados do Centro-Oeste, a soroprevalência encontrada foi de 2,5% sem diferenças epidemiológicas relevantes entre os grupos anti-HEV positivo e negativo e sem fatores de risco associados. No grupo de transplantados renais acompanhados por um ano, foi encontrada prevalência de 16% (8/50) no primeiro momento da coleta ($t = 1$ mês) e prevalência de 20% (10/50) no último momento do estudo ($t = 12$ meses), sugerindo a conversão de dois pacientes no intervalo de 1 ano após o transplante. Finalmente, entre os doadores de sangue a prevalência foi de 6% (3/50). Entre pacientes HIV positivos, a prevalência encontrada foi de 0%, neste grupo o HEV-RNA foi detectado em 3,6% dos pacientes, enquanto esta detecção não ocorreu nos outros grupos estudados. Esses resultados mostram como a prevalência do HEV pode variar de acordo com a região estudada e com o grupo estudado, sendo especialmente importante entre pacientes dependentes de hemodiálise e transplantados. Além disso, nossos resultados justificam e reforçam o monitoramento constante e a aplicação de medidas preventivas destes grupos e de doadores de sangue, cujas bolsas poderão ser aplicadas em pacientes de risco para o desenvolvimento de hepatite E crônica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HEPATITIS E AMONG IMMUNOCOMPROMISED AND IMMUNOSUPPRESSED PATIENTS

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITARY BIOLOGY

Andreza Salvio Lemos

Zoonotic hepatitis E virus (HEV) is the most recently described etiological agent of human hepatitis in Brazil, being responsible for chronic hepatitis and cirrhosis in immunocompromised people. Relevant immunosuppressed groups include chronic kidney disease hemodialysis-dependent (HD) patients, a growing group that is more exposed to HEV infections. In addition to these HD patients, the renal transplanted patients also represent a growing group in Brazil, for which tacrolimus is currently applied as the main immunosuppressive therapy. This immunosuppressant is known to stimulate HEV replication in organ receptors. Thus, understanding the influence of this therapy on the chronic HEV infection in kidney transplanted patients is crucial for the adoption of specific preventive measures. However, consistent data are not available on these prevalence of HEV in immunocompromised populations in Brazil. Thus, the prevalence of HEV was investigated in serum samples from 280 HIV-positive patients from Rio de Janeiro and in plasma samples of 286 HD patients from southeastern and northeastern Brazil, 316 of renal transplant recipients from the Midwest, in collaboration with the Federal University of Goiás, and in 50 blood donors from the HEMORIO. In addition, 50 kidney-transplanted patients were followed-up for 1 year ($t = 1, 3, 6, 9, 12$ months) after transplantation and onset of immunosuppression, totaling 250 plasma samples. All samples were analyzed for anti-HEV IgG and detection of HEV genomic RNA (HEV-RNA). The prevalence among hemodialysis patients was 24.48%, which is consistent with seroprevalence in HD patients from other countries, and is high, when compared to the general population. Factors such as low family income and long period of hemodialysis represent trends regarding the presence of anti-HEV IgG antibodies. In addition, lower phosphate levels were associated as risk factors for anti-HEV IgG positivity. In the Midwest transplanted group, the seroprevalence was 2.5% with no relevant epidemiological differences between the positive and negative anti-HEV groups and no associated risk factors. Among the kidney-transplanted recipients followed for one year, the prevalence of 16% (8/50) was found at the first moment of collection ($t = 1$ month) and a prevalence of 20% (10/50) at the last studied moment ($t = 12$ months), suggesting the seroconversion of two patients within the first year after transplantation. Finally, among the blood donors, the prevalence found was of 6% (3/50). Among HIV positive patients, the prevalence found was 0%, in this group HEV-RNA was detected in 3.6% of patients, while this detection did not occur in the other groups studied. These results show how the prevalence of HEV may vary according to the region of Brazil and the studied group, being especially important among hemodialysis-dependent and kidney-transplanted patients. In addition, our results justify and reinforce the constant monitoring and application of preventive measures to these groups and among blood donors, whose blood bags may be applied to at risk patients for developing chronic hepatitis E.

SUMÁRIO	
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hepatites Virais	1
1.1.1. Histórico das Hepatites Virais.....	2
1.1.2. Vírus da hepatite E.....	5
1.1.3. Estrutura genômica do vírus da hepatite E.....	7
1.1.4. Replicação.....	8
1.1.5. Genótipos.....	10
1.1.6. Epidemiologia.....	13
1.1.7. Transmissão e Profilaxia.....	15
1.1.8. Manifestações Clínicas.....	17
1.1.9. Tratamento.....	20
1.1.10. Diagnóstico.....	22
1.2. Doença Renal Crônica	26
1.2.1. Transplante Renal e Imunossupressão.....	27
1.2.2. Tacrolimo e a Infecção por HEV.....	31
1.3. Justificativa	32
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos Específicos.....	33
3. RESULTADOS	34
3.1. ARTIGO 1 (métodos). Detection and quantification of hepatitis E virus in the absence of IgG and IgM anti-HEV in HIV positive patients.....	35
3.2. ARTIGO 2. Elevated exposition to hepatitis E in chronic kidney disease patients under hemodialysis in Brazil.....	43
3.3. ARTIGO 3. Prevalence of hepatitis E virus RNA and antibodies in a cohort of kidney transplant recipients in Central Brazil.....	54
3.4. ARTIGO 4 (em submissão). Hepatitis E virus prevalence among kidney transplanted population immunosuppressed by tacrolimus in Brazil.....	57
4. DISCUSSÃO	69
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
7. ANEXOS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografia eletrônica de contraste negativo de vírions do vírus da hepatite E em fezes coletadas no Nepal.....	6
Figura 2: Estrutura cristalina da partícula virus-like (VLP) do vírus da hepatite E.....	6
Figura 3: Estrutura do vírus da hepatite E sem envelope contendo capsídeo e RNA genômico e em sua forma quasi-envelopado (eHEV) em que o vírus é envolto por uma membrana exossomal.....	6
Figura 4: Estrutura genômica do vírus da hepatite E dividido por ORFs.....	7
Figura 5: Replicação esquematizada do vírus da hepatite E no interior do hepatócito e sua liberação como partículas virais não envelopadas e quase-envelopadas.....	9
Figura 6: Árvore filogenética contendo os quatro genótipos do vírus da hepatite E que infecta humanos (HEV1, HEV2, HEV3 e HEV4) e de outros vírus do gênero <i>Orthohepevirus</i> que infectam outros mamíferos e aves.....	12
Figura 7: Mapa mundi apresentando as diferenças de prevalência do HEV em diversos países. Em verde escuro, regiões de alta endemicidade.....	14
Figura 8: Distribuição epidemiológica do vírus da hepatite E no Brasil.....	15
Figura 9: Principais vias de transmissão do vírus da hepatite E entre humanos e de forma zoonótica.....	16
Figura 10: Atualização das recomendações de tratamento da infecção pelo HEV	22
Figura 11: Inibição da via das calcineurinas pelo imunossupressor Tacrolimo.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genótipos de Hepatite E que infectam humanos e suas características.....	12
Tabela 2: Sumário de detecção de HEV-RNA e anti-HEV IgM e IgG, em dias pós infecção (dpi).....	20
Tabela 3: Diferentes taxas de filtração glomerular em relação aos diferentes estágios de doença renal crônica e a presença ou não de proteinúria.....	27

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Artigo 1: Levels of Plasma Cytokines in individuals with acute, chronic and occult hepatitis B.....98

Anexo 2: Artigo 2: Simultaneous detection of human herpesviruses in HIV-infected patients by differential diagnosis.....99

LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
>	Maior que
=	Igual
2CMC	2'-C-metilcitidina
aa	Aminoácidos
a.C.	Antes de Cristo
ACLF	Insuficiência hepática crônica agudizada (<i>Acute-on-chronic liver failure</i>)
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CDR	Clínica de Doenças Renais
CE	Ceará
CET-HSFA	Centro Estadual de Transplantes do Hospital São Francisco de Assis
CT	Cycle Threshold
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Fita dupla de DNA (<i>Double strand</i>)
DRC	Doença Renal Crônica
eHEV	HEV quasi-envelopado
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FHF	Falência Hepática Fulminante
FKBP12	Proteína 12 de Ligação da Imunofilina FK
HAV	Vírus da Hepatite A
HBV	Vírus da Hepatite B
HBSAg	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HDV	Vírus da Hepatite Delta
HD	Dependente de hemodiálise (<i>hemodialysis-dependent</i>)
HEV	Vírus da Hepatite E

HEV1	Genótipo 1 do Vírus da Hepatite E
HEV2	Genótipo 2 do Vírus da Hepatite E
HEV3	Genótipo 3 do Vírus da Hepatite E
HEV4	Genótipo 4 do Vírus da Hepatite E
HEV5	Genótipo 5 do Vírus da Hepatite E
HEV7	Genótipo 7 do Vírus da Hepatite E
HEV-RNA	Ácido ribonucleico genômico do Vírus da Hepatite E
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSC70	Forma constitutiva do gene da Proteína do Choque Térmico de 70kDa
HSPGs	Proteoglicanos de Sulfato de Heparano de Superfície
HTLV	Vírus linfotrópico da célula T humana
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IL-2	Interleucina 2
IFN-peg	Interferon peguilado
INQUE	Instituto Nefrológico de Queimados
IPC	Controle Interno Positivo (<i>Internal Positive Control</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	Quilobase
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitogênio (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por Quilograma
mL/min	Mililitro por Minuto
mm ³	Milímetros cúbicos
mTOR	Alvo de mamíferos de rapamicina (<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>)
nm	Nanômetro
NOhep	No hepatitis
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Região de leitura aberta (<i>Open reading frame</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pORF 3	Proteína da ORF 3

PTH	Hormônio da Paratireoide
qPCR	PCR quantitativo
Rdrp	RNA polimerase RNA-dependente
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	PCR quantitativa de transcrição reversa
RT-PCR	PCR de transcrição reversa
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
SOT	Transplantado de órgão sólido (<i>Solid Organ Transplanted</i>)
ssRNA	RNA de Fita Simples (<i>Single Strand</i>)
t	Tempo
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TGP	Transaminase Glutâmico-Pirúvica
VLP	Partículas semelhantes a vírus (<i>virus-like particles</i>)
UI/mL	Unidades internacionais por mililitro
UTR	Regiões não-traduzidas (<i>Untranslated region</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hepatites virais

Hepatites são doenças que desencadeiam um processo inflamatório no tecido hepático e podem derivar de diversas causas, entre elas, agentes patogênicos. As hepatites virais são as principais hepatites descritas e apresentam como agentes etiológicos vírus hepatotrópicos que apresentam características clínicas semelhantes, porém com particularidades epidemiológicas e laboratoriais, com distribuições geográficas variadas e alguns sintomas diferenciados entre elas, como coceira ou sangramento do esôfago, por exemplo (SAÚDE, 2018). Atualmente, cinco vírus são descritos como agentes de hepatites em humanos, todos capazes de causar infecções agudas no fígado. São eles: HAV, o vírus da hepatite A; HBV, o vírus da hepatite B; HCV, vírus da hepatite C; HDV, vírus da hepatite Delta e o HEV, o vírus da hepatite E (OMS, 2019). Elas são de grande importância pelo número de pessoas atingidas e, principalmente, pela possibilidade de complicações como formas agudas graves de médio e longo prazo, casos crônicos – que podem culminar em cirrose e carcinoma hepatocelular – e casos fulminantes, que podem demandar transplante hepático (SAÚDE, 2018).

As hepatites virais são consideradas um importante problema mundial de saúde pública, sendo responsáveis por 1,34 milhões de mortes em 2015. Este número pode ser comparado ao de mortes anuais por tuberculose e é ainda superior ao de mortes causadas por HIV (vírus da imunodeficiência humana). Isso acontece porque, enquanto a mortalidade por HIV e tuberculose tem diminuído com o passar dos anos, as taxas de mortalidade por hepatites virais vem crescendo. A maioria das mortes causadas por hepatites virais ocorre devido à doença hepática crônica, com 720 mil mortes por cirrose e 470 mil mortes por carcinoma hepatocelular (OMS, 2018). Essas mortes poderiam ser evitadas. Para tanto, em 28 de julho de 2016, o Dia Mundial de Luta contra as Hepatites Virais, a Organização Mundial da Saúde, em compromisso com 194 países, lançou o movimento mundial intitulado NOhep (*No hepatitis*). Este movimento visa eliminar as hepatites virais como ameaças à saúde pública até 2030, incluindo a redução de 90% de novas infecções por HBV e HCV e a redução em 65% de mortalidade relacionada às hepatites B e C, em comparação com os dados de 2015 (NOHEP, 2019).

1.1.1. Histórico das Hepatites Virais

As hepatites virais vêm sendo descritas desde os primórdios das civilizações, com quadros de icterícia e afins descritos há 5000 anos na China, surtos descritos na Babilônia há mais de 2500 anos. Hipócrates, em 300-400 a.C. já suspeitava e investigava a origem infecciosa dessa icterícia e que, provavelmente, ela estaria relacionada a uma inflamação hepática (FONSECA, 2010; HOLLINGER, 1994; REUBEN, 2002).

Assim, com o passar dos séculos, diversos surtos foram descritos de “icterícia contagiosa”, antes da aplicação do termo “hepatite” que apenas surgiu em 1725 nos trabalhos científicos publicados por Bianchi JB. Entre estes surtos podemos destacar alguns como o descrito em 752 e conhecido como surto de Mainz (Alemanha); o de 1743 durante a guerra de Sucessão Austríaca; o surto de 1798 durante a invasão de Napoleão ao Egito; e o que ocorreu entre 1861 e 1865 durante a Secessão Americana, entre diversos outros (FONSECA, 2010; REUBEN, 2002). Vêm sendo descritos, desde que se sabe, surtos ou casos isolados de icterícias infecciosas tanto em regiões continentais quanto em regiões insulares. Os relatos de ocorrências de hepatites no Brasil foram escassos até o século XIX, porém há uma urna funerária de origem indígena Aruak, datada do início da colonização do Brasil por portugueses em que se encontra uma representação de nativo com sinais relacionados à cirrose hepática (REUBEN, 2002).

Um surto de icterícia nos Estados Unidos, ocorrido entre 1 e 4 meses após transfusão de sangue ou plasma, levou à introdução, em 1947, dos termos hepatite A e hepatite B por MacCallum. Esta classificação foi baseada em diferenças epidemiológicas observadas entre “icterícia infecciosa” e “icterícia por soro homólogo”. Os termos foram posteriormente aceitos e aderidos pela Organização Mundial da Saúde (HOLLINGER, 1994). Então, em 1965, já começaram a ser descritos os antígenos do HBV (Vírus da hepatite B), como o HBSAg, importante marcador de infecção por HBV (BLUMBERG et al., 1967).

Entre os anos 70 e 80, pesquisadores americanos finalmente visualizaram partículas do HAV (Vírus da hepatite A) em fezes de pacientes, através da microscopia eletrônica, confirmando a etiologia viral da infecção (FEINSTONE; KAPIKIAN; PURCELI, 1973). Em 1977, Rizzetto et al descreveram, por acaso, pela primeira vez os antígenos e anticorpos do vírus da hepatite delta (HDV) e sua associação ao HBV (RIZZETTO et al., 1977). Em 1989, a infecção antes descrita como hepatite não-A não-B, com perfil semelhante à hepatite B, teve seu agente

etiológico descrito como vírus da hepatite C, através da utilização de técnicas moleculares (CHOO et al., 1989; HOUGHTON, 2009).

Já nos anos de 1950, sabia-se que havia uma hepatite que não era A, não era B, mas tinha seus sintomas parecidos com a hepatite A. Também era descrita a transmissão deste agente etiológico como fecal-oral, principalmente de veiculação hídrica como principal meio de infecção. A epidemiologia e as características clínicas desta infecção hepática, então de agente etiológico desconhecido, diferenciavam-se das descritas para as hepatites A e B, mesmo mantendo suas semelhanças com a hepatite A na transmissão entérica e manifestação clínica (MUSHAHWAR, 2008).

A descoberta do vírus da hepatite E é considerada recente quando comparada a de outros vírus causadores de hepatites e ocorreu apenas em 1983 por Balayan, durante uma investigação de surto prévio seguindo o perfil de hepatite não-A, não-B, semelhante à hepatite A, ainda sem etiologia conhecida. Para chegar a um diagnóstico, um voluntário humano, o próprio Balayan, foi submetido à infecção aguda por HEV através da ingestão de um pool de fezes vindas de um paciente agudo do surto estudado por ele. Como esperado, suas amostras foram negativas para marcadores de HAV e HBV, já descritos na época. Além disso, partículas *virus-like* foram visualizadas nas amostras fecais de Balayan coletadas tanto em fases pré-clínica e pós-clínica, por microscópio eletrônico (27 nm – 32 nm), confirmando sua etiologia viral (BALAYAN et al., 1983).

Ainda neste estudo, Balayan e colaboradores também realizaram esta infecção experimental em primatas *Cynomolgus* com a utilização de extratos de fezes humanas contaminadas por HEV, até então descrito apenas como vírus da hepatite não-A não-B. Nos animais infectados, o mesmo perfil de quadro agudo foi observado e confirmado por estudos histológicos e enzimáticos. Além disso, também foi detectada, em relação a estes animais, a liberação de partículas virais nas fezes e a produção de anticorpos (BALAYAN et al., 1983).

As diferenças epidemiológicas puderam ser observadas em grandes surtos de hepatite aguda de etiologia desconhecida, como o surto da Somália, em 1988. Este surto foi de grande importância para a realização de estudos para a determinação de seu agente etiológico, no qual 11.413 indivíduos apresentaram hepatite aguda, com maior incidência entre mulheres e jovens. Dentre os casos, foram relatados 146 óbitos (13%), principalmente entre gestantes. Com a maioria da população infectada vivendo em vilas que eram abastecidas pelo mesmo rio, a transmissão entérica foi sugerida ainda sem agente etiológico definido. Apenas 5 anos após este surto, os

dados e amostras coletados foram analisados novamente e publicados, demonstrando que o vírus da hepatite E foi o agente causador do surto (BILE et al., 1994).

Em 1990, ocorreu finalmente a clonagem do HEV por Reyes e seus colaboradores, quando enfim o vírus recebeu o nome de vírus da hepatite E. Seus experimentos levaram à descoberta do vírus em si, através da clonagem molecular e transmissão experimental em primatas não-humanos (REYES et al., 1990). Em 1991, o primeiro teste sorológico para a detecção de infecções por HEV foi desenvolvido e produzido por Yarbough e seus colaboradores (YARBOUGH et al., 1991).

Entre 1991 e 1992, diversos grupos dedicaram-se aos estudos e publicações sobre a organização genômica e expressão gênica do vírus da hepatite E. Com a melhor compreensão deste vírus, pode-se isolá-lo em diferentes animais, principalmente suínos, o que sugeriu então a origem zoonótica desta infecção assim como esta possível forma de transmissão (GOLDSMITH et al., 1992; HUANG et al., 1992).

Ainda hoje, surtos relacionados à carência de infraestrutura sanitária, de saneamento e de medidas de higiene ocorrem em regiões de circulação dos genótipos 1 e 2 do vírus da hepatite E (os quais discutiremos posteriormente), como o surto do Sudão em 2013, com alto grau de mortalidade e morbidade (CDC; PREVENTION, 2013).

Mais recentemente, o HEV tem sido descrito como causador de hepatite crônica em pacientes imunossuprimidos, como por exemplo, os pacientes transplantados. Para melhor compreender essa questão, Aggarwal e colaboradores, em 2008, desenvolveram um estudo que incluiu 14 casos identificados de infecção aguda por HEV entre pacientes transplantados (3 de transplante hepático, 9 de transplante renal e 2 de transplantes duplos de pâncreas e rins). Em todas as amostras foi detectado o RNA genômico do vírus da hepatite E (HEV-RNA) para confirmação de etiologia da infecção. Durante o acompanhamento dos pacientes, o desenvolvimento de infecção crônica ocorreu em 8 deles, a qual foi confirmada pelos níveis persistentes e elevados de aminotransferases, pela presença contínua de HEV-RNA no soro dos pacientes por mais de 3 meses e através estudos histológicos com presença ou não de anticorpos anti-HEV no soro (AGGARWAL, 2008; KAMAR et al., 2013; WEBB; DALTON, 2019).

1.1.2. Vírus da Hepatite E

De acordo com a classificação atual do ICTV (International Committee on Taxonomy of Virus), o vírus da hepatite E é classificado como a espécie *Orthohepevirus A*, do gênero *Orthohepevirus* e da família Hepeviridae (PURDY et al., 2017). A família Hepeviridae inclui pequenos vírus de genoma de RNA de polaridade positiva, não-envelopados e de transmissão entérica, sendo dividida em 2 gêneros e incluindo 5 espécies ao todo. O gênero *Piscihepevirus*, cujos membros infectam trutas e o gênero *Orthohepevirus*, cujos membros infectam mamíferos e aves (PURDY et al., 2017). O HEV é semelhante aos membros da família Caliciviridae com base na sua organização genômica e na morfologia estrutural de superfície, como já foi revelado por microscopia eletrônica (BRADLEY, 1990). No entanto, os membros das duas famílias apresentam uma baixa homologia de sequência e a estrutura cap 5' na extremidade do genoma do HEV está ausente nos calicivírus (KELLY; NETZLER; WHITE, 2016). Os vírions de HEV são partículas esféricas icosaédricas, sem envelope, com um diâmetro de aproximadamente 27–34 nm (Fig. 1) (BRADLEY, 1990). O capsídeo é formado por capsômeros que consistem em homodímeros de uma única proteína do capsídeo, formando o invólucro do vírus. Esta principal proteína do capsídeo liga-se aos proteoglicanos de sulfato de heparano de superfície (HSPGs) das células do fígado e é processada proteoliticamente (KALIA et al., 2009). Cada proteína do capsídeo contém três domínios lineares que formam elementos estruturais distintos: S (o capsídeo contínuo), P1 (protrusões de três dobras) e P2 (pontas duplas), que inclui epítopos neutralizantes (Fig. 2). Cada um desses domínios contém um suposto sítio de ligação a polissacarídeos que pode interagir com os receptores celulares (MORI; MATSUURA, 2011). Além disso, mutações nos sítios de glicosilação da proteína do capsídeo impedem a formação de partículas virais infecciosas, embora o efeito letal se deva à estrutura proteica alterada e não à eliminação da glicosilação (GRAFF et al., 2008).

Em relação aos aspectos lipídicos, embora o HEV seja eliminado nas fezes como um vírus não-envelopado, há evidências de que, como o HAV, ele possa sequestrar membranas das células hospedeiras durante a montagem e a saída, chamada de membrana exossomal. A posse de um envelope derivado do hospedeiro pode permitir que o vírus circule pelo sangue do paciente, escapando da detecção de anticorpos neutralizantes (YIN; LI; FENG, 2016) (Fig.3).

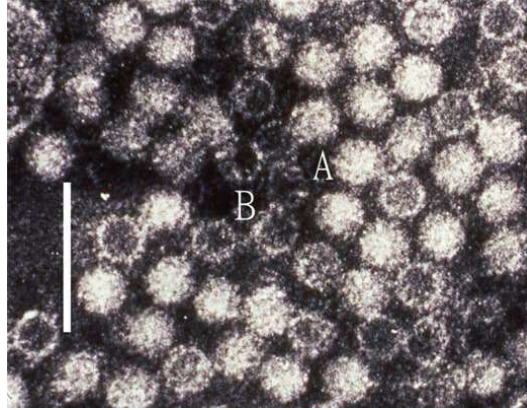


Figura 1: Micrografia eletrônica de contraste negativo de vírions do vírus da hepatite E em fezes coletadas no Nepal. (A) vírion e (B) capsídeo vazio. A barra representa 100nm (PURDY et al., 2017).

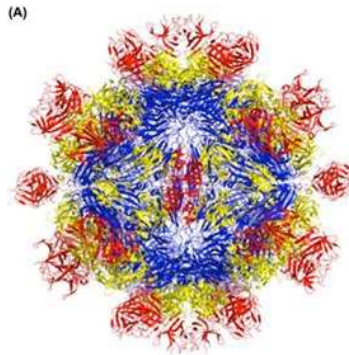


Figura 2: Estrutura cristalina da partícula *virus-like* (VLP) do vírus da hepatite E. Os três domínios: S, P1 e P2 em azul, amarelo e vermelho, respectivamente (Adaptado de: GUU et al., 2009).

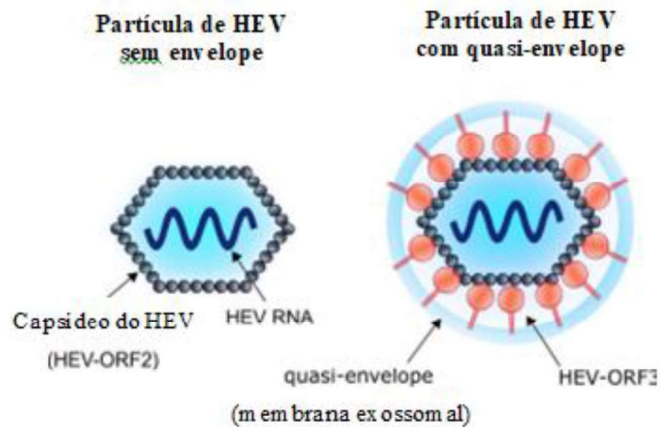


Figura 3: Estrutura do vírus da hepatite E sem envelope contendo capsídeo e RNA genômico e em sua forma quasi-envelopado (eHEV) em que o vírus é envolto por uma membrana exossomal (Adaptado de: HIMMELSBACH; BENDER; HILDT, 2018).

1.1.3. Estrutura genômica do vírus da hepatite E

O genoma do HEV é constituído por uma molécula de ssRNA linear (*single strand ribonucleic acid* - Ácido ribonucleico de fita simples) de polaridade positiva, com aproximadamente 6,6 - 7,2 kb (quilobases), apresentando uma estrutura de cap 5'-metilguanina em uma extremidade e uma cauda poli-A 3' na outra. Além disso, este genoma é dividido em 3 ORFs (Regiões de leitura aberta – *Open Reading frames*): 1, 2 e 3 (Fig. 4), com as proteínas não-estruturais codificadas em direção à extremidade 5' e com as proteínas estruturais em direção à extremidade 3' (PURDY et al., 2017). Esta região 5' não traduzida (UTR – *Untranslated region*) tem aproximadamente 34 nucleotídeos de comprimento entre os *Orthohepevirus A* e sua estrutura de cap 5'-metilguanina apresenta um papel importante para o início da replicação viral (AHMAD; HOLLA; JAMEEL, 2011).

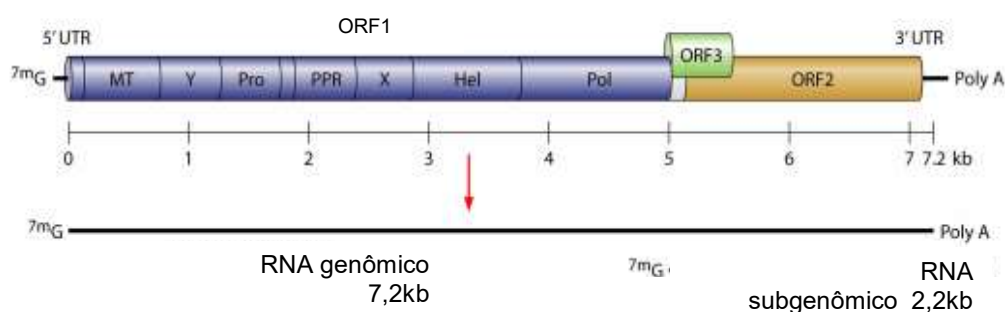


Figura 4: Estrutura genômica do vírus da hepatite E dividido por ORFs: ORF1 em Azul, ORF2 em Amarelo e ORF3 em Verde. Domínios da ORF1: MT- metiltransferase; domínio Y; cisteína-protease (Pro); região hipervariável rica em prolina (PPR); domínio X; RNA-helicase (Hel); RNA-polimerase RNA-dependente (Pol). (Adaptado de: KAMAR et al., 2014).

A ORF1 apresenta 5 kb e está localizada em direção à terminação 5' do RNA genômico. Esta ORF codifica uma poliproteína de 1690 aas (aminoácidos), que sofrerá clivagem pós-traducional em múltiplas proteínas não estruturais que são essenciais para a replicação viral. Entre estas proteínas, temos a metiltransferase, a RNA helicase e a RNA polimerase RNA-dependente (CAO; MENG, 2012; HARRISON, T. J., 1999; HE; HOFFMAN; HAYES, 1997; LEMON; WALKER, 2019; PURCELL, 1994).

Ainda na ORF1, uma região hipervariável (PPR) situa-se entre os domínios de protease (Pro) e helicase (Hel) (Fig. 4). A região hipervariável contém duas sub-regiões: a metade amino-terminal desta região consiste em um polipeptídeo de

comprimento variável com a conservação da sequência espécie específica de acordo com o hospedeiro, o que é exclusivo dos *Hepeviridae* e pode estar relacionado à especificidade em relação ao hospedeiro desses vírus (KELLY et al., 2016; LARA; PURDY; KHUDYAKOV, 2014).

A ORF2 localiza-se na extremidade 3' sem se sobrepor à ORF1. Ela codifica a principal proteína estrutural: A Proteína do Capsídeo, com 660 aas (CAO; MENG, 2012; HARRISON, T. J., 1999; HE et al., 1997; LEMON; WALKER, 2019; PURCELL, 1994; TSAREV et al., 1997).

Finalmente, a ORF3 é a menor região de leitura, sendo sobreposta à ORF2. Esta ORF codifica uma pequena proteína imunogênica fosforilada chamada de pORF3 (proteína da ORF3). Esta proteína está envolvida tanto na morfogênese quanto na liberação e saída do vírion da célula. É também sugerido que a pORF3 interaja com proteínas celulares do hospedeiro, como a MAPK-fosfatase (*Mitogen Activated Protein Kinase*), por exemplo, e outras quinases que respondem a estímulos extracelulares, permitindo assim a sobrevivência da célula durante a infecção viral, através da ativação de vias intracelulares de sinalização (KORKAYA et al., 2001).

1.1.4. Replicação

Embora modelos de cultura celular para cultivo de HEV tenham sido recentemente descritos, ainda não há uma padronização no processo e o modelo de infecção experimental em primatas segue como principal forma de cultivo deste vírus. De qualquer modo, é importante o conhecimento do mecanismo de replicação do HEV *in vivo* para melhor compreensão de sua patogênese, ciclo de vida, cronicidade, e possíveis drogas como candidatas para o tratamento (MEISTER et al., 2019; NISHIYAMA et al., 2019; SCHEMMERER et al., 2019).

Por se tratar de um vírus hepatotrópico, a replicação do HEV ocorre no interior de hepatócitos. Como já mencionado anteriormente, o vírus da hepatite E pode se apresentar como um vírus sem envelope (~30nm), no qual o invólucro do capsídeo interage com o ambiente circundante, ou como um vírus quasi-envelopado (~40nm), onde o capsídeo é revestido com uma membrana exossômica (Fig. 3). Embora ambas as formas sejam infectivas, os vírus não-envelopados podem ser até dez vezes mais infecciosos que os vírus da hepatite E em sua forma quasi-envelopada (HIMMELSBACH et al., 2018).

Como o HEV pode se apresentar não-envelopado ou quasi-envelopado (eHEV), ainda não é claro se ambas as formas são internalizadas pelo mesmo mecanismo embora haja indícios de que ocorram por meios diferentes. A entrada do eHEV apresenta-se de forma mais lenta por clatrina e macropinocitose e a do HEV não-envelopado é supostamente através de endocitose mediada por clatrina por intermédio de receptores HSPGs, já mencionados, e HSC70. Após a entrada do vírus na célula, inicia-se, no citoplasma, o processo de desencapsulamento realizado pelas enzimas celulares. A seguir, o RNA genômico do HEV será liberado (VARMA et al., 2011; YIN; AMBARDEKAR; et al., 2016). A ORF1, previamente descrita, é então traduzida em uma poliproteína inativada não-estrutural que será, em seguida, processada e transformada em proteínas ativadas caracterizadas por atuarem como metil-transferases, proteases, helicases e RNapolimerase (VARMA et al., 2011).

No hepatócito, a replicação propriamente dita ocorrerá supostamente no retículo endoplasmático, no qual o complexo Rdrp (RNA-polimerase RNA-dependente) replica sintetiza uma fita de RNA de polaridade negativa a partir da fita molde de RNA genômico de polaridade positiva (VARMA et al., 2011) (Fig. 5).

