

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DEBORA REGINA LOPES DOS SANTOS

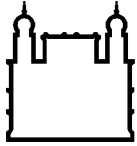
**Epidemiologia, diagnóstico e caracterização molecular do
vírus da hepatite E no Brasil.**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

RIO DE JANEIRO

2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DEBORA REGINA LOPES DOS SANTOS

**Epidemiologia, diagnóstico e caracterização molecular do
vírus da hepatite E no Brasil.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marize Pereira Miagostovich - Revisora e Presidente – IOC/Fiocruz - RJ
Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri – Universidade Estadual de Londrina - PR
Prof. Dr. Adilson José de Almeida – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro-RJ

SUPLENTE:

Prof. Dra. Flávia Barreto dos Santos – IOC/Fiocruz - RJ
Prof. Dr. Marcelo de Lima – Universidade Federal Fluminense – Niterói - RJ

Rio de Janeiro, 19 de abril de 2010

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

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Vitalino e Eunice, e ao meu irmão, Julio.**

AGRADECIMENTOS

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

Ao Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) e Ministério do Abastecimento, Pecuária e Abastecimento (Mapa) pelo suporte financeiro dos estudos desenvolvidos.

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

Aos Drs. Marize Pereira Miagostovich, Amauri Alcindo Alfieri, Adilson José de Almeida, Flávia Barreto dos Santos e Marcelo de Lima, por aceitarem participar da banca examinadora.

Ao Serviço de Inspeção Estadual (SIE), em especial, ao Dr. Plínio Leite, pela colaboração, assim como aos técnicos e médicos veterinários dos abatedouros estudados.

A Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar, por sempre me estimular a seguir com confiança e respeito pelo meu trabalho.

Aos co-autores e colaboradores, em especial, Dr. Renato Sérgio Marchevsky (Bio-Manguinhos / FIOCRUZ), Dra. Lia Laura Lewis-Ximenez (IOC / FIOCRUZ), e Dr. Francisco José Dutra Souto (UFMT) por contribuírem com a qualidade dos trabalhos realizados.

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

Às amigas e colegas, Msc. Luciane Almeida Amado e Dra. Vanessa Salete de Paula, pelos exemplos, conselhos, e solidariedade.

Às amigas, Anna Carolina de Oliveira Mendes e Tamara Fogel pelo carinho, atenção e por estarem sempre dispostas ajudar.

A todos os alunos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia por renovarem diariamente minha crença em minhas escolhas.

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

À amiga e colaboradora, Juliana Bragazzi Cunha, por compartilhar experiências de crescimento profissional e pessoal.

À amiga Carmen Baur Vieira, por ser um exemplo de solidez e pelos valiosos conselhos.

À amiga, Marcelle Figueira Marques da Silva, por me ajudar a superar desafios e pela sua generosidade em ensinar.

Às amigas, Danuza Pinheiro Garcia de Mattos, Luciana Ferreira Barcellos e Suzana Rodrigues de Souza, por serem tão companheiras.

Ao amigo Edmilson de Oliveira, que mesmo à distância contribui com idéias para futuros projetos.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
<i>Taxonomia</i>	2
<i>A Partícula Viral</i>	2
<i>Organização e Estrutura Genômica</i>	4
<i>Heterogeneidade Genética</i>	6
<i>Resistência e Inativação</i>	7
<i>Modelo de replicação</i>	7
<i>Modelos animais e Cultura in vitro</i>	8
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2- O VÍRUS DA HEPATITE E	2
1.3- CURSO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HEV	9
1.4- EPIDEMIOLOGIA	11
1.4.1 – MODOS DE TRANSMISSÃO	11
1.4.2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	13
1.4.3 – HEV EM ANIMAIS	14
1.5- DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	17
1.6- PREVENÇÃO E CONTROLE	18
1.7 – SUÍNO CULTURA NO BRASIL	19
2 - RELEVÂNCIA DO ESTUDO	20
3 – OBJETIVOS	22
3.1- OBJETIVO GERAL	22
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 – METODOLOGIAS E RESULTADOS	23
4.1 – SEROLOGICAL AND MOLECULAR EVIDENCE OF HEPATITIS E VIRUS IN SWINE IN BRAZIL	24
4.2 – PRESENCE OF HEPATITIS E VIRUS IN SWINE AND EFFLUENT SAMPLES FROM SLAUGHTERHOUSES IN BRAZIL.	32
4.3 - FIRST REPORT OF A HUMAN AUTOCHTHONOUS HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN BRAZIL	55
5- DISCUSSÃO	61
6 – CONCLUSÕES	68
7 – PERSPECTIVAS	70
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

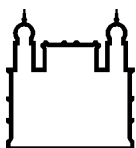
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å – unidade de medida “angstrom”
anti-HAV IgM – imunoglobulina tipo M contra o vírus da hepatite A
anti-HEV – imunoglobulina total contra o vírus da hepatite E
anti-HEV IgG – imunoglobulina tipo G contra o vírus da hepatite E
anti-HEV IgM – imunoglobulina tipo M contra o vírus da hepatite E
CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês “Center for Disease Control and Prevention”
cDNA – fita de DNA complementar, do inglês “complementary DNA”
EIA – ensaio imunoenzimático, do inglês “Enzyme immunoassay”
ET-NANB – entericamente transmitida não-A e não-B
EUA – Estados Unidos da América
HAV – vírus da hepatite A, do inglês “hepatitis A virus”
HBV – vírus da hepatite B, do inglês “hepatitis B virus”
Hel – helicase
HEV – vírus da hepatite E, do inglês “hepatitis E virus”
HEV-RNA – genoma do tipo RNA do vírus da hepatite E
IEM – imunoeletromicroscopia
IgM – imunoglobulina tipo M
MAPK – proteína quinase celular
Met – metiltransferase
NC – não codificante, do inglês “non-coding”
nsP – Proteína não estrutural, do inglês “non structural protein”
ORF – Fase de leitura aberta, do inglês “open reading frame”
pi – pós infecção
pORF3 – proteína expressa pela fase de leitura aberta 3
PR – protease
RdRp – RNA polimerase RNA dependente
RNA – ácido ribonucleico
Real time PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa
SIE – Serviço de Inspeção Estadual
SPF – livre de patógeno específico, do inglês “specific pathogen free”
Th2 – de células T helper tipo 2, do inglês “T helper 2”
VLPs – Partículas semelhantes a vírus, do inglês “Virus-like Particles”
°C – graus celsius

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Reclassificação do vírus da hepatite E de acordo com análise filogenética comparativa entre protótipos das famílias <i>Caliciviridae</i> , <i>Picornaviridae</i> e <i>Togaviridae</i>	2
Figura 2 - Partículas marcadas com anticorpos contra o vírus da hepatite E obtidas das fezes de um paciente com hepatite no México.....	3
Figura 3 Proteína recombinante HEV-VLPORF3/ORF2.....	4
Figura 4 - Organização genômica do vírus da hepatite E.....	5
Figura 5 - Modelo do curso da infecção pelo vírus da hepatite E.....	10



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

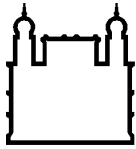
RESUMO

Epidemiologia, diagnóstico e caracterização molecular do vírus da hepatite E no Brasil

TESE DE DOUTORADO

DEBORA REGINA LOPES DOS SANTOS

Vírus da hepatite E (HEV) detectados em amostras de origem animal vêm sendo associados a casos humanos esporádicos de hepatite E aguda em regiões não endêmicas. No Brasil, a alta prevalência de anticorpos anti-HEV em suínos foi demonstrada em granjas comerciais sugerindo a grande disseminação deste vírus em rebanhos suínocolos. A fim de se comprovar a circulação do HEV no país três investigações foram conduzidas a partir de amostras obtidas de suínos, do ambiente, e de humanos. No primeiro estudo, foi realizado o acompanhamento sorológico de 26 animais desde o nascimento até a idade do abate em uma granja comercial e de 47 animais de uma fazenda modelo nos estados do Rio de Janeiro e Mato Grosso, respectivamente. Amostras de fezes foram coletadas de pocilgas de animais de diferentes faixas etárias. Ao fim deste estudo, a maioria dos animais era sororeativa para anti-HEV. Pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), o genoma parcial do HEV foi detectado e as amostras classificadas no genótipo 3, o mesmo que circula em outras populações suínas tanto de regiões endêmicas quanto não-endêmicas. Posteriormente, para se avaliar a incidência de animais com infecção corrente durante o abate, um estudo foi conduzido em três abatedouros fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Estadual do Rio de Janeiro (SIE). Pela técnica de PCR em tempo real, o HEV foi detectado em 9,6% das amostras obtidas de animais. Foram realizadas coletas de efluentes não tratados dos abatedouros estudados e o genoma do HEV foi detectado em três pontos de coleta de um abatedouro. A quantificação média observada foi de 10^1 a 10^5 cópias/mL para as amostras animais de bile e de 10^2 cópias/mL para as amostras ambientais. A detecção do genoma parcial pela técnica de nested RT-PCR foi realizada, para caracterização molecular das amostras. Estas foram classificadas no genótipo 3 subtipo 3b do HEV, agrupando-se com as amostras caracterizadas do estudo anterior sugerindo a circulação endêmica do HEV no Rio de Janeiro. Em um estudo retrospectivo realizado com pacientes agudos de hepatite não A-C atendidos no Grupo de Atendimento para Hepatites Virais do IOC/Fiocruz foi identificado o primeiro caso humano confirmado de hepatite E do Brasil. Esta amostra agrupou-se no genótipo 3 subtipo 3b, também relacionada às amostras obtidas de suínos da granja e dos abatedouros. De acordo as informações epidemiológicas do paciente, o consumo de carne de porco pode ter sido a fonte de infecção. Os estudos apresentados foram os primeiros que constataram a circulação do HEV em suínos, amostras ambientais e em humanos no Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Epidemiologia, Diagnóstico e Caracterização Molecular do vírus da hepatite E no Brasil

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

DEBORA REGINA LOPES DOS SANTOS

Hepatitis E virus (HEV) of animal origin have been associated to sporadic acute hepatitis E human cases of endemic and non endemic regions. In Rio de Janeiro state, a high anti-HEV prevalence has been demonstrated in swine from a commercial herd. To further demonstrate HEV circulation in swine, in environment and in humans, three investigations were then conducted. The initial study, 26 piglets were serologically followed up from birth to slaughter age in a commercial herd and of 47 animals from an experimental farm from Rio de Janeiro and Mato Grosso states, respectively. Pools of stool samples were collected from animals of different age groups. At the end of the study, it was observed that the majority of animals have seroconverted to anti-HEV and HEV partial genome was detected by nested RT-PCR for molecular characterization. Samples clustered within genotype 3, which is also observed circulating in swine from endemic as also in non endemic areas. Following this study, to evaluate the incidence of animals with current HEV infection during slaughter, a study was conducted in three slaughterhouses inspected by the State Inspection Service (SIE). HEV was detected in 9.6% of animal samples by Real time PCR. Raw wastewater was collected from selected sites of slaughterhouses and HEV was detected in three collect sites investigated. Mean quantity observed was from 10^1 a 10^5 copies/mL for bile samples obtained from animals and 10^2 copies/mL for environmental samples. Partial genome detection was performed with nested RT-PCR for molecular characterization of samples. All samples clustered within genotype 3 subtype 3b closely related to samples from the previous study suggesting an endemic circulation of HEV strains in Rio de Janeiro. In a retrospective study carried out with non A-C acute hepatitis patients, it was identified the first autochthonous hepatitis E human case in Brazil. This sample was classified as genotype 3 subtype 3b, also clustered among those obtained from the studies developed in the commercial herd and the slaughterhouses. According to the epidemiological data of the patient, consume of pig meat may have been the source of infection. The presented studies were confirmatory of HEV circulation in swine, humans, and environment in Brazil.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Evidências sobre a existência de um novo agente de hepatite entérica além do vírus da hepatite A (HAV) surgiram na década de 80. Em um estudo retrospectivo, amostras de soro estocadas de uma epidemia de hepatite infecciosa ocorrida na Índia em 1955 foram negativas quando testadas para anticorpos anti-HAV da classe IgM (anti-HAV IgM). Demonstrou-se, neste estudo, que a hepatite A era endêmica naquela região sendo a maioria dos indivíduos imune para o HAV (Khuroo, 1980; Wong et al., 1980; Bradley, 1990).

A confirmação da existência de um novo agente de hepatite com padrão de transmissão entérica ocorreu a partir de um estudo de Balayan e colaboradores (1983), quando partículas semelhantes a vírus (VLPs) foram detectadas por imunoeletromicroscopia (IEM) nas fezes de um voluntário humano experimentalmente infectado. Este voluntário desenvolveu uma forma clínica grave de hepatite 36 dias após a ingestão de uma suspensão fecal obtida de um paciente que havia desenvolvido hepatite entericamente transmitida não-A e não-B (ET-NANB). Após a ingestão da suspensão fecal, o voluntário que já havia sido previamente exposto ao HAV não apresentou resposta sorológica para este vírus nem para o vírus da hepatite B (HBV), mas desenvolveu anticorpos para VLPs recuperadas de suas fezes. Posteriormente, foi relatada a transmissão de hepatite a macacos do gênero *Cynomolgus* inoculados com uma amostra fecal proveniente de um surto ocorrido em Burma (Ásia), seguida da recuperação de VLPs das fezes destes animais (Balayan et al., 1983). Após a caracterização completa do genoma deste agente (Reyes et al., 1990), foi dada a denominação de vírus da hepatite E (HEV) (Reyes et al., 1991; Tam et al., 1991) e a partir da disponibilidade de testes de diagnóstico, estudos epidemiológicos demonstraram que a hepatite E era um doença endêmica em muitos países da Ásia e da África (Khuroo et al., 1983; Arankalle et al., 1993)

1.2- O VÍRUS DA HEPATITE E

Taxonomia

O HEV foi classificado como um membro da família *Caliciviridae* até o ano de 1998 devidos às semelhanças morfológicas compartilhadas com outros vírus desta família (Tam et al., 1991). Posteriormente, observou-se que o genoma do HEV não estava relacionado a qualquer outro vírus conhecido e que a organização do seu genoma assemelhava-se à observada no vírus da rubéola, atualmente classificado na família *Togaviridae* (Figura 1). Em 2004, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) aprovou a nova classificação dos HEV (*Hepatitis E-like viruses*) no gênero *Hepevirus* da família *Hepeviridae* (Emerson et al., 2004a).

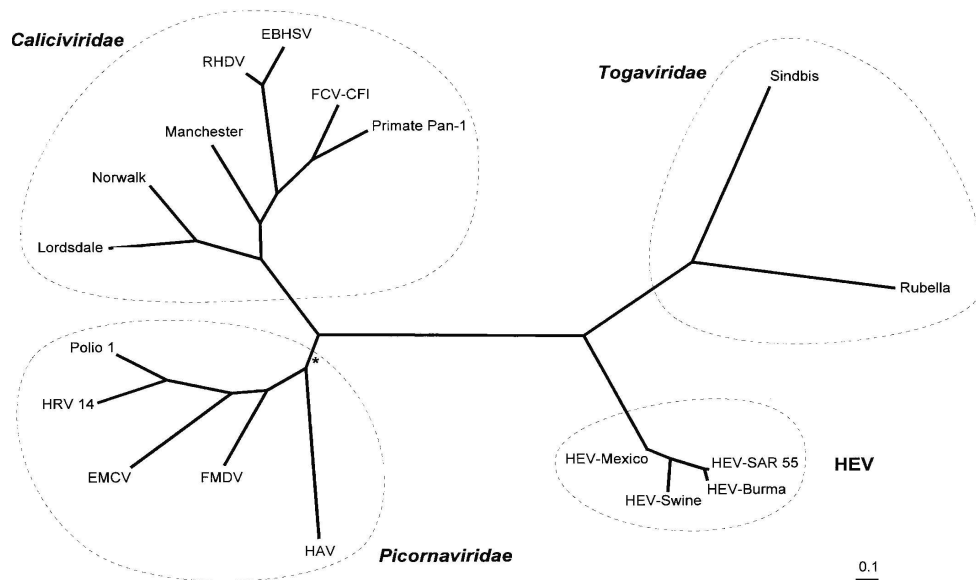


Figura 1: Reclassificação do vírus da hepatite E de acordo com análise filogenética comparativa entre protótipos das famílias *Caliciviridae*, *Picornaviridae* e *Togaviridae* (Berke e Matson, 2000)

A Partícula Viral

O HEV apresenta uma partícula não envelopada e esférica, com aproximadamente 32-34 nm de diâmetro e uma superfície indefinida com leves depressões como as observadas no vírus “Norwalk” (Balayan et al., 1983; Asher et al., 1990; Bradley, 1990) (Figura 2). Análises de micrografias eletrônicas de partículas de HEV sugerem que elas apresentam simetria icosaédrica (Aggarwal et al., 2000). Este vírus possui um coeficiente de sedimentação de

183S (Bradley et al., 1988; Bradley e Balayan, 1988), podendo ser purificado em gradientes de densidade de potássio-glicerol a 1.29 g/cm^3 (Favorov et al., 1989).

