Ariana Carolina Ferreira

Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da
infecção pelo Vírus da Hepatite E (HEV) em indivíduos
portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

São Paulo

2016

Ariana Carolina Ferreira

Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da
infecção pelo Vírus da Hepatite E (HEV) em indivíduos
portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Ariana Carolina

Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo Vírus da Hepatite E (HEV) em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) / Ariana Carolina Ferreira. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: João Renato Rebello Pinho.

Descritores: 1.Hepatite E 2.Vírus da hepatite E 3.Prevalência 4.Imunossupressão
5.HIV 6.Coinfecção 7.Hepatite C 8.Hepatite crônica 9.Vírus da hepatite B 10.Testes
sorológicos

USP/FM/DBD-010/16

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais Madalena De Almeida
Rabago Ferreira e Alcides Ferreira pelo amor com que me
deram a dívida da vida; à Ana de Jesus Rabago, meu anjo
eterno, que em seu plano de luz, segue me guiando; e à Michele
Soares Gomes Gouveia, preciosa em seus atos e igualmente sábia
em suas palavras.*

Agradecimientos

Agradeço a **Deus**, por ter me concedido forças, coragem e sabedoria para seguir em frente mediante as adversidades da vida.

Ao meu pai **Alcides Ferreira**, por ser o grande homem da minha vida! Agradeço, acima de tudo, por ser o seu reflexo, sem barba, evidentemente, e por me permitir ser parte da sua linda e humilde história! Obrigada, pai, por andar ao meu lado e por ser o meu eterno parceiro! Eu te amo demais!

A minha mãe **Madalena de Almeida Rabaço Ferreira**, pela cumplicidade, apoio e parceria no caminho da vida. É com você que me sinto segura ao compartilhar meus problemas, conquistas e vitórias! Obrigada por ser o nosso “Cabeção”! Obrigada por ser a minha mãe! Eu te amo demais!

A minha vó **Ana de Jesus Rabaço**, minha eterna rainha, que segue em seu lindo plano de luz, certamente me guiando junto às mãos de Deus. E, como sempre digo: - *Ainda que atravessemos uma eternidade, iremos nos encontrar, e toda essa falta de palavras, vozes e afins será apenas história de uma vida passada!* Vó, obrigada por tudo aquilo que em vida não pude agradecer! Eu te amo demais!

Ao pequeno **Martin Nunes Ferreira** que, com sua chegada, trouxe cores à minha vida, leveza às dificuldades e sorrisos bobos ao meu dia-a-dia! A titia Ari te ama muito, meu amor!

Ao meu irmão **Alcides Ferreira Filho** e a minha cunhada **Joyce Nunes Paixão Ferreira**, pela amizade, carinho, atenção, assistência e, o principal, pelo Martin! Eu amo vocês!

À **Michele Soares Gomes Gouvêa**, pelos ensinamentos profissionais e de vida! Obrigada, acima de tudo, pela amizade, cumplicidade, pelo apoio em diversos momentos da minha vida profissional e pessoal. Ao longo dos meus cinco anos de USP, eu aprendi, estando ao seu lado, coisas essenciais na vida, como humildade, foco, determinação, responsabilidade e comprometimento. Obrigada por tudo, minha mãe postiça, amiga, chefinha!

Ao **Dr. João Renato Rebello Pinho**, pela orientação durante a execução deste trabalho e por semear, entre nós, o olhar crítico de um verdadeiro cientista! Obrigada por tudo!

À **Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes-Côrrea**, por todo auxílio prestado durante a execução deste trabalho! Obrigada por tudo!

À **Fernanda Malta**, que sempre doce, mostrou-se disponível no esclarecimento de eventuais dúvidas. Obrigada pela amizade, carinho e conhecimentos compartilhados!

Ao **Dr. Gaspar Lisboa Neto**, pela disponibilidade em nos auxiliar frente aos impasses da análise estatística. Obrigada pela dedicação e minucioso trabalho.

Ao **Prof. Dr. Flair José Carrilho** pelo apoio ao nosso grupo de pesquisa.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação de Ciências em Gastroenterologia da FMUSP** pelo suporte oferecido e pelo constante apoio ao desenvolvimento da pesquisa. Muito obrigada!

Às **enfermeiras do Instituto de Infectologia Emílio Ribas**, em especial a **Camila Picone**, pelo auxílio prestado durante a coleta de amostras. O carinho e a dedicação com que tratam os pacientes permitem-nos ver o amor com que exercem a profissão. Muito obrigada!

À **Fundação Pró-Sangue/ Hemocentro de São Paulo**, especialmente à **Nanci Salles**, ao **Dr. Alfredo Mendrone Junior**, ao **Dr. Eduardo Levi** e à **Dra. Ester Sabino** por viabilizarem a realização das sorologias para o diagnóstico das infecções causadas por HBV e HCV em alguns casos da nossa casuística. Muito obrigada!

Aos **pacientes** que participaram do estudo, colaborando, assim, com o desenvolvimento da pesquisa e o avanço da ciência. Muito obrigada!

À **Ketti Gleyzer, Paola Lara Faria, João Paulo Moreira, Livia Botelho, Karine Gasparetto e Caroline Noble** pela amizade que construímos ao longo destes anos de USP. Risada, alegria, choros e palhaçadas são garantidos com vocês! Obrigada por tudo, meus queridos! Amo muito vocês!

Às amigas **Cristina Nakhle**, **Maiara Gottardi**, **Fátima**, **Juliana Goldbaum** e **Clarice Lemos**, que ganhei neste período, com as quais pude compartilhar a jornada nos corredores, almoços e cafés na copa. Obrigada por tudo! Adoro vocês!

À minha querida amiga **Fernanda Domenica Couto** pela amizade fiel, cumplicidade, broncas, risadas e parceria! E como sempre brincamos: “*Te amo você!*”

À querida terapeuta **Katia**, através da qual tem sido possível tornar alguns momentos da vida menos complicados. Obrigada por tudo!

À **Vilma Libério** a quem sempre recorri durante a pós-graduação mediante dúvidas e questionamentos! Muito obrigada!

A todos que fizeram e fazem parte da minha vida, meu imenso obrigada!

"If you can dream it, you can do it!"

Walt Disney

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de Figuras
Lista de Quadros
Lista de Gráficos
Lista de Tabelas
Resumo
Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1 O Vírus da Hepatite E.....	03
1.2 Replicação Viral.....	04
1.3 Diversidade genética do HEV: Genótipos e Subtipos.....	06
1.4 Características epidemiológicas da infecção pelo HEV.....	07
1.4.1 <i>Forma Endêmica</i>	09
1.4.2 <i>Forma Não Endêmica</i>	11
1.5 Quadro clínico e evolução da doença.....	14
1.5.1 <i>Infecção Aguda pelo HEV</i>	14
1.5.2 <i>Manifestações Extra-Hepáticas</i>	16
1.5.3 <i>Infecção pelo HEV e Gravidez</i>	17
1.5.4 <i>Infecção pelo HEV e Doença Hepática Pré-Existente</i>	17
1.5.5 <i>Infecção Crônica pelo HEV</i>	18
1.6 Diagnóstico.....	21
1.7 Tratamento e prevenção.....	22
1.8 Infecção pelo HEV em portadores do HIV.....	24
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	31
3.1 Casuística.....	31
3.1.1 <i>Critério de inclusão</i>	32
3.1.2 <i>Procedimento de coleta</i>	32
3.2 Pesquisa de marcadores sorológicos.....	33
3.3 Extração do RNA viral.....	35

3.4 PCR quantitativo em tempo real.....	35
3.4.1 Seleção de primers e sonda.....	35
3.4.2 Reação de transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativo em tempo real.....	36
3.5 Nested PCR.....	39
3.5.1 Seleção de primers.....	39
3.5.2 Reação de transcrição reversa e amplificação por Nested PCR.....	40
3.5.3 Detecção do DNA amplificado.....	41
3.6 Análise Estatística.....	41
3.7 Aspectos de biossegurança.....	41
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Amostras.....	44
4.1.1 Grupos de estudo.....	44
4.2 Pesquisa de marcadores sorológicos.....	45
4.3 Pesquisa do HEV RNA.....	45
4.3.1 PCR quantitativo em tempo real.....	45
4.3.2 Nested PCR.....	49
4.4 Dados demográficos e clínicos.....	49
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
APÊNDICE	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Genoma do vírus da hepatite E.....	04
Figura 2 -	Ciclo de replicação do HEV.....	05
Figura 3 -	Distribuição geográfica dos diferentes genótipos do HEV.....	07
Figura 4 -	As principais formas de transmissão do HEV.....	08
Figura 5 -	Curso evolutivo da infecção aguda pelo HEV.....	15
Figura 6 -	Curso evolutivo da infecção crônica pelo HEV.....	19
Figura 7 -	Esquematização da técnica de ELISA utilizada para detecção dos anticorpos anti-HEV.....	33
Figura 8 -	Esquematização da técnica de Immunoblotting utilizada para detecção dos anticorpos anti-HEV, para confirmação de alguns resultados obtidos pela técnica de ELISA.....	34
Figura 9 -	CrITÉRIOS para confirmação de determinados resultados obtidos pela técnica de ELISA.....	35
Figura 10 -	Representação dos <i>primers</i> e sonda utilizados no PCR quantitativo em tempo real.....	36
Figura 11 -	Diluição seriada a partir da amostra controle.....	37
Figura 12 -	Curva padrão da técnica de PCR quantitativo em tempo real.....	38
Figura 13 -	Esquematização gráfica do PCR quantitativo em tempo real para amplificação de um fragmento da ORF3 do HEV RNA.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características da infecção pelo HEV em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos.....	20
Quadro 2 -	Conjunto de primers utilizados na reação de <i>Nested</i> PCR para amplificação de um fragmento da ORF1.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Organização das amostras em grupos de estudo.....	44
Gráfico 2 -	Distribuição relativa dos grupos de infecção pelo HIV de acordo com o grupo de marcadores de infecção pelo HEV.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Amostras que apresentaram critérios para confirmação dos resultados obtidos pelo ELISA através do Immunoblotting...	45
Tabela 2 -	Distribuição de características clínicas e laboratoriais de acordo com o grupo de infecção pelo HIV.....	51
Tabela 3 -	Distribuição das características clínicas e laboratoriais de acordo com o grupo de marcadores de infecção pelo HEV...	52