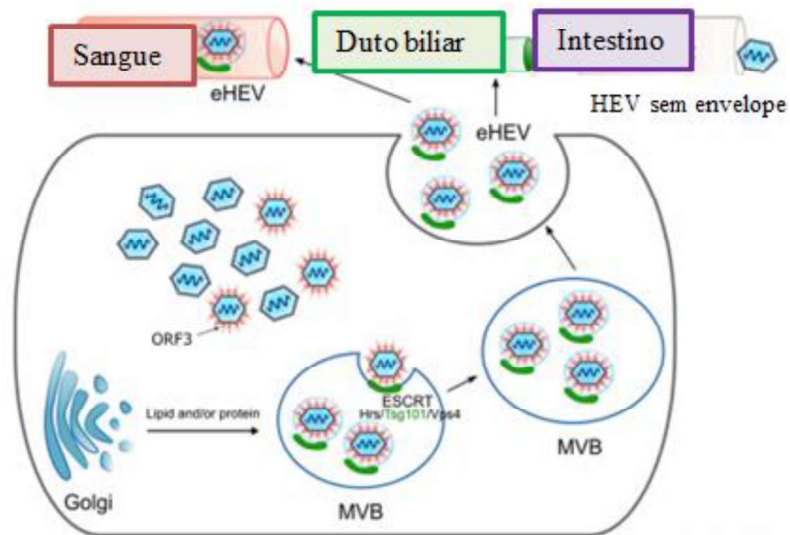


Figura 5: Liberação esquematizada do vírus da hepatite E no interior do hepatócito e sua liberação como partículas virais não envelopadas e quasi-envelopadas (Adaptado de: HIMMELSBACH et al., 2018).

A fita de RNA de polaridade negativa recém-sintetizada é então utilizada como molde para a transcrição da fita de RNA genômico de polaridade positiva que

fará parte do vírion a ser liberado. Além da transcrição deste RNA de polaridade positiva, um mRNA (RNA mensageiro) subgenômico bicistrônico de aproximadamente 2,2 kb serve de molde para a tradução das proteínas das ORFs 1 e 2 (GRAFF et al., 2006). Estas proteínas estão envolvidas no encapsulamento dos RNA genômicos gerados durante a replicação formando novos vírions. As proteínas da ORF 3 são essenciais para a liberação dos vírions das células infectadas. Esta liberação é aparentemente mediada por viroporinas que aumentam a permeabilidade da membrana celular, podendo até levar à lise celular, embora este mecanismo ainda não seja claro (DING et al., 2017). Desta forma, finalmente, as partículas recém-produzidas do vírus são secretadas para os canalículos biliares passando pela membrana apical dos hepatócitos. Em seguida, esses novos vírus vão seguir pela bile até chegarem ao intestino delgado do hospedeiro (AHMAD et al., 2011; HIMMELSBACH et al., 2018).

Por isso, é possível a observação e detecção, embora baixa, de HEV circulando no plasma dos pacientes durante infecção aguda, enquanto a concentração encontrada nas fezes dos mesmos pacientes pode chegar títulos virais bem superiores e em maior concentração (VARMA et al., 2011).

1.1.5. Genótipos

Os *Orthopevirus A* apresentam 8 genótipos ao todo (HEV1 a HEV8), sendo que 4 deles são descritos por infectar humanos, HEV1, HEV2, HEV3 e HEV4 (Genótipos 1, 2, 3 e 4 do HEV). Destes, os genótipos 1 e 2 são associados a transmissões entre humanos e os genótipos 3 e 4 a transmissões zoonóticas, infectando outros mamíferos como porcos, por exemplo (Fig. 6). Os 4 genótipos de HEV que infectam humanos são também subdivididos em subgenótipos: HEV1, em 5 subgenótipos (1a – 1e); HEV2, em 2 subgenótipos (2a e 2b); HEV3, em 10 subgenótipos (3a – 3j) e HEV4, em 7 subgenótipos (4a - 4g) (DALTON; HUNTER; BENDALL, 2013; PURCELL; EMERSON, 2008; SRIDHAR et al., 2017; WEDEMEYER; PISCHKE; MANNNS, 2012) Entre estes genótipos, existe uma grande diversidade entre amostras isoladas ao redor do mundo, com variabilidade de até 12% dentro do próprio genótipo e de até 19% em relação a genótipos diferentes do HEV (Fig. 6) (OKAMOTO, 2007). Recentemente, o HEV5 (genótipo 5 do HEV) e o HEV8 (genótipo 8 do HEV) foram descritos como capazes de infectar primatas, após estudos em modelo experimental, embora não tenha sido descrita infecção natural em primatas não humanos. O HEV7, conhecido por infectar dromedários, foi

registrado como agente etiológico da infecção em humanos também se caracterizando como zoonose. Assim, é reforçada a capacidade zoonótica também destes genótipos (BASSAL et al., 2019; LI, T. C. et al., 2019; WANG, H. et al., 2019).

Embora haja esta heterogeneidade significativa entre os diferentes genótipos de HEV que infectam humanos, há evidência de que esta heterogeneidade, quando se trata de análise sorológica, é limitada. Desta forma, todos os genótipos fazem parte de um mesmo sorotipo (WEDEMEYER et al., 2012).

Ainda sobre os genótipos que infectam humanos, HEV1 e HEV2 são reconhecidos como genótipos de circulação apenas humana, ou seja, o ser humano é seu único reservatório, sem descrição deste genótipo em outras espécies. Assim, apresenta apenas transmissão pessoa a pessoa (GENG et al., 2011; PURCELL; EMERSON, 2008).

Já os genótipos 3 e 4 apresentam potencial zoonótico bem definido, sendo também amplamente descritos em outras espécies, desde suínos a animais silvestres, como morcegos e roedores. Inclusive, HEV3 foi descrito em moluscos bivalvos, por serem filtradores e não hospedeiros, durante um surto em um cruzeiro em 2009. Desta forma, a principal forma de transmissão ocorreria pela ingestão de alimentos de origem animal contaminados (BERTO et al., 2012; BOUWKNEGT et al., 2007; FEAGINS et al., 2007; GOENS; PERDUE, 2004; KACI; NÖCKLER; JOHNE, 2008; MENG, 2010; SAID et al., 2009).

Sobre os genótipos de potencial zoonótico, amostras de suínos e produtos comerciais derivados destes, como salsichas e patês, têm sido descritos como fontes de contaminação relevantes por diversos autores. A forma pela qual o vírus da hepatite E chega ao produto processado e derivado ainda não é bem definida, mas é sugerido que esta contaminação ocorra devido à falta de higiene no manuseio e processamento desses alimentos ou à utilização de carne contaminada crua (CHRISTENSEN et al., 2008; COLSON et al., 2010; WENZEL et al., 2011). Além disso, a circulação do HEV entre suínos e seus tratadores pode ocorrer via fecal-oral, de acordo com as condições sanitárias e de como é realizado o controle de qualidade nos criadouros e matadouros. Em todo o Brasil, o genótipo 3 do HEV é descrito como circulante entre os suínos, nos criadouros, com prevalências variando de 4,8% na Amazônia, até 85,7% no Distrito Federal (DE SOUZA et al., 2012; VILANOVA, 2016).

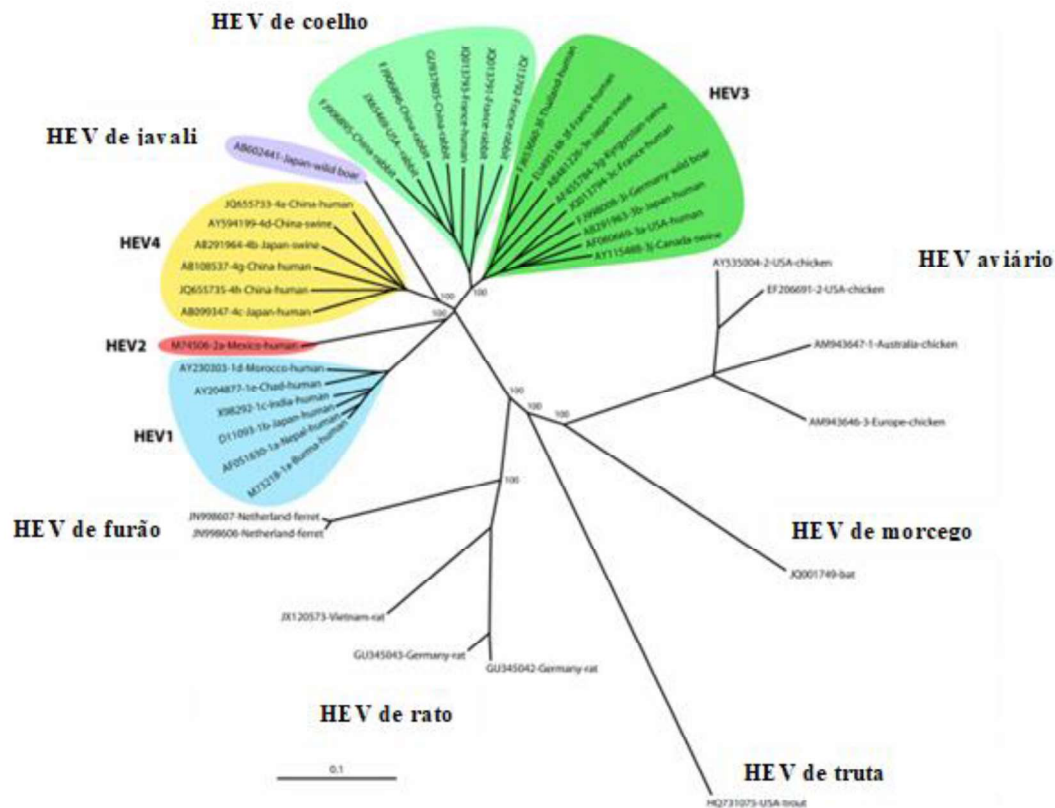


Figura 6: Árvore filogenética contendo os quatro genótipos do vírus da hepatite E que infecta humanos (HEV1, HEV2, HEV3 e HEV4) e de outros vírus do gênero *Orthohepevirus* que infectam outros mamíferos e aves (Adaptado de: KAMAR et al., 2014).

Tabela 1: Genótipos de Hepatite E que infectam humanos e suas características. Adaptado de CDC, 2019 in: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hev/hevfaq.htm#section1>

Características	Genótipo 1	Genótipo 2	Genótipo 3	Genótipo 4
Localização geográfica	África e Asia	México, Oeste da África	Europa, EUA, Brasil, Argentina, Japão etc	China, Taiwan, Japão
Via de transmissão	Água contaminada Fecal- oral Pessoa a Pessoa	Água contaminada Fecal-oral	Alimentos contaminados de origem suína/caça	Alimentos contaminados de origem suína/caça
Grupos em risco	Adultos jovens	Adultos jovens	Homens adultos mais velhos (>40 anos) Imunocomprometidos	Jovens adultos
Transmissão zoonótica	Não	Não	Sim	Sim
Crônica Infecção	Não	Não	Sim	Não
Ocorrência de surtos	Comum	Pequenos surtos	Raros Casos esporádicos	Raros Casos esporádicos

Além dos suínos, como já mencionado, isolados de alguns outros mamíferos, como coelhos, ratos e javalis, também apresentam alta homologia (superior a 80%) com alguns genótipos de HEV isolados de humanos. Em alguns casos, estes isolados em mamíferos são de vírus da hepatite E sem genótipo definido, embora apresentem homologia superior a 80% quando comparados com genótipos que circulam em humanos (WEDEMEYER et al., 2012).

1.1.6. Epidemiologia

A epidemiologia do HEV varia muito conforme a região e genótipo circulante e as diferenças no modo de transmissão dos genótipos 1 e 2 e dos genótipos 3 e 4. Em países desenvolvidos, onde geralmente há circulação dos genótipos 3 e 4, os casos autóctones são raros de forma assintomática ou aguda em pacientes imunocompetentes sem a ocorrência de grandes surtos. A maioria das infecções agudas são contraídas pelos pacientes durante viagens a regiões de alta endemicidade de circulação dos genótipos 1 e 2. (ANTY et al., 2012; ARENDS et al., 2014; DALTON et al., 2007; DAVERN et al., 2011; HALAC et al., 2012; HOERNING et al., 2012; JUNGE et al., 2013; MENG, 2010).

As regiões consideradas de baixa endemicidade para HEV são localizadas nos seguintes continentes, principalmente: Europa, América do Norte, América do Sul e Oceania. Nestas áreas, temos, em geral, circulação dos genótipos 3 ou 4 do HEV e há ocorrência de casos esporádicos autóctones relacionados à transmissão zoonótica e estão fortemente relacionados aos hábitos alimentares de cada região. O aumento no registro de casos nestes locais também está relacionado ao aumento de atenção e utilização de testes mais eficientes de detecção, como o avanço nos testes sorológicos comerciais, revelando o real panorama de prevalência da hepatite E em regiões consideradas de baixa endemicidade (ANTY et al., 2012; ARENDS et al., 2014; DALTON et al., 2007; DAVERN et al., 2011; HALAC et al., 2012; HOERNING et al., 2012; JUNGE et al., 2013; MENG, 2010).

Já em países que apresentam menores índices econômicos e de desenvolvimento, principalmente localizados nos continentes África, Ásia e América Central, há maior ocorrência de surtos e estas regiões são consideradas de alta endemicidade. Estes são os locais de circulação dos genótipos 1 e 2, cuja transmissão é majoritariamente fecal-oral e a prevalência pode chegar a 51,4% entre pacientes com hepatites sem etiologia definida, em Bangladesh (ANTY et al., 2012; ARENDS et al., 2014; DALTON et al., 2007; DAVERN et al., 2011; HALAC et al.,

2012; HOERNING et al., 2012; HOSSAIN et al., 2019; JUNGE et al., 2013; MENG, 2010).



Figura 7: Mapa mundi apresentando as diferenças de prevalência do HEV em diversos países. Em cinza escuro, regiões de alta endemicidade. Em cinza médio, regiões de baixa endemicidade e, em cinza claro/branco, regiões sem dados disponíveis a respeito (TESHALE, EYASU H., 2019).

No mapa epidemiológico (Fig. 7), é possível observar esta relação entre regiões de circulação dos diferentes genótipos com as variações na endemicidade. Além disso, a prevalência varia dependendo do tipo de população. Por exemplo, em criadouros e matadouros de porcos, podemos encontrar prevalências de HEV3 desde 0.0% como descrito na cidade de Santa Maria, no Distrito Federal (VILANOVA, 2016), até bem altas como de 60,3% na Bulgária (KROG; LARSEN; BREUM, 2019) e até 85,7% descrito em Gama, no Distrito Federal (VILANOVA, 2016).

No Brasil, uma região de baixa endemicidade para o HEV, alguns estudos sorológicos realizados foram capazes de determinar diferentes prevalências de hepatite E conforme região e período de publicação dos estudos. Além disso, apenas o genótipo 3 foi descrito no país, com o primeiro caso autóctone relatado por Santos e colaboradores apenas em 2010. A prevalência média geral é considerada de 6,0% (TENGGAN et al., 2019), variando de 2,3% entre catadores de lixo de Goiás (MARTINS et al., 2014) e 10,0% entre doadores de sangue de Santa Catarina

(PASSOS-CASTILHO et al., 2016). Em grupos especiais, como entre pacientes HIV positivos, esta prevalência varia de 3,6% no Rio de Janeiro (SALVIO et al., 2018) a 6,4% em São Paulo (TENGAN et al., 2019) (Fig. 8).



Figura 8: Distribuição epidemiológica do vírus da hepatite E no Brasil. Imagem montada por Salvio, AL a partir de: (OLIVEIRA et al., 2018; PARANA et al., 1997; SALVIO et al., 2018; TENGAN et al., 2019; TRINTA et al., 2001).

1.1.7. Transmissão e Profilaxia

As formas de transmissão do vírus da hepatite E variam principalmente conforme o genótipo do vírus (Fig. 9), embora a sua via de transmissão considerada principal no mundo seja a interpessoal. Assim, os genótipos 1 e 2 tem transmissão entérica, via fecal-oral sendo transmitido de pessoa a pessoa. Este tipo de transmissão também é relacionado ao consumo de água e alimentos contaminados com o vírus. É possível concluir que este tipo de infecção é mais relacionado à ocorrência de surtos e à circulação em regiões de alta prevalência. É importante também levar em consideração aspectos sociais como falta de saneamento básico e de medidas de higiene estando relacionadas às formas de transmissão descrita para

estes genótipos 1 e 2, sendo considerada uma infecção relacionada à pobreza (AGGARWAL; NAIK, 2009; TESHALE, E. H.; HU; HOLMBERG, 2010).

Enquanto isso, os genótipos 3 e 4, também descritos em outras espécies, tem como transmissão característica a via zoonótica. Desta forma, a transmissão destes genótipos se dá através do consumo de carne de caça e de suínos de criação crua ou mal-passada contaminada. Também é bem descrita a transmissão pela ingestão de produtos derivados da carne destes animais que estejam contaminados, como salsichas, patês, linguiças de fígado entre outros (AGGARWAL; NAIK, 2009; TESHALE, E. H. et al., 2010).

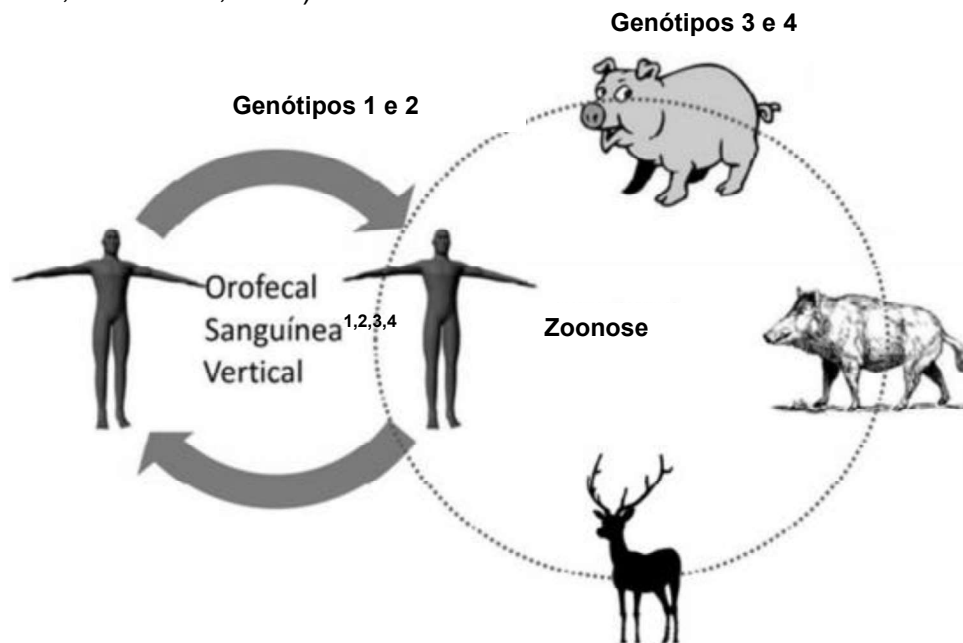


Figura 9: Principais vias de transmissão do vírus da hepatite E entre humanos e de forma zoonótica (Adaptado de: SANTOS; OLIVEIRA-FILHO; PINTO, 2013).

Além dos mamíferos descritos anteriormente serem reservatórios deste vírus, temos também o consumo de moluscos bivalves, como ostras e mariscos, principalmente por serem animais filtradores e termos a liberação do vírus nas fezes, contaminando ambientes aquáticos (LA ROSA et al., 2018; O'HARA et al., 2018; OSHIKI et al., 2018; PURPARI et al., 2019).

É importante também lembrar que, embora seja raro, há sugestão de transmissão de HEV via transfusão de sangue e outros, sendo mais discutida em países de circulação dos genótipos 3 e 4 (ANKCORN et al., 2019; VON FELDEN et al., 2019).

Conhecendo estes diferentes perfis de transmissão, é possível compreender melhor as medidas profiláticas contra a hepatite. No geral, o tratamento de pessoas

doentes e a conscientização da população quanto a esta doença são relevantes em qualquer região em que HEV circule, principalmente através da divulgação de informações corretas para que surtos possam ser evitados. Devido à natureza entérica da transmissão de HEV1 e HEV2, para prevenção da hepatite E em regiões de alta prevalência, é importante o investimento e instalação de sistemas de saneamento básico, atenção aos hábitos de higiene como lavar as mãos, lavar os alimentos e cozê-los, além do consumo de água de procedência conhecida que seja filtrada ou fervida (IPPAGUNTA et al., 2007; RODRIGUEZ-MANZANO et al., 2010).

Regiões de baixa endemicidade têm como característica a transmissão zoonótica de HEV3 e HEV4, assim é importante a constante vigilância de abatedouros e criadouros de suínos e o controle de animais de caça. Também são de grande importância as medidas sanitárias no manuseio, no preparo e na manufatura de alimentos derivados das carnes destes animais, uma vez que estes derivados contaminados são importantes fontes de infecção descritas nestas regiões. Assim, alimentos de origem suína ou de qualquer carne de caça devem ser bem manuseados e preparados com todas as medidas de higiene e corretamente cozidos (IPPAGUNTA et al., 2007; RODRIGUEZ-MANZANO et al., 2010).

Além das medidas descritas, há também uma vacina desenvolvida em 2011, na China, contra infecções pelo HEV4. Esta vacina apresentou eficácia e alta capacidade imunogênica de 86,8% porém, ela ainda não se encontra mundialmente distribuída ou incluída nos calendários de vacinação (KMUSH et al., 2019; ZHANG et al., 2015).

1.1.8. Manifestações clínicas

A hepatite E é caracterizada por apresentar uma variedade de quadros clínicos e padrões de infecção viral, em geral, semelhantes aos das hepatites virais causadas por outros agentes etiológicos. Em geral, o vírus da hepatite E é responsável por infecções subclínicas ou agudas na população imunocompetente (BADER et al., 1991; TORRESI; JOHNSON, 2011). A principal apresentação clínica é na forma de infecção aguda autolimitante com duração máxima de aproximadamente 6 a 7 semanas. A icterícia é o sintoma mais relatado, geralmente estando associada à liberação de urina escura e fezes claras. Mialgia, artralgia, dor abdominal e vômito também são sintomas comuns descritos durante a fase aguda da hepatite E (PÉREZ-GRACIA; MATEOS LINDEMANN; CARIDAD MONTALVO VILLALBA, 2013).

É importante lembrar também que esta infecção pode se desenvolver por diferentes cursos variando conforme o estado imunológico dos pacientes e o genótipo de HEV responsável pela infecção. Os genótipos 1 e 2 são principalmente relacionados a ocorrência de surtos e a infecções agudas autolimitantes. Porém, quando se trata de pacientes gestantes, é bem descrito que HEV1 é responsável por quadros graves de rápida evolução para falência hepática fulminante (FHF). Nestes casos, infecções por HEV1 ocorridas durante o terceiro trimestre de gestação estão relacionadas à ocorrência de FHF (até 70%) e a altas taxas de mortalidade materna, variando entre 15 e 25% (KAR; SENGUPTA, 2019). Coagulopatia, coagulação intravascular disseminada, encefalopatia e edema cerebral são características comuns na insuficiência hepática fulminante em gestantes infectadas pelo vírus da hepatite E. O coma hepático, que pode chegar a atingir 44% das gestantes infectadas por HEV1 é considerado um mau prognóstico, com mortalidade próxima a 100% (PATRA et al., 2007; TEO, 2012). Estas infecções fulminantes possivelmente ocorrem devido às características hormonais e imunológicas durante a gestação, podendo estar relacionada à diminuição na expressão de receptores de progesterona e na resposta de linfócitos T (ANTY et al., 2012; BOSE et al., 2011; KUMAR et al., 2004; NAVANEETHAN; AL MOHAJER; SHATA, 2008; SRIVASTAVA et al., 2011).

Além do genótipo 1, o genótipo 3 também já foi descrito como responsável por FHF, porém em associação a doença hepática crônica prévia, com taxas de mortalidade bem altas, com cerca de 70% dos casos chegando a óbito (ANTY et al., 2012; DALTON et al., 2007; MELGAÇO et al., 2018).

Com o tempo, cada vez mais infecções autóctones têm sido descritas em países de baixa endemicidade de circulação de HEV3 e HEV4. Com isso, não apenas aumentaram os registros de infecções agudas como também de infecções crônicas (Fig. 10), as quais estão relacionadas a pacientes imunossuprimidos (COLSON et al., 2009). Além de complicações como o quadro de FHF, HEV3 e, mais recentemente, HEV4 tem sido associado a infecções crônicas em pacientes imunossuprimidos como transplantados, pacientes HIV positivos com AIDS, pacientes com câncer em quimioterapia entre outros. Quanto aos transplantados, além da influência da imunossupressão do desenvolvimento da hepatite E para cronicidade, é também relevante pontuar que diferentes imunossupressores podem exercer diferentes impactos no curso desta infecção nos pacientes transplantados (WANG, Y.; ZHOU; et al., 2014). A infecção crônica de hepatite E é caracterizada

pela persistência do vírus no soro do paciente, a níveis ainda detectáveis, por mais de 3 meses. Aumento sutil e persistente de níveis de enzimas hepáticas como ALT (Alanina Aminotransferase) e AST (Aspartato Aminotransferase) e de bilirrubina, por exemplo, também são notáveis em casos crônicos. A hepatite E crônica também é caracterizada por significativa atividade histológica com desenvolvimento de fibrose após 12 meses, variando entre 10 e 18 meses. Em geral, é descrito que estas infecções crônicas culminam em cirrose hepática e, de acordo com estudos mais recentes, podendo causar até carcinoma hepatocelular (COLSON; BORENTAIN; GÉROLAMI, 2019; COLSON; RAOULT, 2017; KAMAR et al., 2017; KAMAR et al., 2013).

Infecções crônicas são associadas a significantes taxas de mortalidade e morbidade devido ao diagnóstico tardio e pela associação da hepatite crônica com surgimento de fibrose e cirrose hepática. Esta demora no diagnóstico deve-se à apresentação de apenas sinais enzimáticos leves e manifestações extra-hepáticas e não específicas, sendo dificilmente relacionados diretamente a hepatites (PISCHKE et al., 2014; SCLAIR; SCHIFF, 2013). Estas manifestações extra-hepáticas são raras, porém podem ocorrer principalmente em casos crônicos de hepatite E, são elas: desordens neurológicas, paralisia oculomotora, neutrite branquial bilateral, convulsões, glomerulonefrite, polirradiculopatias, como a síndrome de Guillain-Barré, crioglobulinemia e anomalias hematológicas. Além disso, o HEV também é capaz de mimetizar rejeição a enxerto de transplante hepático durante imunossupressão por tacrolimo (ALLAIRE et al., 2018; COLSON; RAOULT, 2017; KAMAR et al., 2011; KAMAR et al., 2017; SHAH et al., 2012).

Assim, é importante que os pacientes sejam diagnosticados com agilidade e rapidez, sendo necessárias as análises para detecção de alterações nas taxas de enzimas hepáticas (ALT e AST) e de bilirrubina no soro, uma vez que estes resultados auxiliam na investigação de casos suspeitos sem etiologia definida (DAVERN et al., 2011).

Tabela 2: Sumário de detecção de HEV-RNA e anti-HEV IgM e IgG, em dias pós infecção (dpi). Traduzido de: (GARDINALI et al., 2017).

ID	Grupo	Detecção de HEV-RNA			Soroconversão Anti-HEV			Picos de aminotransferases (2x o valor máximo no soro)	
		Soro	Fezes	Fígado	IgA	IgM	IgG	ALT	AST
AD4	1	7-28	7-28	14-69	28	28	28	21, 28 (125, 173)	21 (127)
AE3		7-21	7-42	14	57	28	28	-	-
V12		14-21	7-28	14	57	28	28	21 (67)	21; 99 (97; 96)
AC11		14-21; 56	7-21	14	28	28	28	-	-
AE6	2	7-160	7-160	14-160	141	99	57	42; 56; 160 (82; 89; 84)	21 (93)
AB19		14-160	7-160	14-160	57	14	57	141; 160 (76; 120)	7; 14; 21; 42; 99 (106; 76; 84; 88; 95)
AD8		14-42	7-42	14-42	57	28	28	-	-
AC7		14-160	7-160	14-160	99	14	57	28; 42; 56; 99; 141; 160 (69; 122; 145; 71; 149; 90)	21; 42; 56; 69 (107; 74; 125; 80)
AB17	3	—	—	—	—	—	—	—	—
AD7		—	—	—	—	—	—	—	—
Z2		—	—	—	—	—	—	—	—
AE2		—	—	—	—	—	—	—	—

1.1.9. 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 pelos pacientes. Porém, em casos de pacientes com doenças hepáticas prévias à infecção por HEV ou pacientes imunocomprometidos, é indicada a utilização de ribavirina no tratamento (ALRIC et al., 2011; GEROLAMI et al., 2011; GOYAL et al., 2012; PÉRON et al., 2011). 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).

Em geral, o tratamento para hepatite E é indicado para infecções crônicas e persistentes, comumente causadas pelo HEV3 e relacionadas a condições de imunossupressão ou imunodepressão. Pacientes transplantados de órgãos sólidos (SOT – *Solid Organ Transplant*), de HIV positivos, de dependentes de hemodiálise (HD, *Hemodialysis-dependent*) e de câncer, mais especificamente leucemia, constituem estas populações em risco de hepatite E crônica (BOUDIN et al., 2019; KAMAR et al., 2015; MIYOSHI et al., 2016; PISCHKE et al., 2014).

Diversos estudos descrevem a resolução bem sucedida da infecção por HEV em pacientes imunossuprimidos com a diminuição das doses de imunossupressores. A monoterapia de Ribavirina (600mg/dia), ao ser aplicada a pacientes transplantados com viremia prolongada de HEV, apresenta eficiência na

resolução da infecção em 95% dos casos após 3-6 meses de tratamento. O principal efeito colateral da monoterapia com ribavirina é a anemia, sendo necessária redução da dose em 29% dos pacientes, bem como o uso de eritropoetina (54%) e transfusão de sangue (12%) (KAMAR et al., 2015; SFORZA et al., 2019).

Terapias utilizando ribavirina e interferon peguilado (IFN-Peg) conseguiram estabelecer uma resposta virológica sustentada após 3-6 meses de tratamento em pacientes SOT, com restauração da contagem de linfócitos. O interferon peguilado apresenta efeito bem-sucedido quando aplicado a pacientes com transplante de fígado imunossuprimidos e em hemodiálise que apresentavam viremia de HEV. Porém, este tratamento não é indicado para outros tipos de SOT, como de coração, pulmão ou rim, uma vez pode aumentar o risco de rejeição ao enxerto (PÉRON et al., 2016; PISCHKE et al., 2014; QU et al., 2017).

Outros antivirais podem atuar como formas alternativas de tratamento, como o sal de zinco e o análogo de nucleosídeo 2'-C-metilcitidina (2CMC). Eles têm apresentado sucesso quando aplicados em linhagens de células humanas infectadas por HEV *in vitro* inibindo a replicação viral. Porém, é importante ressaltar que, quando combinado com ribavirina, o sal de zinco compromete sua eficiência. Além desses antivirais, outras drogas promissoras têm sido descritas *in vitro* como auxiliares na eliminação do vírus, entre elas temos o sofosbuvir, inibidores da calcineurina e inibidores da mTOR (KAUSHIK et al., 2017; QU et al., 2017).

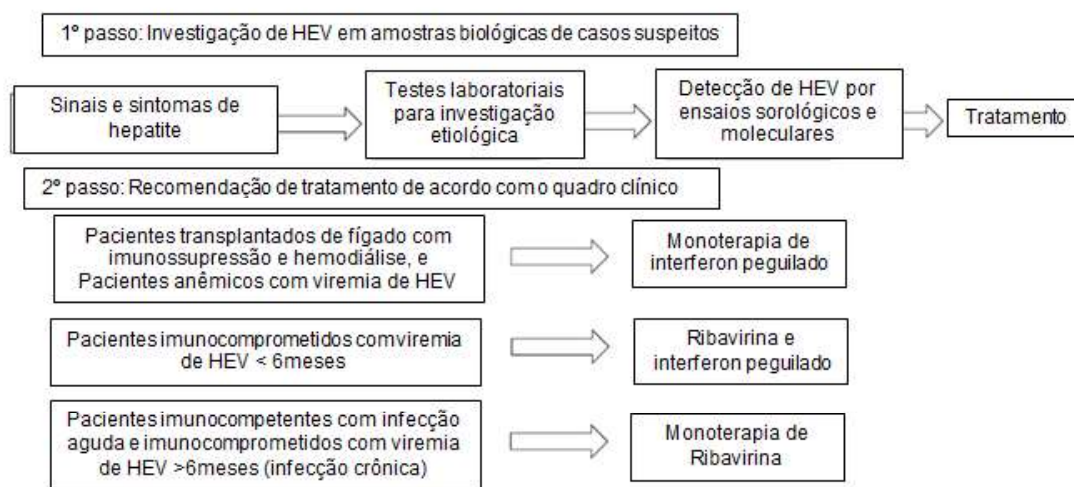


Figura 10: Atualização das recomendações de tratamento da infecção pelo HEV. (Adaptado de: MELGAÇO et al., 2018).