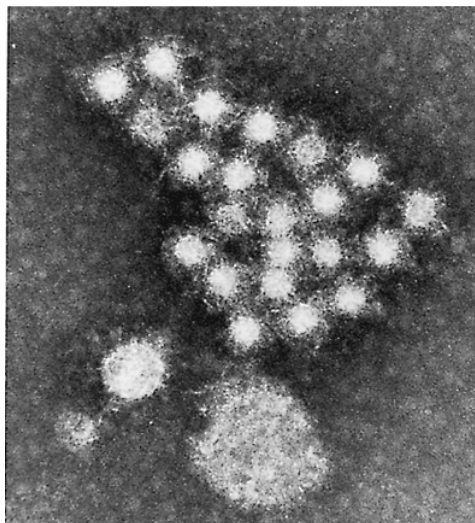


Figura 2: Partículas marcadas com anticorpos contra o vírus da hepatite E obtidas das fezes de um paciente com hepatite no México. Imunoeletromicroscopia ($\tilde{\text{A}}=223,000$) (Emerson e Purcell, 2006).

Um estudo recente descreveu a caracterização cristalográfica preliminar de VLPs purificadas que consistiam em 60 subunidades de uma proteína fusionada (HEV-VLP ORF3/ORF2) (Figura 3). A estrutura da VLP apresentava dois domínios distintos, denominados domínio da casca, que forma uma camada contínua do capsídeo viral e o domínio de protrusão que forma as espículas protrasas (Figura 3a). Os dados de difração obtidos de um cristal determinaram um mapa de densidade de uma VLP com 270 \AA de diâmetro em uma resolução de 8.3 \AA (Figura 3b) (Wang et al., 2008).

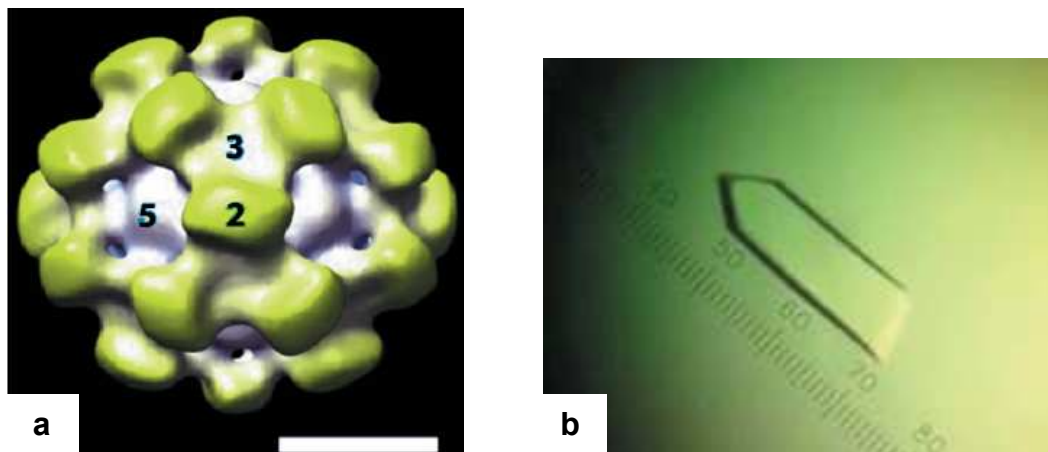


Figura 3 – Proteína recombinante HEV-VLP ORF3/ORF2. **a:** Estrutura tridimensional em uma resolução de 24Å determinada por crioeletromicroscopia e reconstrução de imagem. A partícula está codificada por cores para diferenciar dois domínios diferentes: o domínio de concha (branco) e o domínio de protrusão (verde). A superfície do capsídeo possui simetria icosaédrica T=1 na qual, 60 subunidades são organizadas em 30 espículas protrusas. A escala representa 100Å. **b:** Cristal recombinante da proteína. Na escala, 28 intervalos representam 0.1 mm (Wang et al., 2008).

Organização e Estrutura Genômica

O genoma do HEV consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva com a presença de cap (7-metilguanósina) e de uma cauda poli-A (Tam et al., 1991; Kabrane-Lazizi et al., 1999b), com aproximadamente 7200 nucleotídeos (nt) (Figura 4). O genoma viral possui duas regiões não-codificantes (NC) nas extremidades 5' e 3', que são altamente conservadas e possuem 35 e 68-75 nt, respectivamente (Haqshenas e Meng, 2001). Acredita-se que estas regiões estejam envolvidas na replicação do genoma viral e na encapsidação, como observado em outros vírus com genoma constituído de RNA. Existem três fases abertas de leitura (ORFs), organizadas na ordem 5'- ORF1-ORF3-ORF2 -3' e que variam minimamente entre os diferentes protótipos (Aggarwal e Krawczynski, 2000). As proteínas expressas pelas ORFs 2 e 3 são traduzidas a partir de um único mRNA bicistrônico e estas se sobrepõem uma à outra mas não sobrepõem-se à ORF1 (Graff et al., 2006).

A ORF1 codifica as proteínas envolvidas no processo replicativo do genoma viral como a metiltransferase, uma protease semelhante à papaína, a helicase e a RNA polimerase RNA dependente (Huang et al., 2007).

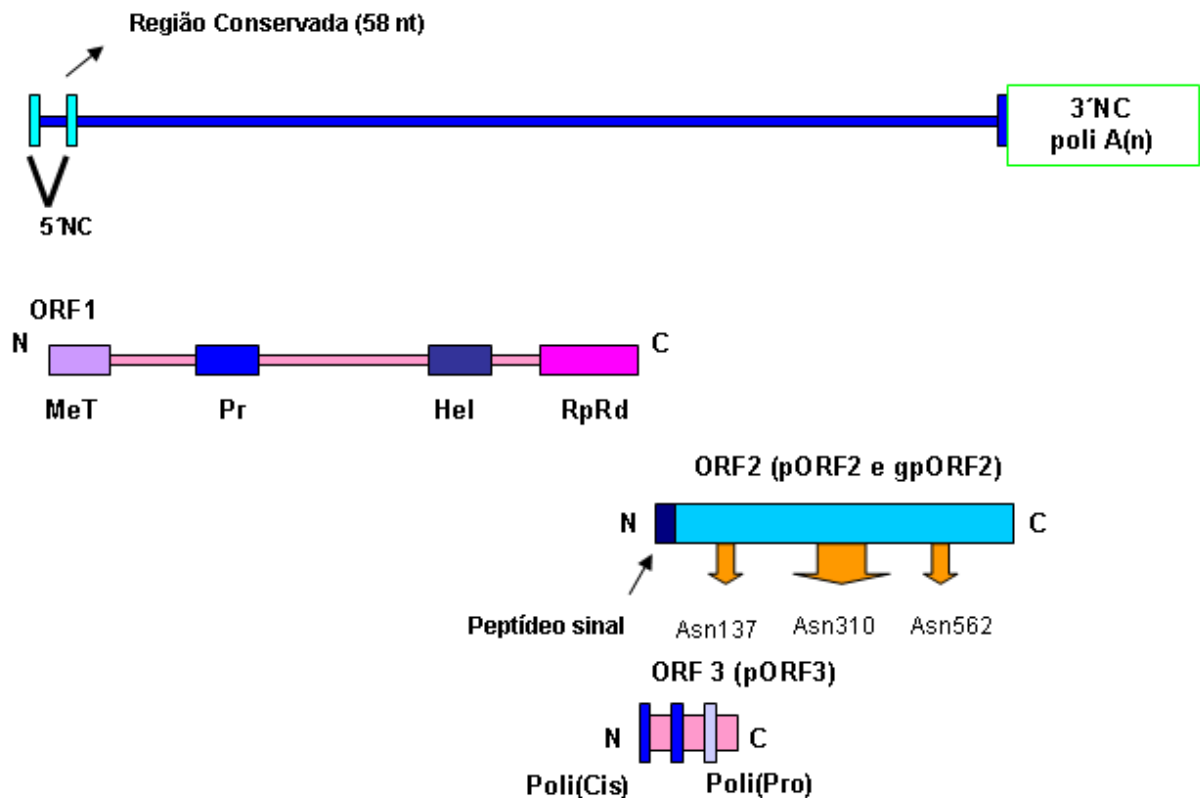


Figura 4: Organização genômica do vírus da hepatite E. Adaptado de Jameel (1999)

Legenda: MeT = metiltransferases; Pr = proteases cisteína papaína-like; Hel = helicase viral; RpRd = RNA polimerase RNA dependente viral; pORF2 = proteína expressa pela ORF2; gpORF2 = proteína glicosilada expressa pela ORF2; pORF3 = proteína expressa pela ORF3; Asn 137, 310, 562 = sítios de glicosilação; Poli (Cis) = região rica em cisteína; Poli (Pro) = região rica em prolina; N = região amino terminal; C = região carboxi terminal.

A ORF2 codifica uma proteína que compõe o capsídeo viral que contém uma sequência sinal típica próxima à região 5' terminal, seguida de uma região com cargas altamente básicas do genoma viral. Acredita-se que esta região esteja envolvida na encapsidação do transcrito genômico. A proteína expressa possui sítios de glicosilação demonstrados experimentalmente (Jameel, 1999). A ORF2 também codifica o principal epítipo imunogênico localizado na extremidade 3' do genoma viral que induz anticorpos neutralizantes e é alvo para o desenvolvimento de uma vacina, além de codificar outros epítipos secundários na região central da proteína (Meng, 2009b).

A ORF3 codifica uma fosfoproteína capaz de se associar ao citoesqueleto da célula, possivelmente servindo como sítio de ancoragem ao citoesqueleto (Zafrullah et al., 1997; Tyagi et al., 2004). A região amino terminal possui uma região rica em cisteína que se associa

ao HEV RNA, e entra em um complexo com a proteína do capsídeo. A região carboxi terminal da ORF3 é um domínio multifuncional, e pode estar envolvido na morfogênese do vírion e na patogenia viral. Anticorpos monoclonais gerados contra a proteína da ORF3 são capazes de capturar partículas livres do HEV em sobrenadantes de culturas celulares e em soro, mas não de partículas livres em fezes, sugerindo que a proteína da ORF3 está presente na superfície de virions recentemente liberados de células infectadas (Takahashi et al., 2008; Yamada et al., 2009).

Heterogeneidade Genética

Os genomas de diversas amostras de HEV detectadas na Ásia (Burma, Paquistão, Índia, China, Nepal, Taiwan), África (Egito, Algéria, Marrocos, Chad, Nigéria), Europa (Holanda, Itália, Grécia, Espanha, Áustria), América do Sul (Argentina), Oceania (Nova Zelândia) e América do Norte (Estados Unidos da América e México) foram total ou parcialmente sequenciados e estão disponíveis no Genbank. De uma maneira geral, os HEV agrupam-se em quatro genótipos principais. O primeiro (genótipo 1) é composto por vírus detectados em amostras de origem humana provenientes da Ásia e África. O segundo (genótipo 2) possui uma amostra proveniente de um surto ocorrido no México e outras provenientes do continente africano (Chad e Nigéria). O genótipo 3 agrupa amostras de origem humana e animal detectadas nos Estados Unidos da América (EUA) e em países da Europa e, por fim, o genótipo 4 que também agrega vírus de origem humana e animal provenientes da China e Taiwan (Huang et al., 1992; Chatterjee et al., 1997; Van Cuyck-Gandre et al., 1997; Tsarev et al., 1999; Zanetti et al., 1999; Buisson et al., 2000; He et al., 2000; Pina et al., 2000; Worm et al., 2000; Garkavenko et al., 2001; Arankalle et al., 2002; Banks et al., 2004; Buti et al., 2004; Cooper et al., 2005; de La Caridad Montalvo Villalba et al., 2005; Mateos et al., 2006; Munne et al., 2006b; Borgen et al., 2008; Villalba Mde et al., 2008; Rutjes et al., 2009; Takahashi et al., 2009).

Recentemente, a partir da identificação de novos HEV descritos em coelhos na China e em roedores na Alemanha, dois novos genótipos foram propostos (Johne et al., 2009; Zhao et al., 2009). Um estudo realizado em 2006, analisou a relação filogenética de 421 HEV disponíveis no Genbank e baseado nas diferenças nucleotídicas de cinco filogenias foram propostos 5, 2, 10 e 7 diferentes subtipos para os respectivos genótipos do HEV (1a – 1e, 2a e 2b, 3a – 3j, 4a – 4g). A maior variabilidade foi observada para os genótipos 3 e 4, cujos vírus de origem humana e animal foram caracterizados como relacionados indicando uma fonte infecciosa comum (Lu et al., 2006).

Resistência e Inativação

Procedimentos laboratoriais como centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο, ultracentrifugação, concentração e a prática de congelamento e descongelamento são capazes de desestruturar a partícula do HEV (Balayan, 1997). Entretanto, apesar de lábil em condições laboratoriais, o HEV pode ser estável em condições ambientais. Um vírus cuja transmissão é via fecal-oral deve resistir à passagem pelo ambiente ácido da mucosa gástrica do hospedeiro. A detecção de HEV-RNA em esgoto demonstra que o vírus é resistente a condições adversas (Pina et al., 1998a ; Pina et al., 2000; Vaidya et al., 2002).

Quanto à estabilidade térmica do HEV em alimentos, um estudo demonstrou que embora menos estável que o HAV, o HEV pode resistir à temperatura interna de carnes mal cozidas (Emerson et al., 2005).

Modelo de replicação

As moléculas de superfície da célula que se ligam ao HEV ou a sua proteína do capsídeo ainda não são conhecidas. Um estudo recente demonstrou que um peptídeo truncado abrangendo a região entre os aminoácidos 368 e 606 codificado pela ORF2 forma partículas de 23 nm que se ligam e penetram em células HepG2 (células de hepatocarcinoma humano), Huh-7 (células de hepatocarcinoma humano), PLC/PRF/5 (células humanas de hepatoma) e A549 (células de carcinoma de pulmão humano), prevenindo infecções subsequentes a estas células (He et al., 2008).

Um modelo de replicação e expressão gênica do HEV foi proposto baseado em similaridades de sequencia com outros vírus com genoma constituído de RNA de polaridade positiva caracterizados anteriormente (Reyes, 1993; Jameel, 1999). Após a entrada em uma célula permissiva o RNA genômico é desencapsidado e traduzido no citoplasma de células infectadas para produção de uma poliproteína não-estrutural codificada pela ORF1 (ORF1 nsP). Proteases celulares realizam a clivagem da ORF1 nsP, possivelmente com o auxílio da protease viral. A replicase viral produz replicativos intermediários negativos a partir das fitas positivas, que então servirão de molde para síntese de cópias adicionais de fitas positivas assim como de fitas subgenômicas positivas. O RNA subgenômico é então traduzido em proteínas estruturais. As proteínas do capsídeo empacotam o genoma viral para montagem da progênie de vírions liberados da célula por uma via ainda não conhecida. Em primatas não-humanos e suínos infectados experimentalmente, fitas de polaridade positiva e negativa foram observadas no fígado (Nanda et al., 1994). Uma vez que transcritos *in vitro* de clones de DNA

complementar (cDNA) completos demonstraram ser infecciosos para primatas não humanos e suínos, acredita-se que RNAs subgenômicos não sejam necessários para o início de uma infecção, devendo ser sintetizados como parte do processo replicativo (Emerson et al., 2004b).