RESUMO

Ferreira AC. ***Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo Vírus da Hepatite E (HEV) em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)*** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A infecção pelo HEV é reconhecida como um considerável problema de saúde pública em diversas regiões do mundo. Embora caracterizada como uma infecção benigna com um curso evolutivo autolimitado, recentes estudos têm mostrado sua evolução para cronicidade em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, tem sido verificado que nesses indivíduos a infecção crônica pelo HEV pode evoluir para fibrose hepática progressiva, culminando com o desenvolvimento de cirrose. Não existem dados acerca da prevalência da infecção pelo HEV em pacientes infectados pelo HIV no Brasil, onde a circulação deste vírus tem sido demonstrada em diversos grupos de indivíduos imunocompetentes e, até mesmo, em alguns animais provenientes de diferentes regiões do país. Com base nisso, este trabalho teve como objetivo estimar a prevalência de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo HEV, bem como a padronização de uma PCR em tempo real para a detecção e quantificação da carga viral do HEV na população de soropositivos da cidade de São Paulo. Foram incluídos neste estudo soro e plasma de pacientes infectados pelo HIV (n=354), que foram divididos em grupos de acordo com a presença ou ausência de coinfeção pelos vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV). Essas amostras foram coletadas entre 2007 e 2013. Anticorpos anti-HEV IgM e IgG foram pesquisados pela técnica de ELISA (RecomWell HEV IgM/ IgG - MIKROGEN®), e, em alguns casos, confirmados por Immunoblotting (RecomLine HEV IgM/ IgG - MIKROGEN®). Todas as amostras foram submetidas à pesquisa de HEV RNA através da PCR em tempo real padronizada. Cerca de 72% dos indivíduos avaliados pertenciam ao sexo masculino. A média de idade entre a população analisada foi de 48,4 anos. Os

anticorpos anti-HEV IgM e IgG foram encontrados em 1,4% e 10,7% dos indivíduos dessa população, respectivamente. Apenas dois pacientes apresentaram positividade simultânea para anti-HEV IgM e IgG. Não houve diferença estatisticamente relevante quanto à presença de marcadores sorológicos nos grupos de estudo. Além disso, foi detectado o HEV RNA em 10,7% das amostras analisadas, entre as quais, seis apresentaram simultaneamente algum marcador sorológico (5 anti-HEV IgG e 1 IgM). A presença deste marcador foi predominante no grupo de pacientes com coinfeção pelo HCV. Através deste trabalho pôde-se constatar, portanto, que o HEV é circulante entre a população de infectados pelo HIV em São Paulo, e que o seguimento desses pacientes se faz necessário dado a possibilidade de progressão para infecção crônica e cirrose.

Descritores: hepatite E; vírus da hepatite E; prevalência; imunossupressão; HIV; coinfeção; hepatite C; hepatite crônica, vírus da hepatite B; testes sorológicos.

ABSTRACT

Ferreira AC. ***Serological and molecular markers of hepatitis E virus infection (HEV) in HIV-infected individuals*** [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2016.

HEV infection is recognized as a significant public health problem in different world regions. Although initially characterized as a benign infection with self-limited course, recent studies have showing its evolution to chronicity in immunocompromised individuals. Furthermore, in these individuals the chronic infection can develop progressive liver fibrosis leading to cirrhosis. There are no data regarding prevalence of HEV infections in HIV- infected patients in Brazil, where the circulation of this virus has been demonstrated in different individuals groups and in some animals from different regions of the country. Based on this, this study aimed to assess the prevalence of serological and molecular makers of HEV infection and the standardization of real-time PCR for the detection and quantification of HEV viral load in HIV-infected individuals in São Paulo. Serum and plasma samples of HIV-infected patients (n=354), collected between 2007 and 2013, were included and organized in groups of co-infection (HIV/ HBV, HIV/HCV and HIV/ HBV/ HCV) and HIV mono-infection. Antibodies anti-HEV IgM and IgG were detected by ELISA (RecomWell HEV IgM/ IgG – MIKROGEN®), and in some cases confirmed by immunoblotting (RecomLine HEV IgM/ IgG - MIKROGEN®). All samples were submitted to research HEV RNA by real-time PCR. About 72% of the patients were male. The mean age of this population was 48.4 years. The anti-HEV IgM and IgG antibodies were found in 1.4% and 10.7%, respectively. Only two patients presented simultaneous anti-HEV IgM and anti-HEV IgG. There was no statistically significant difference in the presence of serological makers among the HIV infection groups. In addition, HEV RNA was detected in 10.7% of samples and six of these samples presented simultaneously a serological maker (5 anti-HEV IgG and 1 IgM). The presence of this maker was more frequent in the co-infection HIV/ HCV group. Through this work, we

observed that HEV is circulating among the HIV-infected population in São Paulo, and the monitoring these patients is necessary because of the possibility progression to chronic infection and cirrhosis.

Descriptors: hepatitis E; hepatitis E virus; prevalence; immunosuppression; HIV; coinfection; hepatitis C; hepatitis, chronic; hepatitis B virus; serologic tests

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Hepatite viral é uma doença resultante da infecção das células hepáticas por agentes virais que utilizam a estrutura das mesmas para sua replicação. Existem cinco principais vírus associados à ocorrência de hepatite, os quais são: vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite Delta (HDV) e vírus da hepatite E (HEV) (1).

Esses vírus não possuem relações taxonômicas, sendo associados apenas pela capacidade de causar dano hepático. Além disso, apresentam diferenças nas taxas de mortalidade, capacidade de causar doença crônica, severidade da doença e transmissão. HBV, HCV e HDV são transmitidos pelas vias parenteral e sexual; HAV e HEV, por meio da via entérica (fecal-oral) (1). Entre estes cinco vírus hepatotrópicos bem reconhecidos, o vírus da hepatite E foi o mais recentemente descoberto e, então, designado como um importante agente causal de hepatite (2, 3).

A infecção pelo agora denominado HEV foi inicialmente reconhecida durante uma epidemia de hepatite aguda que ocorreu durante o ano de 1978 no vale da Caxemira, Índia (4). Outro grande surto de hepatite aguda pelo HEV, que inicialmente foi relacionado à infecção pelo HAV, havia ocorrido cerca de duas décadas antes em Nova Deli (2). Em 1983 a transmissão fecal-oral deste agente foi comprovada após um voluntário se auto infectar através da ingestão de uma suspensão de fezes isolada de casos humanos oriundos de uma epidemia de hepatite Não-A-Não-B no Uzbequistão. Neste momento, pela primeira vez, o HEV foi identificado por microscopia eletrônica (5).

Apenas na década de 90 o genoma do HEV foi sequenciado e clonado, possibilitando o desenvolvimento de ensaios enzimáticos para detecção de anticorpos contra o vírus (6). Estudos retrospectivos e prospectivos puderam, então, ser realizados, e o envolvimento do HEV em muitos surtos de hepatite aguda Não-A-Não-B foi confirmado.

Atualmente a infecção pelo HEV é reconhecida como um considerável problema de saúde pública em diversas regiões do mundo. O HEV é especialmente endêmico em regiões com condições precárias de higiene, onde é responsável por grandes surtos de hepatite aguda. Em países desenvolvidos, acreditava-se que a infecção pelo HEV ocorria quase que exclusivamente em pessoas com histórico de viagens para regiões endêmicas; no entanto, durante a última década, um número crescente de infecções autóctones tem sido identificado nessas regiões, demonstrando a possibilidade de transmissão zoonótica do vírus (7).

A prevalência do HEV nas diferentes regiões do mundo ainda não é completamente compreendida, assim como os padrões de transmissão e evolução da doença. Esta é reconhecida habitualmente como benigna e de evolução autolimitada, entretanto, são crescentes as evidências de sua evolução para a cronicidade em indivíduos imunocomprometidos (8). Tais evidências tem feito ressurgir o interesse pelo estudo dos diferentes aspectos da infecção pelo HEV, assim como do próprio agente, com o objetivo de melhorar as estratégias de diagnóstico, tratamento e prevenção dessa infecção.