Apesar dos efeitos colaterais, a ribavirina é descrita atualmente como a melhor alternativa de tratamento para hepatite E crônica. Na figura 11, pode-se observar os diferentes tratamentos para infecção por HEV e suas recomendações de uso. Embora a terapia antiviral esteja bem estabelecida para a infecção crônica, existem evidências de que o uso de antivirais pode ser inadequado em vários tipos de hepatite aguda, incluindo ACLF (Insuficiência hepática crônica agudizada – Acute-on-chronic liver failure) e hepatite aguda grave E. Assim, é definitivamente necessário um estudo bem planejado para avaliar a segurança e eficácia da ribavirina nos casos de hepatite aguda grave e ACLF induzidas por HEV (KHUROO; KHUROO, 2016; SHRESTHA; P GUPTA; K LAMA, 2017).

1.1.10. Diagnóstico

O diagnóstico de infecção pelo HEV deve ser bem analisado, considerando seu curto período de viremia, o qual nem sempre coincide com o aparecimento dos sintomas. É importante também lembrar que a soroconversão do paciente pode ocorrer de forma tardia ou não ocorrer, também o tempo de permanência de anticorpos detectáveis no soro do paciente é indeterminado. Além de infecções assintomáticas, as infecções crônicas podem ser silenciosas e, desta forma, além da ausência de sintomas específicos, pode também haver mínima ou nenhuma alteração em taxas hepáticas como nas taxas de ALT, AST ou Bilirrubina por exemplo. Assim, apenas o monitoramento destes sinais não é o suficiente para o diagnóstico ou suspeita de infecção por HEV. A ausência então de um método padrão-ouro para diagnóstico confiável de HEV dificulta ainda a diferenciação entre um resultado verdadeiramente positivo de um falso-positivo, assim entre um resultado verdadeiramente negativo de um falso-negativo. No geral, o diagnóstico ocorre através da detecção molecular de HEV-RNA (Ácido Ribonucleico do vírus da hepatite E) (método direto) e de anticorpos específicos contra o capsídeo (ORF2) (método indireto) (BAYLIS, SALLY A.; TERAQ; HANSCHMANN, 2011; CATTOIR et al., 2017; MELGAÇO et al., 2018; MOAL et al., 2015; SALVIO et al., 2018).

Quanto ao diagnóstico sorológico, dois principais marcadores são comumente utilizados para investigar a infecção por HEV. São eles, o anti-HEV IgM (Imunoglobulina M) que indica uma infecção recente e é detectado ainda na fase aguda, e o anti-HEV IgG (Imunoglobulina G) que indica infecção passada e é encontrado tanto durante uma infecção, junto com anti-HEV IgM, quanto após a

infecção, sendo detectado sozinho (DE ALMEIDA RAMOS et al., 2016; DOMANOVIĆ et al., 2017).

Durante uma infecção aguda por HEV, a titulação de IgM atinge seu máximo concomitante com o pico de ALT (Alanina Aminotransferase), também conhecida como TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) e, no geral, permanece detectável por 3 meses após o início da doença, podendo se sustentar por até 5 meses (Drobeniuc et al., 2010; Khudyakov & Kamili, 2011). Após o início da liberação de anti-HEV IgM, o anti-HEV IgG já começa a ser produzido, sendo liberado também durante a fase aguda e a fase convalescente, podendo persistir por tempo indeterminado no soro, com decaimento de sua titulação com cerca 1 ano após o início da doença na maioria dos casos. Assim, a detecção de anti-HEV IgG é muito utilizada para estudos epidemiológicos, uma vez que revela uma exposição prévia, mesmo que assintomática, ao HEV. Ainda há muitas discussões a respeito da duração do período de liberação destes anticorpos e da ocorrência ou não desta soroconversão em alguns casos, uma vez que há relatos de reinfeção por HEV (KAMAR et al., 2012).

Para o diagnóstico sorológico, há diversos kits comerciais mais recentes e modernos disponíveis que se diferenciam quanto à sensibilidade e especificidade, cada um indicado para diferentes níveis de endemicidade. No geral, a sensibilidade destes kits é cerca de 90%, porém a concordância entre diferentes kits comerciais pode variar entre 53% a 71% para detecção de anti-HEV IgM e entre 76% e 95% para detecção de anti-HEV IgG (CATTOIR et al., 2017; DROBENIUC et al., 2010; LEGRAND-ABRAVANEL et al., 2009). Entre os kits comerciais disponíveis para detecção de anticorpos anti-HEV IgM e IgG, temos : Biorex anti-HEV IgM and IgG (Biorex Diagnostics Limited, Antrim, United Kingdom), Wantai anti-HEV IgM and IgG (Wantai Biological Pharmacy, Beijing, China) e Mikrogen RecomWell anti-HEV IgM and IgG (Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany) (BENDALL et al., 2010).

Com a possibilidade de resultados falso-positivos para IgM, devido principalmente a menor especificidade descrita para estes testes, é necessária a confirmação do diagnóstico através de métodos moleculares ou de outros ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos contra epítomos da ORF2.1 e da ORF3, principalmente em regiões de baixa prevalência para HEV (ARENDS et al., 2014; CATTOIR et al., 2017). Devido também à possibilidade de resultados falso-negativos, com a permanência indefinida de anticorpos anti-HEV no soro e da possibilidade de que talvez não haja soroconversão, todos com hepatite sem

etiologia definida devem ser considerados suspeitos para infecção por HEV e testados para detecção de HEV-RNA (ARENDS et al., 2014; CATTOIR et al., 2017).

Técnicas moleculares para detecção de HEV-RNA geralmente são aplicadas quando há dificuldade na interpretação de resultados sorológicos por possível reação cruzada ou em casos de pacientes imunocomprometidos com suspeita de infecção por HEV em que a resposta do anticorpo pode ser indetectável. De qualquer forma, técnicas moleculares são de suma importância para a compreensão da circulação do vírus e sua genotipagem (ZHAO; WANG, 2016).

Os ensaios moleculares para diagnóstico de HEV baseiam-se na detecção do RNA genômico do vírus em amostras, sejam elas de soro, fezes ou biópsia, sendo a maior carga viral encontrada em fezes, nas quais o vírus pode ser detectado até uma semana antes do surgimento dos sintomas e por até 6 meses desde o início da doença. No soro, HEV-RNA pode ser detectado concomitante ao aparecimento de sintomas, persistindo por até 4 semanas após seu início. Atualmente, a detecção molecular é utilizada como padrão para a confirmação da infecção aguda por HEV na maioria dos casos, como sugere a Organização Mundial da Saúde (SARIN; KUMAR, 2006).

Concentrações virais muito baixas nas amostras podem ser um problema de acordo com o limite de detecção do teste, podendo gerar um resultado falso-negativo ao não serem detectadas. Assim, a sensibilidade de um teste molecular pode variar conforme o tempo de início dos sintomas e da forma correta e ágil da coleta de amostras logo no início destes sintomas, momento em que, no geral, a carga viral encontra-se mais elevada. Logo, a ausência de detecção de HEV-RNA não descarta a possibilidade de uma infecção recente e até mesmo crônica ou persistente com baixas cargas virais circulantes em soro (KAMAR et al., 2012).

Dentre os métodos moleculares, damos destaque à RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa) que tem sido amplamente utilizado em protocolos *in house* variando de acordo com parâmetros abordados como região genômica de interesse por exemplo. Assim, pode-se encontrar alto grau de variabilidade de desempenho entre estas metodologias, uma vez que não haja técnica molecular para detecção de HEV definida como padrão (BAYLIS, SALLY A. et al., 2011). Por este motivo, ainda não há um ensaio molecular licenciado para diagnóstico como um padrão e assim, a Organização Mundial da Saúde tem buscado e investido na padronização e determinação de uma metodologia padrão para detecção e quantificação de HEV-RNA (BAYLIS, SALLY A. et al., 2011). Entre

os testes comerciais disponíveis temos os que detectam a região da ORF2 do HEV, como ViPrimePLUS Hepatitis E Virus RT-qPCR Kit (Vivantis - Subang Jaya, Malásia) e o qPCR Kit for Hepatitis E virus (Techne - Stone, Staffordshire, United Kingdom).

Além disso, a RT-PCR em tempo real, ou RT-qPCR, apresenta grande importância em relação à quantificação viral e a uma maior sensibilidade para detecção do HEV mesmo quando este HEV-RNA encontra-se em baixas concentrações na amostra. Além disso, a técnica de RT-qPCR também requer menor tempo de processamento até a obtenção de resultado em relação à RT-PCR (GYARMATI et al., 2007).

O protocolo de RT-qPCR descrito por Juthikumar e colaboradores, em 2006, um dos mais aplicados para testes moleculares *in house*, amplifica a região da ORF3 e permite a inserção de controles positivos internos na reação, o que minimiza casos de resultados falso-negativos. Além disso, a técnica permite a detecção dos 4 genótipos do HEV, embora não amplifique uma região variável o suficiente para determinação do genótipo, como as ORFs 1 e 2. Estas ORFs 1 e 2 consistem em regiões de alta variabilidade genética e são amplificadas por PCR convencional para sequenciamento e genotipagem (JOTHIKUMAR et al., 2006; MOKHTARI et al., 2013).

Quando se trata de pacientes imunocomprometidos, como portadores de HIV e transplantados, o diagnóstico de hepatite E é realizado principalmente através da detecção do RNA viral, uma vez que, nestes doentes, a produção de anticorpos é por vezes tardia ou ausente, o que limita o valor dos testes sorológicos, levando a resultados falso-negativos em ensaios. É importante também lembrar que quando se trata de pacientes transplantados renais ou em hemodiálise, podem principalmente ocorrer resultados falso-negativos em testes moleculares devido ao elevado teor de inibidores nas amostras destes pacientes. Neste contexto, é importante a combinação da aplicação de técnicas tanto sorológicas quanto moleculares para a confirmação da infecção por HEV. Além disso, a possibilidade da quantificação viral por qPCR pode auxiliar no monitoramento clínico da resposta a terapias antivirais (CATTOIR et al., 2017; KAMAR et al., 2008).

1.2. Doença Renal Crônica

Os rins consistem em dois órgãos com funções de eliminar toxinas ou dejetos resultantes do metabolismo do indivíduo, como ureia principalmente. Além disso, eles mantêm o equilíbrio hídrico do corpo através da eliminação do excesso de

água, sais e eletrólitos, evitando edemas e aumento de pressão arterial e também atuam como produtores de hormônios como a eritropoetina, por exemplo, associada à formação de glóbulos vermelhos. Assim, é bem claro como qualquer alteração no funcionamento destes órgãos pode gerar graves consequências ao organismo (SAÚDE, 2019).

A doença renal crônica (DRC) é amplamente prevalente em todo o mundo trazendo grandes impactos socioeconômicos, sendo especialmente importante na população idosa. Cerca de metade das pessoas com mais de 75 anos de idade preenche os critérios de diagnóstico para DRC, de acordo com as diretrizes sobre doença renal do KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) (GROUP, 2013; MORA-GUTIÉRREZ et al., 2017).

A DRC é caracterizada pelas anormalidades persistentes na estrutura e/ou função dos rins por mais de três meses, como alterações na Taxa de Filtração Glomerular (TFG) e da presença de lesões parenquimatosas, quando estas trazem implicações à saúde do paciente. O sinal mais utilizado para o cálculo da TFG é a contagem de creatinina sérica e deve-se levar em consideração idade, gênero, superfície corpórea e etnia do paciente. A presença ou não de proteinúria é também importante para a definição do estágio de DRC em que o paciente se encontra (Tabela 1). Esta detecção ocorre através da testagem de urina e um resultado positivo caracteriza-se por fita de imersão reagente, sendo necessária posterior quantificação desta proteinúria. É importante não só o diagnóstico, mas também a caracterização e compreensão da causa da DRC para, assim, prever possíveis desfechos, como falência renal, e monitorar as projeções de risco de complicações e morte (GROUP, 2013; KIRSZTAJN et al., 2014).

Tabela 3: Diferentes taxas de filtração glomerular em relação aos diferentes estágios de doença renal crônica e a presença ou não de proteinúria (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

Estágios da DRC	Taxa de filtração glomerular*	Proteinúria
1	≥ 90	Presente
2	60-89	Presente
3A	45-59	Presente ou ausente
3B	30-44	
4	15-29	Presente ou ausente
5	<15	Presente ou ausente

*mL/min/1,73m².

A DRC também consiste em um problema de saúde pública no Brasil, atingindo cada vez mais pacientes. Infelizmente, o número exato de brasileiros

doentes renais crônicos não é conhecido, mas estimado em cerca de 3 – 6 milhões de pessoas e pouco mais de 100 mil em tratamento de diálise. Assim, é importante o diagnóstico precoce e monitoramento da população para identificação de novos casos (MARINHO et al., 2017). Enquanto o número de paciente DRC em estágio de pré-diálise não é conhecido plenamente, é sugerido por Bastos & Kirsztajn (2011) que cerca de 2,9 milhões de pessoas teriam um terço ou menos da TFG (TFG <45mL/min/1,73m) em relação ao valor considerado normal (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

O tratamento para DRC é dividido em basicamente três modelos, são eles: pacientes com tratamento clínico não especificamente nefrológico ou sem acompanhamento; com tratamento nefrológico padrão; e em tratamento multidisciplinar. As terapias renais substitutivas devem ser aplicadas a pacientes com DRC de estágio terminal de acordo com as diretrizes do KDIGO 2013. Estas terapias renais substitutivas disponíveis são a diálise peritoneal, a hemodiálise e o transplante renal, que consiste no tratamento mais eficaz para este perfil de paciente (PERES et al., 2010; SAÚDE, 2019).

1.2.1. Transplante Renal e Imunossupressão

Como já mencionado, o transplante renal é indicado como tratamento definitivo para pacientes doentes renais crônicos que apresentem prejuízo grave e irreversível das funções dos rins (AUGUSTINE, 2018; PINTER et al., 2017).

Infelizmente, nem todo paciente, mesmo sendo indicado ao transplante renal, pode passar pelo procedimento. Entre as contraindicações para o transplante, estão o abuso de substâncias, outras infecções e doenças crônicas, cirrose, idade avançada e outras doenças terminais. Por isso, é necessária uma minuciosa avaliação de cada caso já que alguns casos podem ser contornados, como de pacientes HIV positivos em tratamento (AUGUSTINE, 2018; HART et al., 2016; PINTER et al., 2017).

No Brasil, o órgão responsável pelo controle e monitoramento de transplantes de órgãos, tecidos e partes do corpo humano é o Sistema Nacional de Transplantes (SNT). Desde a implantação do SNT, em 1997, o número de transplantes renais já realizados no país ultrapassa 78 mil, com 1448 transplantes renais realizados no Brasil apenas entre janeiro e março de 2019 (CAMARA; ABTO, 2019).

Para um paciente receber um transplante renal, atualmente, no Brasil, é necessário que esteja inscrito em uma lista de espera, cuja posição varia conforme

ordem de inscrição, compatibilidade com doadores disponíveis e gravidade. Esta lista é organizada por região e monitorada pelo SNT, principalmente. Assim, quando há um doador elegível, ou seja, que apresente morte encefálica confirmada, a família deve ser consultada para que autorize a retirada de órgãos e a Central Nacional de Transplantes emitirá, então, uma lista de receptores compatíveis e acionará as equipes de transplantes (SAÚDE, 2019).

O sucesso do transplante vai depender de diversos fatores, entre eles o método de imunossupressão e a compatibilidade entre doador e receptor. Também tem sido descrita a maior chance de sobrevivência em receptores de órgãos de doadores vivos do que de doadores falecidos, embora na maioria dos casos, os rins transplantados venham de doadores falecidos. Em 1 ano, a sobrevivência do paciente é superior a 90% em ambos os grupos, mas em 5 anos cerca de 80% dos pacientes que receberam órgão de doadores vivos ainda estão vivos contra apenas 65% dos pacientes seguem vivos quando receberam órgão de um doador falecido (AUGUSTINE, 2018; HART et al., 2016).

O uso de medicação imunossupressora continuou a evoluir na última década, com mais receptores recebendo terapia de indução com agentes de depleção de células T e 92,3% recebendo tacrolimo, comparados com 2,4% recebendo ciclosporina (AUGUSTINE, 2018).

A terapia de indução com globulina antitimócito ou basiliximabe fornece imunossupressão intensa para prevenir a rejeição aguda durante o período inicial pós-transplante. A globulina antitimocítica é um agente potente e consiste em anticorpos dirigidos a células T, células B, neutrófilos, plaquetas, moléculas de adesão e complemento. Ele se liga às células T e as remove da circulação através de opsonização no tecido esplênico e linfóide. O efeito imunossupressor é mantido por, pelo menos, 2-3 meses após uma série de injeções (4 a 10 doses, geralmente) com a proporção de 1,5 mg/kg por dia. A globulina antitimocítica também é usada para tratar a rejeição aguda, especialmente a rejeição de alto grau, para a qual a terapia com esteróides pode ser insuficiente. Já o Basiliximabe consiste em anticorpos para o receptor de interleucina 2 (IL-2) de células T, impedindo a ativação destes linfócitos T em vez de tirar estas células de circulação, como faz a globulina antitimocítica. O medicamento previne a rejeição, com redução relativa de 30% nos estudos iniciais em comparação com o placebo. No entanto, é ineficaz em reverter rejeição já estabelecida. A dosagem é de 20 mg no dia 0 e no dia 4, proporcionando

saturação do receptor por 30 – 45 dias (ALONSO et al., 2014; CANTAROVICH et al., 2002).

Os inibidores da calcineurina – ciclosporina e tacrolimo – continuam sendo o padrão de tratamento no transplante renal, apesar das múltiplas interações medicamentosas e efeitos colaterais que incluem toxicidade renal e fibrose. Tanto a ciclosporina quanto o tacrolimo se ligam a imunofilinas intracelulares e assim previnem a transcrição de IL-2 e a produção de células T (Fig. 12). Os medicamentos funcionam de forma semelhante, mas com diferentes locais de ligação. A ciclosporina foi amplamente substituída pelo tacrolimo, uma vez que o último apresenta maior confiabilidade de dosagem e maior potência associadas a menores taxas de rejeição. O tacrolimo é tipicamente administrado duas vezes ao dia (1-6 mg /dose). Além disso, ele gera menos efeitos colaterais que a ciclosporina que incluem hipertensão e hipercolesterolemia. Por outro lado, a hiperglicemia tende a piorar com o tacrolimo, em comparação com a ciclosporina, e a combinação do tacrolimo com esteróides frequentemente está relacionada ao diabetes. O tacrolimo também pode causar insuficiência renal aguda e crônica, especialmente em altos níveis de drogas, bem como neurotoxicidade, tremores e perda de cabelo. Tacrolimo geralmente é utilizado em associação a outros imunossupressores, como o inibidor de rapamicina, everolimo, por exemplo, que se liga à proteína 12 de ligação da imunofilina FK (FKBP-12) para bloquear a atividade de mTOR (AUGUSTINE, 2018; CANTAROVICH et al., 2002; SHIHAB et al., 2017).

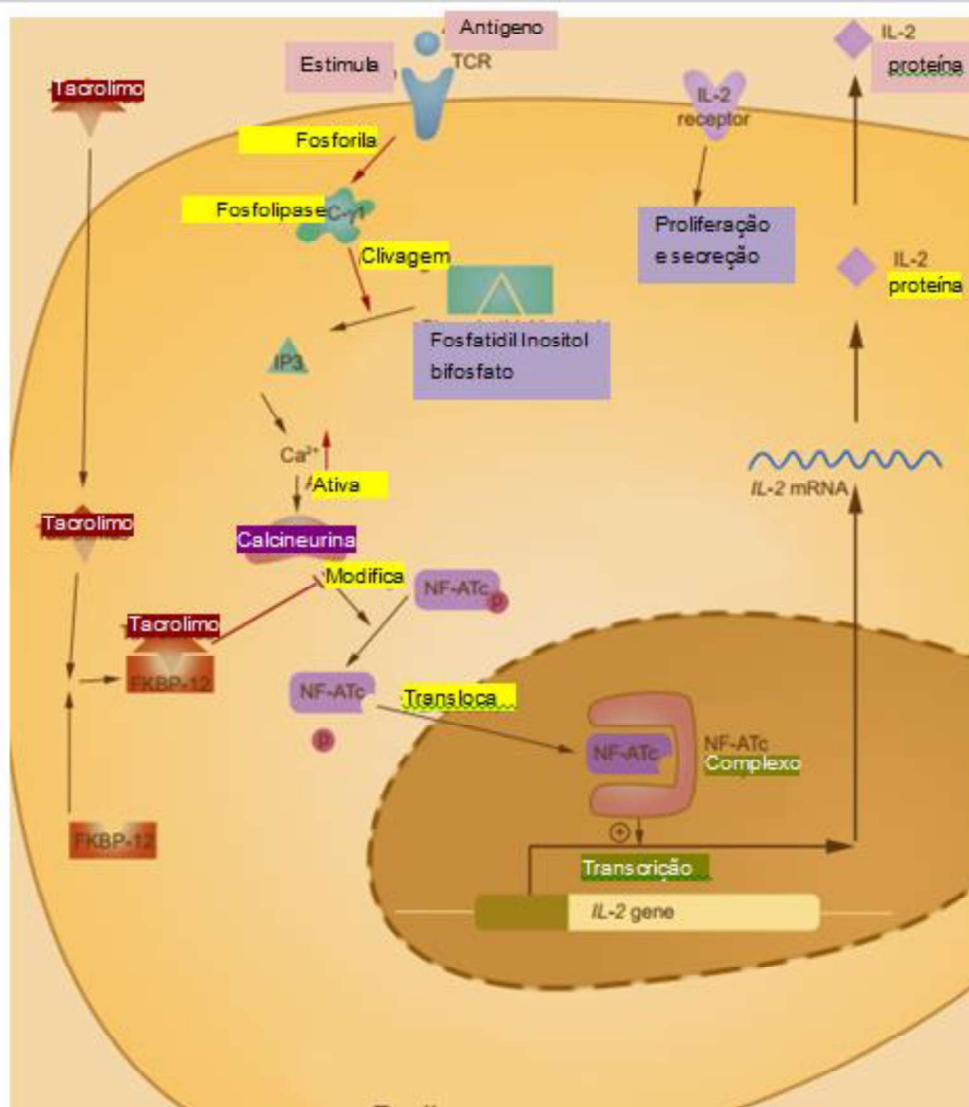


Figura 11: Inibição da via das calcineurinas pelo imunossupressor Tacrolimo (Adaptado de: LI, C. J.; LI, 2015).

É importante conhecer como ocorre a rejeição do enxerto para então compreender a real atuação do tacrolimo na inibição deste processo. Há dois padrões principais de rejeição do enxerto após o transplante de órgãos: rejeição aguda e crônica. Durante a rejeição ao enxerto, células T, células B e citocinas desempenham papéis importantes. As células T reconhecem os antígenos dos doadores e são ativadas para proliferar, diferenciar e secretar citocinas, que estimulam a produção de anticorpos pelas células B. Essas citocinas também ajudam as células T citotóxicas a desenvolver citotoxicidade contra o órgão transplantado. Os antígenos do enxerto são reconhecidos pelos receptores de células T o que induz a geração dos segundos mensageiros das células T, e esta ativação leva a um alto nível sustentado de cálcio intracelular. O cálcio ativa a

calcineurina fosfatase, que altera o componente citoplasmático do fator nuclear e o transporta para o núcleo. Então, o fator de transcrição é formado, o que pode ativar a transcrição do gene da IL-2, a qual pode induzir proliferação e ativação de células T. A IL-2 também aumenta a atividade das células T citotóxicas contra o enxerto (INGULLI, 2010; LI, C. J.; LI, 2015; PATTISON; KRENSKY, 1997).

O tacrolimo pode formar um complexo com FKBP-12. Esse complexo inibe fortemente a atividade da calcineurina fosfatase e inibe a expressão de IL-2. Subsequentemente, a ativação de células T e a secreção de citocinas são inibidas. Este é o mecanismo pelo qual o tacrolimo previne a rejeição do aloenxerto (LI, C. J.; LI, 2015; PATTISON; KRENSKY, 1997).

1.2.2. Tacrolimo e a infecção por HEV

A descrição de desenvolvimento para doença crônica devido a infecções por HEV em receptores de transplantes de órgãos sólidos na França, em 2008, aumentou a conscientização para uma doença importante, porém amplamente subestimada. Desde então, infecções persistentes por HEV foram descritas em diferentes coortes de pacientes transplantados imunossuprimidos (BEHRENDT et al., 2014; DALTON et al., 2009; KAMAR et al., 2008).

É importante ressaltar que o HEV tem sido associado à doença hepática terminal e até mesmo à mortalidade associada. As infecções por HEV parecem ser muito mais comuns em países de circulação de HEV3 do que se pensava anteriormente. Por exemplo, nestas regiões de circulação do genótipo 3 responsável por infecções crônicas nestas populações imunossuprimidas, entre 10% e 50% das populações estudadas eram positivas para o anticorpo anti-HEV (BENDALL et al., 2010; MANSUY et al., 2011; WENZEL et al., 2014) e estes pacientes imunossuprimidos estão em risco de infecção por HEV superior à da população imunocompetente (PAS et al., 2012).

Há também algumas evidências de que o regime imunossupressor pode ser importante para a infecção pelo HEV. Diversos autores têm sugerido por que os casos crônicos de hepatite E são mais frequentes em pacientes transplantados de fígado e rim quando estes pacientes foram tratados com o tacrolimo, como inibidor da via das calcineurinas, em comparação com os pacientes que receberam ciclosporina. É também interessante lembrar que, durante imunossupressão por tacrolimo, o HEV é capaz de mimetizar a rejeição a enxerto hepático (ALLAIRE et

al., 2018; BEHRENDT et al., 2014; KAMAR et al., 2011; WANG, Y.; METSELAAR; et al., 2014).

Curiosamente, a aplicação de tacrolimo aumentou a replicação viral, corroborando as observações clínicas. No entanto, o outro inibidor de calcineurina, a ciclosporina, também aumentou a replicação viral, o que não pôde ser confirmado ainda em coortes de pacientes. Diferentes inibidores de mTOR e rapamicina, como o everolimo, também levaram a uma replicação aumentada de células transfectadas com HEV *in vitro* (BEHRENDT et al., 2014; WANG, Y.; ZHOU; et al., 2014; ZHOU et al., 2014).

1.3. Justificativa

Como uma doença negligenciada, há uma escassez de dados referentes a circulação e prevalência da hepatite E no Brasil. Os estudos de soroprevalência realizados trazem resultados discrepantes de região para região, o que dificulta a interpretação do contexto socioepidemiológico atual no país. Além disso, é descrita uma baixa incidência da hepatite E na população do Brasil em geral, contudo, quando se trata de pacientes imunocomprometidos, este cenário muda (BAYLIS, SALLY A. et al., 2011; DALTON et al., 2013; DE SILVA et al., 2012; GOENS; PERDUE, 2004; KAMAR et al., 2011; RIVERO-JUAREZ et al., 2015; WENZEL et al., 2014).

Como o genótipo descrito no Brasil até o momento (HEV3) é conhecido como agente etiológico de infecções crônicas e persistentes em populações imunocomprometidas e, com o aumento de transplantes renais a cada ano, é importante que esta população seja monitorada com o uso de uma técnica sensível e específica para a detecção de HEV o quanto antes, com a combinação da técnica de RT-qPCR e de testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-HEV IgG e IgM. Assim, será possível cobrir as limitações de cada teste, evitando tanto resultados falseados e levando ao tratamento adequado dos pacientes positivos antes, se possível, que a infecção se desenvolva em quadros mais graves. (BAYLIS, SALLY A. et al., 2011; DALTON et al., 2013; DE SILVA et al., 2012; GOENS; PERDUE, 2004; KAMAR et al., 2011; RIVERO-JUAREZ et al., 2015; WENZEL et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a prevalência da infecção pelo vírus da hepatite E em pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a prevalência do HEV entre doentes renais crônicos dependentes de hemodiálise
- Determinar a prevalência de HEV entre transplantados renais do estado de Goiás
- Monitorar durante 12 meses a prevalência da infecção por HEV na população de DRC transplantados imunossuprimidos por tacrolimo do Rio de Janeiro
- Comparar as prevalências de HEV entre a população transplantada pacientes HIV positivos (imunocomprometidos) e doadores de sangue saudáveis

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados na forma de manuscritos, sendo dois publicados e dois submetidos para publicação em revistas científicas indexadas na base de dados da Capes. Os artigos estão listados a seguir na ordem em que foram realizados e que serão discutidos:

ARTIGO 1 (métodos): Detection and quantification of hepatitis E virus in the absence of IgG and IgM anti-HEV in HIV positive patients.

ARTIGO 2 (submetido): Elevated exposition to hepatitis E in chronic kidney disease patients under hemodialysis in Brazil.

ARTIGO 3: Prevalence of hepatitis E virus RNA and antibodies in a cohort of kidney transplant recipients in Central Brazil.

ARTIGO 4 (submetido): Hepatitis E virus prevalence among kidney transplanted population immunosuppressed by tacrolimus in Brazil.

ORIGINAL ARTICLE

Detection and quantification of hepatitis E virus in the absence of IgG and IgM anti-HEV in HIV-positive patients

A.L. Salvio¹, A.O. Lopes¹, A.J. Almeida^{2,†}, N.R. Gardinali³, L.R.P. Lima¹, J.M. de Oliveira³, F.S. Sion², L.C.P. Ribeiro², M.A. Pinto³ and V.S. de Paula¹ 

¹ Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

² Hematology Department, Gaffrée & Guinle University Hospital, Rio de Janeiro State Federal University/Unirio, Rio de Janeiro, Brazil

³ Laboratory of Technological Development in Virology, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Keywords

coinfection, diagnosis, hepatitis E, HIV, real-time PCR, standard curve, viral load.

Correspondence

Vanessa Salette de Paula, Oswaldo Cruz Foundation, IOC – Av. Brasil 4365-Manguinhos, Pav. Helio e Peggy Pereira B010, 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail: vdepaula@ioc.fiocruz.br

[†]In memorial.

2018/0419: received 26 February 2018, revised 28 May 2018 and accepted 8 June 2018

doi:10.1111/jam.14024

Abstract

Aims: To improve RT-qPCR with an internal control and a synthetic standard curve to detect HEV in HIV co-infected patients.

Methods and Results: A single-stranded RNA (ssRNA) and a double-stranded DNA (dsDNA) synthetic curve were designed, compared to the international reference panel for HEV genotypes, and tested to quantify and detect a reference panel for HEV genotypes. The detection limit of the RNA synthetic curve (50 copies per ml) was better than the DNA synthetic curve (100 copies per ml) and the WHO standard curve (250 copies per ml). Then, 280 serum samples from HIV-positive patients were tested for HEV RNA, which was detected in 3.6% of serum samples. The viral load ranged from 2×10^2 copies per ml to 4.78×10^8 copies per ml. HEV IgM/IgG antibodies were not detected in the RNA-positive patients. Sequencing analysis of HEV showed that the virus belongs to genotype 3 (HEV GT3).

Conclusions: Real-time PCR was a useful tool to estimate co-infection with HEV/HIV, even in patients with low viral loads and undetectable anti-HEV IgG and IgM antibodies.

Significance and Impact of the Study: Hepatitis E virus genotype 3 (HEV GT3) has been associated with silent chronic hepatitis and cirrhosis in HIV-positive subjects worldwide, but there is a lack of data on this co-infection in Brazil.

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), hepatitis E infection is an important public health issue, mainly in special populations, such as immunocompromised (HIV positive), immunosuppressed people (solid organ transplant recipients), pregnant women, person with pre-existing liver disease or malnutrition (Lindsay 1994; Peters 2009). Hepatitis E virus (HEV) is a hepatotropic infection agent causing both self-limiting acute hepatitis in regular populations and chronic hepatitis, which is associated with high levels of morbidity and mortality in immunocompromised populations, such as the low ratio CD4/CD8 human immunodeficiency virus (HIV)-positive persons. In addition, chronic HEV

infection leads to liver cirrhosis in these immunocompromised patients (Labrique *et al.* 2010; Robbins *et al.* 2014; Rivero-Barciela *et al.* 2015; World Health Organization, WHO Expert Committee on Biological Standardization 2015; Zhang *et al.* 2015).