Modelos animais e Cultura in vitro

Balayan e colaboradores (1990) demonstraram que os genótipos 1 e 2 possuem abrangência limitada de hospedeiros e são restritos a humanos, uma vez que tentativas de infecção experimental com estes genótipos em suínos não tiveram sucesso (Balayan et al., 1990). Entretanto, Meng e colaboradores (1998b) demonstraram que os genótipos 3 e 4 do HEV suíno são capazes de quebrar a barreira de espécie e infectar macacos *Rhesus* e Chimpanzés, assim como amostras humanas destes genótipos causam infecção em suínos.

Assim como os genótipos 3 e 4 de mamíferos, o HEV aviário, também é capaz de quebrar a barreira de espécie. Um estudo relatou a infecção de perus por HEV provenientes de galinhas domésticas (Sun et al., 2004). No entanto, este não foi capaz de infectar macacos *Rhesus* sugerindo que, diferentemente do HEV suíno, o HEV aviário possui uma abrangência limitada de espécies hospedeiras e provavelmente, não infecta humanos. Um estudo demonstrando a reprodução da infecção em gerbilos pelo genótipo 4 sugere esta espécie como candidata a modelo animal (Li et al., 2009b).

Alguns estudos sobre a propagação do HEV em cultura celular foram realizados em células 2BS (células humanas diplóides), A549 e FRhK (células de rim de fetos de macacos *Rhesus*) (Huang et al., 1992; Kazachkov Yu et al., 1992; Wei et al., 2000). Recentemente, uma amostra de HEV pertencente ao genótipo 3 proveniente de uma suspensão fecal replicou em células PLC/PRF/5. Estas células foram utilizadas para verificar a infectividade do HEV eliminado em fezes de pacientes (Takahashi et al., 2007; Tanaka et al., 2007). Recentemente, um estudo descreveu um sistema de cultura celular eficiente para uma amostra de um paciente infectado pelo genótipo 4, que desenvolveu hepatite fulminante. Este sistema utiliza as células PLC/PRF/5 e A549, ambas de linhagem contínua (Tanaka et al., 2009). A replicação do HEV tem sido observada em linhagens de células transfectadas com transcritos de clone infeccioso de cDNA. Macacos inoculados com meio de cultura ou lisados de células transfectadas desenvolveram a infecção. Algumas barreiras de espécie devem existir, uma vez que, os virions não foram eficientes em linhagens celulares não-primatas (Panda et al., 2000; Emerson et al., 2004b).

1.3- CURSO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HEV

O HEV é eliminado nas fezes alguns dias antes do aparecimento dos sintomas e do aumento dos títulos de aminotransferases séricas (Figura 5). O HEV replica-se no citoplasma dos hepatócitos e é liberado na bile e no sangue (Krawczynski et al., 2000). Baseado em um estudo realizado com um voluntário humano, a viremia foi detectada por reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) a partir do 22º dia após a infecção (pi) e até 7 dias após o início dos sintomas. A viremia prolongada (48 – 115 d.p.i) foi observada em um pequeno número de pacientes infectados e em crianças assintomáticas (Takahashi et al., 2007). VLPs foram observadas por IEM nas fezes no dia 34 p.i. A mais alta concentração das enzimas do fígado ocorreu 46 dias p.i.. Em um estudo realizado anteriormente, o HEV foi detectado nas fezes por IEM, 28 dias p.i e a concentração das enzimas teve seu pico no dia 42 p.i (Balayan et al., 1983). Os voluntários de ambos os estudos recuperaram-se completamente. Anticorpos específicos contra o HEV podem ser detectados a partir do início dos sintomas.

Anticorpos anti-HEV IgM atingem níveis séricos máximos de detecção durante as quatro primeiras semanas, decaindo normalmente três meses após o início dos sintomas (Favorov et al., 1992; Ticehurst et al., 1992). Títulos crescentes de anti-HEV IgG também podem ser utilizados para fins de diagnóstico. Este anticorpo atinge seu maior título de detecção entre 2 a 4 semanas após o início dos sintomas e decai após a resolução da infecção (Bryan et al., 1994). Em estudo com um voluntário, o anticorpo anti-HEV foi primeiramente observado 41 dias p.i. e permaneceu detectável após 2 anos (Chauhan et al., 1993). No entanto, existe um relato de soropositividade entre adultos 14 anos após a aquisição da infecção (Khuroo et al., 1993).

A hepatite E é uma doença auto-limitada e casos crônicos não foram relatados. O espectro clínico é variado, incluindo desde a forma assintomática à fulminante. Uma forma cujo curso clínico mais brando, é observada em uma parcela dos indivíduos que desenvolve somente sintomas inespecíficos típicos de outras infecções virais e não apresenta icterícia. A hepatite clássica, com desenvolvimento auto-limitado de 1-4, semanas é acompanhada de sinais e sintomas como icterícia, anorexia, hepatomegalia, dor abdominal, náusea, vômitos, febre, acolia fecal e colúria (Purcell e Emerson, 2008).

Casos de hepatite fulminante foram descritos em crianças, pacientes coinfectados e com outros comprometimentos hepáticos, renais crônicos e recém-transplantados (Haagsma et al., 2008; Pischke et al., 2010). Na Argentina, foram descritos três casos de crianças com hepatite fulminante infectados pelo genótipo 3 (Munne et al., 2006a).

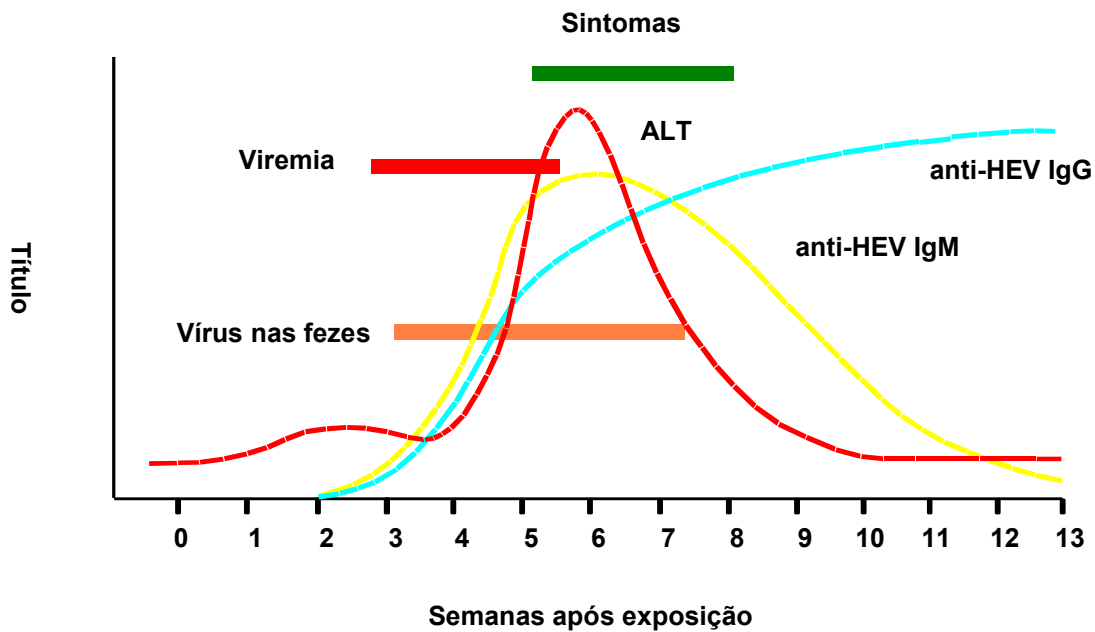


Figura 5: Modelo do curso da infecção pelo vírus da hepatite E (HEV) (Fonte: www.cdc.gov)

Legenda: ALT = alanina aminotransferase; IgM = imunoglobulina da classe M; IgG = imunoglobulina da classe G.

Em estudo realizado no Japão, Ohnishi e colaboradores (2006) investigaram as diferenças nos cursos clínicos em pacientes infectados pelos genótipos 3 e 4, demonstrando que pacientes infectados com o genótipo 4 tiveram manifestações clínicas mais graves do que aqueles infectados pelo genótipo 3. Neste estudo, 28 protótipos do HEV foram comparados e duas substituições nucleotídicas nas posições 3148 e 5905 foram associadas a maior patogenicidade do genótipo 4 (Ohnishi et al., 2006).

Na França, 14 pacientes que receberam transplantes e foram submetidos ao tratamento com drogas imunossupressoras apresentaram alteração das transaminases e evidências de infecção pelo HEV do genótipo 3. Dentre estes pacientes, oito apresentaram viremia persistente e elevação das aminotransferases (Kamar et al., 2008).

A taxa de mortalidade da hepatite E é semelhante à observada na hepatite A, variando de 0,5% a 3%. O aspecto mais relevante, no entanto, é que em mulheres no terceiro trimestre de gravidez a taxa de mortalidade pode atingir 20%, ao contrário dos outros quatro agentes virais que reconhecidamente causam hepatite (Khuroo, 1980). A causa desta alta taxa de mortalidade em mulheres grávidas ainda não é conhecida, no entanto, especula-se que esteja relacionada à resposta imunológica Th2 (Pal et al., 2005).

1.4– EPIDEMIOLOGIA

1.4.1 – MODOS DE TRANSMISSÃO

O principal modo de transmissão durante os surtos de hepatite E é a via entérica, em particular pela ingestão de água contaminada. Os indivíduos que eliminam vírus entericamente durante a fase aguda da doença, sintomáticos ou não, são provavelmente aqueles que mais contribuem para a manutenção do vírus no ambiente, com a quantidade de vírus excretada chegando a 10^8 cópias de genoma por miligrama de fezes. Indivíduos que eliminam HEV nas fezes por um período prolongado também podem contribuir para esta manutenção (Teo, 2007). A viabilidade do HEV no ambiente e em esgoto ainda é desconhecida.

A transmissão pessoa-a-pessoa e vertical não é comum, mas os riscos de infecção pelo HEV e a mortalidade de crianças nascidas de mães infectadas pelo HEV é alta (Banait et al., 2007; Patra et al., 2007). Alguns casos de transmissão vertical do HEV foram relatados em um estudo onde 5/8 crianças nascidas de mães com hepatite E foram HEV-RNA positivas ao nascer (Khuroo et al., 1995).

Tendo em vista o curto período da fase virêmica da infecção, admite-se que a probabilidade de transmissão parenteral seja baixa. A ocorrência de transmissão do HEV por transfusão de sangue em áreas endêmicas foi demonstrada em receptores infectados a partir de doadores com infecção subclínica e viremia (Khuroo et al., 2004). A transmissão parenteral foi apontada como possível fator de risco associado a um surto nosocomial no Paquistão (Siddiqui et al., 2005).

Cada vez mais, acumulam-se evidências que reforçam que a hepatite E seja uma doença zoonótica e transmitida a partir de reservatórios animais, principalmente de suínos. Uma série de 29 casos esporádicos de hepatite E aguda, descritos no Japão, identificou nove pacientes com história recente de consumo de porções de fígado de suíno grelhado (Yazaki et al., 2003). A pesquisa pelo HEV-RNA em fígados de suínos comercializados em mercearias próximas às residências dos respectivos pacientes revelou que 2% de 363 amostras eram positivas para presença do genoma do HEV. Sequências nucleotídicas provenientes destas amostras apresentaram grande similaridade com as sequências determinadas das amostras dos pacientes. Um estudo realizado posteriormente demonstrou que 80% dos pacientes diagnosticados com hepatite E possuíam histórico recente de consumo de porções de fígado cru ou mal cozido de suíno, e metade destes pacientes também haviam consumido porções de intestino de suíno (Mizuo et al., 2005).

Nos EUA, 11% de 127 amostras de fígado de suíno para consumo foram positivos para HEV-RNA. Suínos livres de patógenos específicos (SPF – “specific pathogen-free”) inoculados com homogenados destes fígados desenvolveram a infecção, o que sugere uma sobrevivência relativamente longa de partículas infecciosas sob aquelas condições de armazenamento (Feagins et al., 2007). Embora a infecção sintomática pelo HEV seja rara neste país, um estudo revelou prevalência de 21% de anticorpos anti-HEV em 18.000 mil amostras investigadas e a análise de fatores de risco identificou uma correlação do consumo mensal de fígado ou carne de suíno com a maior sororeatividade para anti-HEV (Kuniholm et al., 2009). Na Holanda, sequências nucleotídicas provenientes de HEV obtidos a partir de fígados de suínos de açougues apresentaram similaridade com as de casos esporádicos autóctones (Bouwknegt et al., 2007). Na Europa, dois casos autóctones de hepatite E foram descritos em um funcionário de matadouro (Espanha) e em um manipulador de carcaças (Inglaterra). A análise da sequência parcial do genoma do HEV da amostra do paciente espanhol demonstrou alto grau de similaridade com os HEV suínos da Espanha (Jary, 2005; Perez-Gracia et al., 2007). A possibilidade de transmissão pelo consumo de carne de porco incorporada em embutidos foi considerada por Mataragas e colaboradores (2008). Na Hungria, o primeiro caso humano autóctone de hepatite E foi descrito como provavelmente relacionado ao consumo de linguiça produzida artesanalmente em granja familiar (Reuter et al., 2006). No entanto, embutidos normalmente são compostos por outros miúdos, que podem ser originados de outras espécies de animais da criação. Na Alemanha, um estudo controle não identificou a exposição à carne crua de suíno e o consumo de linguiças como significativamente mais comum entre pacientes com hepatite E comparado a controles. No entanto, o consumo de miúdos de suínos foi identificado como um risco (Wichmann et al., 2008).

No Japão, casos esporádicos de hepatite E e casos provenientes de surtos foram descritos como associados à ingestão de carne de javali mal cozida. Outro estudo descreveu a infecção pelo HEV em duas famílias que compartilharam refeições que consistiam em carne crua de cervos (Tamada et al., 2004; Tei et al., 2004). Posteriormente, o sequenciamento completo do HEV proveniente de um paciente envolvido no surto descrito demonstrou ser quase idêntico ao HEV obtido de uma amostra de um cervo capturado em uma região próxima (Takahashi et al., 2004).

Um surto de icterícia em Cruzeiro foi descrito, durante o qual 33 passageiros estavam infectados pelo HEV. Neste estudo de caso-controle verificou-se que o consumo de bivalves era o fator de risco significativo (Said et al., 2009). Moluscos bivalves vêm sendo associados

à transmissão de vírus entéricos como os adenovírus, rotavírus, norovírus e vírus da hepatite A (Rigotto et al., 2005; Sincero et al., 2006).

Em países com boa disponibilidade de saneamento básico, o papel do ambiente como fator contribuinte para transmissão e manutenção da endemicidade do HEV ainda é pouco esclarecido, ao contrário das regiões endêmicas, onde esta forma de transmissão já é bem caracterizada e reconhecida (Ippagunta et al., 2007). Estudos desenvolvidos na Espanha e na Holanda demonstraram a correlação entre amostras de origem humana, suína e ambiental para a mesma região geográfica (Clemente-Casares et al., 2003, 2009; Albinana-Gimenez et al., 2006; Rutjes et al., 2009). Na Espanha, um estudo prospectivo demonstrou o impacto das melhorias sanitárias na circulação de HAV em regiões onde programas de vacinação foram estabelecidos desde o ano de 1999. No entanto, estas medidas não influenciaram a circulação do HEV, cuja proporção de detecção permaneceu constante nos últimos anos, o que pode sugerir a sua manutenção em reservatórios animais (Rodriguez-Manzano et al., 2010).

1.4.2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A infecção pelo HEV representa a principal causa de hepatite entericamente transmitida não-A não-B (ET-NANB). Epidemias de hepatite E já foram relatadas no Sudeste e Centro Asiático, Norte, Leste e Oeste da África e na América Central (Velazquez et al., 1990; Tsega et al., 1992; Skidmore et al., 1992; Ticehurst et al., 1992; Benjelloun et al., 1997; Coursaget et al., 1998; Aggarwal e Naik, 2000; Isaacson et al., 2000; Bryan et al., 2002). Em outras regiões consideradas não-endêmicas, como países da Europa, Oceania e Américas do Norte e Sul, a infecção pelo HEV é menos frequente e restrita a indivíduos com histórico de viagens para áreas endêmicas. No entanto, nestas regiões o número de casos agudos esporádicos não associados ao histórico de viagens aumentou e evidências apontam para infecções adquiridas por transmissão zoonótica (Meng, 2009a).