1.1 O VÍRUS DA HEPATITE E

Atualmente, o HEV está classificado na família *Hepeviridae*, gênero *Orthohepevirus* e espécie *Orthohepevirus A*, que corresponde à espécie de isolados obtidos de humanos e outros mamíferos (9). O HEV consiste em uma partícula com aproximadamente 27-34nm de diâmetro, não envelopada, composta por um capsídeo de simetria icosaédrica formado por uma única proteína, e um genoma viral constituído por uma molécula de RNA de fita simples com polaridade positiva e aproximadamente 7,2 Kb (10).

O HEV RNA é constituído por uma pequena região não codificadora (*Untranslated Regions* - UTRs) nas suas extremidades 3' e 5' e por três regiões codificantes (*Open Reading Frames* – ORF), denominadas ORF1, ORF2 e ORF3 (Figura 1). A ORF1 possui cerca de 5079 nucleotídeos, sendo localizada na

região 5' terminal do genoma viral. Além disso, é responsável pela codificação de uma poliproteína de 1693 aminoácidos que, após algumas modificações, origina importantes produtos proteicos não estruturais (metiltransferase, RNA-dependente RNA polimerase, RNA helicase, papaína-cisteína protease) envolvidos no processo de replicação viral. A ORF2, com aproximadamente 2000 nucleotídeos, está localizada na extremidade 3' do genoma e codifica a proteína do capsídeo viral, que contém os epítomos alvos da resposta imunológica do hospedeiro. A ORF3, situada entre a ORF1 e a ORF2 e fazendo sobreposição de cerca de 330 nucleotídeos com a extremidade 5' da ORF2, é a menor região codificante do genoma, sendo responsável por traduzir uma fosfoproteína que se associa ao citoesqueleto dos hepatócitos, sendo, portanto, essencial à infectividade do vírus *in vivo*. As regiões não codificantes e as regiões localizadas na junção entre ORF1 e ORF2/ORF3 exercem um papel importante no processo de replicação do genoma viral (11-13).

Figura 1 – Genoma do vírus da hepatite E. Fonte: (10), modificado.

1.2 REPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo de replicação do HEV não é bem conhecido devido à dificuldade de sua reprodução em cultura celular (3). Entretanto, sabe-se que o RNA genômico do HEV de fita positiva é produzido no citoplasma celular com a finalidade de traduzir as proteínas não estruturais codificadas pela ORF1. Algumas destas poliproteínas, em associação com proteínas celulares, comandam a síntese do RNA antígenômico (negativo), iniciando pela extremidade 3' do genoma. O RNA

antigenômico pode, então, atuar como molde para a síntese de novas fitas de RNA genômico (positivo) e subgenômico (2,2Kb, positivo), responsável pela síntese das proteínas do capsídeo traduzidas a partir da ORF2 (12). As etapas da replicação viral seguem esquematizadas detalhadamente a seguir (Figura 2).

Figura 2 – Ciclo de replicação do HEV. As partículas virais se concentram na superfície das células alvo através de alguns fatores de fixação (1), posteriormente se ligam a receptores específicos ainda não caracterizados (2) e migram para o interior celular através de endocitose (3). No citoplasma celular, os vírus sofrem descapsidação (4), liberando o RNA genômico (fita positiva), que é então parcialmente traduzido em proteínas não estruturais da ORF1 (5), que auxiliam na transcrição de um RNA antigenômico (negativo) (6), o qual passa a atuar como fita molde para a síntese de um RNA subgenômico (2,2 Kb) (7), bem como de transcritos completos de RNA genômico (positivo) (8). O RNA subgenômico é, então, traduzido em proteínas da ORF2 (triângulos cinza) e da ORF3 (círculos azuis) (9). O produto proteico da ORF2 atravessa o retículo endoplasmático a fim de empacotar o RNA genômico, constituindo o capsídeo viral (10). A proteína traduzida a partir da ORF3 se associa às endomembranas (11) e auxilia na saída do vírus recém montado da célula (12) (13). Fonte: (14), modificado.

1.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DO HEV: GENÓTIPOS E SUBTIPOS

A espécie *Orthohepevirus A* se encontra atualmente subdividida em 7 genótipos, e os isolados que acometem humanos estão inseridos nos genótipos 1 a 4, entre os quais, o 3 e 4 foram encontrados em outros mamíferos além do homem. Os genótipos 5 e 6 foram encontrados em javalis e o 7 em camelos (9).

A diversidade genética do HEV foi caracterizada com base na análise de sequências de genomas completos e/ou sequências parciais da ORF1 (nucleotídeos 80 a 450) de cepas isoladas em diferentes regiões geográficas (15).

A variabilidade genética dentro dos diferentes genótipos possibilitou a classificação dos mesmos em subtipos. O genótipo 1 do HEV, embora muito conservado, classifica-se em cinco subtipos distintos: 1a, 1b, 1c, 1d e 1e. As sequências do genótipo 2 são agrupadas em dois diferentes subtipos: 2a e 2b. Os genótipos 3 e 4, por apresentarem grande diversidade, são organizados em dez (3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i e 3j) e sete (4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f e 4g) subtipos, respectivamente (15). Alguns genótipos/subtipos apresentam uma distribuição geográfica característica, porém um determinado genótipo que é dominante em uma dada região não se restringe à mesma, podendo ser encontrado também em outras áreas. O genótipo 1, restrito a humanos, apresenta alta endemicidade em alguns países em desenvolvimento localizados na Ásia e no norte da África; o genótipo 2, consideravelmente raro e exclusivamente humano, foi encontrado em um caso no México e em alguns casos na África. Os genótipos 1 e 2 estão envolvidos nas epidemias de infecção pelo HEV transmitidas através de água contaminada que ocorreram nas regiões em que são predominantes (13). O genótipo 3 foi caracterizado em amostras isoladas de humanos e suínos em países desenvolvidos localizados em regiões da América do Norte, América do Sul, Europa e Japão; o genótipo 4 também é encontrado em casos humanos e suínos na Ásia, particularmente China, Taiwan, Vietnã e Japão. Além de serem encontrados entre rebanhos suínos, os genótipos 3 e 4 também já foram detectados em outros animais como javalis e veados (13).

Surtos devido à infecção por HEV genótipos 1 e 2 são causados pela eficiente transmissão fecal oral entre humanos; já as infecções pelos genótipos 3 e 4 são mantidas entre algumas espécies animais, infectando também humanos. A transmissão do HEV genótipos 3 e 4 ocorre pela ingestão de carne crua ou mal cozida derivada de suínos, javalis e veados portadores do vírus ou pela exposição humana a fluidos destes animais infectados (16). Segue abaixo um mapa com a distribuição geográfica dos diferentes genótipos do HEV (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição geográfica dos diferentes genótipos do HEV. Fonte: (17), modificado.

1.4 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA INFECÇÃO PELO HEV

O HEV, excretado através das fezes de indivíduos infectados, apresenta a via fecal oral como sua principal forma de transmissão, sendo por isso responsável pelos grandes surtos epidêmicos. Esta forma está associada principalmente à ingestão de água contaminada por fezes de indivíduos

infectados. Outras três rotas de transmissão desse vírus já foram relatadas (3, 18):

- Ingestão de carne de porco ou de outros animais contaminadas pelo HEV – caracterizando a transmissão zoonótica da infecção;
- Transmissão transfusional;
- Transmissão perinatal/ vertical.

As principais formas de transmissão do HEV seguem esquematizadas a seguir (Figura 4).

Figura 4- As principais formas de transmissão do HEV. Fonte: (19), modificado.

A infecção pelo HEV apresenta dois padrões epidemiológicos nas diferentes regiões geográficas, podendo ser encontrada sob as formas endêmica

e não endêmica. Nessas áreas, observam-se diferenças marcantes nas rotas de transmissão, grupo populacional afetado e características da doença.

1.4.1 Forma Endêmica

A forma endêmica é observada em países em desenvolvimento, onde grandes surtos associados à deficiência de água potável e às precárias condições sanitárias são mais recorrentes, afetando de centenas a milhares de pessoas. Os genótipos 1 e 2 do vírus estão associados à grande parte das infecções nessas regiões. A infecção pelo HEV é considerada endêmica principalmente na Índia, Ásia Central, África e México. Na América do Norte, dois grandes surtos ocorreram no México durante os anos de 1986 e 1987; posteriormente, não ocorreram relatos de novos surtos na região. A epidemia mais recente aconteceu em Darfur, no Sudão, devido à superlotação nos campos de refugiados (10, 20, 21).

Nas áreas endêmicas, a ocorrência de infecção pelo HEV associa-se principalmente ao consumo de água contaminada com materiais fecais infectados. Durante os episódios epidêmicos, 1 a 15% da população pode ser afetada, sendo os adultos jovens os mais frequentemente acometidos (2, 12, 22, 23). A prevalência da infecção pelo HEV é baixa em crianças menores de 10 anos, entretanto essa prevalência cresce drasticamente entre indivíduos com idade entre 15 a 30 anos. Esses achados são curiosos e inesperados para um vírus de transmissão fecal oral. Diferentemente do HEV, a prevalência da infecção pelo HAV nestas regiões é maior em crianças abaixo de 10 anos, já que se trata de um vírus cuja principal forma de transmissão é a via fecal oral. Contudo, no Egito, as características epidemiológicas da hepatite E diferem significativamente daquelas observadas nos países vizinhos da África e no subcontinente Indiano: uma elevada soroprevalência de anti-HEV é observada em crianças com idade igual ou inferior a 10 anos, chegando a ser semelhante à encontrada para o HAV (2, 10, 24).