HEV has four genotypes that can infect humans: genotypes 1 (HEV-GT1) and 2 (HEV-GT2) cause acute infections through the ingestion of contaminated water and food by the faecal-oral route, and genotypes 3 (HEV-GT3) and 4 (HEV-GT4) can be transmitted by the ingestion of contaminated pork meat and bushmeat, as well as swine products. HEV-GT3 is known to cause acute infection in the general population and chronic disease in immunocompromised patients, such as HIV-positive patients. Genotypes 1 and 2 are more common in

developing countries, genotype 3 in developed countries and genotype 4 in restricted areas (Caron *et al.* 2006; Bouwknegt *et al.* 2007; Feagins *et al.* 2007; Dalton *et al.* 2009; Aggarwal and Naik 2010; Geng *et al.* 2011; Berto *et al.* 2012; Kamar *et al.* 2012; Passos *et al.* 2013; Passos-Castilho *et al.* 2015). There is a notable increase in autochthonous cases caused by HEV-GT3 in developed countries (Santos *et al.* 2010; Passos *et al.* 2013; Passos-Castilho *et al.* 2015).

There are few standard methodologies for HEV detection, especially in HIV co-infected samples, which leads to incorrect diagnosis and deficiency of data for the correct treatment of these patients. This occurs due to a lack of sensitivity and accuracy of regular methods and the need for information about this kind of co-infection (Arends *et al.* 2014; Gerber *et al.* 2014).

Thus, it is important to improve and standardize a sensitive molecular technique for the detection of HEV RNA, reducing false-negative results due to low viral loads in serum. Therefore, the aim of this study was to investigate HIV/HEV co-infection through RT-qPCR with a standard synthetic curve and an internal control to detect and quantify HEV RNA.

Materials and methods

TaqMan probe-based qPCR assay for detection and quantification of the HEV genome.

The TaqMan probe-based quantitative PCR assay (TaqMan qPCR) described by Jothikumar *et al.* (2006) was improved for quantification using a synthetic DNA standard curve (Tourinho *et al.* 2015) with a nucleic acid-based exogenous internal positive control (IPC) added to the samples before the RT-qPCR reaction (TaqMan, Life Technologies, Carlsbad, CA). Positive faecal and serum samples obtained from pigs were used as positive controls. The sensitivity of the assay was assessed using serial 10-fold dilutions of an HIV-positive sample spiked with an HEV-positive swine control of known viral load. The serial dilutions with HEV spiked samples were realized to confirm if the dsDNA curve, the use of IPC and the presence of HIV in the samples does not interfere in detection and quantification of HEV RNA.

For the ssRNA curve synthesis, the dsDNA curve was used as a template. It was submitted to a transcription process with the use of a MAXI Script T7 commercial kit (Ambion; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), for the transcription of the ORF3 region according to the manufacturer's instructions.

A panel of HEV-positive plasma samples including genotypes 1a (two strains), 1e, 2a, 3b, 3c, 3e, 4c and 4g was used to evaluate the TaqMan qPCR performance and the sensitivity of the assays. The dsDNA and ssRNA

synthetic curves were compared to the WHO standard curve (WHO International Standard (IS) for HEV RNA (# 6329/10) WHO/BS/2015.2264) Paul Erlich Institute, Germany).

Source of samples

After evaluation of the synthetic curve to determine viral load, it was used for the detection and quantification of HEV RNA in HIV seropositive individuals treated with antiretroviral. Serum samples were collected from 280 HIV seropositive patients attending a reference centre for HIV treatment at the Hospital Universitário Gaffrée & Guinle, Rio de Janeiro, Brazil. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (CAAE 46165015.4.0000.5258). All patients signed a written informed consent form. The study included samples collected in 2012 (114 samples), 2013 (105 samples) and 2014 (61 samples). Blood samples (5 ml) were collected by venipuncture using Vacutainer blood collection tubes (K2EDTA dry spray; Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). After centrifugation, the plasma samples were stored at -70°C . The sample trial consisted of the exclusion of positive samples to serological markers for hepatitis A, B and C by enzyme immunoassay, the standard technique for the diagnosis of these viral infections (Biokit Reagents, Barcelona, Spain).

In this study, all samples were tested for anti-HAV, anti-HBV and anti-HCV antibodies as a trial test. This procedure was adopted because serological assays are the standard protocol for viral hepatitis, so no further tests regarding to these viruses were performed. However, according to World Health Organization (WHO) Fact Sheets about Hepatitis A, B, C, D and E viruses (2017), for HEV the nucleic acid techniques (NAT) is particularly needed in areas where hepatitis E is infrequent and in cases of chronic infections.

NAT and serological assays

Viral nucleic acids were extracted from 200 μl of HIV-positive serum samples using the High Pure Nucleic Acid Isolation Kit (Roche, Penzberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Negative controls were ultrapure nuclease free water and serum negative to HEV RNA. Positive serum samples obtained from pigs were used as positive controls. These controls were also submitted to the extraction procedure. All care was taken to avoid contamination during procedures.

The purified RNA was submitted to a Reverse Transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay for amplification of the HEV ORF3 region as described by Jothikumar *et al.* (2006) (Table 1) using

the synthetic curve and the exogenous IPC, a commercial IPC labelled with a VIC probe (Applied Biosystems, San Francisco, CA). All samples were tested in triplicate, and the positive samples were extracted again and retested in duplicate twice to confirm the results.

All qPCR-positive samples were also tested using One-step PCR for the qualitative detection of ORF1 (Wang *et al.* 1999) and ORF2 (Huang *et al.*, 2002). In addition, serum from the positive samples was tested by the RecomWell HEV IgG and the RecomWell HEV IgM (Mikrogen, Neuried, Germany) according to the manufacturer's instructions for the detection of anti-HEV IgG and IgM antibodies.

ORF1 detection by qualitative PCR was optimized. In order to confirm the best annealing temperature (TA) of the primers and to establish the most appropriated temperature the changes in the protocol was validated comparing the different results obtained in the repetitively and reproducibility of PCR using diluted known positive samples and controls.

The cDNAs of the RT-qPCR-positive samples were submitted to the optimized protocol as follows: 94°C for 2 min, then 40 cycles of 94°C for 1 min, 64°C for 1 min and 72°C for 1 min, and finally 72°C for 7 min for PCR1; and 94°C for 2 min, then 30 cycles of 94°C for 1 min, 53.7°C for 1 min and 72°C for 1 min, and finally 72°C for 7 min for the nested PCR. The concentration and the volume of the reagents were according to Wang *et al.* (2018). The positive samples in the qualitative PCR were sequenced by Sanger technique by the Sequencing Platform from the Oswaldo Cruz Institute using the kit BigDye terminator 3.1 cycle sequencing (Thermo Fischer) in the Gen Amp PCR system 9700 sequencer (Thermo Fischer), according to manufactures' instructions. The sequence was edited by BIOEDIT software and compared with samples from GenBank using MEGA 6.0 software. The dendrogram was created using MEGA 6.0 software by the maximum likelihood test.

Statistical analysis

Data, such as gender, age, viral load, CD4 and CD8, were recorded in an Excel database. The data were used for

Table 1 Sequences for HEV ORF3 detection

	Sequence
Sense primer	5'-GGTGGTTCTGGGGTGAC-3'
Antisense primer	5'-AGGGTTGGTTGGATGAA-3'
Probe	FAM5'-TGATTCTCAGCCCTTCGC-3'BHQ1
Synthetic curve	5'-TTCGTAGGGGTTGGTTGGATGAACGTAGCG AAGGCTGAGAATCAATGCGTGTCACCCCA GAA ACCACCTTCGT-3'

comparison and determination of the correlation between Lymphocyte TCD4⁺ and TCD8⁺ ratio and the presence of HIV/HEV co-infection during analysis using GRAPHPAD PRISMA 5.0 software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA).

Results

TaqMan qPCR sensitivity and detection limits:

All 11 samples of the panel were detected by the qPCR assays. The standard curves (DNA: slope 3.20 and RNA: slope 3.31) showed strong correlation coefficients (R^2) of 0.98 and 0.99, and amplification efficiencies of 105.31 and 99.75%, respectively, which were comparable to the WHO standard curve (slope 3.45 and E 102.60%). The detection limit of the dsDNA standard curve qPCR assay was 100 copies per ml (17.8 IU ml⁻¹) and the ssRNA standard curve qPCR assay was 50 copies per ml (8.9 IU ml⁻¹), whereas the WHO standard curve showed a detection limit of 250 copies per ml (44.5 IU ml⁻¹; Tables 2 and 3). Additionally, both RT-qPCR assays (using the dsDNA or the ssRNA synthetic curve) were able to detect all six HIV-positive samples spiked with 10-fold dilutions of an HEV-positive control (Table 4). Moreover, the IPC was detected by a VIC-labelled probe in all samples tested, thus preventing false-negative results.

HEV detection and quantitation in HIV-positive serum samples

In this study, serum samples were collected from HIV seropositive patients between January 2012 and December 2014. As shown in Table 5, this included 141 men and 139 women with a median age of 41.2 ± 11.6 years and a lymphocyte TCD4⁺ average load of 604.2 ± 321.1 cells per mm³. HEV RNA was detected in 10 of 280 (3.6%) samples, with viral loads ranging from 2 × 10² copies per ml (0.85 × 10⁰ IU ml⁻¹) to 4.78 × 10⁸ copies per ml (8.55 × 10⁷ IU ml⁻¹).

Table 2 Comparison of synthetic standard curves to the World Health Organization (WHO) reference curve

Standard curve	Slope	R^2	$E>$	Detection limit (copies per ml)	Detection limit (IU per ml)
Synthetic DNA curve	3.20	0.98	105.31	100	17.8
Synthetic RNA curve	3.31	0.99	99.75	50	8.9
WHO curve	3.45	0.97	102.60	250	44.5

Table 3 CT value and SD comparison between the dsDNA standard synthetic curve, the ssRNA standard synthetic curve and the WHO plasmidial dsDNA standard curve

Synthetic curve quantification	Mean CT (\pm SD) dsDNA curve	Mean CT (\pm SD) ssRNA curve	Mean CT (\pm SD) WHO DNA curve
10^8	14.648 (\pm 0.313)		
10^7	17.561 (\pm 0.164)		
10^6	20.560 (\pm 0.069)		
10^5	23.839 (\pm 0.081)	22.735 (\pm 0.4398)	25.971 (\pm 0.0035)
10^4	26.988 (\pm 0.007)	25.773 (\pm 0.1364)	30.030 (\pm 0.0473)
10^3	30.156 (\pm 0.038)	29.343 (\pm 0.2397)	33.011 (\pm 0.4313)
10^2	34.171 (\pm 0.778)	33.803 (\pm 0.5374)	36.354 (\pm 0.7778)

Table 4 Precision test of the dsDNA synthetic curve for HEV RNA detection in different known concentrations in the presence of HIV RNA in the sample and use of the IPC

HIV-positive samples spiked with HEV-positive control (copies per ml of HEV RNA)	Mean quantification in copies per ml (SD)
10^6	4.99×10^6 (\pm 1.605132393)
10^5	4.66×10^5 (\pm 1.513208512)
10^4	4.56×10^4 (\pm 2.001112191)
10^3	3.94×10^3 (\pm 0.403050865)
10^2	4.53×10^2 (\pm 0.509116882)

Table 5 Medians and SDs of age, gender and CD4 from HIV-infected patients

	HIV positive ($n = 280$)	P-Value
Age (years)		
Median \pm SD	41.2 \pm 11.6	<0.0001*
Minimum value	17	
Maximum value	69	
Gender, n (%; IC 95%)		
Female	141 (50.35; 44.0–51.0)	0.9797**
Male	139 (49.65; 49.0–56.0)	
CD4 ⁺ T cells (mm^3)		
Median \pm SD	604.2 \pm 321.1	***
CD4 ⁺ T cells, n (%)		
<500/ mm^3	114 (40.7)	***
\geq 500/ mm^3	166 (59.3)	

* = T-student test; ** = Q-square test; *** = One factor ANOVA Bonferroni post-test.

Relationship between CD4 and CD8 counts and HEV detection:

CD4⁺ and CD8⁺ T cell ratio from the HIV/HEV-positive samples were analysed in comparison to the presence of

HEV RNA in serum. It was observed that 30% of the HEV-positive patients had low CD4⁺ (<250 mm^3), CD8⁺ and CD4/CD8 (<0.80) relation ratio, which means that only these patients were immunocompromised at the moment that the serum was collected (Table 6). No RT-qPCR HEV-positive samples were positive for serological tests for anti-HEV IgM and anti-HEV IgG.

Qualitative PCR of positive samples and genotyping

To genotype, the positive samples in real-time PCR were also tested by qualitative PCR for the ORF1 and ORF2 regions (Huang *et al.*, 2002; Wang *et al.* 2018).

The sample HEV12998 was positive by RT-PCR when tested in duplicate and in triplicate (CT 27.03), this sample had the higher viral load detected by qPCR, and it was possible to amplify ORF1 by nested PCR and to obtain the sequence and consequently, the genotype.

The samples with lower viral load in RT-qPCR were not amplified by nested PCR. Sequencing of this sample by BIOEDIT and its analysis by MEGA 6.0 showed the infection was caused by HEV GT3 in that particular HIV-positive patient sample (HEV12998; GenBank submission # 2027654).

Discussion

Hepatitis E is an important public health problem, with approximately 20 million HEV infection cases and 56 600 hepatitis E-related deaths worldwide, becoming the most common faecal-oral route hepatitis infection in the world. According to a World Health Organization (WHO) report published in 2015, the development of more studies to elucidate questions related to diagnosis, treatment and vaccination against HEV is needed. Additionally, with the WHO strategy, called NOHep, for reducing or eliminating hepatitis B and C from the world by 2030, HEV may increase as a potential challenge in public health (Aggarwal and Naik 2010; World Health Organization, WHO Expert Committee on Biological Standardization 2015).

Aiming to develop an efficient methodology, probes and primers described by Jothikumar (Jothikumar *et al.* 2006) were used with a synthetic curve for ORF3 detection (Tourinho *et al.* 2015) and an internal control. Jothikumar's protocol (Jothikumar *et al.* 2006) was used because it is considered to have the best sensibility and specificity according to Mokhtari *et al.* (2013) who compared in-house and commercial methodologies for HEV RNA detection, achieving a detection limit of 250 copies per ml (44.5 IU ml^{-1}).

Here, synthetic standard curves of dsDNA and ssRNA were compared to the WHO standard curve. The

Table 6 Relation between low CD4⁺/CD8⁺ ratio and detection of HEV in HIV-positive samples

Identification	Year	Gender	Age	CD4 ⁺ cells/mm ³	CD8 ⁺ cells/mm ³	CD4/CD8	HEV viral load (IU ml ⁻¹)	Anti-HEV IgM/anti-HEV IgG	CT
HEV12725	2012	M	56	274	1254	0.22	0.96	N.D.	38.84
HEV12268	2012	M	36	698	883	0.79	0.61	N.D.	38.63
HEV12224	2012	M	28	569	771	0.73	3.92 × 10	N.D.	33.20
HEV12165	2012	M	52	N.I.	N.I.	N.I.	0.85	N.D.	38.03
HEV12995	2012	F	36	218	1015	0.21	8.55	N.D.	34.09
HEV12265	2012	F	28	428	709	0.60	9.16	N.D.	35.16
HEV12998	2012	M	54	343	971	0.35	7.59 × 10 ³	N.D.	27.03
HEV12993	2012	F	N.I.	223	1190	0.19	3.10	N.D.	35.26
HEV12112	2012	M	22	1038	739	1.40	4.52	N.D.	34.78
HEV13674	2013	F	54	193	761	0.25	1.43 × 10 ²	N.D.	30.61

N.I., no information available; M = Male; F = Female; N.D. = not detected.

comparison was undertaken because a dsDNA curve cannot be submitted to the reverse transcription reaction of the RT-qPCR process. The synthetic dsDNA curve was the standard model for the synthesis of the ssRNA curve with the use of the MAXI Script T7. The use of a synthetic ssRNA can minimize false-negative results due to reverse transcription of the RT-qPCR. The detection limit of the ssRNA curve was 50 copies per ml; 8.9 IU ml⁻¹. These results were better than the dsDNA curve (100 copies per ml; 17.8 IU ml⁻¹) and reference HEV curve from the WHO (250 copies per ml; 44.5 IU ml⁻¹). Previous studies showed that the detection limit tends to be different from the ssRNA curve in comparison with the dsDNA curve (Ward *et al.* 2009; Troxler *et al.* 2011; Abravane *et al.* 2012; Mokhtari *et al.* 2013; Gerber *et al.* 2014; Blasco-Perin *et al.* 2015). The IPC internal control was tested, confirming the negative results as truly negative. The use of internal controls, in addition to reducing false-negative results, also allows the detection of the presence of PCR inhibitors in samples (Garson *et al.*, 2005; Bustin *et al.*, 2009; Ward *et al.* 2009; Mokhtari *et al.* 2013).

After establishing the limits of detection, qPCR was used to detect HIV/HEV co-infection. In those experiments, 3.6% of the HIV-positive samples were HEV RNA positive. The prevalence was considered to be average in comparison to the prevalence of HIV/HEV co-infection described worldwide, which varies from country to country and according to the methodology used. For example, the prevalence ranges from 0% to 4%: 0% in Brazil (Ferreira *et al.* 2018), 0.5% in France (Kaba *et al.* 2011), 0.95% in Poland (Bura *et al.* 2017), 3.5% in Gabon (Bivigou-Mboumba *et al.* 2017) and 4% in the United States (Crum-Cianflone *et al.* 2012). A recent study conducted in São Paulo, Brazil did not find any HEV RNA-positive samples in 354 HIV-positive patients (Ferreira *et al.* 2018). In our study, a viraemia of 3.6% was found. Unfortunately, these patients were not followed to

determine if they were chronic cases or sporadic cases. However, the first HEV autochthonous case in Brazil was reported in Rio de Janeiro (Santos *et al.* 2010), the same city in which our study was conducted. These results reinforce the importance of the use of a standard technique that may be the reference to elucidate the real panorama of HEV infection prevalence worldwide (Fainboim *et al.*, 1999; Kaba *et al.* 2011; Crum-Cianflone *et al.* 2012).

Because of the properly applied treatment, the majority (70%) of the HIV-positive patients were not in an immunocompromised state. At the moment that the blood was collected, only 30% of HIV/HEV co-infected patients had low CD4⁺ ratio, <250 cells per mm³ of blood. Immunocompromised HIV-positive subjects can develop HEV infection, since asymptomatic infections to persistent hepatitis E and chronic disease. The chronic disease is characterized by HEV RNA detectable in the serum and change in hepatic enzyme levels for longer than 6 months, leading to hepatic cirrhosis, in 10% of cases (Colson *et al.* 2009; Dalton *et al.* 2009). Thus, the HIV group presents a higher risk of developing a HEV chronic infection because of the changes in CD4⁺ T cell levels even during the treatment, once the immunocompromised patients are more susceptible to the occurrence of HEV infections in comparison to the immunocompetent population (Debes *et al.* 2016). In addition, studies show that HEV infection in HIV-positive patients probably occurs by ingestion of contaminated food, mainly swine (Park *et al.* 2016; Nan *et al.* 2017). In these situations, the infection is caused by genotype 3, the same genotype found in this study and reported in Brazil. It is known that HEV-GT3 is one of the only strains capable of causing chronic infection (Rivero-Juarez *et al.* 2015). Indeed, recent reports of rare chronic infections in immunosuppressed transplant recipients, caused by the genotype 4 of HEV, also a zoonotic genotype, according to Wang *et al.* (2018). However, in our study, it was not

possible to confirm the association between the detection of HEV genotype 3 with swine ingestion.

The viral load of the positive samples ranged from 2.0×10^2 copies per ml (0.31 IU ml^{-1}) to 4.78×10^8 copies per ml ($8.55 \times 10^7 \text{ IU ml}^{-1}$), showing low viral loads in most of the samples. The positive samples were retested in duplicate and the viral loads obtained from the first test and the CT values remained the same or close to the first value when the samples were extracted again.

The sample HEV12998 was positive for ORF1 and sequenced. Unfortunately, the other HEV RNA-positive samples could not be sequenced due to low viral loads. The low viral load of HEV in blood during infection was described previously by Gurmit *et al.* (2013) and by Politou *et al.* (2015). Furthermore, in samples with a low viral load, RT-qPCR is more sensitive than qualitative PCR, when it comes to HEV specifically, which presents low viral loads in serum. In subclinical cases, RNA detection may be the only evidence of HEV infection (Pawlotsky 2002; Jothikumar *et al.* 2006; Mushahmar 2008). The HEV12998 sample was sequenced and classified as genotype 3. This result corroborates a previous study in Brazil that described the HEV-GT3 circulation in the country (Santos *et al.* 2010).

Although the HEV RNA-positive samples had been confirmed by RT-qPCR in triplicate and retested in duplicate twice, none of the replicates were positive in the serological tests (IgM and IgG). This fact has been related to low titres of anti-HEV IgG and IgM antibodies in serum or, probably, due to late or nonexistent seroconversion, as the remains of these antibodies in blood can vary in an undetermined way (Gerber *et al.* 2014). Additionally, in accordance with Pischke *et al.* (2010), HEV seroprevalence ratio in the HIV population may show a large variability according to the serological assay used. This way, the serological assay reliability in an HIV-positive population in a low prevalence area for HEV must be considered (Vollmer *et al.* 2016).

For the HEV diagnosis, HEV RNA detection by RT-qPCR presented a higher sensibility and specificity in comparison to serological anti-HEV IgM and IgG detection tests. This result is important because studies have shown that biochemical anomalies caused by HEV infection may interfere with the sensibility and specificity criteria of commercially available serological tests; IgG titres can remain detectable in serum for an undetermined period of time or seroconversion may not occur (Drobeniuc *et al.* 2010; Khudyakov and Kamili 2011; Arends *et al.* 2014; Gerber *et al.* 2014; Bettinger *et al.* 2014; Pérez-García *et al.* 2014; Wu *et al.* 2017).

In this study, the use of a RT-qPCR molecular methodology for HEV RNA detection in HIV-positive serum samples was efficient to detect and determine the

viral load in co-infected patients. The results demonstrated that most patients had low HEV RNA titres and no anti-HEV IgM and IgG antibodies, which leads to false-negative results in less sensitive methods in populations with medium to low prevalence.

In conclusion, the use of a synthetic standard curve in the RT-qPCR technique allowed the detection and quantification of HEV in HIV-positive samples, even with low viral loads in serum and undetectable anti-HEV IgG and IgM antibodies. This technique can be used to monitor hepatitis E virus genotype 3 (HEV GT3) and in future studies on the association of silent chronic hepatitis with cirrhosis in HIV-positive subjects worldwide.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abrevane, F., Sandres-Saune, K., Lhomme, S., Dubois, M., Mansuy, J.M. and Izopet, J. (2012) Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis e virus RNA. *J Clin Microbiol* **50**, 897–902.
- Aggarwal, R. and Naik, S. (2010) Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 1484–1493.
- Arends, J.E., Ghisetti, V., Irving, W., Dalton, H.R., Izopet, J., Hoepelman, A.I. and Salmon, D. (2014) Hepatitis E: an emerging infection in high income countries. *J Clin Virol* **59**, 81–88.
- Berto, A., Martelli, F., Grierson, S. and Banks, M. (2012) Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* **18**, 1358–1360.
- Bettinger, D., Cathomen, T., Emmerich, F., Hasselblatt, P., Hengel, H., Herzog, R., Kappert, O., Maassen, S. *et al.* (2014) Transfusion-transmitted hepatitis E in Germany, 2013. *Euro Surveill* **19**, pii: 20812.
- Bivigou-Mboumba, B., Rouet, F., Mouinga-Ondeme, A., Deleplancque, L., Sica, J., Ndjoiy-Mbiguino, A., Njouom, R. and François-Souquière, S. (2017) Hepatitis B, C, and E infection among HIV-infected patients in Franceville, Gabon: retrospective cross-sectional study. *Med Sante Trop* **27**, 274–280.
- Blasco-Perrin, H., Madden, R.G., Stanley, A., Crossan, C., Hunter, J.G., Vine, L., Lane, K., Devooght-Johnson, N. *et al.* (2015) Hepatitis E virus in patients with decompensated chronic liver disease: a prospective UK/French study. *Aliment Pharmacol Ther* **42**, 574–581.
- Bouwknegt, M., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W.H., Rutjes, S.A. and de Roda-Husman, A.M. (2007) Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in the Netherlands. *J Food Prot* **70**, 2889–2895.
- Bura, M., Bukowska, A., Bura, A., Michalak, M. and Mozer-Lisewska, I. (2017) Hepatitis E virus antibodies in HIV-

- infected patients and blood donors from western Poland: a preliminary report. *Adv Clin Exp Med* **26**, 577–579.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T. *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**, 611–622.
- Caron, M., Enouf, V., Than, S.C., Dellamonica, L., Buisson, Y. and Nicand, E. (2006) Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol* **44**, 3440–3442.
- Colson, P., Kaba, M., Moreau, J. and Brouqui, P. (2009) Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol* **45**, 269–271.
- Crum-Cianflone, N.F., Curry, J., Drobeniuc, J., Weintrob, A., Landrum, M., Ganesan, A., Bradley, W., Agan, B.K. *et al.*, The Infectious Disease Clinical Research Program HIV Working Group. (2012) Hepatitis E virus infection in HIV infected persons. *Emerg Infect Dis* **18**, 502–506.
- Dalton, H.R., Bendall, R.P., Keane, F.E., Tedder, R.S. and Ijaz, S. (2009) Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* **361**, 1025–1027.
- Debes, J.D., Pisano, M.B., Lotto, M. and Re, V. (2016) Hepatitis E virus infection in the HIV-positive patient. *J Clin Virol* **80**, 102–106.
- Drobeniuc, J., Meng, J., Reuter, G., Greene-Montfort, T., Khudyakova, N., Dimitrova, Z., Kamili, S. and Teo, C.G. (2010) Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin Infect Dis* **51**, 24–27.
- Fainboim, H., González, J., Fassio, E., Martínez, A., Otegui, L., Eposto, M., Cahn, P., Marino, R. *et al.* (1999) Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat* **6**, 53–57.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G. and Meng, X.J. (2007) Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* **88**, 912–917.
- Ferreira, A.C., Gomes-Gouvêa, M.S., Lisboa-Neto, G., Mendes-Correa, M.C.J., Picone, C.M., Salles, N.A., Mendrone-Junior, A., Carrilho, F.J. *et al.* (2018) Serological and molecular markers of hepatitis E virus infection in HIV-infected patients in Brazil. *Arch Virol* **163**, 43–49.
- Garson, J.A., Grant, P.R., Ayliffe, U., Ferns, R.B. and Tedder, R.S. (2005) Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. *J Virol Methods* **126**, 207–213.
- Geng, J., Wang, L., Wang, X., Fu, H., Bu, Q., Liu, P., Zhu, Y., Wang, M. *et al.* (2011) 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* **18**, 583–590.
- Gerber, P.F., Xiao, C.T., Cao, D., Meng, X.J. and Opriessnig, T. (2014) Comparison of real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of swine hepatitis E virus in fecal samples. *J Clin Microbiol* **52**, 1045–1051.
- Gurmit, K., Singh, J., Ijaz, S., Rockwood, N., Farnworth, S.P., Devitt, E., Atkins, M., Tedder, R. *et al.* (2013) Chronic hepatitis E as a cause for cryptogenic cirrhosis in HIV. *J Infect* **66**, 103–106.
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Schommer, S.K., Pierson, F.W., Toth, T.E. and Meng, X.J. (2002) 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* **40**, 1326–1332.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J. and Hill, V.R. (2006) A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* **131**, 65–71.
- Kaba, M., Richet, H., Ravaux, I., Moreau, J., Poizot-Martin, I., Motte, A., Nicolino-Brunet, C., Dignat-George, F. *et al.* (2011) Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Med Virol* **83**, 1704–1716.
- Kamar, N., Weclawiak, H., Guilbeau-Frugier, C., Legrand-Abravanel, F., Cointault, O., Ribes, D., Esposito, L., Cardeau-Desangles, I. *et al.* (2012) Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplant* **93**, 617–623.
- Khudyakov, Y. and Kamili, S. (2011) Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res* **161**, 84–92.
- Labrique, A.B., Kuniholm, M.H. and Nelson, K.E. (2010) The global impact of hepatitis E: new horizons for an emerging virus. In *Emerging Infections* ed. Scheld, W.M., Grayson, M.L. and Hughes, J.M., 9th ed, pp. 53–93. Washington, DC: ASM Press.
- Lindsay, K.L. (1994) Management of chronic hepatitis in special populations. *Am J Med* **96**, 57S–60S.
- Mokhtari, C., Marchadier, E., Haïm-Boukobz, S., Jeblaoui, A., Tessé, S., Savary, J. and Roque-Afonso, A.M. (2013) Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. *J Clin Virol* **58**, 36–40.
- Mushahmar, I.K. (2008) Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* **80**, 646–658.
- Nan, Y., Wu, C., Zhao, Q. and Zhou, E.M. (2017) Zoonotic hepatitis E virus: an ignored risk for public health. *Front Microbiol* **8**, 2396.
- Park, W.J., Park, B.J., Ahn, H.S., Lee, J.B., Park, S.Y., Son, C.S., Lee, S.W., Yoo, H.S. *et al.* (2016) Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. *J Vet Sci* **17**, 1–11.
- Passos, A.M., Heringer, T.P., Medina-Pestana, J.O., Ferraz, M.L. and Granato, C.F. (2013) First report and molecular

- characterization of hepatitis E virus infection in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol* **85**, 615–619.
- Passos-Castilho, A.M., Sena, A., Reinaldo, M.R. and Granato, C.F. (2015) Hepatitis E virus infection in Brazil: results of laboratory-based surveillance from 1998 to 2013. *Rev Soc Bras Med Trop* **48**, 468–470.
- Pawlotsky, J.M. (2002) Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* **122**, 1554–1568.
- Pérez-Gracia, M.T., Suay, B. and Mateos-Lindemann, M.L. (2014) Hepatitis E: an emerging disease. *Infect Genet Evol* **22**, 40–59.
- Peters, M. (2009) Special populations with hepatitis B virus infection. *Hepatology* **49**, 146S–155S.
- Pischke, S., Suneetha, P.V., Baechlein, C., Barg-Hock, H., Heim, A., Kamar, N., Schlue, J., Strassburg, C.P. *et al.* (2010) Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* **16**, 74–82.
- Politou, M., Boti, S., Androutsakos, T., Valsami, S., Pittaras, T. and Kapsimali, V. (2015) Seroprevalence of hepatitis E in HIV infected patients in Greece. *J Med Virol* **87**, 1517–1520.
- Rivero-Barciela, M., Mínguez, B., Gironés, R., Rodríguez-Frías, F., Quer, J. and Buti, M. (2015) Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J Clin Gastroenterol* **49**, 165–168.
- Rivero-Juarez, A., Martinez-Dueña, L., Martinez-Peinado, A., Camacho, A., Cifuentes, C., Gordon, A., Frias, M., Torre-Cisneros, J. *et al.* (2015) High hepatitis E virus seroprevalence with absence of chronic infection in HIV-infected patients. *J Infect* **70**, 624–630.
- Robbins, A., Lambert, D., Ehrhard, F., Brodard, V., Hentzien, M., Lebrun, D., Nguyen, Y., Tabary, T. *et al.* (2014) Severe acute hepatitis E in an HIV infected patient: successful treatment with ribavirin. *J Clin Virol* **60**, 422–423.
- Santos, D.R.L., Lewis-Ximenez, L.L., Silva, M.F., Sousa, P.F., Gaspar, A.M.C. and Pinto, M.A. (2010) First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol* **47**, 276–279.
- Tourinho, R.S., Almeida, C.R., Salvio, A.L., Gardinali, N.R., Vieira, Y. R., Schmidt-Chanasit, J. and De Paula, V.S. (2015) Application of synthetic standard curves for absolute quantification of hepatitis A and E by real-time PCR. *J Genet Genome Res* **2**.
- Troxler, S., Marek, A., Prokofieva, I., Bilic, I. and Hess, M. (2011) 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* **49**, 1339–1346.
- Vollmer, T., Diekmann, J., Eberhardt, M., Knabbe, C. and Dreier, J. (2016) Monitoring of anti-hepatitis E virus antibody seroconversion in asymptotically infected blood donors: systematic comparison of nine commercial anti-HEV IgM and IgG assays. *Viruses* **8**, pii: E232.
- Wang, Y., Ling, R., Erker, J.C., Zhang, H., Li, H., Desai, S., Mushahwar, I.K. and Harrison, T.J. (1999) A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* **80**, 169–177.
- Wang, Y., Chen, G., Pan, Q. and Zhao, G. (2018) Chronic hepatitis E in a renal transplant recipient: the first report of genotype 4 hepatitis E virus caused chronic infection in organ recipient. *Gastroenterology* **154**, 1199–1201.
- Ward, P., Poitras, E., Leblanc, D., Letellier, A., Brassard, J., Plante, D. and Houde, A. (2009) 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* **106**, 1360–1369.
- WHO. (2015) Weekly epidemiological record. No. 18. 2015. 90. 185–200. WHO. 5 Hepatitis E vaccine: WHO position paper.
- World Health Organization Fact sheets: hepatitis A (2017) Hepatitis A. Retrieved from <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a>
- World Health Organization. Fact sheets: hepatitis B (2017) Hepatitis B. Retrieved from <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
- World Health Organization, Fact sheets: hepatitis C (2017) Hepatitis C. Retrieved from <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
- World Health Organization, Fact sheets: hepatitis D (2017) Hepatitis D. Retrieved from <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d>
- World Health Organization, Fact sheets: hepatitis E (2017) Hepatitis E. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
- World Health Organization, WHO Expert Committee on Biological Standardization. (2015). Collaborative study to establish the 1st World Health Organization international reference panel for hepatitis E virus RNA genotypes for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays: Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, 12–16 October 2015. WHO/BS/2015.2264, 50 pp.
- Wu, C.H., Ho, C.M., Tsai, J.H., Sun, H.Y., Hu, R.H. and Lee, P.H. (2017) First case genotype 4 hepatitis e infection after a liver transplant. *Exp Clin Transplant* **15**, 228–230.
- Zhang, J., Zhang, X.F., Huang, S.J., Wu, T., Hu, Y.M., Wang, Z.Z., Wang, H., Jiang, H.M. *et al.* (2015) Long term efficacy of a hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* **372**, 914–922.