Nas Américas, surtos da infecção pelo HEV ocorreram no México, em 1986-1987 e, mais recentemente, na Argentina foram relatados dois casos de hepatite E (Velazquez et al., 1990; Schlauder et al., 2000). Estudos de soroprevalência demonstraram que o HEV é endêmico na Bolívia, Chile, Cuba e México (Ibarra et al., 1994; Alvarez-Munoz et al., 1999; Bartoloni et al., 1999).

Recentemente, foi relatada a primeira descrição de um surto do genótipo 1 do HEV nas Américas (Villalba Mde et al., 2008). Epidemiologicamente, este dado é muito relevante, uma vez que este genótipo está associado à ocorrência de surtos na Ásia e, mais recentemente, na África (Uganda). Em um estudo retrospectivo realizado pelo mesmo grupo de

investigadores de Cuba foi demonstrada a cocirculação e coinfeção por HEV e HAV em surtos e em casos esporádicos (Rodriguez Lay Lde et al., 2008).

No Brasil, alguns estudos de soroprevalência demonstraram a evidência de anticorpos anti-HEV em diversos grupos populacionais como em mineiros na Bacia Amazônica (6,1%) (Pang et al., 1995). Em São Paulo, pacientes submetidos à hemodiálise apresentaram prevalência de 4,9% de anti-HEV (Focaccia et al., 1995). Prevalências de 2% entre doadores de sangue e de 29% dos casos de hepatite viral aguda foram observada em Salvador, Bahia (Parana et al., 1999). No Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais / Fiocruz / RJ (CRNHV), entre janeiro de 1994 e dezembro de 1996, foram diagnosticados 147 casos de hepatite viral aguda não A-C, com prevalência de anti-HEV de 2,1% (Trinta et al., 2001). No Rio de Janeiro, foi observada prevalência de 2,4% para anti-HEV na comunidade de Manguinhos (Santos et al., 2002). Estudos realizados neste estado com usuários de drogas não-injetáveis e injetáveis foram observadas prevalências de 6,5% e 11,8%, respectivamente (Trinta et al., 2001). Um estudo relatou prevalências de 38%, 10% e 17% em pacientes com hepatite A, hepatite B e hepatite não A-C, respectivamente. O marcador anti-HEV IgM foi concomitantemente detectado em quatro pacientes com hepatite A e em um paciente com hepatite aguda não A-C sugerindo a hepatite E como etiologia provável de alguns casos de coinfeção ou de casos não esclarecidos (Lyra et al., 2005).

1.4.3 – HEV EM ANIMAIS

Diversas espécies de animais silvestres e domésticos apresentaram soroprevalências de anti-HEV variando de 9 – 80% em diferentes regiões do mundo. Dentre estas, incluem-se suínos, roedores, caprinos, bovinos, galinhas domésticas e macacos do Velho e Novo mundo (Favorov et al., 2000; Arankalle et al., 2001; Wang et al., 2002). A detecção de anticorpos contra o HEV, ou outro agente relacionado, observada em macacos *Rhesus*, naturalmente infectados, sugere associação entre epidemias originadas por suprimentos de água contaminadas e a proximidade geográfica com estes animais (Arankalle et al., 1994).

Um agente relacionado ao HEV de mamíferos (“avian HEV”) foi identificado em galinhas domésticas (Haqshenas et al., 2001). No entanto, estudos confirmaram que o HEV identificado em animais desta espécie é geneticamente relacionado, porém distinto dos HEV de mamíferos, uma vez que não foi capaz de causar infecção experimental em primatas (Huang et al., 2004).

Independente das prevalências observadas em populações humanas clinicamente saudáveis de regiões onde a hepatite E é endêmica ou não, as altas soroprevalências de anti-

HEV frequentemente observadas em suínos demonstraram que o HEV é enzoótico em animais desta espécie (Meng et al., 1999; Kasorndorkbua et al., 2005). Nos EUA, além dos suínos, foram observadas prevalências variando de 70% a 80% em roedores silvestres (Kabrane-Lazizi et al., 1999a; Favorov et al., 2000). Paralelamente, observou-se que manipuladores de suínos representam o grupo de maior risco para adquirir a infecção pelo HEV (Drobeniuc et al., 2001; Withers et al., 2002).

Dentre as espécies animais analisadas, os suínos vêm sendo os mais investigados como possíveis reservatórios do HEV (Clayson et al., 1995; Chandler et al., 1999; Arankalle et al., 2003; Garkavenko et al., 2001).

A primeira descrição de infecção experimental pelo HEV em suínos foi relatada por Balayan e colaboradores (1990), realizada com um suíno doméstico infectado por uma estirpe proveniente da Ásia Central. Posteriormente, foi descrita pela primeira vez a detecção de anti-HEV IgG e do HEV-RNA em amostras de soro e fezes suínos no Nepal (Clayson et al., 1995). No entanto, a identidade dos vírus presentes em amostras destes suínos não foi determinada.

A primeira amostra de HEV suíno (“swine HEV”) foi caracterizada por Meng e colaboradores (1997) a partir de um estudo prospectivo realizado em uma granja comercial nos EUA. Os suínos foram monitorados desde o nascimento até a idade de cinco meses para se estudar a evidência de infecção pelo HEV, incluindo o acompanhamento de soroconversão por meio de ensaios imunoenimáticos (EIA), viremia e eliminação do vírus nas fezes por RT-PCR, com a utilização de pares de oligonucleotídeos de HEV degenerados. Um vírus geneticamente relacionado ao HEV humano, designado HEV suíno (“swine HEV”), foi identificado em soros de fase aguda de suínos naturalmente infectados. O postulado de *Koch* foi preenchido quando a infecção pelo HEV suíno foi experimentalmente reproduzida em suínos livres de patógeno (SPF) e o vírus suíno foi recuperado a partir destes animais (Meng et al., 1998^a; Halbur et al., 2001).

Desde a descrição do primeiro HEV suíno nos Estados Unidos, outros HEV foram identificados em suínos de diferentes países como Quirguistão, Reino Unido, Indonésia, Coréia, Japão, Taiwan, Índia, Canadá, China, Holanda e Nova Zelândia (Hsieh et al., 1999; Garkavenko et al., 2001; Van der Poel et al., 2001; Huang et al., 2002; Arankalle et al., 2003; Choi et al., 2003; Nishizawa et al., 2003; Yazaki et al., 2003; Banks et al., 2004; Lu et al., 2004; Wibawa et al., 2004).

Os HEV suínos identificados e caracterizados até o momento são classificados nos genótipos 3 e 4 (suínos de Taiwan e Índia), ambos relacionados aos HEV detectados em casos agudos esporádicos em humanos (Meng, 2003).

Em suínos, a infecção pelo HEV é disseminada em granjas comerciais tanto de países em desenvolvimento quanto também industrializados, independente do padrão endêmico observado para as populações humanas correspondentes. A infecção em suínos ocorre entre as idades de 2 a 3 meses com viremia transiente que dura de 1 a 2 semanas, sendo as novas partículas virais eliminadas nas fezes por um período de 3 a 7 semanas. Assim como o HEV que circula em populações humanas, o HEV suíno também é transmitido pela via fecal oral (Kasorndorkbua et al., 2004; 2005). As fezes de animais infectados contêm alta concentração de partículas potencialmente infecciosas, sendo a fonte principal de transmissão do vírus. Acredita-se que os animais adquirem a infecção pelo contato direto com animais infectados ou pela ingestão de alimento ou água contaminada com fezes (Kasorndorkbua et al., 2004). No entanto, a reprodução experimental da infecção com HEV suíno em animais pela via oral não foi efetiva embora pela via parenteral a infecção se estabeleça facilmente (Feagins et al., 2008; Bouwknecht et al., 2009).

Suínos naturalmente infectados com HEV são assintomáticos. Em um estudo prospectivo com suínos infectados naturalmente em uma granja nos EUA, não foram observadas lesões patológicas graves em fígado ou outros tecidos e órgãos de animais necropsiados durante os estágios iniciais da infecção pelo HEV (Meng et al., 1997), embora alguns animais apresentassem evidências microscópicas de hepatite caracterizada por hepatite multifocal moderada e hepatite linfoplasmacítica periportal com necrose hepatocelular. Assim como os animais infectados naturalmente, os animais infectados experimentalmente com o genótipo 3 do HEV também não apresentaram sintomas (Meng et al., 1998a), mesmo sendo observada hipertrofia dos linfonodos hepáticos e mesentéricos. Lesões histológicas incluindo hepatite linfoplasmacística branda a moderada e necrose focal também foram observadas. Outros órgãos como o intestino, linfonodo, tonsilas, baço e pâncreas também podem ser sítios de replicação do HEV, como demonstrado em modelos animais infectados natural e experimentalmente (Williams et al., 2001; de Deus et al., 2008).

O genoma do HEV também foi detectado em javalis e em carne de cervos, representando um risco potencial de transmissão zoonótica (Yazaki et al., 2003; Sonoda et al., 2004; Tei et al., 2004). Um fato curioso é que os HEV obtidos de suínos da Índia, um país onde epidemias de hepatite E são frequentes em humanos, foram caracterizados como genótipo 4, sendo os HEV circulantes em epidemias pertencentes ao genótipo 1. Estes dados sugerem que os HEV do genótipo 1 parece não infectar facilmente suínos e vice-versa (Arankalle et al., 2002).

1.5– DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os testes de laboratório para o diagnóstico da infecção pelo HEV incluem testes sorológicos para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG, além de testes moleculares para detecção do genoma do vírus nas fezes e no soro (Mushahwar, 2008).

A aplicabilidade destes testes depende do caráter de endemicidade da doença. Em áreas reconhecidamente endêmicas a pesquisa de marcadores de infecção aguda em pacientes com quadro de hepatite faz parte da linha de frente no diagnóstico das hepatites, uma vez que nestes locais o HEV é responsável por grande parte dos casos de hepatite aguda esporádica, tanto em crianças quanto em adultos. Fora das áreas endêmicas, a possibilidade de infecção pelo HEV deve ser considerada se o indivíduo apresenta histórico de viagem recente para áreas endêmicas. Caso não exista tal fator de risco, a investigação deve ser feita somente após a exclusão de outras causas mais comuns associadas (CMV e EBV) com hepatite e colestase (Fogeda et al., 2009).

Os testes sorológicos disponíveis para pesquisa de anticorpos contra o HEV foram desenvolvidos a partir da expressão de proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos (Engle et al., 2002; Li et al., 2000; Mast et al., 1998). Domínios antigênicos foram identificados nas três ORFs. Os epítomos foram determinados por estudos de mapeamento utilizando-se peptídeos sintéticos ou pelo rastreamento imunológico de bibliotecas de cDNA recombinante com anticorpos específicos derivados de soros das fases aguda e convalescente. Foram identificados seis domínios antigênicos na ORF2 (Khudyakov et al., 1999). Os antígenos podem ser adsorvidos em placas (EIA) ou em membranas (Western Blot). A maioria dos testes para a detecção de anticorpos anti-HEV utiliza proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos que correspondem aos epítomos imunodominantes das proteínas estruturais do HEV traduzidas a partir das ORF2 e ORF3 dos dois principais protótipos do HEV provenientes de Burma e do México (Dawson et al., 1992; Coursaget et al., 1994; Anderson et al., 1999).

Os ensaios imunoenzimáticos (EIA) desenvolvidos para o diagnóstico da hepatite E foram, inicialmente, padronizados para diagnóstico de infecção aguda pelo HEV adquirida em regiões endêmicas (Dawson et al., 1992; Goldsmith et al., 1992; Coursaget et al., 1994; Anderson et al., 1999). No entanto, o emprego destes testes em estudos de soroprevalência fora das áreas endêmicas é questionável, uma vez que anticorpos anti-HEV têm sido detectados em todos os países, mesmo naqueles industrializados com ótimas condições sanitárias e também em locais onde não existe evidência de infecção aguda pelo HEV (Worm et al., 2002; Clemente-Casares et al., 2003). Estudos em doadores de sangue de regiões não-endêmicas para infecção pelo HEV mostraram prevalência de anti-HEV de 1-20%, a qual é

surpreendentemente alta se comparada com a baixa taxa de doença clinicamente evidente associada com o HEV nestas regiões (Mast et al., 1997; Clemente-Casares et al., 2003). Portanto, a confirmação da positividade em pessoas que vivem em áreas não-endêmicas deve ser feita com extrema precaução. Existem algumas hipóteses para interpretar esta sororeatividade para anti-HEV em áreas não-endêmicas como a infecção subclínica e/ou anictérica, a reatividade cruzada com outros agentes, um resultado falso positivo do teste ou uma combinação de todos estes fatores (Mast et al., 1998). Investiga-se também a relação desta sororeatividade com exposição ao HEV suíno que está intimamente relacionado com HEV que circula em populações humanas (Schlauder et al., 1998).

Para se verificar a concordância entre os resultados obtidos com os EIA disponíveis e utilizados em vários laboratórios, Mast e colaboradores (1998) compararam 12 testes utilizando um painel de amostras de soro codificadas. Os testes analisados empregavam proteínas de HEV, recombinantes ou peptídeos sintéticos, que diferiam no tamanho, região correspondente no genoma e a região geográfica do HEV correspondente. Este estudo demonstrou que a sensibilidade destes testes variou de 17-100%. A concordância nos resultados, com soros de doadores, variou de 41-94% (média de 68%) e entre amostras de soro reativas de 0 a 89% (média de 32%). Esta avaliação sugere que a baixa concordância e a sensibilidade de alguns ensaios se devem ao uso de antígenos derivados da região ORF3, por esta ser a região mais variável entre os genótipos do HEV. Nestes casos, os métodos moleculares representam ferramentas importantes para confirmação da infecção pelo HEV. Sequências genômicas podem ser detectadas pela RT-PCR em amostras de soro e fezes antes das alterações enzimáticas e da soroconversão (Chauhan et al., 1993). A pesquisa de genoma viral é relevante no esclarecimento de casos específicos, como os casos agudos esporádicos ocorridos em regiões não-endêmicas.

1.6- PREVENÇÃO E CONTROLE

Os trabalhos de desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o HEV são focados em uma região conservada da proteína do capsídeo viral expressa pela ORF2. Esta proteína é altamente imunogênica e produz anticorpos neutralizantes de longa duração. Duas vacinas candidatas estão em produção. A primeira composta por proteína recombinante truncada com esquema de três doses, demonstrou eficácia de 95% de proteção em um estudo de fase II em adultos jovens saudáveis no Nepal (Shrestha et al., 2007). A segunda, composta por proteína estrutural recombinante (p239), também com três doses, está em fase III com estudo iniciado

em adultos na China, e que os resultados preliminares demonstraram ser eficaz para prevenir infecções pelos genótipos 1 e 4 (Li et al., 2005).

1.7 – SUÍNOCULTURA NO BRASIL

O Brasil é o quarto maior exportador de carne suína depois da União Européia, dos EUA e do Canadá, sendo os principais destinos da carne suína brasileira a Rússia, Hong Kong, Ucrânia, Angola e Argentina. O rebanho suíno brasileiro, com 30 milhões de cabeças, produção de 3 milhões de toneladas de carne, gera 630 mil empregos diretos e indiretos, sendo uma importante atividade econômica do país. O mercado interno brasileiro absorve 80% da produção e um dos principais desafios em ampliar o mercado externo recai sobre as barreiras técnicas de ordem sanitária (Abipecs, 2010).

Em granjas comerciais para a criação de suínos a estrutura é padrão. Os animais são divididos de acordo com o ganho de peso e categorias. De um modo geral, existe a maternidade, as creches, recria e terminação. Os machos reprodutores e as fêmeas fertilizadas também são agrupados separadamente. Na maternidade, as fêmeas são confinadas em baias individuais separadas por grades com seus leitões onde permanecem, em média, por 20 dias após o parto. As primeiras 48 horas da amamentação são cruciais para a vida dos leitões, uma vez que, nestas primeiras horas a mucosa intestinal se encontra permeável a macromoléculas e estes adquirem as imunoglobulinas passivamente pelo colostro (Damm et al., 2002).