A ocorrência dos surtos se dá frequentemente após desastres naturais em que fortes chuvas e inundações favorecem a mistura de excrementos humanos com a água destinada ao consumo da população, ou em campos de refugiados, onde as condições sanitárias são precárias. Entretanto, durante os meses quentes e secos do verão, alguns surtos também podem ocorrer, possivelmente devido ao menor fluxo de água nos rios, favorecendo o aumento das concentrações de contaminantes fecais. As epidemias são recorrentes no sudeste asiático, onde as pessoas utilizam a água do rio, em que são eliminados dejetos fecais, para beber, cozinhar e para higiene pessoal (3, 8, 22).

É possível observar nas regiões endêmicas casos esporádicos de hepatite aguda em todos os grupos etários. Nesses casos, a forma de transmissão não é bem definida, entretanto, devido ao elevado potencial de contaminação fecal da água e dos alimentos, a transmissão fecal-oral é a mais provável (3, 8).

A transmissão por contato direto (pessoa a pessoa) tem sido relatada durante a ocorrência de surtos da infecção, entretanto não está totalmente claro o quanto esse modo de transmissão contribui eficientemente para a disseminação viral (2, 3, 18, 25). Contudo, um estudo em Uganda evidenciou que os fatores domésticos podem ser importantes na transmissão da doença (26). De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 2013) (27), a propagação pessoa a pessoa pode ter sido um fator de transmissão importante no recente surto ocorrido no sul do Sudão. Nas áreas endêmicas, a transmissão do HEV através do consumo de carne e derivados de animais infectados não parece ser uma forma importante de disseminação da doença (8, 18, 27-29). A transmissão vertical já foi relatada nessas regiões (2). A presença de viremia entre doadores de sangue saudáveis e subsequente transmissão desta infecção para receptores de transfusão tem sido documentada, porém a contribuição dessa forma de transmissão para a endemicidade da doença também não é clara (2, 8, 18, 22).

1.4.2 Forma Não Endêmica

A infecção pelo HEV não é endêmica nos Estados Unidos, Europa Ocidental (Reino Unido, França, Holanda, Áustria, Espanha e Grécia) e em países desenvolvidos da região Ásia-Pacífico (Japão, Taiwan, Hong Kong e Austrália), onde não há relatos de surtos e poucos casos de hepatite viral aguda são associados ao HEV (7, 8, 10, 22). Os genótipos 3 e 4 do vírus, encontrados em alguns animais e esporadicamente em humanos, são responsáveis por grande parte dos casos autóctones de hepatite E no mundo desenvolvido (21).

Os relatos de infecção aguda pelo HEV durante a década de 90 e os primeiros anos do século XXI nos países desenvolvidos estão associados principalmente a casos de pessoas com histórico de viagem para áreas endêmicas (7, 30). Entretanto, tem-se observado nos últimos anos um número crescente de casos relacionados à transmissão autóctone (localmente adquirida) da doença (10, 23, 31-35).

Vários estudos que caracterizaram a sequência genômica das cepas de HEV envolvidas nas infecções autóctones mostraram que as mesmas eram mais próximas das sequências de cepas isoladas de suínos do que daquelas isoladas de casos humanos procedentes de áreas endêmicas (36, 37). Posteriormente, alguns estudos comprovaram a transmissão do HEV para humanos através do consumo de carne crua ou mal cozida de suínos, javalis ou veados, contribuindo com as evidências de transmissão zoonótica do HEV em áreas não endêmicas (38-41). A elevada prevalência de anti-HEV IgG entre veterinários e trabalhadores de matadouros sugere que o contato direto com suínos constitui um importante fator de risco para a transmissão zoonótica do HEV (2).

Estudos relatam uma baixa prevalência de anticorpos anti-HEV, especialmente em adultos (1 – 20%) nessas áreas. Pode-se observar uma variação geográfica considerável na soroprevalência e na incidência da infecção pelo HEV nos locais onde a infecção não é endêmica, como ocorre na França, onde a prevalência da doença no Sul é quatro vezes maior do que no Norte do país. Essa diferença também é observada no Reino Unido, em que a prevalência é de 16% no Sudoeste da Inglaterra, 12% no restante do país e 4,6% em

Edimburgo, na Escócia. Em nítido contraste com os casos de hepatite E em países em desenvolvimento, nos países desenvolvidos a infecção autóctone tem uma predileção para homens idosos e de meia idade, entretanto, não se sabe ainda a razão pela qual a infecção sintomática é mais comum nesta população, acredita-se que pode estar relacionada com a forma de transmissão. Outro dado importante é que os consumidores excessivos de álcool, por serem mais propensos à esteatose hepática subclínica, apresentam maior expressão clínica da doença pelo HEV (10, 18, 19).

Na América do Sul, a prevalência da infecção pelo HEV ainda não é bem conhecida, mas os estudos publicados têm mostrado características epidemiológicas semelhantes àsquelas de regiões não endêmicas. Nessa região há relatos de casos esporádicos de hepatites agudas relacionadas ao HEV, sendo alguns importados de áreas endêmicas e outros autóctones (42, 43). A circulação do HEV entre suínos também já foi identificada na Bolívia (44) e na Argentina (45).

Estudos de prevalência do anti-HEV IgG realizados durante a década de 90 entre diferentes populações mostraram baixa prevalência: 1,8% em doadores de sangue na Argentina (46); 1,2% em doadores de sangue no Uruguai (47); na Venezuela, 1,6% entre mulheres grávidas da área urbana de Caracas, 3,9% entre uma população da área rural e 5,4% entre ameríndios (48). Entre populações da área rural na Bolívia, foi observada uma prevalência de 7,3%, maior do que a observada nos demais países citados anteriormente (49).

No Brasil, casos esporádicos de hepatite aguda devido à infecção pelo HEV já foram identificados (50, 51) e mais recentemente no Rio de Janeiro foi diagnosticado um caso de hepatite E autóctone, no qual o genótipo 3b do HEV foi identificado (52, 53).

Dados referentes à soroprevalência do HEV no Brasil são bastante limitados. Entretanto, estudos epidemiológicos em diferentes regiões do país envolvendo grupos populacionais distintos mostraram uma prevalência variável. Em Campinas, a prevalência de anti-HEV IgG foi de 2,6% entre profissionais da saúde, 3% entre doadores de sangue e 17,7% entre mulheres com

comportamento de risco para aquisição de HIV (54). No Rio de Janeiro, a prevalência encontrada foi: 2,1% em pacientes com hepatite aguda Não-A Não-B Não-C, 6,2% em pacientes hemodialisados, 4,3% em doadores de sangue, 11,8% em usuários de drogas injetáveis, 1% em mulheres grávidas, 2,1% em indivíduos da zona rural e 0% em uma população da área urbana (55). Entre crianças de 2 a 9 anos, em um município da Amazônia Matogrossense, a prevalência de anti-HEV IgG foi 4,5% (56). Entre doadores voluntários matriculados no banco de sangue regional de Londrina – Paraná, durante o ano de 1999, a prevalência do anti-HEV IgG foi de 2,3% (23/996) (57).

Estudos mais recentes acerca da situação epidemiológica da infecção no Brasil tem sido desenvolvidos; como no Vale do Itajaí, Santa Catarina, em que se verificou uma alta prevalência de anti-HEV IgG (10% - 30/300) entre doadores de sangue, o que aparentemente pode estar associado aos hábitos alimentares germânicos predominantes na região (58). Uma análise de registros laboratoriais de testes para anti-HEV realizados entre janeiro de 1998 e dezembro de 2013 em um grande laboratório de análises clínicas de São Paulo, que abrange uma área que se estende do sul ao nordeste do país, determinou uma soroprevalência de 2,1% para anti-HEV IgG (59). Em uma recente pesquisa, que teve como objetivo avaliar a soroprevalência de anticorpos anti-HEV em uma população de catadores de material reciclável em Goiânia, verificou-se que 5,1% e 0,7% dos mesmos apresentaram anticorpos anti-HEV IgG e anti-HEV IgM, respectivamente. Este trabalho indica uma baixa prevalência da infecção no Brasil Central, sugerindo que este apresenta um padrão de infecção pelo HEV semelhante ao apresentado pelas regiões de baixa endemicidade (60).

Evidências sorológicas de infecção pelo HEV entre suínos e outros animais já foram relatadas no Brasil (61-65). Em suínos do Rio de Janeiro (62), Pará (63) e São Paulo (64), o HEV RNA foi pesquisado e detectado. Embora o Mato Grosso seja o quinto maior produtor de suínos entre os demais estados brasileiros, nenhum estudo havia sido realizado com o objetivo de investigar a ocorrência de HEV em suínos provenientes de fazendas de grande produção, onde são abatidos em condições sanitárias adequadas, e fazendas de produção familiar, que fornecem os suínos sem inspeção sanitária das condições de abate,

podendo ser esta uma importante fonte de transmissão do HEV aos humanos. Recentemente, foi desenvolvido um estudo que demonstrou a ocorrência de infecção pelo HEV em suínos provenientes de fazendas de produção familiar dessa região. Dentre estes, 72% (18/25) dos suínos apresentaram lesões hepáticas microscópicas, entre os quais 32% (8/25) apresentaram HEV RNA detectável por *Nested* PCR e 28% (7/25) por Imuno-histoquímica (53).