Elevated exposition to hepatitis E in chronic kidney disease patients under hemodialysis in Brazil

Running title: **Salvio, AL** - Hepatitis E among patients under hemodialysis in Brazil

Andreza Lemos Salvio⁽¹⁾, Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro⁽¹⁾, Jakeline Ribeiro Barbosa⁽²⁾, Danielle Malta Lima⁽³⁾, Jeová Keny Baima Colares⁽³⁾, Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues⁽⁴⁾, Marcelo Alves Pinto⁽⁵⁾, Livia Melo Villar⁽⁴⁾, Vanessa Salete de Paula⁽¹⁾

[1] Laboratory of Molecular Virology – Oswaldo Cruz Institute/ FIOCRUZ Rio de Janeiro, Brazil. [2] Evidences for Health Politics and Technologies Program (PEPTS), FIOCRUZ Brasília, Brazil. [3] Postgraduate Program in Medical Sciences, University of Fortaleza, Ceará, Brazil. [4] Laboratory of Viral Hepatitis – Oswaldo Cruz Institute /FIOCRUZ Rio de Janeiro, Brazil. [5] Laboratory of Technological Development in Virology – Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding authors: Dr Vanessa Salete de Paula, Oswaldo Cruz Foundation, IOC – Av. Brasil 4365-Manguinhos, Pav. Helio e Peggy Pereira B10, 21040-360. Rio de Janeiro, Brazil. Tel (+55 21) 2562-1823



ELEVATED EXPOSITION TO HEPATITIS E IN CHRONIC KIDNEY DISEASE PATIENTS UNDER HEMODIALYSIS IN BRAZIL

Journal:	<i>Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical</i>
Manuscript ID	RSBMT-2019-0461
Manuscript Type:	Short Communications
Keyword:	Chronic Kidney Disease, Hemodialysis, Hepatitis E Virus

SCHOLARONE™
Manuscripts

Abstract

Introduction: Hemodialysis-dependent (HD) patients are relevant to studies on hepatitis E virus (HEV) infection due to its association with chronic hepatitis. Here, we monitored the HEV prevalence among HD patients.

Methods: A total of 286 serum samples were collected from three private dialysis centers and tested for anti-HEV IgG and HEV-RNA detection.

Results: The prevalence of anti-HEV IgG was 24.48% (37.80% in Rio de Janeiro, 0% in Queimados and 27.27% in Fortaleza). Low family income and long periods of hemodialysis were related to anti-HEV IgG positivity in the univariate analysis.

Conclusions: The HEV seroprevalence among CKD patients is higher than that in the general population.

Key words: Chronic Kidney Disease, Hemodialysis, Hepatitis E Virus

Hepatitis E virus (HEV) is a self-limiting disease that presents variable clinical characteristics according to the immune status of the patient. HEV genotypes 3 (HEV-3) and 4 (HEV-4) are etiologic agents of chronic disease in immunocompromised people¹. Hemodialysis-dependent (HD) patients, whose immune systems are permanently activated, constitute an important population, as there were 100,000 Brazilian HD CKD (Chronic Kidney Disease) patients in 2017². In Brazil, HEV-3 has already been described in kidney recipients¹. Thus, anti-HEV IgG and HEV-RNA should be routinely monitored in this group in which HEV prevalence can reach 36.8%³.

This cross-sectional study aims to determine the HEV prevalence among HD patients and the associated risk factors in two regions of Brazil.

1
2
3 The recruitment and characteristics of the studied population have been previously
4 described⁴. For this study, 286 blood samples from HD patients from three private
5 hemodialysis clinics from the Southeast (Rio de Janeiro and Queimados) and Northeast
6 (Fortaleza) Regions were collected from 2013 to 2015 (Table 1). Blood samples were
7 collected by venipuncture using Vacutainer collection tubes (Becton Dickinson® and
8 Company, Franklin Lakes, USA) and stored at -70°C after centrifugation.

9
10 All the samples underwent IgG anti-HEV antibody detection using a RecomWell IgG
11 kit (Mikrogen, Neuried, Germany). Positive, negative and cutoff control were applied in
12 all serological experiments according to manufacturer's instructions for validation of the
13 assays. Samples were considered positive if they presented an OD (optical density) >
14 $(\text{Cutoff1} + \text{Cutoff2}/2) + 20\%$.

15
16 Viral nucleic acids were extracted using a High Pure Nucleic Acid Isolation kit
17 (Roche®, Penzberg, Germany). Negative and positive controls were included in all
18 experiments. All the extracted nucleic acids were submitted to optimized RT-qPCR
19 (reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction) (TaqMan System, Foster
20 City, USA) for ORF 3 amplification (FAM-probe) using a 7500 real-time PCR system,
21 a VIC-probe as an exogenous internal positive control (IPC - Applied Biosystems
22 TaqMan, Foster City, USA) and a synthetic standard curve for quantification⁵.

23
24 A database including the sociodemographic and laboratory data from all the patients
25 was created. Statistical analyses were performed using IBM SPSS v.25 2017 (IBM
26 Corporation, Chicago, USA). Pearson chi-square tests, Mann-Whitney tests and T-tests
27 were applied for the univariate analysis and logistic regression for multivariable
28 analysis. A variable was statistically significant when the p-value < 0.05.

1
2
3 The study was approved by the ethics committee under CAAE (Presentation Certificate
4 for Ethical Appreciation/*Certificado de apresentação para Apreciação Ética*) nº
5 34049514.7.3006.5258 and registration number 34049514.7.3009.5051.
6
7

8
9
10 The seroprevalence of anti-HEV IgG antibodies was 24.48%. The highest prevalence
11 was found in Rio de Janeiro (Southeast) (37.80%, 31/82), followed by Fortaleza
12 (27.27%). In patients who underwent dialysis in Queimados, no anti-HEV IgG was
13
14
15
16
17 found.

18
19 Table 2 shows the statistical analysis of HEV reactive and nonreactive samples in
20 comparison to demographic characteristics, possible risk factors and biochemical
21 characteristics. Lower phosphate levels and anti-HEV IgG positivity were significantly
22 associated (p -value < 0.05). Additionally, the patients with HEV reactivity presented
23 high levels of glucose and low levels of iron. Indeed, statistical relevance between a
24 long hemodialysis time of ($p=0.021$) and a low family income ($p=0.015$) and anti-HEV
25 IgG reactivity was observed in the univariate analysis. In the multivariate analysis,
26 phosphate levels remained statistically relevant ($p=0.028$). No patient was positive for
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
HEV-RNA.

In Brazil, only genotype 3 of HEV has been described¹; additionally, patients under dialysis represent 0.05% of the Brazilian population² and may be at risk of HEV infection. It is important to remember that they may require kidney transplantation and long-term immunosuppressive therapy, increasing their risk of chronic hepatitis E⁶.

Different HEV prevalence rates in the immunocompetent general population were observed in each of the Brazilian geographic regions¹. The epidemiological explanation for HEV-3 circulation in Brazil and other countries is still unclear. In our study, a general seroprevalence of 24.48% was found in CKD patients, with a particular prevalence of 37.80%, 0% and 27.27% in Rio de Janeiro, Queimados and Fortaleza

1
2
3 municipalities, respectively. A total prevalence of 24.48% of anti-HEV IgG antibodies
4
5 in CKD patients was considered intermediary in comparison to HD patients from other
6
7 countries; the seroprevalence rates of HEV infection in HD patients are discrepant
8
9 among countries, ranging from 3.7% in Italy⁷, 9.9% in Iran⁸, 10.2% in Tunisia⁶, 10.2%
10
11 in Argentina⁹ and 36.8% in England⁷. In fact, HEV-3 infection has been associated with
12
13 chronic hepatitis in immunocompromised patients³. In Rio de Janeiro, the local
14
15 prevalence was higher (37.80%) than that previously described worldwide.
16
17 Comparatively, in healthy immunocompetent individuals, the HEV seroprevalence
18
19 varied from 0% to 10% in Brazil¹. The elevated HEV prevalence rate among CKD
20
21 patients has been justified by nosocomial infections and plasma exchange¹⁰, the absence
22
23 of HEV infection monitoring by PCR in CKD patients¹¹, and zoonotic HEV exposure
24
25 via the use of porcine-based heparin in hemodialysis treatment centers¹¹. The statistical
26
27 analysis showed an increased prevalence of HEV infection in low-income families
28
29 when the univariate analysis was considered ($p=0.015$), as previously described¹².
30
31 Hepatitis E is considered a zoonotic disease in Brazil¹ and is associated with conditions
32
33 related to low income, poor hygiene and inadequate food preparation conditions and the
34
35 related consumption of swine meat and raw pork derivatives in this population¹³. Long-
36
37 term hemodialysis (time > 48 months) was associated with an increased risk of HEV
38
39 infection, without a statistically sustained association, corroborating previous work⁸
40
41 despite discordant opinions when this association was not observed⁷. According to the
42
43 obtained biochemical data, a trend of elevated glucose levels was observed among anti-
44
45 HEV-positive patients, similar to previous studies¹⁴. Hyperglycemia is related to
46
47 pancreatitis and extra-hepatic manifestations associated with beta-islet dysfunction
48
49 during acute hepatitis E¹⁴; however, all anti-HEV IgG reactive patients presented
50
51 undetectable HEV RNA blood titers during hemodialysis. This laboratory finding is
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 consistent with the absence of acute HEV infection¹⁴. Conversely, patients with CKD
4
5 are at high risk of hypoglycemia¹⁵. Additionally, significantly reduced levels of blood
6
7 phosphates were found among the HEV reactive group; this reduction should not be
8
9 attributed to HEV infection since hemodialysis may induce a bidirectional variation in
10
11 parathyroid hormone (PTH) and phosphate blood levels over time, which is quite
12
13 common in adult patients under hemodialysis¹⁵. Optimal phosphate control is likely to
14
15 be dependent on not only consistent adherence to dietary restrictions and phosphate
16
17 binders but also additional control of PTH levels¹⁵. Fortunately, all CKD patients
18
19 showed an absence of viremia, an important marker of active infection also described in
20
21 Argentina⁹ and Italy⁷, at the time of blood collection (hemodialysis procedures). Thus,
22
23 negative HEV-RNA results may represent subclinical cases without progression to
24
25 chronicity.
26
27
28
29

30
31 In summary, the most elevated HEV reactivity described in our study reinforces the
32
33 hypothesis that CKD and HD patients are exposed to hepatitis E virus during
34
35 hemodialysis, justifying the need for HEV-RNA research in these patients. Additional
36
37 efforts for HEV prevention should be carried out in CKD patients at admission in the
38
39 kidney unit care.
40
41
42
43
44
45
46

47 References

48
49 1- Passos-Castilho AM, De Sena A, Geraldo A, Spada C, Granato CF. High prevalence
50
51 of hepatitis E virus antibodies among blood donors in Southern Brazil. *J Med Virol.*
52
53 2016; 88(2): 361-4.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 2- Marinho AWGB, Penha AP, Silva MT, Galvão TF. Prevalence of chronic renal
4 disease among Brazilian adults: a systematic review. *Cad Saúde Colet.* 2017; 25 (3):
5 379-388.
6
7
- 8
9
10 3- Harrison A, Scobie L, Crossan C, Parry R, Johnston P, Stratton J, et al. Hepatitis E
11 seroprevalence in recipients of renal transplants or haemodialysis in southwest England:
12 a case-control study. *J Med Virol.* 2013; 85 (2): 266-271.
13
14
- 15
16
17 4- Barbosa JR, Cortes VF, Portilho MM, Miguel JC, Marques VA, Bezerra CS, et al.
18 Performance of point of care assays for hepatitis B and C viruses in chronic kidney
19 disease patients. *J Clin Pathol.* 2018; 71 (10): 1–6.
20
21
- 22
23
24 5- Salvio AL, Lopes AO, Almeida AJ, Gardinali NR, Lima LRP, de Oliveira JM, et al.
25 Detection and quantification of hepatitis E virus in the absence of IgG and IgM anti-
26 HEV in HIV-positive patients. *J Appl Microbiol.* 2018; 125(4): 1208-1215.
27
28
- 29
30
31 6- Haffar S, Bazerbachi F, Leise MD, Dillon JJ, Albright RC, Murad MH, et al.
32 Systematic review with meta-analysis: the association between hepatitis E
33 seroprevalence and haemodialysis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017; 46(9): 790-799.
34
35
- 36
37
38 7- Scotto G, Aucella F, Grandaliano G, Martinelli D, Querques M, Gesuete A, et al.
39 Hepatitis E in hemodialysis and kidney transplant patients in south-east Italy. *World J*
40 *Gastroenterol.* 2015; 21(11): 3266-73.
41
42
- 43
44
45 8- Alavian SM, Ataei B, Ebrahimi A, Pirhaji O, Azad R, Olya B, Ataei AM. Anti-
46 Hepatitis E Antibody in Hemodialysis Patients in Isfahan, Iran: Prevalence and Risk
47 Factors. *Hepat Mon.* 2015; 15(9): e23633.
48
49
- 50
51
52 9- Pisano MB, Balderramo D, Wassaf MM, Lotto M, Carlino Y, Ré VE, Debes JD.
53 Hepatitis E virus infection in patients on dialysis and in solid organ transplant recipients
54 in Argentina: exploring associated risk factors. *Arch Virol.* 2017; 162(3): 787-792.
55
56
57
58
59
60

10- Mallet V, Sberro-Soussan R, Roque-Afonso AM, Vallet-Pichard A, Deau B, Portal A, et al. Transmission of Hepatitis E Virus With Plasma Exchange in Kidney Transplant Recipients: A Retrospective Cohort Study. *Transplantation* 2018; 102(8): 1351-1357.

11- Caruso C, Gobbi E, Biossa T, Andra' M, Cavallazzi U, Masoero L. Evaluation of viral inactivation of pseudorabies virus, encephalomyocarditis virus, bovine viral diarrhoea virus and porcine parvovirus in pancreatin of porcine origin. *J Virol Methods* 2014; 208: 79-84.

12- Hosseini-Moghaddam SM, Zarei A, Alavian SM, Mansouri M. Hepatitis E virus infection: a general review with a focus on hemodialysis and kidney transplant patients. *Am J Nephrol*. 2010; 31(5): 398-40.

13- Barnaud E, Rogée S, Garry P, Rose N, Pavio N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(15): 5153-9.

14- Aggarwal R. Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res*. 2011; 161(1): 15-22.

15- Slee AD. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutr Metab (Lond)*. 2012; 9: 36.

Tables

Table 1: CKD hemodialysis-dependent patients

Origin of the samples	Number of samples	Year of collection	Age (\pm SD)	Sex		Anti-HEV IgG +
				Female	Male	
Rio de Janeiro, RJ	82 (28.68%)	2013	50.45 (\pm 12.60)	34 (11.89%)	48 (16.80%)	37.80% (31)
Queimados, RJ	61 (21.32%)	2014	54.26 (\pm 15.20)	26 (9.09%)	35 (12.23%)	0% (0)
Fortaleza, CE	143 (50%)	2015	50.48 (\pm 13.68)	44 (15.38%)	99 (34.61%)	27.27% (39)
Total:	286 (100%)		51.32 (\pm13.81)	104 (36.36%)	182 (63.64%)	24.48% (70)

SD – Standard Deviation

Table 2: Univariate and multivariate analyses of Hepatitis E antibody detection according to the demographic and biochemical data of the studied population. The family income is expressed in dollars (1 US\$=3.91 R\$) For the multivariate analysis, the logistic regression method was applied.

Variable	HEV-nonreactive (n=216)	HEV-reactive (n=70)	P-value	Multivariate Analysis	
				OR (95% C.I.)	P-value
Age, years***	52.09 (±14.133)	49.07 (±12.664)	0.115		
Sex*	Male	128 (63.1%)	44 (62.9%)	0.977	
	Female	75 (36.9%)	26 (37.1%)		
Marital Status*	Non married	97 (47.8%)	35 (52.2%)	0.527	
	Married	106 (52.2%)	32 (47.8%)		
Ethnic Group*	White	55 (27.8%)	17 (25.4%)	0.891	
	Black	50 (25.3%)	15 (22.4%)		
	Asian	4 (2.0%)	1 (1.5%)		
	Indigenous	1 (0.5%)	0 (0.0%)		
	Brown	88 (44.4%)	34 (50.7%)		
Scholarity*	Illiterate	11 (5.5%)	4 (6.0%)	0.936	
	Primary School	68 (33.8%)	23 (34.3%)		
	Elementary School	40 (19.9%)	16 (23.4%)		
	High School	53 (26.4%)	14 (20.9%)		
	College degree	20 (10.0%)	6 (9.0%)		
Family Income**	Postgrad degree	9 (4.5%)	4 (6.0%)	0.015	1.000 (1.000 - 1.000)
		383.63 (00.00 - 383.63)	204.60 (179.02 - 1790.20)		
Sexual orientation*	Heterosexual	196 (98.0%)	63 (95.5%)	0.470	
	Bisexual	2 (1.0%)	2 (3.0%)		
	Homosexual	2 (1.0%)	1 (1.5%)		
Blood transfusion*		129 (64.5%)	42 (62.7%)	0.789	
Injection drug use*		15 (7.6%)	3 (4.5%)	0.379	
Time of hemodialysis (months)*	<48 months	96 (47.1%)	20 (30.8%)	0.021	1.115 (0.488 - 2.549)
	≥ 48 months	108 (52.9%)	45 (69.2%)		
Kidney transplant*		23 (11.3%)	5 (7.8%)	0.423	
	3 times	181 (89.6%)	57 (89.1%)		
	4 times	14 (6.9%)	7 (10.9%)		
	5 times	4 (2.0%)	0 (0.0%)		
Hemodialysis during the week*	6 times	3 (1.5%)	0 (0.0%)	0.361	
AST**	39.33 (±26.333)	37.03 (±21.532)	0.464		
ALT**	32.53 (±19.304)	31.07 (±17.217)	0.574		
GGT**	24.0 (1.00 - 1319.00)	26.50 (1.00 - 4.88)	0.369		
Alkaline Phosphatase**	100.50 (7.00 - 355.00)	93.00 (3.00 - 352.00)	0.231		
Total bilirubin**	0.30 (-0.13 - 24.3)	0.47 (00.00 - 2.69)	0.164		
Direct bilirubin**	0.31 (0 - 0.08)	0.27 (00.00 - 3.87)	0.335		
Indirect bilirubin**	0.25 (-0.22 - 5.26)	0.23 (-0.16 - 1.67)	0.680		
Iron***	144.92 (±85.429)	121.00 (±72.242)	0.049	0.998 (0.994 - 1.003)	0.433
Phosphate**	7.23 (3.05 - 30.60)	6.74 (1.06 - 10.78)	0.019	0.778 (0.622 - 0.973)	0.028

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Glucose**	123.00 (21.00 - 472.00)	145.00 (27.00 - 432.00)	0.00	1.003 (0.998 - 1.007)	0.243
Anti-HEV (ratio of optical density to cut off value -OD/CO)	0.39 (±0.59)	2.91 (±1.16)			

*Pearson's Chi-Square Test

**Mann-Whitney Test

*** T-Test

For Review Only



Short Communication

Prevalence of hepatitis E virus RNA and antibodies in a cohort of kidney transplant recipients in Central Brazil



Jerusa Marielle Nunes Seabra de Oliveira^a, Nara Rubia de Freitas^a, Sheila Araújo Teles^b, Fernanda de Oliveira Bottino^c, Andreza Sálvio Lemos^c, Jaqueline Mendes de Oliveira^c, Vanessa de Paula^c, Marcelo Alves Pinto^c, Regina Maria Bringel Martins^{a,*}

^a Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

^b Faculty of Nursing, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

^c Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2017

Received in revised form 24 January 2018

Accepted 27 January 2018

Corresponding Editor: Eskild Petersen, Aarhus, Denmark

Keywords:

Hepatitis E virus

Kidney transplant recipients

Prevalence

Brazil

ABSTRACT

Objective: To assess the prevalence of hepatitis E virus (HEV) RNA and antibodies among kidney transplant recipients (KTR) in Central Brazil. The presence of chronic HEV infection was also investigated.

Methods: A cohort study was conducted among 316 KTR treated at a referral center for kidney transplantation in Goiânia, Brazil. All serum samples were tested for the presence of HEV RNA (real-time PCR) and anti-HEV IgG/IgM (ELISA). Anti-HEV-positive samples were confirmed using an immunoblot test. HEV chronicity was investigated in a subgroup of patients with elevated alanine aminotransferase (ALT >40 IU/l) through HEV RNA detection in additional serum samples collected 3 and 6 months apart.

Results: A seroprevalence of 2.5% (95% confidence interval 1.2–5.1%) was found for anti-HEV IgG. There was no difference in characteristics between the anti-HEV IgG seropositive and seronegative KTR groups. Anti-HEV IgM was detected in only one patient (0.3%). All KTR were negative for HEV RNA.

Conclusions: These results show that HEV infection is infrequent in KTR in Central Brazil, with low seroprevalence rates of past and recent infection, and also an absence of active and chronic HEV infections.

© 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a cause of acute and chronic hepatitis and cirrhosis in transplant recipients (McPherson et al., 2018). In kidney transplant recipients (KTR), reported rates of past HEV infection (anti-HEV IgG: 3% to 43%) and active HEV infection (HEV RNA: 0% to 10%) have varied widely (Harrison et al., 2013; Naik et al., 2013; Hering et al., 2014; Moal et al., 2015; Scotto et al., 2015). In Brazil, only HEV genotype 3, which is associated with chronic infection, has been reported (Passos et al., 2013). HEV prevalence among KTR has been examined only retrospectively in São Paulo (Hering et al., 2014). Hepatitis E remains poorly understood in these patients because they are not routinely screened for this. The aim of this study was to assess the prevalence of HEV RNA and

antibodies among KTR in Central Brazil. The presence of chronic HEV infection was investigated in patients with elevated alanine aminotransferase (ALT).

Methods

A cohort study was conducted in the Santa Casa de Misericórdia hospital in the city of Goiânia (1.3 million inhabitants), a referral center for kidney transplantation in the state of Goiás, Central Brazil. Of a total of 370 KTR, 342 were on follow-up in 2014 and were invited to take part in the study. Of these, 316 agreed to participate. Informed consent was obtained from each patient before they answered a questionnaire to gather socio-demographic and behavioral characteristics. Clinical and laboratory data were obtained from the medical records. This study was approved by the Ethics Committee of the Santa Casa de Misericórdia (reference number 505.632).

All serum samples were tested for HEV RNA using a real-time PCR (limit of four copies of HEV RNA per reaction) (Jothikumar et al., 2006) and also for anti-HEV IgG and IgM using an ELISA

* Corresponding author at: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 131, CEP: 74.605-050 Goiânia, Goiás, Brazil.

E-mail address: rbringel.iptsp.ufg@gmail.com (R.M.B. Martins).

(recomWell HEV IgG and recomWell HEV IgM; Mikrogen GmbH, Neuried, Germany). Anti-HEV-positive samples were confirmed using an immunoblot test (recomLine HEV IgG/IgM; Mikrogen GmbH). Additional serum samples from patients with ALT levels >40 IU/l were tested for HEV RNA 3 and 6 months apart.

The prevalence and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated. Data were analyzed using IBM SPSS Statistics version 20 (IBM Corp.). Descriptive statistics were reported as the mean \pm standard deviation for continuous variables and as the frequency and percentage for dichotomous variables. The Student *t*-test and Fisher's exact test were used to compare continuous variables and dichotomous variables, respectively. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

The characteristics of the KTR included in the study are shown in Table 1. Eight patients (2.5%; 95% CI 1.2–5.1%) were positive for anti-HEV IgG by ELISA and immunoblot. There was no statistically significant difference in characteristics between the anti-HEV IgG seropositive and seronegative KTR groups (Table 2). Anti-HEV IgM was detected in only one patient (0.3%), who was also anti-HEV IgG positive. All serum samples from KTR were negative for HEV RNA. ALT levels remained elevated for at least 3 months in 25 patients (four were infected with hepatitis C virus and another with hepatitis B virus).

Discussion

The prevalence of anti-HEV IgG found in this study is similar to that shown among blood donors in the same region (4.0%; 95% CI 1.3–10.5%) (Silva et al., 2012), but lower than that observed in KTR in São Paulo, Brazil (14.6%; 95% CI 10.1–20.6%) (Hering et al., 2014). On the other hand, this prevalence is comparable to that obtained in another study among KTR in South America (Córdoba, Argentina: 5.7%; 95% CI 2.3–12.4%) (Pisano et al., 2017). Differences in regional endemicity, risk characteristics, and the performance of diagnostic assays for hepatitis E are the possible reasons for these differences in observed rates.

In this study, only one sample (0.3%) was anti-HEV IgM positive, but negative for HEV RNA. Similarly, a low rate of anti-HEV IgM (0.8%) has been reported elsewhere (Scott et al., 2015). The

Table 1
Characteristics of the kidney transplant recipients included in the study (N = 316).

Characteristic	
Age (years), mean \pm SD	46.4 \pm 12.3
Male, n (%)	174 (55.1)
Previous residence in rural area, n (%)	218 (69.4)
Consumption of bush meat, n (%)	265 (77.1)
Previous blood transfusion, n (%)	268 (84.8)
Hemodialysis before transplantation, n (%)	310 (98.1)
Time after transplant (years), mean \pm SD	6.6 \pm 4.8
Live donor, n (%)	159 (50.3)
Causes of renal failure, n (%)	
Hypertension	76 (24.1)
Glomerulonephritis	69 (21.8)
Polycystic kidney disease	24 (7.6)
Diabetes	18 (5.7)
Chronic pyelonephritis	12 (3.8)
Others	23 (7.3)
Undetermined	94 (29.7)
Immunosuppression, n (%)	
Triple regimen (PDN, CI, and MF or AZA)	278 (88.0)
Regimen including tacrolimus	208 (65.8)
ALT >40 IU/l, n (%)	25 (7.9)

SD, standard deviation; PDN, prednisolone; CI, calcineurin inhibitor (tacrolimus or cyclosporin); MF, mycophenolate; AZA, azathioprine; ALT, alanine aminotransferase.

Table 2

Characteristics of kidney transplant recipients based on anti-HEV IgG status (N = 316).

Characteristic	Anti-HEV-positive (n = 8)	Anti-HEV-negative (n = 308)	<i>p</i> -Value
Age (years), mean \pm SD	46.5 \pm 11.3	46.4 \pm 12.3	0.979
Sex, n (%)			0.734
Male	5 (62.5)	169 (54.9)	
Female	3 (37.5)	139 (45.1)	
Previous residence in rural area, n (%)	4 (50)	214 (69.5)	0.254
Consumption of bush meat, n (%)	7 (87.5)	258 (83.8)	0.777
Previous blood transfusion, n (%)	7 (87.5)	261 (84.7)	0.668
Previous HD, n (%)	8 (100)	302 (98.1)	0.690
Time after transplant (years), mean \pm SD	8.5 \pm 7.5	6.5 \pm 4.7	0.254
Creatinine, mean \pm SD	1.8 \pm 0.7	1.4 \pm 0.6	0.088
ALT >40 IU/l, n (%)	2 (25)	23 (7.5)	0.092
Triple regimen of immunosuppression ^a , n (%)	7 (87.5)	271 (90.3)	0.967
Regimen including tacrolimus	5 (62.5)	203 (65.9)	0.441

HEV, hepatitis E virus; SD, standard deviation; HD, hemodialysis; ALT, alanine aminotransferase.

^a Triple regimen of immunosuppression: prednisolone, calcineurin inhibitor (tacrolimus or cyclosporin), and mycophenolate or azathioprine.

absence of viremia can be explained by the short period of HEV RNA detection in serum samples in cases of self-limited infection (McPherson et al., 2018), which seems to be the profile of this study patient. On the other hand, HEV RNA testing is essential to exclude hepatitis E in the immunosuppressed population (McPherson et al., 2018). Furthermore, HEV RNA was detected in 3.1% and 10% of KTR in São Paulo (Hering et al., 2014; Passos et al., 2013). However, in line with other studies (Harrison et al., 2013; Naik et al., 2013), an absence of detectable HEV RNA was found in all serum samples tested in the present study, revealing no case of active or chronic infection in KTR during the study period. These data are also consistent with the finding of a reported lack of evidence of chronic hepatitis E despite the use of tacrolimus (Pisano et al., 2017), an immunosuppressive drug that may influence the course of HEV infection (McPherson et al., 2018).

In conclusion, besides the absence of active and chronic infections, these results revealed that HEV may be responsible for sporadic cases of recent or acute infection among KTR in Central Brazil. This study also showed a low prevalence of past HEV infection, comparable to those reported in other areas considered of low endemicity.

Funding

The study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (number 200910267000446).

Conflict of interest

No competing interest declared.

Acknowledgements

We would like to thank Sueli Meira and Ágabo Macedo da Costa e Silva for their technical support, the staff of the Santa Casa de Misericórdia for their helpful collaboration, and Brian Ream for the English language editing.

References

Harrison A, Scobie L, Crossan C, Parry [14_TD\$DIFF]R, Johnston P, Stratton J, et al. Hepatitis E seroprevalence in recipients of renal transplants or haemodialysis in southwest England: a case-control study. *J Med Virol* 2013;85:266–71.

- Hering T, Passos AM, Perez RM, Bilar [15_TD\$DIFF], Fragano D, Granato C, et al. Past and current hepatitis E virus infection in renal transplant patients. *J Med Virol* 2014;86:948–53.
- Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng [16_TD\$DIFF]XJ, Hill VR. 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.
- McPherson S, Elsharkawy AM, Ankcorn M, Ijaz [17_TD\$DIFF]S, Powell J, Rowe I, et al. Summary of the British Transplantation Society UK guidelines for hepatitis E and solid organ. *Transplantation* 2018;102:15–20.
- Moal V, Legris T, Motte A, Vacher-Coponat [18_TD\$DIFF]H, Fages L, Jourde-Chiche N, et al. Systematic serological testing for hepatitis E virus in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2015;53:1523–30.
- Naik A, Gupta N, Goel D, Ippagunta [19_TD\$DIFF]SK, Sharma RK, Aggarwal R. Lack of evidence of hepatitis E virus infection among renal transplant recipients in a disease-endemic area. *J Viral Hepat* 2013;20:e138–40.
- Passos AM, Heringer TP, Medina-Pestana JO, Ferraz [20_TD\$DIFF]ML, Granato CF. First report and molecular characterization of hepatitis E virus infection in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol* 2013;85:615–9.
- Pisano MB, Balderramo D, Wassaf MM, Lotto [21_TD\$DIFF]M, Carlino Ré YVE, et al. Hepatitis E virus infection in patients on dialysis and in solid organ transplant recipients in Argentina: exploring associated risk factors. *Arch Virol* 2017;162:787–92.
- Scotto G, Aucella F, Grandaliano G, Martinelli [22_TD\$DIFF]D, Querques M, Gesuete A, et al. Hepatitis E in hemodialysis and kidney transplant patients in south-east Italy. *World J Gastroenterol* 2015;21:3266–73.
- Silva SM, Oliveira JM, Vitral CL, Vieira de [23_TD\$DIFF][24_TD\$DIFF]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;107:338–41.

Hepatitis E virus among kidney transplanted population immunosuppressed by tacrolimus in Brazil

Andreza Salvio Lemos^{1*}, Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro¹, Caroline Cordeiro Soares¹, Rafael Brandão Varella³, Flávia Savassi Baptista de Souza Ribas⁴, Tereza Cristina Simão Wagner⁴, Jaqueline Mendes de Oliveira², Vanessa Salete de Paula^{1*}, Marcelo Alves Pinto².