Uma dificuldade enfrentada pelos órgãos oficiais e associações de produtores de suínos inclui a estimativa de produtores que atuam na atividade e a forma de produção para se ter acesso ao planejamento dos programas oficiais de monitoria sanitária. O cadastro oficial de produtores de suínos permitiria o estabelecimento de normas técnicas de movimentação de animais e programas sanitários nos estabelecimentos. Além disso, é preciso que a legislação ambiental tenha abrangência nacional, de forma que possa contribuir para reduzir o impacto no meio ambiente. Para competir no mercado internacional a segurança alimentar é indispensável. Com este objetivo é necessário o estabelecimento da certificação de granjas para que se possa rastrear os suínos com relação a doenças de controle oficial, doenças de segurança alimentar e boas práticas de produção. A formação de um banco de dados sobre informações sanitárias dos Serviços de Defesa Sanitária (SDS) e do Serviço de Inspeção (SI) permitiria a integração entre os órgãos de Defesa Sanitária e os Serviços de Inspeção (Brum, 2009).

Os estudos epidemiológicos envolvendo as principais regiões produtoras de suínos, para muitas das doenças de ocorrência enzoótica, ainda são escassos. A lista de doenças de

notificação obrigatória foi baseada em quatro critérios básicos: disseminação internacional, disseminação significativa dentro da população nativa, potencial de ser zoonose ou doença emergente (Morés e Zanella, 2005). A descrição do HEV suíno (Meng et al., 1997) e o estabelecimento da relação genética com os HEV de casos esporádicos na mesma região geográfica sugere que a transmissão de suínos para humanos possa ocorrer. Esta hipótese é corroborada com a demonstração de que o HEV suíno dos EUA reproduz a infecção em primatas não-humanos (Meng et al., 1998b).

2 - RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A hepatite E vem emergindo como uma importante questão de saúde pública em regiões antes consideradas como não-endêmicas (Clemente-Casares et al., 2003; Teo, 2009b). Com a detecção de HEV a partir de amostras de origem animal, principalmente de suínos, e o aprimoramento de técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico, novos trabalhos têm demonstrado a existência de reservatórios animais e da transmissão zoonótica, alterando o perfil epidemiológico da infecção pelo HEV (Meng, 2009a). Na Europa e nos EUA, a identificação de vírus proveniente de casos agudos esporádicos com amostras relacionadas a amostras de origem suína das respectivas regiões geográficas e o estabelecimento de testes sorológicos e moleculares para hepatite E para fins de vigilância epidemiológica vem contribuindo de forma crescente para o conhecimento da epidemiologia da infecção pelo HEV (Kantala et al., 2009; Mansuy et al., 2009; Rutjes et al., 2009). A detecção do HEV em amostras ambientais demonstra que, além da transmissão zoonótica, outras fontes de infecção devem ser consideradas (Clemente-Casares et al., 2009; Rodriguez-Manzano et al., 2010).

No Brasil, casos agudos da infecção pelo HEV não foram, até o momento, identificados, sendo importante rastrear a possibilidade da circulação do vírus entre suínos e em casos agudos de hepatite não A-C. Como mencionado, a detecção de anticorpos específicos em áreas não-endêmicas sugere infecção pelo HEV a partir de animais reservatórios.

Neste trabalho, esta possibilidade foi inicialmente investigada por meio de um estudo de acompanhamento da infecção natural pelo HEV em suínos provenientes de uma granja comercial no estado do Rio de Janeiro e da fazenda modelo da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT). A seguir, a incidência de animais com infecção corrente pelo HEV no momento do abate foi avaliada em um estudo realizado em três estabelecimentos submetidos à inspeção estadual. Realizamos também um estudo retrospectivo para identificar casos

agudos de hepatite E em pacientes agudos não A-C da demanda do Ambulatório de Hepatites Virais do Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz.

3 – OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Caracterizar a circulação do HEV por métodos sorológicos e moleculares de detecção e quantificação viral a partir de amostras de origem animal, ambiental e humana obtidas nos estados do Rio de Janeiro e do Mato Grosso.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demonstrar a infecção pelo HEV em suínos por meio da pesquisa de anticorpos anti-HEV IgM e IgG em amostras de soro e colostro e pela detecção de HEV RNA em amostras de soro e fezes de animais provenientes de uma granja comercial no estado do Rio de Janeiro e de uma fazenda modelo na Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).
2. Padronizar a metodologia de PCR em tempo real (Real-Time PCR) para quantificação do HEV RNA em amostras obtidas de suínos e do ambiente.
3. Demonstrar a infecção pelo HEV em suínos por meio da detecção e quantificação de HEV RNA em amostras de bile provenientes de animais de abatedouros no estado do Rio de Janeiro.
4. Demonstrar a contaminação ambiental em abatedouros de suínos por meio da detecção e quantificação de HEV RNA em amostras de efluentes de abatedouros.
5. Demonstrar a infecção pelo HEV em pacientes com hepatite aguda não A-C pela pesquisa de anticorpos anti-HEV IgM e IgG e da detecção e quantificação de HEV RNA em amostras de soro.
6. Caracterizar os genótipos de HEV detectados por meio do sequenciamento nucleotídico parcial do genoma do HEV.

4 – METODOLOGIAS E RESULTADOS

Os resultados desta tese serão apresentados sob a forma de manuscritos a seguir:

4.1 – Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil.

4.2 – Presence of hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil.

4.3 - First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil.

4.1 – SEROLOGICAL AND MOLECULAR EVIDENCE OF HEPATITIS E VIRUS IN SWINE IN BRAZIL

The Veterinary Journal 182 (2009) 474–480



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj



Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil

Debora Regina Lopes dos Santos^{a,*}, Claudia Lamarca Vitral^{a,b}, Vanessa Salette de Paula^a, Renato Sergio Marchevsky^c, Juliana Freitas Lopes^a, Ana Maria Coimbra Gaspar^a, Telma Michella Saddi^d, Nilton Cecílio de Mesquita Júnior^d, Flavio de Rezende Guimarães^d, João Garcia Caramori Júnior^d, Lia Laura Lewis Ximenes^f, Francisco José Dutra Souto^e, Marcelo Alves Pinto^a

^a Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Avenida Brasil 4365, Pavilhão Helio e Peggy Pereira, 2º andar, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, UFF, Rua Professor Ernani Pires de Melo, 101, 24210-130 Niterói, RJ, Brazil

^c Laboratório de Neurovirologia, Bio-Manguinhos – Fiocruz, Avenida Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, UFMT, Avenida Fernando Correa da Costa, s/n, 78.060-600, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

^e Faculdade de Ciências Médicas, UFMT, Avenida Fernando Correa da Costa, s/n, 78.060-600, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

^f Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Avenida Brasil 4365, Pavilhão Helio e Peggy Pereira, térreo, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Objetivos: Demonstrar a infecção pelo HEV em suínos por meio da pesquisa de anticorpos anti-HEV IgG e IgM em amostras de soro e colostro e da detecção de HEV RNA em amostras de soro e fezes de animais provenientes de uma granja comercial no estado do Rio de Janeiro e de uma fazenda modelo na Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT). Caracterizar os genótipos de HEV detectados por sequenciamento nucleotídico parcial do genoma viral.

4.2 – PRESENCE OF HEPATITIS E VIRUS IN SWINE AND EFFLUENT SAMPLES FROM SLAUGHTERHOUSES IN BRAZIL.

Objetivos: Padronizar a metodologia de PCR em tempo real (Real-Time PCR) para quantificação do HEV RNA. Demonstrar a infecção de HEV em suínos pela detecção e quantificação de HEV RNA em amostras de bile provenientes de animais de abatedouros no Estado do Rio de Janeiro. Demonstrar a contaminação ambiental em abatedouros de suínos pela detecção e quantificação de HEV RNA em amostras de efluentes de abatedouros. Caracterizar os genótipos de HEV detectados pelo sequenciamento nucleotídico parcial do genoma.

4.3 - FIRST REPORT OF A HUMAN AUTOCHTHONOUS HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN BRAZIL

Journal of Clinical Virology 47 (2010) 276–279



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv



Case report

First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil

Debora Regina Lopes dos Santos^{a,*}, Lia Laura Lewis-Ximenez^b, Marcelle Figueira Marques da Silva^c, Paulo Sérgio Fonseca de Sousa^b, Ana Maria Coimbra Gaspar^a, Marcelo Alves Pinto^a

^aLaboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

^bLaboratório de Hepatites Virais, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

^cLaboratório de Virologia Comparada e Ambiental, IOC, Fiocruz, Brazil

Objetivos: Demonstrar a infecção pelo HEV em pacientes com hepatite aguda não A-C pela pesquisa de anticorpos anti-HEV IgG e IgM e pela detecção e quantificação de HEV RNA em amostras de soro. Caracterizar os genótipos de HEV detectados pelo sequenciamento nucleotídico parcial do genoma.

5- DISCUSSÃO

Um dos aspectos importantes relativos à hepatite E consiste na possibilidade desta doença ser uma zoonose e que algumas espécies de animais possam servir de reservatórios. Aparentemente, a infecção pelo HEV suíno é endêmica em diferentes países, independente do caráter de endemicidade da infecção no homem (Meng, 2009a). No Brasil, a prevalência de anticorpos contra o HEV foi pesquisada em suínos de diferentes grupos etários da região sudeste do país (Vital et al., 2005). A constatação de que a infecção pelo HEV era amplamente disseminada entre estes conduziu ao desenvolvimento de outros estudos para investigar aspectos da patogenia do HEV nestes animais e, também, a possível transmissão do HEV ao homem.

Dando continuidade a estes estudos, com o objetivo de detectar animais com infecção ativa pelo HEV, foram realizadas duas investigações de infecção natural nos estados do Rio de Janeiro (RJ) e do Mato Grosso (MT) (**manuscrito 4.1**). Nos animais pesquisados no RJ foi demonstrada a cinética da transferência passiva de anticorpos contra o HEV através da detecção destes anticorpos, inicialmente no colostro de todas as matrizes sororeativas para, em seguida, serem detectados nos leitões após serem amamentados. Estes resultados foram semelhantes aos observados por Meng e colaboradores (1997) em seu estudo prospectivo, que relataram taxa de 80% a 100% de soropositividade para anticorpos anti-HEV nos suínos de fazendas comerciais nos EUA. Resultados semelhantes foram obtidos em diferentes regiões geográficas com soroprevalências variando de 15% a 100% em suínos com mais de duas semanas de idade (Clayson et al., 1995; Meng et al., 1997; Chandler et al., 1999; Arankalle et al., 2001; Garkavenko et al., 2001). A alta prevalência de anti-HEV (88,5%) observada ao final do estudo, quando os suínos estavam com 20 semanas de idade, é compatível com aquela observada no estudo realizado anteriormente por Vital e colaboradores (2005), o que mais uma vez demonstra a disseminação do HEV nos suínos desta granja. A alta prevalência de anti-HEV IgG em suínos de fazendas comerciais já foi relatada tanto em países endêmicos quanto em países não-endêmicos para infecção pelo HEV em humanos.

A pesquisa do RNA do HEV nestes suínos foi realizada pela amplificação de duas regiões parciais do genoma viral, da ORF1 (região codificante da metiltransferase) e da ORF2 (região codificante do capsídeo viral), seguida de sequenciamento nucleotídico das amostras provenientes de soro coletadas antes da soroconversão. Também foram utilizadas amostras de fezes coletadas de pocilgas que agrupavam suínos de diferentes faixas etárias. O HEV foi detectado em um “pool” de fezes de uma pocilga agrupando animais de 13 semanas de idade. O sequenciamento e a análise filogenética, de ambas as regiões pesquisadas, classificou o

HEV no genótipo 3, onde também estão incluídos outros HEV de origem suína e humana de regiões não endêmicas (América do Norte, Europa, Oceania e Argentina) (Kwo et al., 1997; Schlauder et al., 1999; Zanetti et al., 1999; Pina et al., 2000; Garkavenko et al., 2001; Van der Poel et al., 2001; Banks et al., 2004; Okamoto et al., 2001; Pei e Yoo, 2002; Worm et al., 2000). Outra amostra detectada no soro de um animal também com 13 semanas de idade amplificada somente para o protocolo da região parcial da ORF1 e também foi classificada no genótipo 3. Estes resultados são consoantes com outros trabalhos realizados em granjas comerciais de regiões não-endêmicas para o HEV, como Nova Zelândia, Japão, Espanha e Holanda, nas quais as amostras isoladas de HEV também pertenciam ao genótipo 3 (Pina et al., 2000; Garkavenko et al., 2001; Okamoto et al., 2001; Van der Poel et al., 2001). O genótipo 3 foi primeiramente estabelecido a partir da identificação do primeiro HEV suíno (Meng et al., 1997), que apresentou divergência em relação a amostras humanas pertencentes aos genótipos 1 e 2, determinando um novo genótipo. Encontram-se nele classificados também amostras de pacientes nos EUA com hepatite aguda sem histórico de viagem para região endêmica (Kwo et al., 1997; Schlauder et al., 1998).

Posteriormente, em colaboração com um grupo da UFMT, 47 animais nascidos de seis matrizes soropositivas para anti-HEV foram acompanhados após a perda de anticorpos passivos. Paralelamente, amostras de “pool” de fezes de pocilgas agrupando animais de 12 a 16 semanas de idade também foram coletadas. Duas destas amostras foram positivas para presença do HEV e também classificadas no genótipo 3, agrupando-se próximas às amostras do estudo realizado no Rio de Janeiro. Estes resultados sugerem que embora o Brasil seja um país de dimensões continentais, uma circulação endêmica de HEV nas granjas brasileiras pode existir. Este foi o primeiro estudo brasileiro que demonstrou a infecção natural do HEV em suínos de duas regiões no Brasil.

Visando a otimização para a detecção de HEV pela técnica de PCR padronizamos a técnica de PCR em tempo real para a detecção e quantificação de HEV. De acordo com protocolo descrito por Jothikumar e colaboradores (2006), utilizamos uma amostra anteriormente caracterizada para construção de uma curva padrão pela técnica de clonagem com o kit TOPO TA cloning® (Invitrogen, Carlsberg, CA). A técnica de PCR em tempo real tem sido descrita como mais sensível do que a técnica de RT-PCR, uma vez que, é capaz de detectar quantidades mínimas do genoma viral (10^0 - 10^1 cópias/ uL) pela quantificação da emissão fluorescente, enquanto na RT-PCR, a obtenção dos resultados se dá pela visualização do produto após os ciclos (30 em média) de amplificação. Desta forma, esta técnica foi utilizada como ferramenta de rastreamento nos próximos subseqüentes.

Embora tenha sido observada alta prevalência de anti-HEV na população de suínos, pressupõe-se que uma parcela de animais alcance a idade comercial de abate susceptíveis ou infectados. Com o objetivo de avaliar esta possibilidade, realizamos um estudo (**manuscrito 4.2**) no qual, em colaboração com o Serviço de Inspeção do estado do Rio de Janeiro, foram coletadas 115 amostras de bile de suínos de três abatedouros localizados nas cidades de Petrópolis, Itaperuna e Itaocara (RJ). A bile demonstrou ser uma amostra mais sensível e mais acessível para detecção de HEV RNA quando comparada ao fígado, linfonodo e vesícula biliar de animais infectados naturalmente (de Deus et al., 2007; Leblanc et al., 2010). Um estudo de determinação da carga viral de HEV em diferentes amostras de órgãos e tecidos de suínos abatidos em uma fazenda comercial demonstrou cargas virais variando entre 10^3 - 10^7 cópias genômicas (cg/mL) nas amostras de bile (Leblanc et al., 2010). Paralelamente, amostras de efluentes de diferentes pontos dos abatedouros também foram investigadas em nosso estudo. As amostras foram submetidas à técnica de PCR em tempo real e PCR convencional para regiões parciais da ORF1 e ORF2. Dentre as amostras pesquisadas, 11 amostras de bile (9,6%) e 3 amostras obtidas de pontos de saída de efluentes coletados no abatedouro de Itaperuna demonstraram ser positivas para presença de HEV RNA. As amostras de bile apresentaram entre 10^1 - 10^5 cg/mL. As amostras dos pontos coletados de efluentes apresentaram 10^2 cópias genômicas por mL de efluente coletado. Após o sequenciamento e análise filogenética, estas amostras também demonstraram ser pertencentes ao genótipo 3 subtipo 3b, de acordo com a recente classificação proposta por Lu e colaboradores (2006), estando agrupadas com as amostras obtidas do primeiro estudo. Dentre as amostras pertencentes a este genótipo está um grupo de amostras suínas, de cervo e humanas autóctones do Japão (Lu et al., 2006).