1.5 QUADRO CLÍNICO E EVOLUÇÃO DA DOENÇA

A evolução clínica da hepatite E é bem variável, podendo se apresentar de forma assintomática a formas mais graves, como insuficiência hepática fulminante; entretanto, o quadro de hepatite aguda autolimitada é o mais comumente observado. Esta é a apresentação mais frequente em países industrializados e em países em desenvolvimento, distinguindo-se apenas a taxa de mortalidade que é muito mais elevada nestes últimos. Além disso, nas regiões endêmicas, os adultos jovens apresentam mais frequentemente doença sintomática, enquanto que nas crianças a infecção geralmente é benigna e assintomática. As características clínicas e bioquímicas da hepatite E são indistinguíveis daquelas observadas na infecção aguda por outros vírus hepatotrópicos. Recentemente, alguns casos de infecção crônica pelo HEV também têm sido descritos (2, 3, 23, 32).

1.5.1 Infecção Aguda pelo HEV

O período médio de incubação do HEV é de 40 dias, podendo variar de 15 a 60 dias. A hepatite E aguda geralmente tem duas fases distintas: a fase pré-ictérica e a fase ictérica. A fase pré-ictérica pode variar de 1 a 10 dias e sintomas gastrointestinais, como dor epigástrica, náuseas e vômitos têm sido frequentemente relatados. A fase ictérica é caracterizada pelo desaparecimento dos sintomas prodrômicos e é geralmente autolimitada. Nesta fase se observa icterícia, hepatomegalia e discreta esplenomegalia. A elevação dos níveis da

enzima alanina aminotransferase (ALT) precede ou coincide com o início da icterícia, a qual é observada na maioria dos pacientes juntamente às queixas de colúria, prurido e hipocolia fecal. Nos casos em que não há complicações, em um mês há remissão sintomática completa. Nas hepatites colestáticas pelo HEV (20-25% dos adultos acometidos), os testes laboratoriais mostram a elevação da enzima fosfatase alcalina e a persistência de bilirrubinas elevadas mesmo após a normalização da ALT. Semelhante a outros vírus causadores de hepatite, o HEV não é diretamente citopático e é possível que os danos hepáticos sejam devido à resposta imune do hospedeiro, no entanto isso ainda não foi confirmado (2, 12, 30, 32, 66).

A viremia e a excreção fecal têm início de 1-2 semanas antes do aparecimento dos sintomas e perduram por 2-4 semanas após o começo dos mesmos. A resposta imune é marcada pelo aumento dos anticorpos anti-HEV IgM e logo em seguida os da classe IgG, sendo que os títulos de IgM declinam dentro de 4 a 6 meses e os de IgG persistem por longos períodos (32). A eficácia dos anticorpos anti-HEV IgG na proteção contra novas infecções é questionável (67). O curso da infecção típica pelo HEV é resumido da figura abaixo (Figura 5).

Figura 5 – Curso evolutivo da infecção aguda pelo HEV. Fonte: (17), modificado.

1.5.2 Manifestações Extra-Hepáticas

Além das manifestações clínicas clássicas de hepatite, a infecção pelo HEV também é responsável pelo surgimento de distúrbios extra-hepáticos, os quais incluem doenças neurológicas, lesão renal, pancreatite e problemas hematológicos (10).

- a) **Distúrbios Neurológicos:** As principais manifestações neurológicas observadas em pacientes com infecção pelo HEV tem sido a Síndrome de Guillain-Barré, paralisia de Bell, amiotrofia nevralgia, mielite transversa aguda e meningoencefalite aguda. Estes sintomas têm sido verificados em infecções agudas pelo HEV genótipos 1 e 3, e crônicas pelo HEV genótipo 3;
- b) **Lesões Renais:** Nas infecções agudas e crônicas pelos genótipos 1 e 3 do HEV tem sido verificado também a ocorrência de insuficiência renal e doenças glomerulares, incluindo glomerulonefrite membranosa e membranoproliferativa;
- c) **Pancreatite:** O quadro de pancreatite aguda tem sido associado à infecção pelo HEV genótipo 1. A pancreatite aguda geralmente ocorre em homens jovens na segunda ou terceira semana após o início da icterícia, caracterizando-se por dor abdominal e amilase sérica elevada;
- d) **Distúrbios Hematológicos:** Foram relatadas trombocitopenia e anemia aplástica em casos de infecção aguda pelo HEV (10).

Os fatores que determinam a gravidade da infecção pelo HEV não são totalmente compreendidos, entretanto podem estar associados à gravidez, gênero, idade e doença hepática previamente existente (23).

1.5.3 Infecção pelo HEV e Gravidez

A hepatite E é caracteristicamente associada a uma alta incidência de apresentações sintomáticas entre mulheres grávidas, nas quais a doença é grave, evoluindo para um quadro de hepatite fulminante (falência hepática aguda), especialmente se a infecção ocorre durante o terceiro trimestre da gravidez (10).

Alguns estudos em países em desenvolvimento mostraram um elevado índice de mortalidade (20 a 25%) entre mulheres grávidas que apresentaram infecção pelo HEV. A mortalidade ocorre principalmente no terceiro trimestre da gravidez e está associada a problemas obstétricos, incluindo hemorragia, eclampsia ou insuficiência hepática fulminante. Somente os genótipos 1 e 2 parecem estar implicados nesta elevada mortalidade. A transmissão vertical do HEV de mães infectadas aos seus bebês é bem documentada. Isso leva a parto prematuro, aumento do risco de aborto espontâneo e hepatite aguda icterica ou anictérica no recém-nascido (2, 10, 35, 66, 68).

Estudos recentes relatam que entre mulheres infectadas pelo HEV, as cargas virais são mais elevadas em gestantes do que em mulheres que não estavam grávidas (69, 70). Em algumas regiões em países em desenvolvimento não tem sido verificado elevados índices de mortalidade pelo HEV durante a gravidez. No Egito, por exemplo, a infecção parece seguir um curso benigno na gestação, embora seja causada pelo genótipo 1. Uma explicação plausível para tal fato é a possibilidade dessas populações terem sido expostas desde a infância ao HEV, resultando em doença atenuada na reexposição ao vírus. Essa hipótese é suportada pela verificação de uma soroprevalência de anti-HEV IgG de aproximadamente 78% em mulheres grávidas egípcias (71, 72).

1.5.4 Infecção pelo HEV e Doença Hepática Pré-Existente

A infecção aguda pelo HEV junto a uma doença hepática crônica pré-existente de etiologia viral ou não viral tem sido frequentemente relatada. As

manifestações clínicas iniciais são semelhantes às da hepatite aguda, entretanto, o quadro pode se complicar por descompensação da doença hepática crônica, aparecimento de ascite e encefalopatia hepática. O consumo de álcool é um fator de risco importante, já que favorece o aparecimento rápido dos sintomas clínicos e se relaciona à gravidade da doença (3, 73). Na Índia, foi relatado um elevado índice de mortalidade (70%) em pacientes previamente cirróticos que se infectaram com HEV genótipo 1, retratando a impossibilidade de um bom prognóstico na ausência de transplante hepático nos mesmos. Os pacientes que apresentaram descompensação devido à infecção aguda pelo HEV tiveram significativamente um pior prognóstico do que os pacientes que desenvolveram a descompensação hepática por outra causa (74). Por outro lado, na França, tem sido verificado que um curto período de administração de ribavirina tem evitado a necessidade de transplante (75).

1.5.5 Infecção Crônica pelo HEV

Até poucos anos, o conhecimento estabelecido era de que, diferente das infecções pelo HBV ou HCV, a infecção pelo HEV em humanos resultava em uma hepatite aguda autolimitada com resolução espontânea em até seis meses, ou seja, sem evolução para a cronicidade. Entretanto, estudos tem relatado casos de infecção persistente pelo HEV em pacientes imunocomprometidos (HIV positivos, em terapia contra o câncer, com distúrbios hematológicos ou transplantados) desde 2008(76-82). Até recentemente, os casos crônicos de infecção pelo HEV tinham sido descritos em adultos imunocomprometidos, envolvendo exclusivamente o genótipo 3 do vírus. Entretanto, na China, identificou-se um caso crônico de infecção pelo genótipo 4d em uma criança de 4 anos com leucemia linfoblástica aguda (83). Ainda não foi relatado a ocorrência de cronicidade da infecção pelos genótipos 1 e 2.

A hepatite E crônica tem sido definida pela persistência do HEV RNA nas fezes e no soro sanguíneo por seis meses ou mais após a fase aguda da doença, acompanhada, geralmente, pela elevação leve e moderada dos níveis de ALT (Alanina Aminotransferase), bem como dos níveis de AST (Aspartato

Aminotransferase), bilirrubinas, fosfatase alcalina e GGT (Gama Glutamiltransferase) no sangue, junto à presença ou não de anticorpos anti-HEV das classes IgM e IgG (Figura 6) (4, 19, 84).

Figura 6 – Curso evolutivo da infecção crônica pelo HEV. Fonte: (17), modificado.