¹ *Laboratory of Molecular Virology – Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.*

² *Laboratory of Technological Development in Virology – Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.*

³ *Center of Medical Science, Biomedic Institute – Fluminense Federal University, Niterói, Brazil.*

⁴ *Saint Francis of Assisi Hospital– Rio de Janeiro Federal University, Rio de Janeiro, Brazil*

***Corresponding author:**

Dr Vanessa Salete de Paula
Head of Laboratory of Molecular Virology
Oswaldo Cruz Foundation, IOC
Av. Brasil 4365-Manguinhos, Pav. Helio e Peggy Pereira B10, 21040-360. Rio de Janeiro, Brazil.
Tel (+55 21) 2562-1823
e-mail: vdepaula@ioc.fiocruz.br (VSP)

Abstract:

Introduction: Zoonotic hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3) is the most recently described human hepatitis virus in Brazil, is the causative agent of chronic hepatitis and cirrhosis in immunocompromised individuals. Kidney transplanted patients represent an increasingly larger group in Brazil, in which tacrolimus is currently included as immunosuppressive protocols, known to stimulate HEV replication in organs recipients. Thus, understand the influence of tacrolimus therapy in the prevalence of HEV infection among kidney transplant patients is fundamental to assume specific preventive measures. However, consistent data are not available.

Methodology: Thus, HEV prevalence was investigated in 50 kidney transplanted patients during a 01 year after surgical procedure, totaling 250 plasma samples. 50 blood donors plasma samples were also collected for comparison. All samples was assayed for anti-HEV IgG antibodies and HEV RNA.

Results: A seroprevalence of 16% (8/50) was found at the first moment of collection (t=0 month after transplant) and seroprevalence of 20% (10/50) was found at the last moment of study (t=12 months), finally, a prevalence of 6% (3/50) was described among blood donors. HEV RNA was undetectable in all blood samples. These results show the seroconversion of 2 patients without HEV RNA detection, during one-year monitoring kidney transplanted patients.

Conclusions: The high HEV prevalence among kidney transplanted patients reinforces the importance of continuous HEV-monitoring and assume preventive measures.

Keywords: hepatitis e, prevalence, tacrolimus, kidney transplant, chronic hepatitis

Running title: Hepatitis E in kidney transplanted people

Introduction

Hepatitis E virus genotypes 3 and 4 were considered zoonosis, with infections associated with the consumption of swine meat and bushmeat, and blood swine derivatives, mostly described in developed countries(1). Generally, the hepatitis E virus (HEV) causes asymptomatic or self-limiting acute infections in immunocompetent individuals. When it comes to special populations, HEV genotypes 3 and 4 (HEV-3, HEV-4) have been reported as being responsible for persistent and chronic hepatitis and cirrhosis (1-5) , associated with high levels of mortality among solid organ recipients (6-8).

Hepatitis E outbreaks have never been reported in Brazil, only sporadic case of HEV genotype 3 was reported so far (9), a genotype described as being responsible for chronic infections in immunosuppressed patients (10-12). As a neglected disease, hepatitis E is poorly studied and the prevalence of HEV infection among the Brazilian population is variable from 2.3% (13) to 10.0% (14). In the other hand, the kidney transplant population represents a numerically important HEV risk group, mainly due to the increase of the number of kidney transplants in Brazil, according National Transplant System (NTS) (15-18). The immunosuppressive therapy, that avoids the graft rejection, also increases HEV replication in kidney recipients (19). Tacrolimus, a calcineurin inhibitor immunosuppressant, affects mainly cellular immune responses, has been pointed as a pro-HEV replication drug (20-22) and inducer of HEV persistence among immunocompromised non-human primates (NHP) (23) and human patients (19, 24, 25).

Thus, our main here was access the prevalence and incidence data of HEV infection among kidney transplant patients. In our opinion, it is a key role to assure the HEV3-infection diagnosis in laboratory routine of kidney transplanted patients and would support the immediate adoption of the specific preventive zoonotic measures of HEV infection. So, a specific anti-HEV antibodies and molecular HEV-RNA detections are clinically recommended to this proposal (26-32). Additionally, the premature diagnosis of HEV infection in the immunosuppressed population with the adoption of antiviral therapy can prevent graft loss and the worst outcome to the transplanted patient.

Methodology

Blood sample collection procedure

This study included a total of 250 samples from 50 follow-up kidney transplanted patients immunosuppressed by tacrolimus, from the State Transplant Center of the São Francisco de Assis Hospital (CET-HSFA), in Rio de Janeiro. The plasma samples were collected within the period from 0 to 12 months just after beginning tacrolimus immunosuppressive therapy. The collection moments were characterized T=0, 3, 6, 9 and 12 months. For statistical analysis, 50 blood samples from healthy blood donors subjects were collected between 2018 and 2019 from HemoRio, the official government blood bank.

The whole blood samples (5mL) were collected by venipuncture by using Vacutainer blood collection tubes (K2EDTA dry spray) (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA). After centrifugation, plasma samples were stored at -30°C. For the samples selection, they were submitted to a serological trial, according to manufacturer's instructions (Biokit reagents, Barcelona, Spain). The positive samples for HAV, HBV and/or HCV antibodies were excluded from this study and the negative ones, included in this study to avoid false positive results.

Serological Assays

Plasma samples collected at the first moment (t=0 month) to last moment (t=12 months) after the transplant and start of immunosuppression and plasma samples from blood donors were all tested for anti-HEV IgG detection by HEV IgG Kit (Mikrogen, Neuried, Germany), according to the manufacturer's instructions. Positive, negative and cut-off controls were included in all the experiments.

Nucleic acid extraction and Molecular Assays

Viral nucleic acids were extracted from 200 µL of all plasma samples (Kidney transplanted patients samples and blood donors samples) using the High Pure Nucleic Acid Isolation Kit (Roche, Penzberg, Germany), according to the manufacturer's instructions. Negative and positive controls were also submitted to the extraction procedure and all the following techniques.

First, all extracted nucleic acids were submitted to the previously optimized RT-qPCR (TaqMan System) for amplification and detection of ORF3 region of HEV-RNA (FAM-probe), using the 7500 Real-Time PCR Systems device (Applied Biosystems TaqMan, Foster City, USA). It consists of a One Step technique, described by Jothikumar et al (33) which was optimized with the use of a dsDNA synthetic standard curve (32) and an VIC-labeled exogenous internal positive control (IPC - Applied Biosystems TaqMan, Foster City, USA). Positive and negative controls were included in all the experiments.

Data Analysis

A database was created including transplant date, age, gender, immunosuppression scheme and serological results from all patients. The seroprevalences found at $t=0$ and $t=12$ were compared. The prevalences described for kidney transplanted patients and for blood donors were compared.

Results

The mean age of all patients was 45.16 years (± 11.605) but among HEV+ patients, it was 49.4 years (± 11.862). However 60% of all individuals were male, among the HEV+ group, the male gender constituted 50% of the patients (Table 1). Two different prevalence were found according to the time of collection, with 16% (8/50) of anti-HEV IgG positivity in the first moment ($t=0$) and of 20% (10/50) of anti-HEV positivity in the last moment of collection ($t=12$) presenting approximately one year between the first and last plasma collections (Table 2), showing a seroconversion of two patients (Fig 1). The seroprevalence among blood donors was 6% (3/50).

From the 250 samples tested, none was positive for RT-qPCR.

Discussion

Hepatitis E prevalence varies from country to country due to different circulating genotypes in each region. In Brazil, where the first autochthonous hepatitis E case were only reported in 2010 (34), with the known circulation of genotype 3, it is not expected the occurrence of outbreaks but only sporadic cases. The real importance of HEV-GT3 in Brazil is when it comes to the immunosuppressed population. This group may suffer

from more severe hepatic and chronic diseases, a persistent infection lasting more than 3 months, it can remain for a long time without clear hepatitis symptoms leading or not to cirrhosis and death (1-5, 35-37).

The HEV prevalence among the kidney transplanted group was 16% at the first moment after transplant ($t=0$) and 20% after one year of transplant ($t=12$). This seroprevalence is considered to be high in comparison to other areas, where it varies from 2.5% (Center-East of Brazil) to 9.1% (Italy) (38-40). Hepatitis E infection is apparently frequent among solid organ transplanted people, although the chronicity seems to happen only in the minority of the cases. Generally, this chronicity is associated to the detection of HEV-RNA (41). When it comes to the hemodialysis dependent group, that may become transplanted or not, HEV seroprevalence varies from 3.7% in Italy (42) to 36.8% in England (43). Even when compared to this group, 20% (the seroprevalence found for kidney transplanted here) is high and alarming.

When it comes to the seroconversion, the results show that 2 patients presented seroconversion, suggesting a HEV infection during post-transplant period, within the first year after the start of immunosuppression. It is important to take in consideration that immunosuppressed patients may present a different anti-HEV IgG profile, with a late or non-existent seroconversion, also, the period of time these antibodies remain circulating in blood is yet not clear (41, 44, 45). It is also very important to keep in mind that the presence of anti-HEV IgG does not confer protection against HEV re-infection in immunosuppressed patients (41, 46, 47).

Considering the high dissemination of HEV among pork products, this repeated exposure may increase the anti-HEV IgG titers in most of the positive patients, although it is not able to confer immunity for a long time, starting to decrease in approximately five years (45).

The prevalence found for the immunocompetent group of blood donors was 6%, considered to be average in comparison to the discrepant prevalences worldwide in countries where there is the circulation of the genotype 3 of HEV. The HEV prevalence can vary from 3.94% in France (48), 9.5% in the USA (49), 19.96% in Spain (50) to 52% also in France (7). It is important also to pay attention to blood donors when concerned about solid organ receipts, because it has been described more than once, the

HEV transmission through blood transfusion in HEV-G3 circulating countries (47, 51, 52).

In this study, no kidney transplanted patients samples were positive for HEV RNA detection. It corroborates other studies developed before, in Brazil and other low endemic areas, where the HEV RNA circulation among immunosuppressed transplanted people varied between 0% (Center-East Region of Brazil) and 1.9% (France) (40, 53).

In former Brazilian studies, chronic disease caused by HEV was detected by the time of 13, 60 (54) and 84 (55) months after the start of immunosuppressive treatment. Also, in other countries, this time after immunosuppression was considerably high, as reported in France, 49 months after transplantation (44) and in Sweden, more than 24 months of immunosuppression (56). Also, it has been previously reported a higher prevalence of HEV among older man (47, 57).

This study was conducted following these patients for a short period of time and, nevertheless a high prevalence was found. So, it is important to keep the monitoring of this group for a longer period of time., This is because the development of chronicity is considered to be silent and the chronic hepatitis E infection seems to occur and develop after 120 months in immunosuppression by tacrolimus.

Acknowledgements

We thank the Oswaldo Cruz Foundation and CAPES for funding this study.

References

1. 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(1):60-2.
2. 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;17(6):1091-6.
3. Gardinali NR, Barry AF, Otonel RA, Alfieri AF, Alfieri AA. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(7):935-9.
4. Péron JM, Dalton H, Izopet J, Kamar N. Acute autochthonous hepatitis E in western patients with underlying chronic liver disease: a role for ribavirin? *J Hepatol.* 2011;54(6):1323-4; author reply 4-5.
5. Sclair SN, Schiff ER. An update on the hepatitis E virus. *Curr Gastroenterol Rep.* 2013;15(2):304.

6. Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol.* 2010;82(5):799-805.
7. Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Sauné K, Miédouge M, Ellis V, et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(12):2309-12.
8. Wenzel JJ, Sichler M, Schemmerer M, Behrens G, Leitzmann MF, Jilg W. Decline in hepatitis E virus antibody prevalence in southeastern Germany, 1996-2011. *Hepatology.* 2014;60(4):1180-6.
9. Tengan FM, Figueiredo GM, Nunes AKS, Manchiero C, Dantas BP, Magri MC, et al. Seroprevalence of hepatitis E in adults in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty.* 2019;8(1):3.
10. Dalton HR, Hazeldine S, Banks M, Ijaz S, Bendall R. Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease. *Lancet.* 2007;369(9569):1260.
11. Anty R, Ollier L, Péron 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(1):76-8.
12. Melgaço JG, Gardinali NR, de Mello VDM, Leal M, Lewis-Ximenez LL, Pinto MA. Hepatitis E: Update on Prevention and Control. *Biomed Res Int.* 2018;2018:5769201.
13. Martins RM, Freitas NR, Kozlowski A, Reis NR, Lopes CL, Teles SA, et al. Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a population of recyclable waste pickers in Brazil. *J Clin Virol.* 2014;59(3):188-91.
14. Passos-Castilho AM, de Sena A, Domingues AL, Lopes-Neto EP, Medeiros TB, Granato CF, et al. Hepatitis E virus seroprevalence among schistosomiasis patients in Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(3):262-6.
15. Siviero PCL, Machado CJ, Cherchiglia ML. Insuficiência renal crônica no Brasil segundo enfoque de causas múltiplas de morte. *Caderno de saúde coletiva.* 2014;22(1).
16. Peres LAB, Biela R, Herrmann M, Matsuo T, Ann HK, Camargo MTA, et al. Estudo epidemiológico da doença renal crônica terminal no oeste do Paraná. Uma experiência de 878 casos atendidos em 25 anos. *Jornal Brasileiro de Nefrologia.* 2010;32.
17. Saúde Md. Rim: Ministério da Saúde; 2019 [Available from: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doacao-de-orgaos/rim>].
18. Camara TQ, ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes. Pacheco L, editor. São Paulo, Brasil: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos; 2019. 24 p.
19. Zhou X, Wang Y, Metselaar HJ, Janssen HL, Peppelenbosch MP, Pan Q. Rapamycin and everolimus facilitate hepatitis E virus replication: revealing a basal defense mechanism of PI3K-PKB-mTOR pathway. *J Hepatol.* 2014;61(4):746-54.
20. Simpson D, Noble S. Tacrolimus ointment: a review of its use in atopic dermatitis and its clinical potential in other inflammatory skin conditions. *Drugs.* 2005;65:827-58.
21. Castro APBM. Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. *Jornal de Pediatria.* 2006;82:166-72.
22. Krain LJ, Nelson KE, Labrique AB. Host immune status and response to hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(1):139-65.
23. Gardinali NR, Guimaraes JR, Melgaco JG, Kevorkian YB, Bottino FO, Vieira YR, et al. Cynomolgus monkeys are successfully and persistently infected with hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3) after long-term immunosuppressive therapy. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174070.

24. Behrendt P, Steinmann E, Manns MP, Wedemeyer H. The impact of hepatitis E in the liver transplant setting. *J Hepatol.* 2014;61(6):1418-29.
25. Wang Y, Zhou X, Debing Y, Chen K, Van Der Laan LJ, Neyts J, et al. Calcineurin inhibitors stimulate and mycophenolic acid inhibits replication of hepatitis E virus. *Gastroenterology.* 2014;146(7):1775-83.
26. Ward P, Poitras E, Leblanc D, Letellier A, Brassard J, Plante D, et al. 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(4):1360-9.
27. Baylis SA, Terao E, Hanschmann K-MO. Collaborative study to establish a World Health Organization international standard for Hepatitis E virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
28. Abravanel F, Mansuy JM, Huynh A, Kamar N, Alric L, Peron JM, et al. Low risk of hepatitis E virus reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol.* 2012;54(2):152-5.
29. Mokhtari C, Marchadier E, Haïm-Boukobza S, Jeblaoui A, Tessé S, Savary J, et al. Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. *J Clin Virol.* 2013;58(1):36-40.
30. 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.
31. Blasco-Perrin H, Madden RG, Stanley A, Crossan C, Hunter JG, Vine L, et al. Hepatitis E virus in patients with decompensated chronic liver disease: a prospective UK/French study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(5):574-81.
32. Tourinho RS, Almeida CRd, Lemos AS, Gardinali NR, Vieira YR, Schmidt-Chanasit J, et al. Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR. *Journal of Genetics and Genome Research.* 2015;2(1):1-3.
33. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods.* 2006;131(1):65-71.
34. Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol.* 2010;47(3):276-9.
35. Kamar N, Rostaing L, Legrand-Abravanel F, Izopet J. How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? *Am J Transplant.* 2013;13(7):1935-6.
36. dos Santos DR, 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(1-2):236-41.
37. De Silva S, Hassan-Ibrahim MO, Austin M, Newport M, Verma S. Hepatitis E infection is an under recognized cause of acute decompensation in patients with chronic liver disease. *Dig Liver Dis.* 2012;44(11):930-4.
38. Puttini C, Riccio ML, Redi D, Tordini G, Cenerini M, Romanello F, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in blood donors and renal transplant recipients: a retrospective study from central Italy. *Infez Med.* 2015;23(3):253-6.

39. Unzueta A, Valdez R, Chang YH, Desmarteau YM, Heilman RL, Scott RL, et al. Hepatitis E virus serum antibodies and RNA prevalence in patients evaluated for heart and kidney transplantation. *Ann Hepatol.* 2016;15(1):33-40.
40. Oliveira JMNSd, Freitas NRd, Teles SA, Bottino FdO, Lemos AS, Oliveira JMd, et al. Prevalence of hepatitis E virus RNA and antibodies in a cohort of kidney transplant recipients in Central Brazil. *Int J Infect Dis.* 2018;69:41-3.
41. Buffaz C, Scholtes C, Dron AG, Chevallier-Queyron P, Ritter J, Andre P, et al. Hepatitis E in liver transplant recipients in the Rhone-Alpes region in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(6):1037-43.
42. Scotto G, Aucella F, Grandaliano G, Martinelli D, Querques M, Gesuete A, et al. Hepatitis E in hemodialysis and kidney transplant patients in south-east Italy. *World J Gastroenterol.* 2015;21(11):3266-73.
43. Harrison A, Scobie L, Crossan C, Parry R, Johnston P, Stratton J, et al. Hepatitis E seroprevalence in recipients of renal transplants or haemodialysis in southwest England: a case-control study. *J Med Virol.* 2013;85(2):266-71.
44. Moal V, Legris T, Burtsey S, Morange S, Purgus R, Dussol B, et al. Infection with hepatitis E virus in kidney transplant recipients in southeastern France. *J Med Virol.* 2013;85(3):462-71.
45. Schemmerer M, Rauh C, Jilg W, Wenzel JJ. Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults. *J Viral Hepat.* 2017;24(1):75-9.
46. Baylis SA, Crossan C, Corman VM, Blumel J, Scobie L, Dalton HR. Unusual serological response to hepatitis E virus in plasma donors consistent with re-infection. *Vox Sang.* 2015;109(4):406-9.
47. Ticehurst JR, Pisanic N, Forman MS, Ordak C, Heaney CD, Ong E, et al. Probable transmission of hepatitis E virus (HEV) via transfusion in the United States. *Transfusion.* 2019;59(3):1024-34.
48. Gallian P, Lhomme S, Piquet Y, Saune K, Abravanel F, Assal A, et al. Hepatitis E virus infections in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1914-7.
49. Stramer SL, Moritz ED, Foster GA, Ong E, Linnen JM, Hogema BM, et al. Hepatitis E virus: seroprevalence and frequency of viral RNA detection among US blood donors. *Transfusion.* 2016;56(2):481-8.
50. Sauleda S, Ong E, Bes M, Janssen A, Cory R, Babizki M, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). *Transfusion.* 2015;55(5):972-9.
51. Hewitt PE, Ijaz S, Brailsford SR, Brett R, Dicks S, Haywood B, et al. Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet.* 2014;384(9956):1766-73.
52. Izopet J, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Kamar N, Abravanel F. HEV and transfusion-recipient risk. *Transfus Clin Biol.* 2017;24(3):176-81.
53. Mallet V, Sberro-Soussan R, Roque-Afonso AM, Vallet-Pichard A, Deau B, Portal A, et al. Transmission of Hepatitis E Virus With Plasma Exchange in Kidney Transplant Recipients: A Retrospective Cohort Study. *Transplantation.* 2018;102(8):1351-7.
54. Passos AM, Heringer TP, Medina-Pestana JO, Ferraz ML, Granato CF. First report and molecular characterization of hepatitis E virus infection in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol.* 2013;85(4):615-9.
55. Passos-Castilho AM, Porta G, Miura IK, Pugliese RP, Danesi VL, Porta A, et al. Chronic hepatitis E virus infection in a pediatric female liver transplant recipient. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4425-7.

56. Waldenstrom J, Castedal M, Konar J, Karason K, Lagging M, Norder H. Chronic hepatitis E infection with an emerging virus strain in a heart transplant recipient successfully treated with ribavirin: a case report. *J Med Case Rep.* 2015;9:180.

57. Zafrullah M, Zhang X, Tran C, Nguyen M, Kamili S, Purdy MA, et al. Disparities in detection of antibodies against hepatitis E virus in US blood donor samples using commercial assays. *Transfusion.* 2018;58(5):1254-63.

Tables

Table 1: Kidney transplanted samples classified by year of collection, gender of the patient and presence of anti-HEV IgG antibodies

Serological Status	Number of samples	Mean Age	Gender	
			Female	Male
Anti-HEV+	20% (10/50)	49.4 (\pm 11.862)	5 (50.0%)	5 (50.0%)
Anti-HEV-	80% (40/50)	44.1 (\pm 11.444)	15(37.5%)	25 (62.5%)
Total	50 (100%)	45.16 (\pm 11.605)	20 (40.0%)	30 (60.0%)

Table 2: Kidney transplanted samples positive for anti-HEV antibodies detection showing the seroconversion of two patients.

Positive samples	Gender	Age	anti-HEV+ (t=0)		anti-HEV+ (t=0)	
			OD1	OD1/CO1	OD2	OD2/CO2
HEVT4	M	44	0.038	0.091	3.000	4.201
HEVT 5	M	62	1.231	2.973	1.638	2.292
HEVT 18	M	43	1.328	3.207	3.000	4.201
HEVT 29	M	61	0.871	2.103	0.857	1.199
HEVT 33	F	42	1.834	4.429	2.573	3.601
HEVT 36	M	66	0.579	1.398	0.863	1.207
HEVT 40	F	36	0.051	0.123	1.516	2.121
HEVT 54	F	42	3.000	7.246	3.000	4.201
HEVT 87	F	36	3.000	7.246	2.421	3.388
HEVT 92	F	62	2.408	5.816	3.000	4.201

Figures

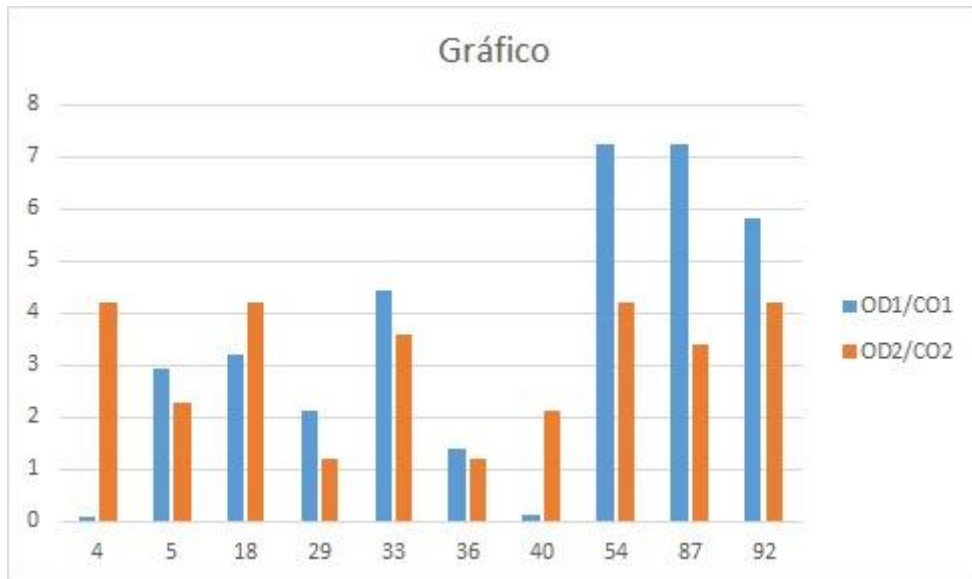


Fig 1: Bar graph showing the differences between t=0 and t=12 in OD/CO of anti-HEV IgG+ samples. Here it is possible to see the two samples that seroconverted for HEV (HEVT4 AND HEVT40).

4. DISCUSSÃO

A hepatite E é um importante problema de saúde pública mundial, com aproximadamente 20 milhões de casos de infecção e 56.600 mortes relacionadas ao HEV, tornando-se a infecção por hepatite via fecal-oral mais comum no mundo. De acordo com um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) publicado em 2015, é necessário o desenvolvimento de mais estudos para elucidar questões relacionadas ao diagnóstico, tratamento e vacinação contra o vírus da hepatite E (HEV). Além disso, com a estratégia da OMS, chamada NOHep, para reduzir ou eliminar as hepatites virais até 2030, o HEV pode se destacar como um desafio potencial, pois existem dois diferentes perfis epidemiológicos muito diferentes a serem combatidos, tanto em regiões de ocorrência de surtos, principalmente por vírus das hepatites de transmissão fecal-oral, quanto em regiões de ocorrências de casos esporádicos, como causados por vírus das hepatites de transmissão zoonótica, sexual ou parenteral (AGGARWAL; NAIK, 2009; OMS, 2015).

Entre os quadros clínicos decorrentes de infecção por HEV, a doença crônica é relatada em pacientes imunocomprometidos, como HIV positivos e doentes renais crônicos em hemodiálise, e imunossuprimidos, como os transplantados. Ela é caracterizada, principalmente, pela presença de RNA do HEV detectável no soro e por alterações nos níveis de enzimas hepáticas por mais de 6 meses, levando à cirrose hepática em 10% dos casos e até ao carcinoma hepatocelular. Por isso, é importante conhecer o perfil de infecção por HEV, sua prevalência e monitoramento em pacientes destes grupos susceptíveis à cronicidade, principalmente, em regiões de circulação dos genótipos 3 e 4 do vírus, descritos como associados a este tipo de quadro (AMOUGOU ATSAMA et al., 2017; COLSON et al., 2019; COLSON et al., 2009; DALTON et al., 2009).

Como uma doença negligenciada, há uma escassez de dados referentes à circulação e prevalência da hepatite. No Brasil, os estudos de soroprevalência realizados trazem resultados discrepantes de região para região e, às vezes, são difíceis de interpretar no contexto sociodemográfico (LOPES DOS SANTOS et al., 2010; TENGAN et al., 2019). Antes de iniciarmos os estudos epidemiológicos sobre HEV em populações especiais de doentes renais crônicos do Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste, foi necessário realizar a otimização de uma técnica molecular mais sensível, com capacidade de detectar uma baixa carga viral. Para o desenvolvimento desta metodologia mais eficiente, sondas e oligonucleotídeos

descritos por Jothikumar (JOTHIKUMAR et al., 2006) foram utilizados com uma curva sintética para a detecção de ORF3 (TOURINHO et al., 2015) e um controle interno IPC (Exogenous Internal Positive Control – Applied Biosystems TaqMan, Waltham, USA) para validar a reação de qPCR e confirmar os resultados negativos como realmente negativos. O protocolo de Jothikumar foi utilizado justamente por ser considerado o que apresenta a melhor sensibilidade, com limite de detecção de 250 cópias / mL (44,5 UI / mL), e especificidade de acordo com Mokhtari e cols (2013) num estudo em que metodologias *in house* e comerciais para a detecção do RNA genômico do HEV foram comparadas. Além disso, durante a otimização da técnica, curvas padrão sintéticas de dsDNA (double strand DNA – fita dupla de DNA) e ssRNA (single strand RNA – fita simples de RNA) foram comparadas com a curva padrão da OMS. A comparação foi realizada porque uma curva de dsDNA não passa pela reação de transcrição reversa durante a RT-qPCR, não sendo possível comprovar a eficiência da técnica apenas com esta curva. Assim, a curva dsDNA sintética foi utilizada como molde para a síntese da curva ssRNA com o uso do MAXI Script T7 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). O uso de um ssRNA sintético como curva padrão confirma a eficiência da técnica, inclusive da fase de transcrição reversa, minimizando resultados falso-negativos por erros neste processo especificamente.

O limite de detecção da curva ssRNA foi de 50 cópias / mL (8,9 UI / mL). Esses resultados foram melhores que a curva dsDNA (100 cópias / mL; 17,8 UI / mL) e que a curva de referência da OMS (250 cópias / mL; 44,5 UI / mL). Alguns estudos anteriores corroboram estes achados, mostrando que o limite de detecção tende a variar quando são utilizadas curvas de ssRNA em comparação com curvas de dsDNA (ABRAVANEL et al., 2012; BLASCO-PERRIN et al., 2015; GERBER et al., 2014; MOKHTARI et al., 2013; TROXLER et al., 2011; WARD et al., 2009). O controle interno testado, IPC, foi validado e útil para confirmação de resultados negativos como verdadeiramente negativos. O uso de controles internos, além de reduzir os resultados falso-negativos, também é muito relevante para a detecção da presença de inibidores de PCR nas amostras, os quais podem ser recorrentes dependendo do tipo de amostra e perfil do paciente (MOKHTARI et al., 2013; WARD et al., 2009).

Após a validação e estabelecimento dos limites de detecção, a RT-qPCR foi utilizada para detectar o vírus da hepatite E em quatro perfis de pacientes: HIV positivos, caracterizando uma coinfeção; pacientes em hemodiálise, doentes renais

crônicos não transplantados; transplantados renais, imunossuprimidos por tacrolimo; e doadores de sangue, imunocompetentes e negativos para sífilis, chagas, HBV, HCV, HTLV I e II, HIV. Além disso, estes pacientes também foram sorologicamente testados para detecção de anticorpos anti-HEV IgG e IgM com utilização do kit RecomWell IgG e IgM (Mikrogen Diagnostik, Neuried, Alemanha).

Quanto ao grupo HIV positivo, foram testadas 280 amostras e 3,6% das amostras foram positivas para detecção do RNA do HEV. A prevalência foi considerada média-alta em comparação com a prevalência de coinfeção por HIV / HEV descrita em todo o mundo, variando de acordo com a região e com a metodologia aplicada. Em geral, a circulação desta coinfeção varia de 0% a 4%, sendo reportada de 0% no Brasil (FERREIRA, A. C. et al., 2018), 0,5% na França (KABA et al., 2011), 0,95% na Polônia (BURA et al., 2017), 3,5% em Gabão (BIVIGOU-MBOUMBA et al., 2017) e 4% nos Estados Unidos (CRUM-CIANFLONE et al., 2012). Em um estudo realizado em São Paulo envolvendo 354 pacientes HIV positivos, nenhuma amostra foi positiva para HEV-RNA (FERREIRA, V. L. et al., 2017). Infelizmente, esses pacientes não puderam ser acompanhados para determinar se eram casos crônicos ou esporádicos.

Em nosso estudo, a carga viral das amostras positivas variou de $2,0 \times 10^2$ cópias / mL (0,31 UI / mL) a $4,78 \times 10^8$ cópias / mL ($8,55 \times 10^7$ UI / mL), com baixas cargas virais na maioria das amostras. As amostras positivas foram retestadas em duplicata e as cargas virais obtidas no primeiro teste e os valores de CT permaneceram iguais ou próximos ao primeiro valor quando as amostras foram extraídas novamente.

Entre as amostras positivas para HEV-RNA, a amostra HEV12998 foi positiva para amplificação da ORF1 por PCR qualitativa e, posteriormente, sequenciada. Infelizmente, as outras amostras positivas para HEV-RNA não puderam ser sequenciadas devido a baixas cargas virais. A baixa carga viral de HEV no sangue durante a infecção foi descrita anteriormente por Jagjit e colaboradores em 2013 (JAGJIT SINGH et al., 2013). Além disso, em amostras com baixa carga viral, a RT-qPCR é mais sensível que a PCR qualitativa, quando se trata especificamente de HEV, que geralmente apresenta baixas cargas virais no soro e altas cargas virais nas fezes. Em casos subclínicos, a detecção de RNA pode ser a única evidência de infecção por HEV, além dos casos em que a soroconversão não ocorre (JOTHIKUMAR et al., 2006; MUSHAHWAR, 2008; PAWLOTSKY, 2002). A amostra HEV12998 foi sequenciada e classificada como genótipo 3. Esse resultado confirma

a circulação do HEV-3 no Brazil, conforme descrito anteriormente (LOPES DOS SANTOS et al., 2010).

Devido ao tratamento adequadamente aplicado, a maioria (70%) dos pacientes HIV positivos não estavam imunocomprometidos (células T CD4+ > 250 células / mm³ de sangue), o que reforça a sugestão de que os pacientes com viremia de HEV se tratavam de casos esporádicos sem progressão para cronicidade. Os indivíduos HIV positivos, principalmente os em estado de imunocomprometimento, estão mais susceptíveis a infecções por HEV e podem desenvolver infecções de assintomáticas a persistentes, com maior risco para desenvolvimento de infecções crônicas, mesmo em tratamento (CRUM-CIANFLONE et al., 2012) (DEBES et al., 2016). Além disso, estudos realizados na China e nos Estados Unidos mostraram que a infecção por HEV em pacientes HIV positivos provavelmente ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente suínos (NAN et al., 2017; PARK et al., 2016).