Os resultados obtidos no estudo realizado nos abatedouros demonstraram que uma parcela de animais em idade de abate está com infecção ativa pelo HEV. A avaliação do real impacto para saúde pública incluiria um estudo mais amplo considerando outras regiões do país e também abatedouros submetidos à inspeção por outros órgãos governamentais (Municipal e Federal). Também são necessários estudos de avaliação da infecciosidade destas amostras. Embora o principal órgão de replicação do HEV seja o fígado, a replicação em outros órgãos já foi demonstrada pela detecção da fita negativa nestes locais em modelos suínos. Primariamente, o HEV RNA foi detectado no intestino, linfonodos e cólon (Williams et al., 2001). Este dado acentua a importância da vigilância para segurança alimentar de produtos de origem suína, incluindo os embutidos, que utilizam os intestinos como matéria-prima. No Brasil, o hábito de se consumir fígado de suíno é extremamente limitado. No entanto, a presença do HEV nas amostras de bile pode sugerir uma viremia concomitante e a

circulação do vírus nos vasos irrigantes do músculo mesmo após a sangria do animal no abatedouro. Considerando-se que uma alta dose infecciosa e a possível resistência do HEV às temperaturas internas de carne mal cozida, não podemos descartar que exista um risco de infecção pelo HEV como já descrito anteriormente (Tamada et al., 2004; Tei et al., 2004; Melenhorst et al., 2007; Teo, 2009a).

Em estudo experimental realizado com primatas não-humanos foi demonstrado que a gravidade da doença é proporcional à dose infecciosa (Tsarev et al., 1994). Um aspecto importante a se considerar é que o Regulamento Federal de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) baseia-se em critérios clínicos, incluindo a observação da presença de lesões nos órgãos na inspeção “post-mortem”. A legislação brasileira de inspeção e qualificação da sanidade da carne a ser comercializada não inclui, portanto, testes moleculares para detecção de vírus zoonóticos que não sejam patogênicos para o animal. A produção de carne segura depende do controle efetivo de micro-organismos patogênicos em todos os estágios da produção. Na Europa, um trabalho recente de revisão de medidas de intervenção em segurança alimentar sugere medidas de controle para produção primária com fins de reduzir o carreamento de patógenos antes que o animal seja encaminhado para o abate. No entanto, estas medidas são aplicadas basicamente para bactérias e micobactérias (Adam e Brulisauer, 2010). Diversos estudos já demonstraram que uma vez infectados pelo HEV, os suínos não apresentam sintomas e as evidências histopatológicas são microscópicas (Meng et al., 1998a; Williams et al., 2001; Kasorndorkbua et al., 2004; Lee et al., 2009). Desta forma, independente do órgão governamental de fiscalização, a identificação de animais com infecção ativa pelo HEV não seria possível sem o auxílio de ferramentas de diagnóstico.

A presença de animal infectado na idade de abate implica em uma série de riscos em potencial como contaminação dos efluentes, do manipulador de forma direta ou indireta, dos produtos processados e finalmente, do receptor final e consumidor. Dois relatos descrevem a infecção de um açougueiro e de um funcionário de abatedouro que, provavelmente, se infectaram pelo contato direto com as carcaças, produtos derivados ou contaminação ambiental (Jary, 2005; Perez-Gracia et al., 2007).

Neste estudo, o HEV RNA foi detectado em amostras de efluentes da sala de espera, de abate e da saída final do esgoto do matadouro. A detecção do genoma do HEV não implica que a partícula viral esteja completa e infecciosa. No entanto, em alguns estudos realizados com outros vírus como rotavírus e norovírus, argumenta-se que sendo a molécula de RNA muito sensível quando isenta do capsídeo, sua detecção no ambiente implicaria na provável integridade da molécula (Meleg et al., 2006; Carducci et al., 2008). A detecção do HEV no

efluente sugere que as medidas tomadas para desinfecção da sala de abate não foram suficientes para prevenir a disseminação do vírus naquele ambiente. A detecção de vírus no ambiente vem sendo uma ferramenta fundamental para o conhecimento da epidemiologia de diferentes infecções virais (Puig et al., 1994; Pina et al., 1998b; Vaidya et al., 2002; Albinana-Gimenez et al., 2006). As técnicas envolvidas vêm sendo aprimoradas, uma vez que, diferentes matrizes ambientais podem ser investigadas. A ultracentrifugação, técnica aplicada em nosso estudo, é a mais conveniente para concentração viral a partir de amostras ricas em sedimentos, comparada a outras técnicas que envolvem a utilização de membranas, ideal para amostras menos sedimentadas (Katayama et al., 2002; Haramoto et al., 2010).

Nos estabelecimentos estudados não estão disponíveis sistemas de tratamento dos efluentes que são lançados diretamente no ambiente e a exposição ao HEV deve ser considerada. A dimensão territorial e o limitado número de estabelecimentos legalmente inspecionados disponíveis nos diferentes estados do Brasil, e agregado ao aspecto cultural extremamente diverso em nosso país, podemos inferir que o HEV esteja mais disseminado.

Experimentalmente, sabe-se que os HEV suínos desenvolvem infecções assintomáticas em primatas (Meng et al., 1998b). No Brasil, apesar das evidências sorológicas da infecção pelo HEV em alguns grupos populacionais, não há relatos de casos agudos confirmados sorologicamente (anti-HEV IgM) e molecularmente pelo HEV (HEV-RNA). Considerada uma doença não endêmica em nosso país, testes sorológicos para diagnóstico de casos agudos de infecção pelo HEV não estão incluídos na rotina laboratorial. Por este motivo um estudo investigativo (**manuscrito 4.3**) em colaboração com o Laboratório de Referência em Hepatites Virais / IOC / Fiocruz foi realizado com amostras de pacientes com hepatite aguda não A-C. Neste estudo, após o rastreamento das amostras utilizando a ferramenta de PCR em tempo real, o primeiro caso autóctone agudo de hepatite E foi identificado dentre 64 amostras de soro de pacientes atendidos entre os anos de 2006 a 2009. Após sequenciamento e análise filogenética, o HEV detectado foi classificado no genótipo 3, subtipo 3b, assim como as amostras dos estudos anteriormente citados. O paciente não possuía histórico de viagem para regiões endêmicas e relatou ter consumido carne de porco durante as comemorações natalinas, algumas semanas antes do aparecimento dos sintomas. Uma vez que esta amostra agrupou-se com outras amostras obtidas de suínos do Brasil podemos sugerir que este paciente possa ter se contaminado pelo consumo de carne contaminada. O paciente residia em uma área urbana e não relatou contato com animais, o que reforça esta hipótese e demonstra que esta doença, não está necessariamente associada à uma atividade rotineira ou habitação em área rural.

Mediante as variações observadas para os testes imunoenzimáticos, as ferramentas moleculares são essenciais para a confirmação de casos suspeitos de hepatite E em regiões não endêmicas. O diagnóstico laboratorial da hepatite E aguda é, atualmente, obtido pela detecção de anticorpos específicos da classe IgM (anti-HEV IgM) e pela amplificação de uma região parcial do genoma do HEV em amostras de soro ou de fezes pela técnica de RT-PCR. No estudo realizado nos abatedouros, as amostras de bile que foram positivas usando-se a técnica PCR em tempo real, demonstraram amplificar para um ou outro protocolo de amplificação parcial do genoma do HEV (ORF1 ou ORF2), o que sugere que esta técnica seja ideal para rastreamentos de amostras de casos suspeitos. A região utilizada para detecção e amplificação no protocolo previamente descrito é a ORF3, sendo esta a região mais variável do genoma do HEV (Jothikumar et al., 2006). Entretanto, a técnica demonstrou ser sensível para detecção e quantificação na padronização com amostras protótipos dos quatro genótipos do HEV. A RT-PCR foi essencial para a caracterização molecular das amostras, assim como a interpretação das possíveis fontes de infecção, como observado no estudo do primeiro caso humano descrito. Na literatura, ainda não há um consenso sobre as regiões a serem utilizadas para caracterização molecular do HEV (Lu et al., 2006), sendo a ORF1, a região mais conservada e por isso, ideal para detecção (Mateos et al., 2006). As regiões utilizadas em nossos estudos foram anteriormente descritas e demonstrou-se que podem ser utilizadas para estes fins (Meng et al., 1997; Schlauder et al., 1999; Wang et al., 1999; Lu et al., 2006). No estudo do caso humano, esta amostra somente amplificou para o protocolo da ORF1, no entanto, de acordo com a classificação proposta por Lu e colaboradores (2006), a amostra japonesa com a qual se agrupou (E21-YKH00), foi classificada no genótipo 3, subtipo 3b, para este mesmo protocolo. Diante de nossas observações, para fins da futura aplicação de técnicas moleculares no esclarecimento de casos suspeitos de hepatite E em nosso país, o protocolo para amplificação parcial da ORF1 seria ideal para detecção do genoma do HEV, seguido da amplificação parcial da ORF2 para caracterização molecular das amostras para epidemiologia molecular. Uma vez que a técnica de PCR em tempo real envolve um alto custo para ser estabelecida em laboratórios de rede pública, esta pode se restringir à pesquisa, embora fosse a mais indicada para o rastreamento de amostras. Esta técnica é menos demorada e possui baixo risco de contaminação, além de fornecer dados adicionais que podem ser utilizados em estudos de avaliação de risco, como a determinação da carga do inóculo. Outra possibilidade seria a colaboração entre os Laboratórios Públicos Centrais (LACENs) e o Centro de Referência Nacional para Hepatites Virais, onde as técnicas de diagnóstico para hepatite E poderiam ser centralizadas.

Os resultados obtidos nesta tese representam as primeiras investigações que constataram a circulação do HEV em suínos, no ambiente e em humanos no Brasil. O potencial zoonótico do HEV justifica o aprofundamento dos estudos deste agente de forma mais abrangente, sinalizando para a necessidade de implantação de medidas sanitárias preventivas. A ausência de diagnóstico de rotina para hepatite E em nosso país demonstra a necessidade de pesquisas para se avaliar a ocorrência de outros casos agudos no país que não foram identificados. A colaboração com outras instituições de pesquisa e também de laboratórios da rede pública permitiria uma estimativa da real incidência de hepatite E no Brasil e considerações sobre o fluxograma de diagnóstico de casos agudos de hepatite não A-C. Estudos abrangentes realizados em outras regiões do país permitiriam a avaliação dos subtipos de HEV circulantes relacionando amostras de diferentes fontes e identificando possíveis fatores de risco associados e, finalmente, o papel do HEV como uma ameaça em potencial para a saúde pública.

6 – CONCLUSÕES

1. A avaliação da resposta imune em suínos recém-nascidos demonstrou que a infecção pelo HEV é adquirida logo após o desaparecimento de anticorpos transferidos naturalmente adquiridos de forma passiva, confirmando o caráter endêmico deste vírus nos locais estudados.
2. A investigação da infecção natural do HEV em suínos por meio de um estudo prospectivo identificou animais com infecção ativa confirmando a circulação do HEV nos rebanhos avaliados.
3. Os HEV identificados foram classificados no genótipo 3, sendo este genótipo o observado como circulante em populações suínas de outras regiões endêmicas e não-endêmicas.
4. A demonstração da circulação de amostras relacionadas em dois diferentes estados sugere que, embora o Brasil seja um país de dimensões continentais, pode existir circulação endêmica de HEV nas granjas brasileiras.
5. O protocolo do PCR em tempo real demonstrou ser mais sensível comparado aos protocolos utilizados para RT-PCR e amplificação de regiões parciais do genoma para as amostras de bile e de soro humanas pesquisadas.
6. A técnica de PCR em tempo real realizada para detecção viral fornece informações sobre a carga viral das amostras o que pode ser aplicado em futuros estudos de avaliação de risco.
7. A sensibilidade da técnica de PCR em tempo real permite que esta metodologia seja aplicada no rastreamento de amostras clínicas na vigilância epidemiológica de casos de hepatite aguda não A-C não esclarecidos.
8. A presença do HEV em amostras de animais dos abatedouros investigados demonstra que embora disseminado em granjas comerciais, uma parcela de animais no abate está com infecção ativa pelo HEV podendo representar um risco para saúde pública.
9. A presença de animais sem sintomatologia e infectados pelo HEV aponta para necessidade de novas considerações sobre os critérios de inspeção para segurança alimentar.
10. A detecção do HEV em amostras de efluentes não tratados indica a possibilidade de exposição direta ou indireta a este vírus, além de apontar para necessidade de se considerar o estabelecimento de sistemas de tratamento de efluentes de origem animal em estabelecimentos comerciais.

11. Os estudos realizados demonstraram pelas técnicas sorológicas e moleculares aplicadas que assim como em outras regiões não endêmicas, também no Brasil, os suínos podem servir de reservatórios para o HEV.
12. A avaliação da resposta imune e a detecção do HEV RNA confirmaram o primeiro caso autóctone humano de hepatite E no país.
13. A caracterização molecular classificou o HEV humano no genótipo 3 subtipo 3b, o mesmo descrito em outros casos agudos esporádicos associados à transmissão zoonótica de outras regiões não-endêmicas e também o das amostras de suínos e de efluente dos outros estudos fortalecendo esta hipótese.
14. A caracterização do primeiro caso humano de hepatite E no Brasil, revela a necessidade de reavaliação do fluxograma de diagnóstico estabelecido em Laboratórios de Referência para pacientes com hepatite aguda não A-C, com o estabelecimento de testes de diagnóstico para hepatite E na rede pública e laboratórios de referência.
15. Os dados obtidos neste estudo demonstram a circulação do HEV nas áreas investigadas.

7 – PERSPECTIVAS

Os dados obtidos nesta tese confirmaram pela primeira vez a circulação do HEV no Brasil. Pesquisas complementares serão desenvolvidas para se verificar a infecciosidade e a patogenicidade destes vírus pelo estabelecimento de um sistema de cultivo celular para o HEV e pela realização de um estudo de infecção experimental em primatas não-humanos.

Os estudos realizados nos estados do Rio de Janeiro e do Mato Grosso refletem uma parcela de dados inéditos sobre a epidemiologia do HEV no Brasil, sendo necessário o estabelecimento de colaborações interdisciplinares e interinstitucionais para a realização de novos estudos visando ampliar os dados epidemiológicos da hepatite E no Brasil.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abipecs, 2010. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. [on line]. Brasil. [capturado 21 jan 2010]. Disponível em: www.abipecs.org.br.

Adam, K., Brulisauer, F., 2010. The application of food safety interventions in primary production of beef and lamb: A review. *Int J Food Microbiol* [Epub ahead of print]

Aggarwal, R., Kini, D., Sofat, S., Naik, S.R., Krawczynski, K., 2000. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet* 356:1081-1082.

Aggarwal, R., Krawczynski, K., 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol* 15:9-20.

Aggarwal, R., Naik, S.R., 2000. Hepatitis E and intrafamilial transmission. *Indian J Gastroenterol* 19:6-8.

Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F., Girones, R., 2006. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ Sci Technol* 40:7416-7422.

Alvarez-Munoz, M.T., Torres, J., Damasio, L., Gomez, A., Tapia-Conyer, R., Munoz, O., 1999. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in Mexican subjects 1 to 29 years of age. *Arch Med Res* 30:251-254.

Anderson, D.A., Li, F., Riddell, M., Howard, T., Seow, H.F., Torresi, J., et al., 1999. ELISA for IgG-class antibody to hepatitis E virus based on a highly conserved, conformational epitope expressed in *Escherichia coli*. *J Virol Methods* 81:131-142.