O Quadro 1 resume as principais características da infecção pelo HEV em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos. Em alguns casos de infecção crônica, a evolução clínica para insuficiência hepática e cirrose foi verificada (4, 19, 84). Alguns estudos sugerem que o estado imunológico do paciente está relacionado à ocorrência e à persistência da infecção pelo HEV (85).

Quadro 1 - Características da infecção pelo HEV em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos. Fonte: (19), modificado.

	Imunocompetentes	Imunocomprometidos
Apresentação	Geralmente sintomática	Raramente sintomática
ALT no diagnóstico	≈ 1000 – 3000 IU/L	≈300 IU/L
Genótipo do HEV	Genótipos 1, 2, 3 ou 4	Somente genótipo 3 e, mais recentemente, um caso de genótipo 4
Diagnóstico	Aumento dos índices de anti-HEV IgM e IgG. O PCR é positivo em 75% dos casos.	O diagnóstico deve ser estabelecido por PCR, uma vez que o teste sorológico é pouco confiável e a soroconversão pode nunca ocorrer.
Resultado da infecção	Resolução da infecção	Infecção crônica ocorre em 60% dos pacientes e 10% dos mesmos desenvolvem cirrose.
Tratamento	A ribavirina tem sido utilizada em alguns poucos casos, nos quais o paciente apresenta um quadro de hepatite aguda grave.	Interferon e ribavirina são eficazes no tratamento da infecção crônica pelo HEV.

1.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da hepatite E é baseado na detecção de anticorpos anti-HEV (IgM e IgG) no soro por métodos sorológicos (ELISA e Immunoblotting, por exemplo) e do HEV RNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de soro, bile e fezes. Esses marcadores aparecem nas diferentes fases de evolução da infecção conforme descrito anteriormente.

O anticorpo anti-HEV IgM é o marcador para diagnóstico de infecção aguda, pois surge rapidamente (~ 1 mês após a infecção) e seu pico é atingido no momento do aparecimento dos sintomas, porém o nível desses anticorpos também declina rapidamente (dentro de ~4 a 6 meses) na maioria dos pacientes. Os anticorpos anti-HEV IgG surgem ainda quando os níveis de anti-HEV IgM estão detectáveis e podem persistir por longos períodos (1 a 14 anos após a infecção), porém um rápido declínio já foi observado em alguns estudos e, portanto, o tempo exato de persistência desses anticorpos ainda não está bem definido (2, 86).

O diagnóstico sorológico do HEV permanece um grande desafio, pois os kits disponíveis comercialmente apresentam grande variação em sua sensibilidade e especificidade, o que pode explicar as divergências nos resultados de prevalência do HEV encontrados em vários estudos e as discordâncias relatadas quanto ao tempo de detecção dos anticorpos (86, 87). A maioria dos ensaios imunoenzimáticos disponíveis atualmente são baseados em epítopos imunodominantes presentes na proteína codificada pela região ORF2 do genoma viral. Esses ensaios utilizam proteínas recombinantes da ORF2 expressas em diferentes sistemas, e empregam principalmente o método de ELISA indireto, no qual os anticorpos específicos contra o HEV presentes no soro do paciente são capturados por antígenos do HEV ligados na superfície sólida da microplaca e, posteriormente, detectados utilizando-se anticorpos anti-IgG ou anti-IgM humana marcados. Alguns desses ensaios também podem ser utilizados para a detecção de anticorpos anti-HEV em suínos, empregando para isso uma anti-imunoglobulina marcada suíno-específica. Recentemente um teste de Immunoblotting (Recomblot HEV IgG e IgM/ Mikrogen) foi

disponibilizado comercialmente para a detecção de anticorpos IgG/ IgM em humanos e suínos. Esse ensaio usa três proteínas recombinantes obtidas de regiões sobrepostas da ORF2 completa e uma proteína recombinante da ORF3, o que lhe confere maior sensibilidade e especificidade (86). A utilização do Immunoblotting como teste confirmatório dos resultados obtidos no ELISA é de grande importância para a obtenção de resultados com índices ideais de sensibilidade e especificidade, especialmente em áreas de baixa endemicidade (87).

Na infecção aguda pelo HEV, o RNA viral pode ser detectado no soro e nas fezes durante o pico da resposta imunológica, porém este marcador tem valor limitado no diagnóstico da infecção aguda devido aos períodos muito curtos de viremia (~ 2 semanas) (32). Alguns ensaios de PCR em tempo real têm sido utilizados para a quantificação de HEV RNA em amostras de fezes e soro. Essas técnicas apresentam elevada especificidade e desempenho variável da sensibilidade. Devido a isso e ao curto tempo de viremia, o HEV RNA indetectável não exclui infecção pelo HEV (3). Contudo, tem fundamental importância para o diagnóstico da infecção crônica pelo HEV, especialmente entre indivíduos imunocomprometidos, para o monitoramento da terapia antiviral e genotipagem dos produtos de amplificação sequenciados (3, 88).

1.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO

Até o momento não existe nenhuma droga antiviral específica para o tratamento da infecção pelo HEV. Isso se deve ao fato de só recentemente ter-se obtido o conhecimento de que o HEV pode causar infecção crônica com rápida evolução para cirrose em pacientes com quadro clínico de imunocomprometimento (3). Muitos trabalhos acerca desta abordagem têm relatado a redução da terapia imunossupressora para depuração viral e o uso de Interferon Peguilado e/ou Ribavirina como possíveis formas de tratamento da infecção crônica pelo HEV (23, 66). Indivíduos imunocompetentes com hepatite

aguda E normalmente não necessitam de terapia antiviral, já que quase todos são capazes de eliminar o vírus espontaneamente (17).

Atualmente a principal estratégia para prevenção da infecção pelo HEV consiste na redução da exposição ao vírus, uma vez que ainda não há disponibilidade de vacina eficaz que venha a prevenir a infecção pelos diferentes genótipos do HEV. Sendo a rota fecal-oral o modo predominante de transmissão do HEV, estratégias destinadas à eliminação segura de dejetos humanos, ao abastecimento de água potável e às melhorias de higiene pessoal formam os pilares de sua prevenção. Visto que a transmissão zoonótica também assume papel importante na disseminação do vírus, algumas medidas podem ser adotadas, como: evitar o consumo de carne crua ou mal cozida de porco e/ ou outros animais, que eventualmente possam estar infectados pelo vírus e inserir os cuidados e as práticas sanitárias adequadas no abate e manipulação dos mesmos (17, 18).

Outra medida que pode auxiliar na prevenção desta infecção é o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o HEV. Até o momento, duas vacinas (RHEV e HEV239) foram avaliadas com êxito em ensaios de fase II e fases II, III e IV, respectivamente. A primeira vacina, a RHEV, constituída por uma proteína de 56kDa codificada por um segmento da ORF2 do HEV genótipo 1 expressa em células de insetos, apresentou uma eficácia de 95,5% após administração de três doses em voluntários do sexo masculino do exército do Nepal, entretanto, a segurança e a sua eficácia em mulheres não foi estabelecida. A segunda vacina, a HEV239, um recombinante de 26kDa expresso em bactérias com base em um segmento da ORF2 do HEV genótipo 1, foi testada em indivíduos provenientes de alguns municípios na China, sendo administrada em três doses. Os participantes foram acompanhados e a eficácia do teste estimada em 100%. Esta vacina foi licenciada para o uso na China em 2011, entretanto, sua eficácia em situações de surtos, em áreas endêmicas para o HEV genótipo 3 e nas populações de crianças e indivíduos imunocomprometidos não está bem estabelecida, exigindo, portanto, ainda mais estudos (10, 19, 21).

1.8 INFECÇÃO PELO HEV EM PORTADORES DO HIV

Os mecanismos envolvidos na coinfeção pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e HEV são pouco conhecidos; sabe-se, no entanto, que este último pode causar infecção crônica em pacientes portadores do HIV. A cronicidade da hepatite E entre este grupo tem sido relatada em diferentes países desenvolvidos. A incidência desta coinfeção é baixa, variando de 0% a 0,9%. Em todos os casos previamente relatados, somente o HEV genótipo 3 foi encontrado nesta população (19, 77, 80, 89-93).

A prevalência de anti-HEV IgG entre indivíduos HIV positivos é bem variável nas diferentes regiões estudadas, entretanto, idade, sexo, etnia, estilo de vida, duração e forma de contágio da infecção pelo HIV parecem não definir a soroprevalência dos anticorpos anti-HEV (77, 80, 94, 95).

A rota de aquisição do HEV em pacientes infectados pelo HIV não foi determinada. Estudos sugerem que a transmissão sexual é improvável (80, 96). Entretanto, um recente estudo demonstrou que homens que fazem sexo com homens podem apresentar um maior risco de aquisição para o HEV (97). O uso de drogas intravenosas pode ser considerado também um fator de risco para a aquisição da infecção autóctone pelo HEV (98).

Até o momento, todos os pacientes com HIV que desenvolveram infecção crônica pelo HEV apresentaram contagens de CD4 <250 células/mm³ e genótipo 3 do vírus. Nesses casos, o tratamento com Ribavirina e Interferon Peguado levou ao eficiente clareamento viral. Além, disso, a infecção pelo HEV em portadores do HIV associa-se, normalmente, à elevação das transaminases séricas (10, 96).