Nessas situações de casos esporádicos que podem ou não evoluir para infecções crônicas em pacientes imunocomprometidos, a infecção é causada pelo genótipo 3. Além disso, sabe-se que o HEV-3 é uma das únicas linhagens capazes de causar infecção crônica (RIVERO-JUAREZ et al., 2015). No entanto, não foi possível acompanhar estes pacientes para confirmar a transmissão zoonótica do vírus pela ingestão de alimentos de origem suína.

Embora as amostras positivas para o HEV-RNA tenham sido confirmadas em triplicata duas vezes, nenhuma das amostras foi também positiva nos testes sorológicos (IgM e IgG). Este fato tem sido relacionado a baixos títulos de anticorpos anti-HEV IgG e IgM no soro ou, provavelmente, devido à soroconversão tardia ou inexistente, pois o tempo de permanência dos anticorpos no soro pode variar (GERBER et al., 2014). Além disso, de acordo com Pischke et al. (PISCHKE et al., 2014), a taxa de soroprevalência de HEV na população de HIV pode mostrar uma grande variabilidade de acordo com o teste sorológico utilizado e com o estado de imunocomprometimento dos pacientes, que podem desenvolver infecções subclínicas apenas detectadas por testes moleculares. É também relevante destacar que mutações nos receptores de progesterona (PROGINS) em pacientes HIV positivos estão relacionadas a maior susceptibilidade a infecção por HEV e a menor resposta imunológica relacionada (DEBES et al., 2016; VOLLMER; KNABBE; DREIER, 2016).

O uso de uma metodologia molecular de RT-qPCR para detecção de HEV-RNA em amostras de soro HIV positivo foi eficiente para detectar e determinar a carga viral em pacientes coinfectados. Os resultados aqui descritos demonstraram que a maioria dos pacientes tinha baixos títulos de HEV-RNA e não apresentaram anticorpos anti-HEV IgM e IgG, o que leva a resultados falsos-negativos quando se testadas apenas por uma técnica.

Outro grupo de imunocomprometidos com grande importância para a saúde pública brasileira e de grande interesse para os estudos sobre o HEV é o de doentes renais crônicos, representando cada vez mais indivíduos. No Brasil, estes pacientes DRC em tratamento através de diálise representam 0,05% da população brasileira e podem estar em risco de infecção por HEV. No entanto, os dados de prevalência disponíveis são discrepantes para a confirmação deste evento e, no Brasil, há carência de informações a respeito desta infecção no grupo de pacientes DRC em hemodiálise (ALAVIAN et al., 2015; HOSSEINI-MOGHADDAM et al., 2010; MARINHO et al., 2017; PISANO et al., 2017; ZEKAVAT et al., 2013).

Assim, estudos de incidência e prevalência de HEV devem ser realizados em pacientes dependentes de hemodiálise (HD) de forma multicêntrica, uma vez que esses pacientes eventualmente serão submetidos a procedimentos de transplante combinados com terapias imunossupressoras de longo prazo e, desta forma, com risco de desenvolver hepatite crônica induzida por HEV. Somado a este fato, o status de imunocomprometimento do paciente hemodialisado é atualmente reconhecido, com reconhecida suscetibilidade aumentada ao vírus, (GRZEGORZEWSKA, 2015; HAFFAR et al., 2017).

O grupo de DRC hemodiálise-dependentes (HD) estudado consistiu em 286 amostras coletadas de 3 diferentes centros de terapia renal da rede privada de 3 cidades brasileiras diferentes, sendo 82 do Rio de Janeiro - RJ (CDR Centro – Clínica de Doenças Renais), 61 de Queimados – RJ (INQUE - Instituto Nefrológico de Queimados) e 143 de Fortaleza – CE (PRONEFRON). Além de análise de prevalência geral também foi realizada comparação entre duas diferentes regiões brasileiras (Sudeste e Nordeste) e entre centro urbano metropolitano e região de baixada, adjacente (Rio de Janeiro e Queimados) para análise de fatores de risco variações de prevalência. A detecção de anticorpos anti-HEV IgG, a prevalência geral descrita foi de 24,48%, com prevalências particulares de 37,80%, 0% e 27,27% nos municípios do Rio de Janeiro, Queimados e Fortaleza, respectivamente. A prevalência total de 24,48% de anticorpos anti-HEV IgG em pacientes com DRC foi

considerada média em comparação com pacientes HD de outros países, uma vez que as taxas de soroprevalência de infecção por HEV nestes indivíduos são discrepantes de região para região, variando de 0% (PARANA et al., 1997) a 6,2% (TRINTA et al., 2001) no Brasil, sem estudos mais recentes no país. No mundo, esta soroprevalência varia de 3,7% na Itália (SCOTTO et al., 2015), 9,9% no Irã (ALAVIAN et al., 2015), 10,2% na Tunísia (HAFFAR et al., 2017), 10,2% na Argentina (PISANO et al., 2017) e chegando a 36,8% na Inglaterra (SCOTTO et al., 2015). De fato, a infecção por HEV3 tem sido associada à hepatite crônica em pacientes imunocomprometidos em países de baixa endemicidade em que ocorrem casos esporádicos (WANG, Y.; ZHOU; et al., 2014).

No Rio de Janeiro, a prevalência local foi a maior descrita (37,80%), inclusive em relação a estudos anteriores de outras regiões do mundo (TRINTA et al., 2001). Comparativamente, em indivíduos imunocompetentes saudáveis, a soroprevalência do HEV varia de 0% a 10% (PASSOS-CASTILHO et al., 2016) no Brasil. Esta elevada prevalência de HEV entre pacientes com DRC foi justificada por infecções nosocomiais e troca de plasma durante os procedimentos de hemodiálise (MALLET et al., 2018), ausência de monitoramento de infecção por HEV em pacientes com DRC (DE WINTER; HESSELINK; KAMAR, 2018) e exposição zoonótica de HEV pelo uso de heparina de origem suína nos centros de tratamento em hemodiálise (CARUSO et al., 2014), além da transmissão zoonótica e transfusão de sangue, comuns a diversos grupos.

As análises estatísticas mostraram uma maior prevalência de infecção por HEV em famílias com rendas mais baixas quando consideradas análises univariadas ($p = 0,015$), o que já foi descrito e sugerido anteriormente por outros autores (HOSSEINI-MOGHADDAM et al., 2010; KAMAR et al., 2011) que relatam esta tendência de infecção por HEV entre pacientes com menores rendimentos. A hepatite E é considerada uma doença zoonótica no Brasil (LOPES DOS SANTOS et al., 2010; MELGAÇO et al., 2018), estando associada a condições decorrentes de baixa renda, condições inadequadas e falta de higiene no preparo de alimentos, além do consumo de carne suína e seus derivados de origem não segura ou certificada (BARNAUD et al., 2012; DI BARTOLO et al., 2017). A hemodiálise a longo prazo (tempo > 48 meses) também está associada ao maior risco de infecção por HEV, sem associação estatisticamente sustentada pelas análises multivariadas, corroborando trabalhos anteriores em que esta tendência também foi observada (ALAVIAN et al., 2015; TAHERKHANI; FARSHADPOUR, 2016), apesar de opiniões

discordantes quando essa associação não foi observada (BELADI MOUSAVI; MOTEMEDNIA; BELADI MOUSAVI, 2014; SCOTTO et al., 2015; STEFANIDIS et al., 2004; UCAR et al., 2009).

Ainda neste grupo de pacientes HD, de acordo com dados bioquímicos obtidos, foi observada em análise univariada níveis elevados de glicose entre pacientes positivos para IgG anti-HEV, em concordância com trabalhos anteriores (LAGLER et al., 2014). A hiperglicemia pode então estar relacionada à pancreatite, manifestação extra-hepática associada à disfunção das ilhotas beta durante a hepatite E aguda também observada em transplantados tratados com tacrolimo (AGGARWAL, 2011). No entanto, todos os pacientes reativos para IgG anti-HEV apresentaram títulos indetectáveis de HEV-RNA no sangue durante período de hemodiálise, sendo este achado laboratorial consistente com a ausência de infecção aguda por HEV (YACHHA et al., 2001). Por outro lado, vale ressaltar que pacientes com DRC apresentam alto risco de hipoglicemia (GIANCHANDANI et al., 2017).

Além disso, níveis reduzidos de fosfato no sangue foram considerados estatisticamente significativos no grupo reagente para detecção de IgG anti-HEV, porém não devem ser atribuídos unicamente à infecção pelo HEV, já que o procedimento de hemodiálise pode induzir uma variação bidirecional no hormônio da paratireoide (PTH) e nos níveis sanguíneos de fosfato ao longo do tempo, o que é bastante comum entre pacientes adultos em hemodiálise (BLOCK et al., 2016). O controle ideal de fosfato provavelmente depende não apenas às restrições alimentares e aos ligantes de fosfato, mas também ao controle adicional dos níveis de PTH (BLOCK et al., 2016).

Neste estudo, todos os pacientes com DRC apresentaram ausência de viremia no momento da coleta de sangue (procedimentos de hemodiálise), um importante marcador de infecção ativa por HEV, corroborando estudos anteriores realizados na Argentina (PISANO et al., 2017) e na Itália (SCOTTO et al., 2015). Resultados negativos para o HEV-RNA podem representar casos subclínicos sem progressão para cronicidade, além da possível presença de inibidores de PCR, como hemoglobina e ureia, por exemplo, em amostras de soro de pacientes em hemodiálise frequente (SCHRADER et al., 2012).

Em resumo, a reatividade mais elevada do HEV descrita em nossos resultados reforça a hipótese de que os pacientes com DRC dependentes de hemodiálise são mais expostos ao vírus da hepatite E durante os procedimentos de hemodiálise,

justificando a inclusão da pesquisa de HEV-RNA e de IgG anti-HEV nesses pacientes como monitoramento de rotina.

Além dos doentes renais crônicos em hemodiálise, o grupo de DRC transplantados caracteriza-se como um importante grupo a ser considerado quando se trata de hepatite E. O grupo de transplantados renais no Brasil é um grupo de risco numericamente relevante, principalmente devido ao aumento anual no número de transplantes renais realizados, segundo o SNT (Sistema Nacional de Transplantes) (CAMARA; ABTO, 2019; PERES et al., 2010; SAÚDE, 2019; SIVIERO; MACHADO; CHERCHIGLIA, 2014). Além disso, sua importância nos estudos sobre HEV também se deve ao imunossupressor de eleição para este grupo, o tacrolimo, que pode estar associado ou não a outras drogas. O tacrolimo, um inibidor da calcineurina, afeta principalmente as respostas imunes celulares e tem sido apontado como um medicamento que estimula a replicação do HEV (CASTRO, 2006; KRAIN; NELSON; LABRIQUE, 2014; SIMPSON; NOBLE, 2005) e como sendo responsável pela persistência do HEV tanto em pacientes imunocomprometidos humanos quanto não-humanos (GARDINALI et al., 2017; KRAIN et al., 2014). Assim, neste grupo, é relatada a maior parte dos casos crônicos de HEV-3 descritos no mundo, no qual podem ocorrer de doenças hepáticas agudas, persistentes a crônicas mais graves, podendo o paciente permanecer por um longo tempo como assintomáticos ou apresentando apenas sintomas e sinais extra-hepáticos, levando ou não a cirrose e morte (DE SILVA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011; GARDINALI et al., 2012; GEROLAMI et al., 2011; GOYAL et al., 2012; PÉRON et al., 2011; SCLAIR; SCHIFF, 2013).

Neste estudo, foram investigados dois grupos de transplantados renais imunossuprimidos por tacrolimo. O primeiro grupo constitui em 316 amostras coletadas de pacientes em acompanhamento no centro de referência de transplante renal da Santa Casa de Goiânia, capital de Goiás (OLIVEIRA et al., 2018). Neste estudo, realizado em colaboração com De Oliveira e cols (2018), a prevalência de anticorpos IgG anti-HEV encontrada foi de 2,5%, com anticorpos IgM detectados em apenas um paciente (0,3%). Esta prevalência (2,5%) entre transplantados renais de Goiás é considerada semelhante à descrita na população imunocompetente da mesma região (4,0%) (DE SILVA et al., 2012). Em comparação com a prevalência descrita para a população de transplantados renais no Brasil, esta é considerada baixa uma vez que a prevalência recentemente descrita em São Paulo foi de 14,6% (HERING et al., 2014). Estas variações podem estar relacionadas a fatores de risco,

endemicidade de cada região e testes utilizados, A baixa prevalência de IgM anti-HEV e a ausência de viremia detectadas são indicadores de infecções assintomáticas ou crônicas e podem estar associadas ao curto período de detecção destes marcadores no soro durante uma infecção por HEV (HARRISON, A. et al., 2013; MCPHERSON et al., 2018; NAIK et al., 2013; SCOTTO et al., 2015).

Com estes achados de Goiás, foi possível observar que, além da ausência de infecções ativas e crônicas, o HEV pode ser responsável por casos esporádicos de infecção recente ou aguda entre estes pacientes na região do Centro-Oeste do Brasil. Este estudo também mostrou uma baixa prevalência de infecção prévia por HEV, comparável àquelas relatadas em outras áreas consideradas de baixa endemicidade.

O segundo grupo de transplantados renais imunossuprimidos por tacrolimo consistiu em 50 pacientes acompanhados por um ano, totalizando em 250 amostras. Estes pacientes eram transplantados renais imunossuprimidos por tacrolimo em acompanhamento no Centro Estadual de Transplantes do Hospital São Francisco de Assis (CET-HSFA), no Rio de Janeiro. Neste estudo de acompanhamento, amostras de plasma foram coletadas durante os 12 primeiros meses após o início do tratamento com o imunossupressor, com coletas nos meses 1, 3, 6, 9 e 12 após o início da terapia através de diagnóstico molecular por RT-qPCR e sorológico por ELISA.

É interessante observar que este grupo apresentou diferentes prevalências durante este intervalo de tempo relativamente curto. A prevalência de HEV descrita no primeiro momento após o transplante (t=1mês) foi de 16%, enquanto a prevalência encontrada ao fim do monitoramento (t=12 meses) foi de 20% após um ano de transplante. Essa soroprevalência é considerada alta em comparação com outras áreas brasileiras, variando de 2,5%, como relatado anteriormente em Goiás (OLIVEIRA et al., 2018) a 14,6%, conforme relatado em São Paulo (HERING et al., 2014). Em relação à prevalência de HEV descrita no mundo, a aqui encontrada foi considerada alta, uma vez que ela varia entre 5,7% na Argentina (PISANO et al., 2017) e 9,1% na Itália (PUTTINI et al., 2015; UNZUETA et al., 2016). Aparentemente, a infecção pelo vírus da hepatite E é frequente entre pessoas que sofreram transplante de órgãos sólidos, embora a cronicidade pareça ocorrer apenas em alguns casos, estando geralmente associada à detecção de HEV-RNA (BUFFAZ et al., 2014). A prevalência de HEV entre DRC dependentes de hemodiálise é usualmente mais elevada que a descrita em outros grupos, como a de

24, 48% encontrada em pacientes HD, porém, ainda assim, esta prevalência de 20% entre transplantados renais é considerada alta. Assim como descrito no grupo de transplantados analisado de Goiás, nenhuma amostra foi positiva para a detecção de HEV-RNA. Este achado corrobora outros estudos desenvolvidos anteriormente, no Brasil e em outras regiões de baixa endemicidade, onde a circulação do RNA do HEV entre pessoas transplantadas imunossuprimidas variou entre 0% (Goiás, Brasil), 1,9% (França) e até 10,0% (São Paulo, Brasil) (HERING et al., 2014; MALLETT et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

No que diz respeito à soroconversão, os resultados mostram que diferenças na prevalência descrita no primeiro momento de coleta (t=1) e um ano depois (t=12) indicam que 2 pacientes apresentaram soroconversão, ou seja, apenas foram reagentes para IgG anti-HEV 1 ano depois do transplante renal, sugerindo a ocorrência de infecção por HEV no período pós-transplante, ainda durante este primeiro ano, após o início da imunossupressão. Reforçando esta sugestão de que ocorreu soroconversão no caso destes dois pacientes, anticorpos IgM anti-HEV não foram detectados nestas amostras no primeiro momento (t=1). É importante levar em consideração que pacientes imunossuprimidos podem apresentar um perfil de IgG anti-HEV diferente, com uma soroconversão tardia ou inexistente (BUFFAZ et al., 2014; MOAL et al., 2013; SCHEMMERER et al., 2017). Também é muito importante ter em mente que a presença de IgG anti-HEV não confere proteção contra a futuras re-infecções por HEV nestes pacientes imunossuprimidos, já que a permanência destes títulos de anticorpos no soro pode ser indeterminada, com decaimento ao longo do tempo, como foi possível observar em 6 dos 10 pacientes anti-HEV IgG positivos durante o período de acompanhamento (12 meses) (BAYLIS, S. A. et al., 2015; BUFFAZ et al., 2014; TICEHURST et al., 2019). Considerando a alta disseminação do HEV entre os produtos suínos, essa exposição repetida a estes alimentos contaminados pode aumentar os títulos de IgG anti-HEV na maioria dos pacientes positivos, embora seja capaz de conferir imunidade por determinado período de tempo, começando a diminuir em aproximadamente cinco anos (DE CAMPOS et al., 2018; DE SOUZA et al., 2012; SCHEMMERER et al., 2017; VILANOVA, 2016).

Apesar de este estudo ter acompanhado os pacientes por um curto período de tempo, foi encontrada uma alta soroprevalência de HEV. Portanto, é importante manter o monitoramento constante desse grupo por um período mais longo, pois o desenvolvimento da cronicidade pode ser silencioso e a infecção crônica pela

hepatite E parece se desenvolver e se apresentar de 60 a 120 meses após a imunossupressão pelo tacrolimo. Em estudos brasileiros, a doença crônica causada pelo HEV foi detectada aos 13, 60 (PASSOS et al., 2013) e 84 (PASSOS-CASTILHO et al., 2014) meses após o início da terapia imunossupressora. Em comparação com os achados de outros países, esse período de surgimento da doença crônica após a imunossupressão foi consideravelmente alto, conforme relatado na França, em que a infecção crônica por HEV foi diagnosticada apenas 49 meses após o transplante (MOAL et al., 2013) e na Suécia, a infecção foi confirmada com mais de 24 meses de imunossupressão (WALDENSTROM et al., 2015). Além disso, foi relatada anteriormente uma maior prevalência de HEV entre homens transplantados mais velhos, embora esta relação não tenha sido encontrada em nenhum dos grupos estudados (TICEHURST et al., 2019; ZAFRULLAH et al., 2018).

Após investigar os grupos de pacientes HIV positivos, DRC dependentes de hemodiálise e transplantados renais, pesquisamos também um grupo de doadores de sangue como controle imunocompetente, para fins de determinação de prevalência do HEV na população e para comparação com estas populações especiais. Além disso, diferentes dados de prevalência de HEV em populações imunocompetentes são observados em cada região geográfica brasileira (PANDOLFI et al., 2017; PASSOS-CASTILHO et al., 2016), porém os fatores epidemiológicos envolvidos nestas discrepâncias na circulação do HEV-3 no Brasil e no mundo ainda não estão claros.

No grupo de doadores de sangue, a prevalência encontrada foi de 6%, sendo considerada média em comparação com as prevalências que variam bastante de região para região onde existe a circulação do genótipo 3 do HEV. Esta prevalência de HEV-3 entre doadores de sangue pode variar de 3,94% na França (GALLIAN et al., 2014), 9,5% nos Estados Unidos da América (STRAMER et al., 2016), 19,96% na Espanha (SAULEDA et al., 2015) chegando a 52% também na França (MANSUY et al., 2011). Os doadores de sangue são um grupo importante quando se trata da triagem prévia e do direcionamento das bolsas destes indivíduos para transplantados, uma vez que elas poderão ser utilizadas em pacientes receptores de órgãos sólidos ou outros tipos de pacientes imunossuprimidos. É também relevante reforçar que a transfusão de sangue já foi reportada como uma importante via, embora menos comum, de transmissão de HEV nestas regiões de circulação de HEV-3, já que a triagem para este vírus não está incluída no monitoramento rotineiro das bolsas de sangue recebidas e a investigação de infecções por HEV nos bancos

de sangue não é realizada (HEWITT et al., 2014; IZOPET et al., 2017; TICEHURST et al., 2019).

Em conclusão, as prevalências encontradas nos grupos estudados de DRC dependentes em hemodiálise (24,48%) e de transplantados (20%) foram ambas consideradas altas em comparação com a prevalência de HEV entre doadores de sangue (6,0%). Desta forma, embora não tenham sido descritas infecções crônicas por HEV nestes estudos, é clara a importância do constante monitoramento dos pacientes imunossuprimidos para detecção precoce de infecções por HEV através de técnicas sensíveis e específicas, como a RT- qPCR e o ELISA. Este monitoramento é ainda mais importante no grupo de transplantados renais, que abrange a maioria dos casos de hepatite E crônica no mundo, cujas infecções por HEV costumam ser detectadas apenas tardiamente. Assim como é de grande importância o monitoramento rotineiro dos doadores de sangue, cujas bolsas podem ser direcionadas a pacientes susceptíveis às infecções crônicas ou graves por HEV, além do grupo de pacientes DRC em hemodiálise, que poderão ser submetidos ao transplante renal como terapia definitiva para sua condição renal.

5. CONCLUSÕES

- A prevalência de HEV entre pacientes doentes renais crônicos dependentes de hemodiálise foi de 24,48%, com prevalências discrepantes entre municipalidades: 0% em Queimados – RJ, 27,27% em Fortaleza – CE e 37,80% no Rio de Janeiro – RJ.
- A prevalência de HEV descrita entre pacientes doentes renais crônicos transplantados renais em Goiás foi de 2,5%.
- Durante os 12 meses de monitoramento de pacientes transplantados renais (do Rio de Janeiro) para a detecção de HEV foram encontradas duas prevalências: 16% no primeiro momento após o início da imunossupressão e de 20% após 12 meses de imunossupressão. Nenhum paciente foi positivo para a detecção de HEV-RNA.
- A prevalência descrita entre doentes renais crônicos tanto transplantados quando dependentes de hemodiálise foi superior às encontradas nas populações de pacientes HIV-positivos (3,6%) e de doadores de sangue (6,0%), salvo os pacientes transplantados renais de Goiás, que apresentaram prevalência menor (2,5%) que a descrita para a população geral.
- Por fim, é nítida a relevância dos grupos imunossuprimidos e imunocomprometidos em relação a infecções por HEV devido a possibilidade do desenvolvimento das infecções para cronicidade e suas consequências. Mas também pela maior soroprevalência encontrada nesta população que se mostra assim como um grupo de risco. Assim, é importante o monitoramento destes pacientes, principalmente dos transplantados imunossuprimidos por tacrolimo, para que o diagnóstico ocorra antes da progressão para a cronicidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAVANEL, F. et al. Low risk of hepatitis E virus reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. **J Clin Virol**, v. 54, n. 2, p. 152-5, Jun 2012.
- AGGARWAL, R. Hepatitis E: does it cause chronic hepatitis? **Hepatology**, v. 48, n. 4, p. 1328-30, Oct 2008.
- AGGARWAL, R. Clinical presentation of hepatitis E. **Virus Res**, v. 161, n. 1, p. 15-22, Oct 2011.
- AGGARWAL, R.; NAIK, S. Epidemiology of hepatitis E: current status. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, n. 9, p. 1484-93, Sep 2009.
- AHMAD, I.; HOLLA, R. P.; JAMEEL, S. Molecular virology of hepatitis E virus. **Virus Res**, v. 161, n. 1, p. 47-58, Oct 2011.
- ALAVIAN, S. M. et al. Anti-Hepatitis E Antibody in Hemodialysis Patients in Isfahan, Iran: Prevalence and Risk Factors. **Hepat Mon**, v. 15, n. 9, p. e23633, Sep 2015.
- ALLAIRE, M. et al. Hepatitis E virus infection mimicking acute graft rejection in a liver transplant recipient. **Clin Res Hepatol Gastroenterol**, v. 42, n. 4, p. e68-e71, 09 2018.
- ALONSO, P. et al. Use of a "CNI holidays" strategy in acute renal dysfunction late after heart transplant. Report of two cases. **Heart Int**, v. 9, n. 2, p. 74-7, 2014 Jul-Dec 2014.
- ALRIC, L. et al. Definitive clearance of a chronic hepatitis E virus infection with ribavirin treatment. **Am J Gastroenterol**, v. 106, n. 8, p. 1562-3, Aug 2011.
- AMOUGOU ATSAMA, M. et al. Hepatitis E virus infection as a promoting factor for hepatocellular carcinoma in Cameroon: Preliminary Observations. **Int J Infect Dis**, v. 64, p. 4-8, Nov 2017.
- ANKCORN, M. J. et al. Characterising the risk of Hepatitis E virus infection in haematological malignancies: a UK prospective prevalence study. **Br J Haematol**, v. 186, n. 1, p. 191-195, Jul 2019.
- ANTY, R. et al. First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. **J Clin Virol**, v. 54, n. 1, p. 76-8, May 2012.
- ARENDS, J. E. et al. Hepatitis E: An emerging infection in high income countries. **J Clin Virol**, v. 59, n. 2, p. 81-8, Feb 2014.
- AUGUSTINE, J. Kidney transplant: New opportunities and challenges. **Cleve Clin J Med**, v. 85, n. 2, p. 138-144, Feb 2018.
- BADER, T. F. et al. Hepatitis E in a U.S. traveler to Mexico. **N Engl J Med**, v. 325, n. 23, p. 1659, Dec 1991.
- BALAYAN, M. S. et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. **Intervirology**, v. 20, n. 1, p. 23-31, 1983.

- BARNAUD, E. et al. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 15, p. 5153-9, Aug 2012.
- BASSAL, R. et al. Seroprevalence of hepatitis E virus in dromedary camels, Bedouins, Muslim Arabs and Jews in Israel, 2009-2017. **Epidemiol Infect**, v. 147, p. e92, Jan 2019.
- BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 33, n. 1, p. 74-87, 2011.
- BAYLIS, S. A. et al. Unusual serological response to hepatitis E virus in plasma donors consistent with re-infection. **Vox Sang**, v. 109, n. 4, p. 406-9, Nov 2015.
- BAYLIS, S. A.; TERAU, E.; HANSCHMANN, K.-M. O. **Collaborative study to establish a World Health Organization international standard for Hepatitis E virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays**. Geneva, Switzerland: World Health Organization: 30p p. 2011.
- BEHRENDT, P. et al. The impact of hepatitis E in the liver transplant setting. **J Hepatol**, v. 61, n. 6, p. 1418-29, Dec 2014.
- BELADI MOUSAVI, S. S.; MOTEMEDNIA, F.; BELADI MOUSAVI, M. Epidemiology of hepatitis e virus infection in patients on chronic hemodialysis. **Jundishapur J Microbiol**, v. 7, n. 5, p. e6993, May 2014.
- BENDALL, R. et al. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. **J Med Virol**, v. 82, n. 5, p. 799-805, May 2010.
- BERTO, A. et al. Hepatitis E virus in pork food chain, United Kingdom, 2009-2010. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 8, p. 1358-60, Aug 2012.
- BILE, K. et al. 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**, v. 51, n. 4, p. 466-74, Oct 1994.
- BIVIGOU-MBOUMBA, B. et al. Hepatitis B, C, and E infection among HIV-infected patients in Franceville, Gabon: retrospective cross-sectional study. **Med Sante Trop**, v. 27, n. 3, p. 274-280, Aug 1 2017.
- BLASCO-PERRIN, H. et al. Hepatitis E virus in patients with decompensated chronic liver disease: a prospective UK/French study. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 42, n. 5, p. 574-81, Sep 2015.
- BLOCK, G. et al. Co-trending of parathyroid hormone and phosphate in patients receiving hemodialysis. **Clin Nephrol**, v. 85, n. 3, p. 142-51, Mar 2016.
- BLUMBERG, B. S. et al. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. **Ann Intern Med**, v. 66, n. 5, p. 924-31, May 1967.

- BOSE, P. D. et al. High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: association with hepatitis E-related poor pregnancy outcome. **J Hepatol**, v. 54, n. 6, p. 1107-13, Jun 2011.
- BOUDIN, L. et al. Successful treatment with ribavirine for chronic hepatitis E in chronic lymphocytic leukemia treated with Ibrutinib. **Bull Cancer**, v. 106, n. 1, p. 84-85, Jan 2019.
- BOUWKNEGT, M. et al. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. **J Food Prot**, v. 70, n. 12, p. 2889-95, Dec 2007.
- BRADLEY, D. W. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. **Br Med Bull**, v. 46, n. 2, p. 442-61, Apr 1990.
- BUFFAZ, C. et al. Hepatitis E in liver transplant recipients in the Rhone-Alpes region in France. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 6, p. 1037-43, Jun 2014.
- BURA, M. et al. Hepatitis E virus IgG seroprevalence in HIV patients and blood donors, west-central Poland. **Int J Infect Dis**, v. 61, p. 20-22, Aug 2017.
- CAMARA, T. Q.; ABTO. **Registro Brasileiro de Transplantes**. São Paulo, Brasil: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, 2019. 24
- CANTAROVICH, M. et al. Anti-CD25 monoclonal antibody coverage allows for calcineurin inhibitor "holiday" in solid organ transplant patients with acute renal dysfunction. **Transplantation**, v. 73, n. 7, p. 1169-72, Apr 2002.
- CAO, D.; MENG, X. J. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. **Emerg Microbes Infect**, v. 1, n. 8, p. e17, Aug 2012.
- CARUSO, C. et al. Evaluation of viral inactivation of pseudorabies virus, encephalomyocarditis virus, bovine viral diarrhea virus and porcine parvovirus in pancreatin of porcine origin. **J Virol Methods**, v. 208, p. 79-84, Nov 2014.
- CASTRO, A. P. B. M. Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 166-72, 2006.
- CATTOIR, L. et al. Hepatitis E virus serology and PCR: does the methodology matter? **Arch Virol**, v. 162, n. 9, p. 2625-2632, Sep 2017.
- CDC, C. F. D. C.; PREVENTION. Investigation of hepatitis E outbreak among refugees - Upper Nile, South Sudan, 2012-2013. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 62, n. 29, p. 581-6, Jul 2013.
- CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, Apr 1989.
- CHRISTENSEN, P. B. et al. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 8, p. 1026-31, Oct 2008.
- COLSON, P.; BORENTAIN, P.; GÉROLAMI, R. Hepatitis E virus as an agent of hepatocellular carcinoma. **Int J Infect Dis**, v. 80, p. 62-63, 03 2019.

- COLSON, P. et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. **J Infect Dis**, v. 202, n. 6, p. 825-34, Sep 2010.
- COLSON, P. et al. Hepatitis E in an HIV-infected patient. **J Clin Virol**, v. 45, n. 4, p. 269-71, 2009.
- COLSON, P.; RAOULT, D. Autochthonous hepatitis E: a common and fatal but neglected emerging disease in France. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 12, p. 898-899, Dec 2017.
- CRUM-CIANFLONE, N. F. et al. Hepatitis E virus infection in HIV-infected persons. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 3, p. 502-6, Mar 2012.
- DALTON, H. R. et al. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. **N Engl J Med**, v. 361, n. 10, p. 1025-7, Sep 2009.
- DALTON, H. R. et al. Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease. **Lancet**, v. 369, n. 9569, p. 1260, Apr 2007.
- DALTON, H. R.; HUNTER, J. G.; BENDALL, R. P. Hepatitis E. **Curr Opin Infect Dis**, v. 26, n. 5, p. 471-8, Oct 2013.
- DAVERN, T. J. et al. Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1665-72.e1-9, Nov 2011.
- DE ALMEIDA RAMOS, D. et al. Production and characterization of a Brazilian candidate antigen for Hepatitis E Virus genotype 3 diagnosis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 363, n. 5, p. fnw021, Mar 2016.
- DE CAMPOS, C. G. et al. Detection of hepatitis E virus genotype 3 in pigs from subsistence farms in the state of Mato Grosso, Brazil. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 58, p. 11-16, Jun 2018.
- DE SILVA, S. et al. Hepatitis E infection is an under recognized cause of acute decompensation in patients with chronic liver disease. **Dig Liver Dis**, v. 44, n. 11, p. 930-4, Nov 2012.
- DE SOUZA, A. J. et al. HEV infection in swine from Eastern Brazilian Amazon: evidence of co-infection by different subtypes. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 35, n. 5, p. 477-85, Sep 2012.
- DE WINTER, B. C. M.; HESSELINK, D. A.; KAMAR, N. Dosing ribavirin in hepatitis E-infected solid organ transplant recipients. **Pharmacol Res**, v. 130, p. 308-315, Apr 2018.
- DEBES, J. D. et al. Hepatitis E virus infection in the HIV-positive patient. **J Clin Virol**, v. 80, p. 102-6, Jul 2016.
- DI BARTOLO, I. et al. Presence of Hepatitis E Virus in a RED Deer (*Cervus elaphus*) Population in Central Italy. **Transbound Emerg Dis**, v. 64, n. 1, p. 137-143, Feb 2017.
- DING, Q. et al. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 5, p. 1147-1152, 01 2017.