Arankalle, V.A., Chobe, L.P., Jha, J., Chadha, M.S., Banerjee, K., Favorov, M.O., et al., 1993. Aetiology of acute sporadic non-A, non-B viral hepatitis in India. *J Med Virol* 40:121-125.

Arankalle, V.A., Chobe, L.P., Joshi, M.V., Chadha, M.S., Kundu, B., Walimbe, A.M., 2002. Human and swine hepatitis E viruses from Western India belong to different genotypes. *J Hepatol* 36:417-425.

Arankalle, V.A., Chobe, L.P., Walimbe, A.M., Yergolkar, P.N., Jacob, G.P., 2003. Swine HEV infection in south India and phylogenetic analysis (1985-1999). *J Med Virol* 69:391-396.

Arankalle, V.A., Goverdhan, M.K., Banerjee, K., 1994. Antibodies against hepatitis E virus in Old World monkeys. *J Viral Hepat* 1:125-129.

Arankalle, V.A., Joshi, M.V., Kulkarni, A.M., Gandhe, S.S., Chobe, L.P., Rautmare, S.S., et al., 2001. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat* 8:223-227.

- Asher, L.V., Innis, B.L., Shrestha, M.P., Ticehurst, J., Baze, W.B., 1990. Virus-like particles in the liver of a patient with fulminant hepatitis and antibody to hepatitis E virus. *J Med Virol* 31:229-233.
- Balayan, M.S., 1997. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 4:155-165.
- Balayan, M.S., Andjaparidze, A.G., Savinskaya, S.S., Ketiladze, E.S., Braginsky, D.M., Savinov, A.P., et al., 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20:23-31.
- Balayan, M.S., Usmanov, R.K., Zamyatina, N.A., Djumalieva, D.I., Karas, F.R., 1990. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol* 32:58-59.
- Banait, V.S., Sandur, V., Parikh, F., Muruges, M., Ranka, P., Ramesh, V.S., et al., 2007. Outcome of acute liver failure due to acute hepatitis E in pregnant women. *Indian J Gastroenterol* 26:6-10.
- Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J., Dalton, H., 2004. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 10:953-955.
- Bartoloni, A., Bartalesi, F., Roselli, M., Mantella, A., Arce, C.C., Paradisi, F., et al., 1999. Prevalence of antibodies against hepatitis A and E viruses among rural populations of the Chaco region, south-eastern Bolivia. *Trop Med Int Health* 4:596-601.
- Benjelloun, S., Bahbouhi, B., Bouchrit, N., Cherkaoui, L., Hda, N., Mahjour, J., et al., 1997. Seroepidemiological study of an acute hepatitis E outbreak in Morocco. *Res Virol* 148:279-287.
- Berke, T.E., Matson, D.O., 2000. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* 145:1421-1436.
- Borgen, K., Herremans, T., Duizer, E., Vennema, H., Rutjes, S., Bosman, A., et al., 2008. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004 - 2006. *BMC Infect Dis* 8:61.
- Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CB, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong M., et al. 2009. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* 5:7.
- Bouwknegt, M., Lodder-Verschoor, F., Van Der Poel, W.H., Rutjes, S.A., De Roda Husman, A.M., 2007. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot* 70:2889-2895.
- Bradley, D., Andjaparidze, A., Cook, E.H., Jr., Mccaustland, K., Balayan, M., Stetler, H., et al., 1988. Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J Gen Virol* 69 (Pt 3):731-738.
- Bradley, D.W., 1990. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 46:442-461.

- Bradley, D.W., Balayan, M.S., 1988. Virus of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1:819.
- Brum, P.A.R.D., 2009. CADEIA SUINÍCOLA PROBLEMAS E ... SUGESTÕES. EMBRAPA. [online]. Brasil. [capturado 21 jan. 2010]. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/setorial/documentos/embrapa_%20suinoseaves.PDF.
- Bryan, J.P., Iqbal, M., Tsarev, S., Malik, I.A., Duncan, J.F., Ahmed, A., et al., 2002. Epidemic of hepatitis E in a military unit in Abbotabad, Pakistan. *Am J Trop Med Hyg* 67:662-668.
- Bryan, J.P., Tsarev, S.A., Iqbal, M., Ticehurst, J., Emerson, S., Ahmed, A., et al., 1994. Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. *J Infect Dis* 170:517-521.
- Buisson, Y., Grandadam, M., Nicand, E., Cheval, P., Van Cuyck-Gandre, H., Innis, B., et al., 2000. Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria. *J Gen Virol* 81:903-909.
- Buti, M., Clemente-Casares, P., Jardi, R., Formiga-Cruz, M., Schaper, M., Valdes, A., et al., 2004. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol* 41:126-131.
- Carducci, A., Morici, P., Pizzi, F., Battistini, R., Rovini, E., Verani, M., 2008. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water Sci Technol* 58:893-897.
- Center for Disease Control and Prevention, 2010. EUA. [capturado 21 jan 2010]. Disponível em: www.cdc.gov
- Chandler, J.D., Riddell, M.A., Li, F., Love, R.J., Anderson, D.A., 1999. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol* 68:95-105.
- Chatterjee, R., Tsarev, S., Pillot, J., Coursaget, P., Emerson, S.U., Purcell, R.H., 1997. African strains of hepatitis E virus that are distinct from Asian strains. *J Med Virol* 53:139-144.
- Chauhan, A., Jameel, S., Dilawari, J.B., Chawla, Y.K., Kaur, U., Ganguly, N.K., 1993. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 341:149-150.
- Choi, I.S., Kwon, H.J., Shin, N.R., Yoo, H.S., 2003. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea. *J Clin Microbiol* 41:3602-3608.
- Clayson, E.T., Innis, B.L., Myint, K.S., Narupiti, S., Vaughn, D.W., Giri, S., et al., 1995. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 53:228-232.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., et al., 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 9:448-454.
- Clemente-Casares, P., Rodriguez-Manzano, J., Girones, R., 2009. Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain. *J Water Health* 7:664-673.

Cooper, K., Huang, F.F., Batista, L., Rayo, C.D., Bezanilla, J.C., Toth, T.E., et al., 2005. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol* 43:1684-1688.

Coursaget, P., Buisson, Y., N'gawara, M.N., Van Cuyck-Gandre, H., Roue, R., 1998. Role of hepatitis E virus in sporadic cases of acute and fulminant hepatitis in an endemic area (Chad). *Am J Trop Med Hyg* 58:330-334.

Coursaget, P., Depril, N., Buisson, Y., Molinie, C., Roue, R., 1994. Hepatitis type E in a French population: detection of anti-HEV by a synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Virol* 145:51-57.

Damm, B.I., Friggens, N.C., Nielsen, J., Ingvarsen, K.L., Pedersen, L.J., 2002. Factors affecting the transfer of porcine parvovirus antibodies from sow to piglets. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49:487-495.

Dawson, G.J., Mushahwar, I.K., Chau, K.H., Gitnick, G.L., 1992. Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveller to Pakistan. *Lancet* 340:426-427.

de Deus, N., Casas, M., Peralta, B., Nofrarias, M., Pina, S., Martin, M., et al., 2008. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* 132:19-28.

de Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martin, M., e Segales, J., 2007. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol* 119:105-114.

de La Caridad Montalvo Villalba, M., Avalos, A.T., de Los Angeles Rodriguez Lay, L., De Jesus Goyenechea Hernandez, A., Corredor, M.B., Moreno, A.G., et al., 2005. Acute hepatitis E virus infection in a Cuban patient. *Int J Infect Dis* 9:286-287.

Drobeniuc, J., Favorov, M.O., Shapiro, C.N., Bell, B.P., Mast, E.E., Dadu, A., et al., 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 184:1594-1597.

Emerson, S.U., Anderson, D., Arankalle, V.A., Meng, X.J., Purdy, M., Schlauder, G.C., Tsarev, S. A., 2004a. Hepevirus. In: Fauquet, C.M., Mayo M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy, VIIIth Report of ICTV*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 851-855.

Emerson, S.U., Arankalle, V.A., Purcell, R.H., 2005. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 192:930-933.

Emerson, S.U., Nguyen, H., Graff, J., Stephany, D.A., Brockington, A., Purcell, R.H., 2004b. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol* 78:4838-4846.

Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2006. Hepatitis E Virus. In: *Fields Virology*. In: Knipe, D. M. and Howley, P. M. (Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, p. 3047–3058.

- Engle, R.E., Yu, C., Emerson, S.U., Meng, X.J., Purcell, R.H., 2002. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 40:4576-4580.
- Favorov, M.O., Fields, H.A., Purdy, M.A., Yashina, T.L., Aleksandrov, A.G., Alter, M.J., et al., 1992. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol* 36:246-250.
- Favorov, M.O., Kosoy, M.Y., Tsarev, S.A., Childs, J.E., Margolis, H.S., 2000. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Infect Dis* 181:449-455.
- Favorov, M.O., Kuzin, S.N., Iashina, T.L., Zairov, G.K., Gurov, A.V., Shavakhabov, S., et al., 1989. [Characteristics of viral hepatitis non-A, non-B with a fecal-oral mechanism of transmission of the infection in southern Uzbekistan]. *Vopr Virusol* 34:436-442.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2007. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* 88:912-917.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2008. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol* 123:32-37.
- Focaccia, R., Sette Junior, H., Conceicao, O.J., 1995. Hepatitis E in Brazil. *Lancet* 346:1165.
- Fogeda, M., De Ory, F., Avellon, A., Echevarria, J.M., 2009. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol* 45:259-261.
- Garkavenko, O., Obriadina, A., Meng, J., Anderson, D.A., Benard, H.J., Schroeder, B.A., et al., 2001. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* 65:525-529.
- Goldsmith, R., Yarbough, P.O., Reyes, G.R., Fry, K.E., Gabor, K.A., Kamel, M., et al., 1992. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children. *Lancet* 339:328-331.
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., Emerson, S.U., 2006. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* 80:5919-5926.
- Haagsma, E.B., Van Den Berg, A.P., Porte, R.J., Benne, C.A., Vennema, H., Reimerink, J.H., et al., 2008. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 14:547-553.
- Halbur, P.G., Kasorndorkbua, C., Gilbert, C., Guenette, D., Potters, M.B., Purcell, R.H., et al., 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol* 39:918-923.
- Haqshenas, G., Meng, X.J., 2001. Determination of the nucleotide sequences at the extreme 5' and 3' ends of swine hepatitis E virus genome. *Arch Virol* 146:2461-2467.

- Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Woolcock, P.R., Read, D.H., Meng, X.J., 2001. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* 82:2449-2462.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ohgaki, S., 2010. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Res* 44:1747-1752.
- He, J., Binn, L.N., Tsarev, S.A., Hayes, C.G., Frean, J.A., Isaacson, M., et al., 2000. Molecular characterization of a hepatitis E virus isolate from Namibia. *J Biomed Sci* 7:334-338.
- He, S., Miao, J., Zheng, Z., Wu, T., Xie, M., Tang, M., et al., 2008. Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. *J Gen Virol* 89:245-249.
- Hsieh, S.Y., Meng, X.J., Wu, Y.H., Liu, S.T., Tam, A.W., Lin, D.Y., et al., 1999. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 37:3828-3834.
- Huang, C.C., Nguyen, D., Fernandez, J., Yun, K.Y., Fry, K.E., Bradley, D.W., et al., 1992. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 191:550-558.
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Schommer, S.K., Pierson, F.W., et al., 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.
- Huang, F.F., Sun, Z.F., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Shivaprasad, H.L., Pierson, F.W., et al., 2004. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol* 85:1609-1618.
- Huang, Y.W., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2007. Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo. *J Virol* 81:3018-3026.
- Ibarra, H.V., Riedemann, S.G., Siegel, F.G., Reinhardt, G.V., Toledo, C.A., Frosner, G., 1994. Hepatitis E virus in Chile. *Lancet* 344:1501.
- Ippagunta, S.K., Naik, S., Sharma, B., Aggarwal, R., 2007. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J Med Virol* 79:1827-1831.
- Isaacson, M., Frean, J., He, J., Seriwatana, J., Innis, B.L., 2000. An outbreak of hepatitis E in Northern Namibia, 1983. *Am J Trop Med Hyg* 62:619-625.
- Jameel, S., 1999. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev Mol Med* 1999:1-16.
- Jary, C., 2005. Hepatitis E and meat carcasses. *Br J Gen Pract* 55:557-558.

- Johne, R., Plenge-Bonig, A., Hess, M., Ulrich, R.G., Reetz, J., Schielke, A., 2009. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol*. [Epub ahead of print]
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., 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.
- Kabrane-Lazizi, Y., Fine, J.B., Elm, J., Glass, G.E., Higa, H., Diwan, A., et al., 1999a. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 61:331-335.
- Kabrane-Lazizi, Y., Meng, X.J., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1999b. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol* 73:8848-8850.
- Kamar, N., Mansuy, J.M., Cointault, O., Selves, J., Abravanel, F., Danjoux, M., et al., 2008. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am J Transplant* 8:1744-1748.
- Kantala, T., Maunula, L., Von Bonsdorff, C.H., Peltomaa, J., Lappalainen, M., 2009. Hepatitis E virus in patients with unexplained hepatitis in Finland. *J Clin Virol* 45:109-113.
- Kasorndorkbua, C., Guenette, D.K., Huang, F.F., Thomas, P.J., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol* 42:5047-5052.
- Kasorndorkbua, C., Opriessnig, T., Huang, F.F., Guenette, D.K., Thomas, P.J., Meng, X.J., et al., 2005. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl Environ Microbiol* 71:7831-7837.
- Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* 68:1033-1039.
- Kazachkov Yu, A., Balayan, M.S., Ivannikova, T.A., Panina, L.I., Orlova, T.M., Zamyatina, N.A., et al., 1992. Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol* 127:399-402.
- Khudyakov, Y.E., Lopareva, E.N., Jue, D.L., Crews, T.K., Thyagarajan, S.P., Fields, H.A., 1999. Antigenic domains of the open reading frame 2-encoded protein of hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 37:2863-2871.
- Khuroo, M.S., 1980. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 68:818-824.
- Khuroo, M.S., Duermeyer, W., Zargar, S.A., Ahanger, M.A., Shah, M.A., 1983. Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in India. *Am J Epidemiol* 118:360-364.
- Khuroo, M.S., Kamili, S., Dar, M.Y., Moecklii, R., Jameel, S., 1993. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet* 341:1355.

- Khuroo, M.S., Kamili, S., Jameel, S., 1995. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 345:1025-1026.
- Khuroo, M.S., Kamili, S., Yattoo, G.N., 2004. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* 19:778-784.
- Krawczynski, K., Aggarwal, R., Kamili, S., 2000. Hepatitis E. *Infect Dis Clin North Am* 14:669-687.
- Kulkarni, M.A., Arankalle, V.A., 2008. The detection and characterization of hepatitis E virus in pig livers from retail markets of India. *J Med Virol* 80:1387-1390.
- Kuniholm, M.H., Purcell, R.H., Mcquillan, G.M., Engle, R.E., Wasley, A., Nelson, K.E., 2009. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Infect Dis* 200:48-56.
- Kwo, P.Y., Schlauder, G.G., Carpenter, H.A., Murphy, P.J., Rosenblatt, J.E., Dawson, G.J., et al., 1997. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* 72:1133-1136.
- Leblanc, D., Poitras, E., Gagne, M.J., Ward, P., Houde, A., 2010. Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *Int J Food Microbiol*. [Epub ahead of print]
- Leblanc, D., Ward, P., Gagne, M.J., Poitras, E., Muller, P., Trottier, Y.L., et al., 2007. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int J Food Microbiol* 117:160-166.
- Lee, Y.H., Ha, Y., Ahn, K.K., Chae, C., 2009. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet J* 179:417-421.
- Li, F., Riddell, M.A., Seow, H.F., Takeda, N., Miyamura, T., Anderson, D.A., 2000. Recombinant subunit ORF2.1 antigen and induction of antibody against immunodominant epitopes in the hepatitis E virus capsid protein. *J Med Virol* 60:379-386.
- Li, S.W., Zhang, J., Li, Y.M., Ou, S.H., Huang, G.Y., He, Z.Q., et al., 2005. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine* 23:2893-2901.
- Li, W., She, R., Wei, H., Zhao, J., Wang, Y., Sun, Q., et al., 2009a. Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. *Vet Microbiol* 133:75-83.
- Li, W., Sun, Q., She, R., Wang, D., Duan, X., Yin, J., et al., 2009b. Experimental infection of Mongolian gerbils by a genotype 4 strain of swine hepatitis E virus. *J Med Virol* 81:1591-1596.
- Lu, L., Drobeniuc, J., Kobylnikov, N., Usmanov, R.K., Robertson, B.H., Favorov, M.O., et al., 2004. Complete sequence of a Kyrgyzstan swine hepatitis E virus (HEV) isolated from a piglet thought to be experimentally infected with human HEV. *J Med Virol* 74:556-562.

- Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H., 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 16:5-36.
- Lyra, A.C., Pinho, J.R., Silva, L.K., Sousa, L., Saraceni, C.P., Braga, E.L., et al., 2005. HEV, TTV and GBV-C/HGV markers in patients with acute viral hepatitis. *Braz J Med Biol Res* 38:767-775.
- Mansuy, J.M., Abravanel, F., Miedouge, M., Mengelle, C., Merviel, C., Dubois, M., et al., 2009. Acute hepatitis E in south-west France over a 5-year period. *J Clin Virol* 44:74-77.
- Mast, E.E., Alter, M.J., Holland, P.V., Purcell, R.H., 1998. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 27:857-861.
- Mast, E.E., Kuramoto, I.K., Favorov, M.O., Schoening, V.R., Burkholder, B.T., Shapiro, C.N., et al., 1997. Prevalence of and risk factors for antibody to hepatitis E virus seroreactivity among blood donors in Northern California. *J Infect Dis* 176:34-40.
- Mataragas, M., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H., 2008. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *Int J Food Microbiol* 126:1-12.
- Mateos, M.L., Molina, A., Ta, T.H., Moreira, V., Milicua, J.M., Barcena, R., 2006. Acute hepatitis E in Madrid: description of 18 cases. *Gastroenterol Hepatol* 29:397-400.
- Meleg, E., Jakab, F., Kocsis, B., Banyai, K., Melegh, B., Szucs, G., 2006. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *J Appl Microbiol* 101:1123-1129.
- Melenhorst, W.B., Gu, Y.L., Jaspers, W.J., Verhage, A.H., 2007. Locally acquired hepatitis E in the Netherlands: associated with the consumption of raw pig meat? *Scand J Infect Dis* 39:454-456.
- Meng, X.J., 2000. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol* 33:842-845.
- Meng, X.J., 2003. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 278:185-216.
- Meng, X.J., 2009a. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol*. [Epub ahead of print]
- Meng, X.J., 2009b. Recent advances in Hepatitis E Virus. *J Viral Hepat*. [Epub ahead of print]
- Meng, X.J., Dea, S., Engle, R.E., Friendship, R., Lyoo, Y.S., Sirinarumitr, T., et al., 1999. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* 59:297-302.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., Haynes, J.S., Tsareva, T.S., Bruna, J.D., Royer, R.L., et al., 1998a. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol* 143:1405-1415.

- Meng, X.J., Halbur, P.G., Shapiro, M.S., Govindarajan, S., Bruna, J.D., Mushahwar, I.K., et al., 1998b. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72:9714-9721.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., et al., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9860-9865.
- Mizuo, H., Yazaki, Y., Sugawara, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., et al., 2005. Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* 76:341-349.
- Morés, N., Zanella, J.C., 2005. PERFIL SANITÁRIO DA SUINOCULTURA NO BRASIL. EMBRAPA. [online]. Brasil. [capturado 21 jan 2010]. Disponível em: www.cnpisa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_x1b40v7z.pdf.
- Munne, M.S., Vladimirovsky, S., Otegui, L., Brajterman, L., Castro, R., Soto, S., et al., 2006a. Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina. *Acta Gastroenterol Latinoam* 36:125-130.
- Munne, M.S., Vladimirovsky, S., Otegui, L., Castro, R., Brajterman, L., Soto, S., et al., 2006b. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol* 78:1579-1583.
- Mushahwar, I.K., 2008. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 80:646-658.
- Nanda, S.K., Panda, S.K., Durgapal, H., Jameel, S., 1994. Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected rhesus monkeys: evidence for viral replication. *J Med Virol* 42:237-240.
- Nishizawa, T., Takahashi, M., Mizuo, H., Miyajima, H., Gotanda, Y., Okamoto, H., 2003. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome. *J Gen Virol* 84:1245-1251.
- Ohnishi, S., Kang, J.H., Maekubo, H., Arakawa, T., Karino, Y., Toyota, J., et al., 2006. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *Hepatol Res* 36:301-307.
- Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U., Yoshikawa, A., 2001. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289:929-936.
- Pal, R., Aggarwal, R., Naik, S.R., Das, V., Das, S., Naik, S., 2005. Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* 20:1094-1101.
- Panda, S.K., Ansari, I.H., Durgapal, H., Agrawal, S., Jameel, S., 2000. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J Virol* 74:2430-2437.
- Pang, L., Alencar, F.E., Cerutti, C., Jr., Milhous, W.K., Andrade, A.L., Oliveira, R., et al., 1995. Short report: hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 52:347-348.

- Parana, R., Vitvitski, L., Andrade, Z., Trepo, C., Cotrim, H., Bertillon, P., et al., 1999. Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in Northeastern Brazil: etiology and natural history. *Hepatology* 30:289-293.
- Patra, S., Kumar, A., Trivedi, S.S., Puri, M., Sarin, S.K., 2007. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med* 147:28-33.
- Pei, Y., Yoo, D., 2002. Genetic characterization and sequence heterogeneity of a canadian isolate of Swine hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 40:4021-4029.
- Perez-Gracia, M.T., Mateos, M.L., Galiana, C., Fernandez-Barredo, S., Garcia, A., Gomez, M.T., et al., 2007. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am J Trop Med Hyg* 77:893-896.
- Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J., Girones, R., 2000. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 33:826-833.
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Girones, R., 1998a. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol* 64:4485-4488.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., 1998b. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol* 64:3376-3382.
- Pischke, S., Suneetha, P.V., Baechlein, C., Barg-Hock, H., Heim, A., Kamar, N., et al., 2010. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 16:74-82.
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G., Girones, R., 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 60:2963-2970.
- Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2008. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 48:494-503.
- Reuter, G., Fodor, D., Katai, A., Szucs, G., 2006. Identification of a novel variant of human hepatitis E virus in Hungary. *J Clin Virol* 36:100-102.
- Reyes, G.R., 1993. Hepatitis E virus (HEV): molecular biology and emerging epidemiology. *Prog Liver Dis* 11:203-213.
- Reyes, G.R., Huang, C.C., Yarbough, P.O., Tam, A.W., 1991. Hepatitis E virus. Comparison of 'New and Old World' isolates. *J Hepatol* 13 Suppl 4:S155-161.
- Reyes, G.R., Purdy, M.A., Kim, J.P., Luk, K.C., Young, L.M., Fry, K.E., et al., 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247:1335-1339.
- Rigotto, C., Sincero, T.C., Simoes, C.M., Barardi, C.R., 2005. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water Res* 39:297-304.

- Rodriguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., Buti, M., et al., 2010. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in Eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health* 8:346-354.
- Rodriguez Lay Lde, L., Quintana, A., Villalba, M.C., Lemos, G., Corredor, M.B., Moreno, A.G., et al., 2008. Dual infection with hepatitis A and E viruses in outbreaks and in sporadic clinical cases: Cuba 1998-2003. *J Med Virol* 80:798-802.
- Rutjes, S.A., Lodder, W.J., Lodder-Verschuur, F., Van Den Berg, H.H., Vennema, H., Duizer, E., et al., 2009. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 15:381-387.
- Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H.L., Walsh, A., et al., 2009. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis* 15:1738-1744.
- Santos, D.C., Souto, F.J., Santos, D.R., Vitral, C.L., Gaspar, A.M., 2002. Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living in a community located in the North Area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:637-640.
- Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Erker, J.C., Kwo, P.Y., Knigge, M.F., Smalley, D.L., et al., 1998. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 79 (Pt 3):447-456.
- Schlauder, G.G., Desai, S.M., Zanetti, A.R., Tassopoulos, N.C., Mushahwar, I.K., 1999. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* 57:243-251.
- Schlauder, G.G., Frider, B., Sookoian, S., Castano, G.C., Mushahwar, I.K., 2000. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J Infect Dis* 182:294-297.
- Shrestha, M.P., Scott, R.M., Joshi, D.M., Mammen, M.P., Jr., Thapa, G.B., Thapa, N., et al., 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 356:895-903.
- Siddiqui, A.R., Jooma, R.A., Smego, R.A., Jr., 2005. Nosocomial outbreak of hepatitis E infection in Pakistan with possible parenteral transmission. *Clin Infect Dis* 40:908-909.
- Sincero, T.C., Levin, D.B., Simoes, C.M., Barardi, C.R., 2006. Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). *Water Res* 40:895-902.
- Skidmore, S.J., Yarbough, P.O., Gabor, K.A., Reyes, G.R., 1992. Hepatitis E virus: the cause of a waterborne hepatitis outbreak. *J Med Virol* 37:58-60.
- Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T., Sato, Y., Bando, M., Fukui, E., et al., 2004. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol* 42:5371-5374.
- Sun, Z.F., Larsen, C.T., Huang, F.F., Billam, P., Pierson, F.W., Toth, T.E., et al., 2004. Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J Clin Microbiol* 42:2658-2662.

- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, N., Mishiro, S., 2004. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330:501-505.
- Takahashi, K., Okamoto, H., Abe, N., Kawakami, M., Matsuda, H., Mochida, S., et al., 2009. Virulent strain of hepatitis E virus genotype 3, Japan. *Emerg Infect Dis* 15:704-709.
- Takahashi, M., Tanaka, T., Azuma, M., Kusano, E., Aikawa, T., Shibayama, T., et al., 2007. Prolonged fecal shedding of hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute hepatitis E: evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system. *J Clin Microbiol* 45:3671-3679.
- Takahashi, M., Yamada, K., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Tanaka, T., et al., 2008. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol* 153:1703-1713.
- Tam, A.W., Smith, M.M., Guerra, M.E., Huang, C.C., Bradley, D.W., Fry, K.E., et al., 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185:120-131.
- Tamada, Y., Yano, K., Yatsunami, H., Inoue, O., Mawatari, F., Ishibashi, H., 2004. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 40:869-870.
- Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., Okamoto, H., 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 88:903-911.
- Tanaka, T., Takahashi, M., Takahashi, H., Ichiyama, K., Hoshino, Y., Nagashima, S., et al., 2009. Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol* 47:1906-1910.
- Tei, S., Kitajima, N., Ohara, S., Inoue, Y., Miki, M., Yamatani, T., et al., 2004. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol* 74:67-70.
- Teo, C.G., 2007. The two clinico-epidemiological forms of hepatitis E. *J Viral Hepat* 14:295-297.
- Teo, C.G., 2009a. Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin Microbiol Infect* 16:24-32.
- Teo, C.G., 2009b. Subduing the hepatitis E Python. *Epidemiol Infect* 137:480-484.
- Ticehurst, J., Popkin, T.J., Bryan, J.P., Innis, B.L., Duncan, J.F., Ahmed, A., et al., 1992. Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis in Pakistan: serologic responses and pattern of virus excretion. *J Med Virol* 36:84-92.
- Trinta, K.S., Liberto, M.I., De Paula, V.S., Yoshida, C.F., Gaspar, A.M., 2001. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:25-29.

- Tsarev, S.A., Binn, L.N., Gomatos, P.J., Arthur, R.R., Monier, M.K., Van Cuyck-Gandre, H., et al., 1999. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J Med Virol* 57:68-74.
- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Yarbough, P.O., Legters, L.J., Moskal, T., et al., 1994. Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys. *J Med Virol* 43:135-142.
- Tsega, E., Hansson, B.G., Krawczynski, K., Nordenfelt, E., 1992. Acute sporadic viral hepatitis in Ethiopia: causes, risk factors, and effects on pregnancy. *Clin Infect Dis* 14:961-965.
- Tyagi, S., Surjit, M., Roy, A.K., Jameel, S., Lal, S.K., 2004. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-microglobulin/bikunin precursor (AMBP) and expedites their export from the hepatocyte. *J Biol Chem* 279:29308-29319.
- Vaidya, S.R., Chitambar, S.D., Arankalle, V.A., 2002. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J Hepatol* 37:131-136.
- Van Cuyck-Gandre, H., Zhang, H.Y., Tsarev, S.A., Clements, N.J., Cohen, S.J., Caudill, J.D., et al., 1997. Characterization of hepatitis E virus (HEV) from Algeria and Chad by partial genome sequence. *J Med Virol* 53:340-347.
- Van der Poel, W.H., Verschoor, F., Van Der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A., Kooreman, M., et al., 2001. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 7:970-976.
- Velazquez, O., Stetler, H.C., Avila, C., Ornelas, G., Alvarez, C., Hadler, S.C., et al., 1990. Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. *Jama* 263:3281-3285.
- Villalba Mde, L., Lay Lde, L., Chandra, V., Corredor, M.B., Frometa, S.S., Moreno, A.G., et al., 2008. Hepatitis E virus genotype 1, Cuba. *Emerg Infect Dis* 14:1320-1322.
- Vitral, C.L., Pinto, M.A., Lewis-Ximenez, L.L., Khudyakov, Y.E., Dos Santos, D.R., e Gaspar, A.M., 2005. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:117-122.
- Wang, C.Y., Miyazaki, N., Yamashita, T., Higashiura, A., Nakagawa, A., Li, T.C., et al., 2008. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64:318-322.
- Wang, Y., Ling, R., Erker, J.C., Zhang, H., Li, H., Desai, S., et al., 1999. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 80 (Pt 1):169-177.
- Wang, Y.C., Zhang, H.Y., Xia, N.S., Peng, G., Lan, H.Y., Zhuang, H., et al., 2002. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol* 67:516-521.

- Wei, S., Walsh, P., Huang, R., To, S.S., 2000. 93G, a novel sporadic strain of hepatitis E virus in South China isolated by cell culture. *J Med Virol* 61:311-318.
- Wibawa, I.D., Muljono, D.H., Mulyanto, Suryadarma, I.G., Tsuda, F., Takahashi, M., et al., 2004. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: Identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus. *J Med Virol* 73:38-44.
- Wichmann, O., Schimanski, S., Koch, J., Kohler, M., Rothe, C., Plentz, A., et al., 2008. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis* 198:1732-1741.
- Williams, T.P., Kasorndorkbua, C., Halbur, P.G., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Toth, T.E., et al., 2001. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 39:3040-3046.
- Withers, M.R., Correa, M.T., Morrow, M., Stebbins, M.E., Seriwatana, J., Webster, W.D., et al., 2002. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg* 66:384-388.
- Wong, D.C., Purcell, R.H., Sreenivasan, M.A., Prasad, S.R., Pavri, K.M., 1980. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 2:876-879.
- Worm, H.C., Schlauder, G.G., Brandstatter, G., 2002. Hepatitis E and its emergence in non-endemic areas. *Wien Klin Wochenschr* 114:663-670.
- Worm, H.C., Schlauder, G.G., Wurzer, H., Mushahwar, I.K., 2000. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. *J Gen Virol* 81:2885-2890.
- Yamada, K., Takahashi, M., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Nagashima, S., et al., 2009. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 90:1880-1891.
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., et al., 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 84:2351-2357.
- Zafrullah, M., Ozdener, M.H., Panda, S.K., Jameel, S., 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol* 71:9045-9053.
- Zanetti, A.R., Schlauder, G.G., Romano, L., Tanzi, E., Fabris, P., Dawson, G.J., et al., 1999. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 57:356-360.
- Zhao, C., Ma, Z., Harrison, T.J., Feng, R., Zhang, C., Qiao, Z., et al., 2009. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol* 81:1371-1379.