Diferentes estudos têm relatado uma prevalência de anti-HEV IgG bem variável entre a população infectada pelo HIV. Na Suíça, a soroprevalência de anti-HEV IgG nestes indivíduos foi de 2,6% (19/735) (91). Na França, a prevalência deste anticorpo foi de 3% (3/112) em um grupo de pacientes infectados pelo HIV procedentes do norte do país, porém entre aqueles

procedentes do sul, a prevalência foi maior, 9% (12/130) (94). Outro estudo realizado na França, com pacientes procedentes de Paris, também encontrou uma prevalência menor 1,5% (4/261) de anti-HEV IgG do que a encontrada na região Sul (99). Tais achados sugerem um aumento de prevalência no sentido Norte-Sul do país (94). Na região leste da Espanha, a prevalência de anti-HEV IgG nesse grupo foi de 9% (22/238), onde a infecção pelo HEV foi fortemente associada à cirrose hepática (90). Na Holanda, essa taxa foi de 3,8% (100). Na Alemanha, 5% (6/123) dos pacientes HIV apresentaram positividade para o anti-HEV IgG (101). No sudoeste do Reino Unido, a soroprevalência foi de 9,4% entre os soropositivos (80). No entanto, a incidência da infecção pelo HEV definida pela presença de HEV RNA no soro é muito baixa, variando de 0 a 1,3% (84).

Trabalhos recentemente publicados também têm demonstrado uma prevalência variável de anti-HEV IgG entre os infectados pelo HIV. Em Barcelona (Espanha), Córdoba (Espanha), Grécia e Polônia, a prevalência desses anticorpos nessa população foi de 9,2% (22/238), 9,6% (86/894), 7,3% (18/243) e 21,3% (13/61), respectivamente (102-105).

Alguns estudos têm sugerido que a população de pacientes HIV apresenta maior prevalência de anti-HEV IgG, porém se percebe que os resultados dos estudos são controversos. Na Rússia, foi relatado um aumento significativo na prevalência de anti-HEV IgG (11%;13/117) entre pacientes HIV comparado com a população geral (1,7%) (106). Igualmente, na Argentina, uma maior prevalência (6,6%) também foi encontrada entre os pacientes HIV em comparação com um grupo controle (1,8%) (107). Entretanto, um estudo realizado na Inglaterra não encontrou diferenças na prevalência de anti-HEV IgG entre pacientes HIV e controles, que foi de 9,4% (30/138) e 13,8% (64/464), respectivamente (80).

As discrepâncias que têm sido encontradas nos estudos de soroprevalência entre pacientes portadores do HIV podem ser devido às diferenças na sensibilidade dos kits de ELISA utilizados, mas também podem estar relacionadas à redução da resposta imunológica entre indivíduos imunocomprometidos. Alguns estudos têm relatado a detecção do HEV RNA na ausência de anti-HEV IgG ou anti-HEV IgM em pacientes HIV e transplantados

(88). A técnica de PCR demonstra ser a forma mais eficaz e eficiente na detecção da infecção pelo HEV (19).

Vários estudos não têm encontrado evidências de infecção crônica entre os casos anti-HEV IgG positivos, o que pode estar relacionado com o fato da infecção pelo HEV ter sido adquirida antes da infecção pelo HIV. Os fatores envolvidos na evolução da hepatite E para a cronicidade entre pacientes HIV não são bem conhecidos, mas parece estar relacionada com o grau de imunodepressão indicado pela contagem de CD4+, assim como nos pacientes transplantados está relacionada com a intensidade da terapia imunossupressora (76, 77). Sendo assim, supõe-se que a evolução da infecção pelo HEV para a cronicidade em pacientes imunocomprometidos (HIV positivos, em terapia contra câncer, com distúrbios hematológicos ou transplantados) pode ser evitada através da redução do nível de imunossupressão e uso de terapia antirretroviral altamente ativa (Interferon Peguilado ou Ribavirina), no entanto, mais dados são necessários para apoiar estas medidas (17, 19, 108).

Os recentes achados, que demonstram o papel do HEV no desenvolvimento de hepatite crônica e não apenas como um agente causal de uma hepatite aguda autolimitada, têm alarmado pesquisadores e autoridades de Saúde Pública em todo o mundo. Vários estudos relatam que pacientes com quadros de imunodepressão constituem a população mais susceptível à evolução da infecção pelo HEV para a cronicidade, os quais apresentam grande risco de desenvolver doença hepática grave, como a cirrose.

Diante de tal cenário e considerando a escassez de informações acerca da soroprevalência da infecção pelo HEV no Brasil, e especificamente na cidade de São Paulo, o presente estudo tem por objetivo avaliar a prevalência do HEV entre os indivíduos portadores do HIV na cidade de São Paulo. É de grande importância estimar o quanto o HEV representa o agente causal de doença hepática entre esse grupo, pois tal conhecimento permitirá melhor avaliação e tratamento desses pacientes.

Os resultados obtidos neste estudo nos ajudarão a desvendar as incógnitas acerca da distribuição do HEV em São Paulo, além de possibilitarem a avaliação

da necessidade de implantação de um teste diagnóstico para detecção da infecção pelo HEV entre pacientes com HIV.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a prevalência dos marcadores sorológicos (anti-HEV IgG e IgM) e molecular (HEV RNA) entre os indivíduos portadores do HIV com e sem coinfeção pelos vírus B e C.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização de PCR em tempo real para detecção e quantificação da carga viral do HEV;
- Estabelecer correlação entre variáveis laboratoriais e clínicas dos pacientes com a presença de marcadores sorológicos e/ ou moleculares infecção pelo HEV.

*Casuística e
Métodos*

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Neste trabalho foram incluídas amostras de soro e plasma coletadas retrospectivamente e prospectivamente de pacientes portadores de HIV regularmente atendidos na Casa da AIDS e no Instituto de infectologia Emílio Ribas. Este grupo total de amostras foi dividido em dois subgrupos: coinfectados (HIV/HBV, HIV/HCV e HIV/HCV/HBV) e monoinfectados pelo HIV. As amostras coletadas retrospectivamente (entre os anos 2007 e 2013) e prospectivamente (para o presente estudo) foram devidamente distribuídas nos grupos previamente estabelecidos após análise de dados referentes às coinfeções pelos vírus B e C ou, na ausência das mesmas, após testes sorológicos para detecção de marcadores de infecção pelos mesmos, realizados na Fundação Pró-Sangue/ Hemocentro de São Paulo - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As informações acerca da idade, sexo, níveis de transaminases, contagem de CD4, carga viral e tratamento para HIV também foram obtidas dos prontuários médicos dos pacientes.

Dentre as 354 amostras utilizadas neste trabalho, 154 foram coletadas retrospectivamente em períodos distintos para o desenvolvimento de diferentes projetos, e 200 coletadas em 2013 para a realização deste trabalho.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq (04721712.4.0000.0068).

3.1.1 Critério de inclusão

Para a realização deste trabalho, foram selecionadas amostras de soro e plasma de pacientes portadores de HIV, independentemente de outras infecções ou doenças secundárias.

3.1.2 Procedimento de coleta

Para obtenção das amostras coletadas em 2013, os pacientes com atendimento agendado no Instituto de Infectologia Emílio Ribas foram informados acerca do protocolo de pesquisa referente à infecção pelo vírus E durante a etapa de triagem que precede a consulta médica. Manifestando o interesse em participar da mesma, o paciente era conduzido a uma sala apropriada à entrevista e, então, submetido às informações mais detalhadas do estudo e dos procedimentos de coleta. Caso o indivíduo fosse soropositivo para HIV e tivesse interesse em participar do estudo, era entregue ao mesmo um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), o qual, preenchido posteriormente com seus dados pessoais e assinado pelos responsáveis do estudo e pelo participante, continha as informações por escrito de todos os procedimentos e possíveis eventualidades e riscos derivados da coleta. Foram coletadas amostras de soro e plasma de cada paciente envolvido no estudo, utilizando-se um tubo Gel BD Vacutainer® SST® II Advance® (BD Vacutainer®, NJ, EUA) ideal para obtenção de soro com maior qualidade, destinado às técnicas sorológicas, e dois tubos BD Vacutainer® PPT™ (BD Vacutainer®, NJ, EUA), o qual possibilita a obtenção de um plasma não diluído, ideal para testes diagnósticos moleculares. Posteriormente, as amostras foram separadas e organizadas na soroteca, sendo então acondicionadas à 80°C.

3.2 PESQUISA DE MARCADORES SOROLÓGICOS

As amostras de soro foram submetidas à pesquisa qualitativa dos anticorpos anti-HEV das classes IgM e IgG, utilizando-se os kits comerciais *in vitro* RecomWell HEV IgM/ IgG MIKROGEN® (Mikrogen, Neuried, Germany), que são baseados no princípio de ELISA sanduíche indireto (Figura 7). Nos poços das placas teste estão fixados antígenos recombinantes da região ORF2 do genoma do HEV genótipos 1 e 3. Os kits RecomWell para detecção e quantificação de anticorpos IgM e IgG são distintos, entretanto as orientações para os procedimentos dos ensaios são idênticas, diferindo apenas na adição do conjugado IgM ou IgG. Os ensaios foram realizados e validados segundo as orientações específicas do fabricante.