- DOMANOVIĆ, D. et al. Hepatitis E and blood donation safety in selected European countries: a shift to screening? **Euro Surveill**, v. 22, n. 16, Apr 2017.
- DOS SANTOS, D. R. et al. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. **Vet Microbiol**, v. 149, n. 1-2, p. 236-41, Apr 21 2011.
- DROBENIUC, J. et al. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 3, p. e24-7, Aug 2010.
- FEAGINS, A. R. et al. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 3, p. 912-7, Mar 2007.
- FEINSTONE, S. M.; KAPIKIAN, A. Z.; PURCELL, R. H. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. **Science**, v. 182, n. 4116, p. 1026-8, Dec 1973.
- FERREIRA, A. C. et al. Serological and molecular markers of hepatitis E virus infection in HIV-infected patients in Brazil. **Arch Virol**, v. 163, n. 1, p. 43-49, Jan 2018.
- FERREIRA, V. L. et al. Prevalence of Hepatitis E Virus Antibodies Among Blood Donors: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Hepatitis Monthly**, v. 17, n. 7, p. e42875, 2017.
- FONSECA, J. C. F. D. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 322-330, 2010.
- GALLIAN, P. et al. Hepatitis E virus infections in blood donors, France. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 11, p. 1914-7, Nov 2014.
- GARDINALI, N. R. et al. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 935-9, Nov 2012.
- GARDINALI, N. R. et al. Cynomolgus monkeys are successfully and persistently infected with hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3) after long-term immunosuppressive therapy. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0174070, 2017.
- GENG, J. 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**, v. 18, n. 10, p. e583-90, Oct 2011.
- GERBER, P. F. et al. Comparison of real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of swine hepatitis E virus in fecal samples. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 4, p. 1045-51, Apr 2014.
- GEROLAMI, R. et al. Treatment of severe acute hepatitis E by ribavirin. **J Clin Virol**, v. 52, n. 1, p. 60-2, Sep 2011.
- GIANCHANDANI, R. Y. et al. Pathophysiology and Management of Hypoglycemia in End-Stage Renal Disease Patients: A Review. **Endocr Pract**, v. 23, n. 3, p. 353-362, Mar 2017.

- GOENS, S. D.; PERDUE, M. L. Hepatitis E viruses in humans and animals. **Anim Health Res Rev**, v. 5, n. 2, p. 145-56, Dec 2004.
- GOLDSMITH, R. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children. **Lancet**, v. 339, n. 8789, p. 328-31, Feb 1992.
- GOYAL, R. et al. Ribavirin therapy for hepatitis E virus-induced acute on chronic liver failure: a preliminary report. **Antivir Ther**, v. 17, n. 6, p. 1091-6, 2012.
- GRAFF, J. et al. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. **J Virol**, v. 80, n. 12, p. 5919-26, Jun 2006.
- GRAFF, J. et al. Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. **J Virol**, v. 82, n. 3, p. 1185-94, Feb 2008.
- GROUP, K. D. I. G. O. C. W. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney international Suppl**, v. 3, n. 1, p. 1-150, 2013.
- GRZEGORZEWSKA, A. E. Prophylactic vaccinations in chronic kidney disease: Current status. **Hum Vaccin Immunother**, v. 11, n. 11, p. 2599-605, 2015.
- GUU, T. S. et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12992-7, Aug 2009.
- GYARMATI, P. et al. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. **J Virol Methods**, v. 146, n. 1-2, p. 226-35, Dec 2007.
- HAFFAR, S. et al. Systematic review with meta-analysis: the association between hepatitis E seroprevalence and haemodialysis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 46, n. 9, p. 790-799, Nov 2017.
- HALAC, U. et al. Cirrhosis due to chronic hepatitis E infection in a child post-bone marrow transplant. **J Pediatr**, v. 160, n. 5, p. 871-4.e1, May 2012.
- HARRISON, A. et al. Hepatitis E seroprevalence in recipients of renal transplants or haemodialysis in southwest England: a case-control study. **J Med Virol**, v. 85, n. 2, p. 266-71, Feb 2013.
- HARRISON, T. J. Hepatitis E virus -- an update. **Liver**, v. 19, n. 3, p. 171-6, Jun 1999.
- HART, A. et al. Kidney. **Am J Transplant**, v. 16 Suppl 2, p. 11-46, Jan 2016.
- HE, J.; HOFFMAN, S. L.; HAYES, C. G. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structural protein gene induces immune response in mice. **Vaccine**, v. 15, n. 4, p. 357-62, Mar 1997.
- HERING, T. et al. Past and current hepatitis E virus infection in renal transplant patients. **J Med Virol**, v. 86, n. 6, p. 948-53, Jun 2014.

- HEWITT, P. E. et al. Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. **Lancet**, v. 384, n. 9956, p. 1766-73, Nov 15 2014.
- HIMMELSBACH, K.; BENDER, D.; HILDT, E. Life cycle and morphogenesis of the hepatitis E virus. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p. 196, Nov 2018.
- HOERNING, A. et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in pediatric solid organ transplant recipients--a single-center experience. **Pediatr Transplant**, v. 16, n. 7, p. 742-7, Nov 2012.
- HOLLINGER, F. B. The five viruses: a perspective. **AASLD Postgraduate Course "Viral hepatitis A to F: An Update**, p. 2-20, 1994.
- HOSSAIN, M. S. et al. Prevalence of Serological Markers of Viruses in Patients of Acute Hepatitis. **Mymensingh Med J**, v. 28, n. 2, p. 278-285, Apr 2019.
- HOSSEINI-MOGHADDAM, S. M. et al. Hepatitis E virus infection: a general review with a focus on hemodialysis and kidney transplant patients. **Am J Nephrol**, v. 31, n. 5, p. 398-407, 2010.
- HOUGHTON, M. Discovery of the hepatitis C virus. **Liver Int**, v. 29 Suppl 1, p. 82-8, Jan 2009.
- HUANG, C. C. et al. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). **Virology**, v. 191, n. 2, p. 550-8, Dec 1992.
- INGULLI, E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. **Pediatr Nephrol**, v. 25, n. 1, p. 61-74, Jan 2010.
- IPPAGUNTA, S. K. et al. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. **J Med Virol**, v. 79, n. 12, p. 1827-31, Dec 2007.
- IZOPET, J. et al. HEV and transfusion-recipient risk. **Transfus Clin Biol**, v. 24, n. 3, p. 176-181, Sep 2017.
- JAGJIT SINGH, G. K. et al. Chronic Hepatitis E as a cause for cryptogenic cirrhosis in HIV. **J Infect**, v. 66, n. 1, p. 103-6, Jan 2013.
- JOTHIKUMAR, N. et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. **J Virol Methods**, v. 131, n. 1, p. 65-71, Jan 2006.
- JUNGE, N. 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**, v. 17, n. 4, p. 343-7, Jun 2013.
- KABA, M. et al. Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. **J Med Virol**, v. 83, n. 10, p. 1704-16, Oct 2011.
- KACI, S.; NÖCKLER, K.; JOHNE, R. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. **Vet Microbiol**, v. 128, n. 3-4, p. 380-5, Apr 2008.

- KALIA, M. et al. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. **J Virol**, v. 83, n. 24, p. 12714-24, Dec 2009.
- KAMAR, N. et al. Hepatitis E. **Lancet**, v. 379, n. 9835, p. 2477-2488, Jun 2012.
- KAMAR, N. et al. Hepatitis E virus and neurologic disorders. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 173-9, Feb 2011.
- KAMAR, N. et al. Hepatitis E virus infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 1, p. 116-38, Jan 2014.
- KAMAR, N. et al. Hepatitis E virus infection. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17086, Nov 2017.
- KAMAR, N. et al. An Early Viral Response Predicts the Virological Response to Ribavirin in Hepatitis E Virus Organ Transplant Patients. **Transplantation**, v. 99, n. 10, p. 2124-31, Oct 2015.
- KAMAR, N. et al. How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? **Am J Transplant**, v. 13, n. 7, p. 1935-6, Jul 2013.
- KAMAR, N. et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. **N Engl J Med**, v. 358, n. 8, p. 811-7, Feb 2008.
- KAR, P.; SENGUPTA, A. A guide to the management of hepatitis E infection during pregnancy. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 3, p. 205-211, Mar 2019.
- KAUSHIK, N. et al. Zinc Salts Block Hepatitis E Virus Replication by Inhibiting the Activity of Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. **J Virol**, v. 91, n. 21, 11 2017.
- KELLY, A. G.; NETZLER, N. E.; WHITE, P. A. Ancient recombination events and the origins of hepatitis E virus. **BMC Evol Biol**, v. 16, n. 1, p. 210, 10 2016.
- KHUROO, M. S.; KHUROO, N. S. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 31, p. 7030-45, Aug 2016.
- KIRSZTAJN, G. M. et al. [Fast reading of the KDIGO 2012: guidelines for evaluation and management of chronic kidney disease in clinical practice]. **J Bras Nefrol**, v. 36, n. 1, p. 63-73, 2014 Jan-Mar 2014.
- KMUSH, B. L. et al. Long-term Antibody Persistence After Hepatitis E Virus Infection and Vaccination in Dongtai, China. **Open Forum Infect Dis**, v. 6, n. 4, p. ofz144, Apr 2019.
- KORKAYA, H. et al. The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. **J Biol Chem**, v. 276, n. 45, p. 42389-400, Nov 2001.
- KRAIN, L. J.; NELSON, K. E.; LABRIQUE, A. B. Host immune status and response to hepatitis E virus infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 1, p. 139-65, Jan 2014.
- KROG, J. S.; LARSEN, L. E.; BREUM, S. Tracing Hepatitis E Virus in Pigs From Birth to Slaughter. **Front Vet Sci**, v. 6, p. 50, 2019.

- KUMAR, A. et al. Hepatitis E in pregnancy. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 85, n. 3, p. 240-4, Jun 2004.
- LA ROSA, G. et al. First Detection of Hepatitis E Virus in Shellfish and in Seawater from Production Areas in Southern Italy. **Food Environ Virol**, v. 10, n. 1, p. 127-131, 03 2018.
- LAGLER, H. et al. Hepatitis E virus seroprevalence in Austrian adults: a nationwide cross-sectional study among civilians and military professionals. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87669, 2014.
- LARA, J.; PURDY, M. A.; KHUDYAKOV, Y. E. Genetic host specificity of hepatitis E virus. **Infect Genet Evol**, v. 24, p. 127-39, Jun 2014.
- LEGRAND-ABRAVANEL, F. et al. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 5, p. 772-4, May 2009.
- LEMON, S. M.; WALKER, C. M. Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus: Emerging and Re-Emerging Enterically Transmitted Hepatitis Viruses. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 9, n. 6, Jun 2019.
- LI, C. J.; LI, L. Tacrolimus in preventing transplant rejection in Chinese patients--optimizing use. **Drug Des Devel Ther**, v. 9, p. 473-85, 2015.
- LI, T. C. et al. Genotype 5 Hepatitis E Virus Produced by a Reverse Genetics System Has the Potential for Zoonotic Infection. **Hepatol Commun**, v. 3, n. 1, p. 160-172, Jan 2019.
- LOPES DOS SANTOS, D. R. et al. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. **J Clin Virol**, v. 47, n. 3, p. 276-9, Mar 2010.
- MALLET, V. et al. Transmission of Hepatitis E Virus With Plasma Exchange in Kidney Transplant Recipients: A Retrospective Cohort Study. **Transplantation**, v. 102, n. 8, p. 1351-1357, Aug 2018.
- MANSUY, J. M. et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 12, p. 2309-12, Dec 2011.
- MARINHO, A. W. G. B. et al. Prevalence of chronic renal disease among Brazilian adults: a systematic review. **Caderno de saúde coletiva**, v. 25, n. 3, p. 379-388, 2017.
- MARTINS, R. M. et al. Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a population of recyclable waste pickers in Brazil. **J Clin Virol**, v. 59, n. 3, p. 188-91, Mar 2014.
- MCPHERSON, S. et al. Summary of the British Transplantation Society UK Guidelines for Hepatitis E and Solid Organ Transplantation. **Transplantation**, v. 102, n. 1, p. 15-20, Jan 2018.
- MEISTER, T. L. et al. Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. **Antiviral Res**, v. 163, p. 34-49, Mar 2019.

- MELGAÇO, J. G. et al. Hepatitis E: Update on Prevention and Control. **Biomed Res Int**, v. 2018, p. 5769201, 2018.
- MENG, X. J. Recent advances in Hepatitis E virus. **J Viral Hepat**, v. 17, n. 3, p. 153-61, Mar 2010.
- MIYOSHI, M. et al. Chronic Hepatitis E Infection in a Persistently Immunosuppressed Patient Unable to Be Eliminated after Ribavirin Therapy. **Intern Med**, v. 55, n. 19, p. 2811-2817, 2016 2016.
- MOAL, V. et al. Infection with hepatitis E virus in kidney transplant recipients in southeastern France. **J Med Virol**, v. 85, n. 3, p. 462-71, Mar 2013.
- MOAL, V. et al. Systematic serological testing for hepatitis E virus in kidney transplant recipients. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 5, p. 1523-30, May 2015.
- MOKHTARI, C. et al. Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. **J Clin Virol**, v. 58, n. 1, p. 36-40, Sep 2013.
- MORA-GUTIÉRREZ, J. M. et al. [Chronic kidney disease in the elderly patient]. **Rev Esp Geriatr Gerontol**, v. 52, n. 3, p. 152-158, 2017 May - Jun 2017.
- MORI, Y.; MATSUURA, Y. Structure of hepatitis E viral particle. **Virus Res**, v. 161, n. 1, p. 59-64, Oct 2011.
- MUSHAHWAR, I. K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. **J Med Virol**, v. 80, n. 4, p. 646-58, Apr 2008.
- NAIK, A. et al. Lack of evidence of hepatitis E virus infection among renal transplant recipients in a disease-endemic area. **J Viral Hepat**, v. 20, n. 4, p. e138-40, Apr 2013.
- NAN, Y. et al. Zoonotic Hepatitis E Virus: An Ignored Risk for Public Health. **Front Microbiol**, v. 8, p. 2396, 2017.
- NAVANEETHAN, U.; AL MOHAJER, M.; SHATA, M. T. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. **Liver Int**, v. 28, n. 9, p. 1190-9, Nov 2008.
- NISHIYAMA, T. et al. Screening of novel drugs for inhibiting hepatitis E virus replication. **J Virol Methods**, v. 270, p. 1-11, Aug 2019.
- NOHEP. About hepatitis. <http://www.nohep.org/learn-more/>, 2019. Acesso em: June 1.
- O'HARA, Z. et al. First Report of the Presence of Hepatitis E Virus in Scottish-Harvested Shellfish Purchased at Retail Level. **Food Environ Virol**, v. 10, n. 2, p. 217-221, 06 2018.
- OKAMOTO, H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. **Virus Res**, v. 127, n. 2, p. 216-28, Aug 2007.
- OLIVEIRA, J. M. N. S. D. et al. Prevalence of hepatitis E virus RNA and antibodies in a cohort of kidney transplant recipients in Central Brazil. **Int J Infect Dis**, v. 69, p. 41-43, Apr 2018.

OMS, O. M. D. S. Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015. <https://www.who.int/hepatitis/publications/hepE-positionpaper/en/>, p. 185 - 200, 2015.

OMS, O. M. D. S. What is hepatitis? , 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/features/qa/76/en/> >. Acesso em: 27 de Agosto.

OMS, O. M. D. S . Hepatitis E: Facts sheets. <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/hepatitis-e>, 2019. Acesso em: August 1th.

OSHIKI, M. et al. Microfluidic PCR Amplification and MiSeq Amplicon Sequencing Techniques for High-Throughput Detection and Genotyping of Human Pathogenic RNA Viruses in Human Feces, Sewage, and Oysters. **Front Microbiol**, v. 9, p. 830, 2018.

PANDOLFI, R. et al. In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti-hepatitis E virus amongst blood donors in south Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0176409, 2017.

PARANA, R. et al. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibodies in patients from a referral unit of liver diseases in Salvador, Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 57, n. 1, p. 60-1, Jul 1997.

PARK, W. J. et al. Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. **J Vet Sci**, v. 17, n. 1, p. 1-11, Mar 2016.

PAS, S. D. et al. Hepatitis E virus infection among solid organ transplant recipients, the Netherlands. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 5, p. 869-72, May 2012.

PASSOS-CASTILHO, A. M. et al. Hepatitis E virus seroprevalence among schistosomiasis patients in Northeastern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 20, n. 3, p. 262-6, 2016 May-Jun 2016.

PASSOS-CASTILHO, A. M. et al. Chronic hepatitis E virus infection in a pediatric female liver transplant recipient. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 12, p. 4425-7, Dec 2014.

PASSOS, A. M. et al. First report and molecular characterization of hepatitis E virus infection in renal transplant recipients in Brazil. **J Med Virol**, v. 85, n. 4, p. 615-9, Apr 2013.

PATRA, S. et al. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. **Ann Intern Med**, v. 147, n. 1, p. 28-33, Jul 2007.

PATTISON, J. M.; KRENSKY, A. M. New insights into mechanisms of allograft rejection. **Am J Med Sci**, v. 313, n. 5, p. 257-63, May 1997.

PAWLOTSKY, J. M. Molecular diagnosis of viral hepatitis. **Gastroenterology**, v. 122, n. 6, p. 1554-68, May 2002.

PERES, L. A. B. et al. Estudo epidemiológico da doença renal crônica terminal no oeste do Paraná. Uma experiência de 878 casos atendidos em 25 anos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 32, 2010.

- PÉREZ-GRACIA, M. T.; MATEOS LINDEMANN, M. L.; CARIDAD MONTALVO VILLALBA, M. Hepatitis E: current status. **Rev Med Virol**, v. 23, n. 6, p. 384-98, Nov 2013.
- PÉRON, J. M. et al. Treatment of autochthonous acute hepatitis E with short-term ribavirin: a multicenter retrospective study. **Liver Int**, v. 36, n. 3, p. 328-33, Mar 2016.
- PÉRON, J. M. et al. Acute autochthonous hepatitis E in western patients with underlying chronic liver disease: a role for ribavirin? **J Hepatol**, v. 54, n. 6, p. 1323-4; author reply 1324-5, Jun 2011.
- PINTER, J. et al. Perspectives of Older Kidney Transplant Recipients on Kidney Transplantation. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 12, n. 3, p. 443-453, Mar 2017.
- PISANO, M. B. et al. Hepatitis E virus infection in patients on dialysis and in solid organ transplant recipients in Argentina: exploring associated risk factors. **Arch Virol**, v. 162, n. 3, p. 787-792, Mar 2017.
- PISCHKE, S. et al. Course and treatment of chronic hepatitis E virus infection in lung transplant recipients. **Transpl Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 333-9, Apr 2014.
- PURCELL, R. H. Hepatitis viruses: changing patterns of human disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 7, p. 2401-6, Mar 1994.
- PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. **J Hepatol**, v. 48, n. 3, p. 494-503, Mar 2008.
- PURDY, M. A. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. **J Gen Virol**, v. 98, n. 11, p. 2645-2646, Nov 2017.
- PURPARI, G. et al. Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. **Int J Infect Dis**, v. 80, p. 66-72, Mar 2019.
- PUTTINI, C. et al. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in blood donors and renal transplant recipients: a retrospective study from central Italy. **Infez Med**, v. 23, n. 3, p. 253-6, Sep 2015.
- QU, C. et al. Nucleoside analogue 2'-C-methylcytidine inhibits hepatitis E virus replication but antagonizes ribavirin. **Arch Virol**, v. 162, n. 10, p. 2989-2996, Oct 2017.
- REUBEN, A. Landmarks in Hepatology. **Hepatology**, v. 36, p. 770-773, 2002.
- REYES, G. R. et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. **Science**, v. 247, n. 4948, p. 1335-9, Mar 1990.
- RIVERO-JUAREZ, A. et al. High hepatitis E virus seroprevalence with absence of chronic infection in HIV-infected patients. **J Infect**, v. 70, n. 6, p. 624-30, Jun 2015.
- RIZZETTO, M. et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. **Gut**, v. 18, n. 12, p. 997-1003, Dec 1977.

- RODRIGUEZ-MANZANO, J. et al. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. **J Water Health**, v. 8, n. 2, p. 346-54, Jun 2010.
- SAID, B. et al. Hepatitis E outbreak on cruise ship. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 11, p. 1738-44, Nov 2009.
- SALVIO, A. L. et al. Detection and quantification of hepatitis E virus in the absence of IgG and IgM anti-HEV in HIV-positive patients. **J Appl Microbiol**, v. 125, n. 4, p. 1208-1215, Oct 2018.
- SANTOS, D. L. D.; OLIVEIRA-FILHO, E. F. D.; PINTO, M. A. Hepatite E no Brasil e no mundo: Revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 9-26, 2013.
- SARIN, S.; KUMAR, M. Hepatitis E. In: SANYAL, A. J.;BOYER, T., *et al* (Ed.). **Zakim & Boyer's hepatology: a textbook of liver disease**. 5ª. eBook: Elsevier, 2006. p.693–724.
- SAÚDE, M. D. Hepatite: causas, sintomas, diagnóstico, prevenção e tratamento. **Saúde de A a Z**, <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hepatite>, 2018. Acesso em: June 1th.
- SAÚDE, M. D. Rim. **Doação de órgãos**, 2019. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doacao-de-orgaos/rim> >. Acesso em: July 29th.
- SAULEDA, S. et al. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). **Transfusion**, v. 55, n. 5, p. 972-9, May 2015.
- SCHEMMERER, M. et al. Isolation of Subtype 3c, 3e and 3f-Like Hepatitis E Virus Strains Stably Replicating to High Viral Loads in an Optimized Cell Culture System. **Viruses**, v. 11, n. 6, May 2019.
- SCHEMMERER, M. et al. Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults. **J Viral Hepat**, v. 24, n. 1, p. 75-79, Jan 2017.
- SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **J Appl Microbiol**, v. 113, n. 5, p. 1014-26, Nov 2012.
- SCLAIR, S. N.; SCHIFF, E. R. An update on the hepatitis E virus. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 15, n. 2, p. 304, Feb 2013.
- SCOTTO, G. et al. Hepatitis E in hemodialysis and kidney transplant patients in south-east Italy. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 11, p. 3266-73, Mar 21 2015.
- SFORZA, D. et al. Switch From Twice-daily Tacrolimus to Once-daily, Prolonged-release Tacrolimus in Kidney Transplantation: Long-term Outcome. **Transplant Proc**, v. 51, n. 1, p. 140-142, 2019 Jan - Feb 2019.
- SHAH, S. A. et al. Hepatitis E virus-associated aplastic anaemia: the first case of its kind. **J Clin Virol**, v. 54, n. 1, p. 96-7, May 2012.

SHIHAB, F. et al. Association of Clinical Events With Everolimus Exposure in Kidney Transplant Patients Receiving Low Doses of Tacrolimus. **Am J Transplant**, v. 17, n. 9, p. 2363-2371, Sep 2017.

SHRESTHA, A.; P GUPTA, B.; K LAMA, T. Current Treatment of Acute and Chronic Hepatitis E Virus Infection: Role of Antivirals. **Euroasian J Hepatogastroenterol**, v. 7, n. 1, p. 73-77, 2017 Jan-Jun 2017.

SIMPSON, D.; NOBLE, S. Tacrolimus ointment: a review of its use in atopic dermatitis and its clinical potential in other inflammatory skin conditions. **Drugs**, v. 65, p. 827-58, 2005.

SIVIERO, P. C. L.; MACHADO, C. J.; CHERCHIGLIA, M. L. Insuficiência renal crônica no Brasil segundo enfoque de causas múltiplas de morte. **Caderno de saúde coletiva**, v. 22, n. 1, 2014.

SRIDHAR, S. et al. Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 4, Apr 20 2017.

SRIVASTAVA, R. et al. Adaptive immune responses during acute uncomplicated and fulminant hepatitis E. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, n. 2, p. 306-11, Feb 2011.

STEFANIDIS, I. et al. Hepatitis E virus antibodies in hemodialysis patients: an epidemiological survey in central Greece. **Int J Artif Organs**, v. 27, n. 10, p. 842-7, Oct 2004.

STRAMER, S. L. et al. Hepatitis E virus: seroprevalence and frequency of viral RNA detection among US blood donors. **Transfusion**, v. 56, n. 2, p. 481-8, Feb 2016.

SUNEETHA, P. V. et al. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 695-708, Mar 2012.

TAHERKHANI, R.; FARSHADPOUR, F. Epidemiology of hepatitis E virus in Iran. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 22, p. 5143-53, Jun 14 2016.

TENGAN, F. M. et al. Seroprevalence of hepatitis E in adults in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Infect Dis Poverty**, v. 8, n. 1, p. 3, Jan 2019.

TEO, C. G. Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis E. **Epidemiol Infect**, v. 140, n. 5, p. 767-87, May 2012.

TESHALE, E. H. Travel-related infectious disease - Hepatitis E. In: CDC (Ed.). **CDC Yellow Book 2020**. 2019. Atlanta, USA: Oxford University Press, v.1, 2019. cap. 4, (CDC Yellow Book 2020).

TESHALE, E. H.; HU, D. J.; HOLMBERG, S. D. The two faces of hepatitis E virus. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 3, p. 328-34, Aug 2010.

TICEHURST, J. R. et al. Probable transmission of hepatitis E virus (HEV) via transfusion in the United States. **Transfusion**, v. 59, n. 3, p. 1024-1034, Mar 2019.

TORRESI, J.; JOHNSON, D. Hepatitis a and e infection in international travellers. **Curr Infect Dis Rep**, v. 13, n. 3, p. 248-55, Jun 2011.

TOURINHO, R. S. et al. Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR. **Journal of Genetics and Genome Research**, v. 2, n. 1, p. 1-3, 2015.

TRINTA, K. S. et al. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 25-9, Jan 2001.

TROXLER, S. et al. 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**, v. 49, n. 4, p. 1339-46, Apr 2011.

TSAREV, S. A. et al. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. **Vaccine**, v. 15, n. 17-18, p. 1834-8, Dec 1997.

UCAR, E. et al. [Hepatitis E virus seropositivity in hemodialysis patients in Hatay province, Turkey]. **Mikrobiyol Bul**, v. 43, n. 2, p. 299-302, Apr 2009.

UNZUETA, A. et al. Hepatitis E virus serum antibodies and RNA prevalence in patients evaluated for heart and kidney transplantation. **Ann Hepatol**, v. 15, n. 1, p. 33-40, Jan-Feb 2016.

VARMA, S. P. et al. Hepatitis E virus replication involves alternating negative- and positive-sense RNA synthesis. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 3, p. 572-81, Mar 2011.

VILANOVA, L. F. L. S. **Soroprevalência da hepatite E em suínos no Distrito Federal, Brasil**. 2016. 73p (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

VOLLMER, T.; KNABBE, C.; DREIER, J. Knowledge Is Safety: The Time Is Ripe for Hepatitis E Virus Blood Donor Screening. **Transfus Med Hemother**, v. 43, n. 6, p. 425-427, Nov 2016.

VON FELDEN, J. et al. The burden of hepatitis E among patients with haematological malignancies: A retrospective European cohort study. **J Hepatol**, May 2019.

WALDENSTROM, J. et al. Chronic hepatitis E infection with an emerging virus strain in a heart transplant recipient successfully treated with ribavirin: a case report. **J Med Case Rep**, v. 9, p. 180, Aug 26 2015.

WANG, H. et al. Genetically similar hepatitis E virus strains infect both humans and wild boars in the Barcelona area, Spain, and Sweden. **Transbound Emerg Dis**, v. 66, n. 2, p. 978-985, Mar 2019.

WANG, Y. et al. Chronic hepatitis E in solid-organ transplantation: the key implications of immunosuppressants. **Curr Opin Infect Dis**, v. 27, n. 4, p. 303-8, Aug 2014.

WANG, Y. et al. Calcineurin inhibitors stimulate and mycophenolic acid inhibits replication of hepatitis E virus. **Gastroenterology**, v. 146, n. 7, p. 1775-83, Jun 2014.

- WARD, P. et al. 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**, v. 106, n. 4, p. 1360-9, Apr 2009.
- WEBB, G. W.; DALTON, H. R. Hepatitis E: an underestimated emerging threat. **Ther Adv Infect Dis**, v. 6, p. 2049936119837162, Jan-Dec 2019.
- WEDEMEYER, H.; PISCHKE, S.; MANN, M. P. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. **Gastroenterology**, v. 142, n. 6, p. 1388-1397.e1, May 2012.
- WENZEL, J. J. 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**, v. 52, n. 1, p. 50-4, Sep 2011.
- WENZEL, J. J. et al. Decline in hepatitis E virus antibody prevalence in southeastern Germany, 1996-2011. **Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 1180-6, Oct 2014.
- YACHHA, S. K. et al. Autoimmune liver disease in children. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 16, n. 6, p. 674-7, Jun 2001.
- YARBOUGH, P. O. et al. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. **J Virol**, v. 65, n. 11, p. 5790-7, Nov 1991.
- YIN, X. et al. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. **J Virol**, v. 90, n. 8, p. 4232-4242, Apr 2016.
- YIN, X.; LI, X.; FENG, Z. Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. **Viruses**, v. 8, n. 8, 08 2016.
- ZAFRULLAH, M. et al. Disparities in detection of antibodies against hepatitis E virus in US blood donor samples using commercial assays. **Transfusion**, v. 58, n. 5, p. 1254-1263, May 2018.
- ZEKAVAT, O. R. et al. Serological investigation for hepatitis E virus infection in the patients with chronic maintenance hemodialysis from southwest of Iran. **Asian J Transfus Sci**, v. 7, n. 1, p. 21-5, Jan 2013.
- ZHANG, J. et al. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. **N Engl J Med**, v. 372, n. 10, p. 914-22, Mar 2015.
- ZHAO, C.; WANG, Y. Laboratory Diagnosis of HEV Infection. **Adv Exp Med Biol**, v. 948, p. 191-209, 2016.
- ZHOU, X. et al. Rapamycin and everolimus facilitate hepatitis E virus replication: revealing a basal defense mechanism of PI3K-PKB-mTOR pathway. **J Hepatol**, v. 61, n. 4, p. 746-54, Oct 2014.

7. ANEXOS

Artigos em desenvolvimento em colaborações:

Artigo 1: Levels of Plasma Cytokines in individuals with acute, chronic and occult hepatitis B

LEVELS OF PLASMA CYTOKINES IN INDIVIDUALS WITH ACUTE, CHRONIC AND OCCULT HEPATITIS B

Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro^a, Daniela Gois Beghini^c, Andreza Salvio Lemos^a, Vinícius da Motta de Mello^b, Nathalia Alves Araújo de Almeida^a, Lia Laura Lewis-Ximenez^b, and Vanessa Salete de Paula^{a*}

^aLaboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

^bLaboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

^cLaboratory of Innovations in Therapies, Teaching and Bioproducts, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author: Vanessa Salete de Paula. Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, 4365, Brasil Av., Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, zip code 21040-360, Brazil 55-021-2562-1823 (vdepaula@ioc.fiocruz.br)

E-mail addresses: camilla_almeida@ioc.fiocruz.br (C.R.A. Ribeiro), vinicmk@hotmail.com (V.M. Mello), andreaslemos@gmail.com (A.S. Lemos), natybio92@yahoo.com.br (N.A.A. Almeida), lialewis.fiocruz@gmail.com (L.L. Lewis Ximenez), vdepaula.fiocruz@gmail.com (V.S. De Paula).

Artigo 2: Simultaneous detection of human herpesviruses in HIV-infected patients by differential diagnosis

Simultaneous detection of human herpesviruses in HIV-infected patients by differential diagnosis

Amanda de O. Lopes,¹ Andreza S. Lemos,¹ Jéssica V. Raposo,¹ Lyana R. P. Lima,¹ Livia M. Villar,² Fernando S. Sion,³ Luiz Claudio P. Ribeiro,³ Adilson J. de Almeida^{2†}, Vanessa S. de Paula^{1*}

¹Laboratory of Technological Development in Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, zipcode 21040-360, Brazil

²Viral Hepatitis Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, zipcode 21040-360, Brazil

³Department of Hematology of Medical Clinic B, Gaffrée & Guinle University Hospital, Medicine and Surgery School of Federal University of the Rio de Janeiro State, Rio de Janeiro, zipcode 20270-004, Brazil

Correspondence: Vanessa S. de Paula. Laboratory of Technological Development in Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, 4365, Brasil Ave., Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, postal code 21040-360, Brazil 55-021-2562-1876 (vdepaula@ioc.fiocruz.br)