Figura 7– Esquematização da técnica de ELISA utilizada para detecção dos anticorpos anti-HEV.

Alguns critérios foram considerados para confirmação final de determinados resultados obtidos pelo ELISA. Para isso, utilizou-se os kits comerciais RecomLine IgM/ IgG MIKROGEN® (Mikrogen, Neuried, Germany), os quais, baseados na técnica de Immunoblotting, empregam o uso de antígenos

homólogos, recombinantes e purificados de dois genótipos diferentes (1 e 3) das regiões ORF2 e ORF3 do genoma do HEV, garantindo, assim, elevada sensibilidade e especificidade da técnica (Figura 8). Tais critérios seguem esquematizados abaixo (Figura 9).

Figura 8– Esquematização da técnica de Immunoblotting utilizada para detecção dos anticorpos anti-HEV, para confirmação de alguns resultados obtidos pela técnica de ELISA.

Figura 9 – Critérios para confirmação de determinados resultados obtidos pela técnica de ELISA – **a)** Para os casos cujo ELISA IgG foi indeterminado e/ou ELISA IgM indeterminado ou ELISA IgM positivo isolado foi realizada a pesquisa de anti-HEV IgG através do RecomLine IgM/ IgG MIKROGEN® (Mikrogen, Neuried, Germany); **b)** Para os casos cujo ELISA IgM foi indeterminado ou ELISA IgM positivo isolado foi realizada a pesquisa do anti-HEV IgM através do RecomLine IgM/ IgG MIKROGEN® (Mikrogen, Neuried, Germany).

3.3 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

A extração do RNA viral foi realizada a partir de 200 µl de plasma, utilizando-se o kit de extração QIAmp® MinElute® Virus Spin (Qiagen®, Hilden Germany), conforme as orientações do fabricante. O RNA extraído foi eluído em 60µl de tampão de eluição.

3.4 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

3.4.1 Seleção de primers e sonda

Neste trabalho foi realizada a seleção de um conjunto de *primers* e sondas para a padronização de um PCR quantitativo em tempo real para a detecção e quantificação do material genético do HEV. Inicialmente foi feito um levantamento das metodologias utilizadas entre os estudos já publicados, e foram, então, selecionados um conjunto de *primers* e sonda já testados e que apresentaram a melhor sensibilidade e possibilidade de detecção dos diferentes

genótipos do HEV. Após essa seleção, realizou-se a análise da região genômica alvo dos *primers* e sonda, com o objetivo de avaliar a capacidade de anelamento dos mesmos em genomas de diferentes genótipos. Para isso, foi feita uma busca no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) por sequências completas do genoma do HEV de diferentes genótipos isolados em distintas regiões geográficas, e após o alinhamento das mesmas, as regiões de interesse foram analisadas.

Considerando os resultados obtidos nos estudos publicados e a análise da sequência realizada, verificou-se que os *primers* e sonda (Figura 10) que anelam na região ORF3 do genoma viral, produzindo amplicons de 69pb, são os mais adequados para detecção e quantificação do HEV RNA através da PCR em tempo real (109).

Figura 10 - Representação dos *primers* e sonda utilizados no PCR quantitativo em tempo real. Fonte: (109).

3.4.2 Reação de transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativo em tempo real

Para a amplificação e quantificação do HEV RNA foi utilizada a metodologia de *One-Step Real Time PCR*, a qual combina a síntese de cDNA (transcrição reversa) e a amplificação na mesma reação. Para isso, empregou-se o kit QuantiFast Pathogen RT-PCR + IC® Qiagen® (Qiagen®, Hilden, Germany), com o par de *primers* (JVHEVF e JVHEVR) e a sonda TaqMan® (JVHEVP) (Life Technologies, Foster City, CA, USA). O kit utilizado apresenta um controle

interno exógeno (RNA) acompanhado de *primers* e sonda específicos, que foi amplificado no mesmo poço da amostra teste, com a finalidade de verificar a presença de inibidores da reação, evitando-se, assim, a ocorrência de resultados falsos negativos. As reações foram realizadas no equipamento ABI 7500 Fast (Life Technologies, Foster City, CA, USA). A amplificação começa com uma incubação a 50°C por 20 minutos, seguida de uma elevação de temperatura para 95°C por 5 minutos e um programa de ciclos constituído de 45 ciclos de duas etapas de 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C.

Além disso, obteve-se também uma amostra de HEV com carga viral conhecida (250.000 Unidades Internacionais - UI) e estabelecida pela *Organização Mundial de Saúde* (OMS) para a padronização das técnicas de PCR quantitativo em tempo real (110, 111). Essa amostra foi submetida a diluições seriadas (Figura 11) na proporção de 1:10, para obtenção de uma curva padrão, a partir da qual se tornou possível quantificar os níveis de HEV RNA nas amostras positivas e também estabelecer o limite de detecção e quantificação do PCR quantitativo em tempo real.

Figura 11 – Diluição seriada a partir da amostra controle (1:10).

A fim de determinar a sensibilidade da técnica de PCR quantitativo em tempo real, foi realizada a diluição de pontos internos com cargas virais de 125 UI, 62,5 UI, 31,25 UI e 12,5 UI a partir do ponto de diluição de 250 UI. Tendo

todos estes pontos diluídos e o ponto de 25UI, 10 replicatas dos mesmos foram submetidas à reação de PCR em tempo real.

Todas as amostras foram testadas em triplicata para favorecer a detecção de um baixo número de moléculas de HEV RNA. A carga viral de cada amostra foi determinada através da plotagem do resultado do Cycle Threshold – Ct (ciclo no qual a fluorescência de amplificação ultrapassa o eixo a partir do qual a amostra é considerada positiva) obtido por amostra contra os Cts obtidos a partir da curva padrão (Figura 12). Os resultados foram expressos em UI (Unidades Internacionais) por ml.

Figura 12 – Curva padrão da técnica de PCR quantitativo em tempo real.

3.5 NESTED PCR

3.5.1 Seleção de primers

As amostras que apresentaram carga viral detectada pelo PCR quantitativo em tempo real foram submetidas à reação de *Nested* PCR, com a finalidade de gerar amplicons, para posterior sequenciamento e caracterização do genótipo viral.

Diversos trabalhos foram publicados recentemente discutindo os problemas relacionados com a sensibilidade das metodologias de *Nested* PCR disponíveis para a amplificação do HEV RNA, os quais têm mostrado resultados extremamente variáveis. Tal variabilidade é decorrente da região genômica onde anelam os primers e também da diversidade genética do vírus (112, 113).

Após o levantamento das metodologias utilizadas entre os estudos já publicados, um conjunto de *primers*, previamente testado e com melhor sensibilidade e possibilidade de detecção dos diferentes genótipos do HEV, foi selecionado. Estes iniciadores anelam na região MTase (Metiltransferase) da ORF 1 (Quadro 2), produzindo um produto final de 172 pb (31, 114).

Quadro 2 – Conjunto de primers utilizados na reação de *Nested* PCR para amplificação de um fragmento da ORF1.

Identificação	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	Tamanho do amplicon gerado	Posição do <i>primer</i> (5' - 3')
HEV-1679	CCAYCAGTTYATHAAGGCTCC	348 (1ª fase do <i>Nested</i> PCR)	36-56
HEV-1680	TACCAVCGCTGRACRTC		383-367
HEV-1681	CTCCTGGCRTYACWACTGC	172 (2ª fase do <i>Nested</i> PCR)	53-71
HEV-1682	GGRTGRTTCCAIARVACYTC		224-205

3.5.2 Reação de transcrição reversa e amplificação por Nested PCR

A amplificação foi realizada utilizando-se uma reação de *One Step Nested* PCR, a qual combina a síntese de cDNA (transcrição reversa) e a reação de amplificação no mesmo tubo. Para isso, empregou-se o uso do kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Foster City, CA, USA) e os pares de *primers* HEV 1679/ HEV 1680 e HEV 1681/ HEV 1682 para a primeira e segunda etapa da *Nested* PCR, respectivamente. Para as duas etapas de amplificação foram realizados 40 ciclos de variação de temperatura em termociclador MasterCycler® EPGradiente S Eppendorf® (Eppendorf, Canadá). Durante a primeira etapa, as amostras foram inicialmente submetidas a 50°C por 30 minutos, para a realização da transcrição reversa. Posteriormente, foram realizados os seguintes ciclos de variação de temperatura após uma etapa de incubação inicial a 94°C por 2 minutos: 94°C por 15 segundos, 51°C por 30 segundos e 68°C por 30 segundos. Na segunda etapa da reação, realizou-se uma nova ciclagem de temperatura a partir da incubação inicial a 94°C por 2 minutos: 40 ciclos a 94°C por 15 segundos, 48°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Para a segunda etapa de amplificação foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies).

Para determinar a sensibilidade da técnica de *Nested* PCR, a amostra de HEV com carga viral previamente conhecida (250.000 UI) e estabelecida pela *Organização Mundial de Saúde* (OMS) foi submetida a diluições seriadas, obtendo-se cinco pontos de diluição com concentrações na proporção de 1:10 (250.000 UI, 25.000 UI, 2.500UI, 250 UI e 25 UI), como realizado na reação de PCR em tempo real. Posteriormente foi realizada a diluição de pontos internos com cargas virais de 125 UI, 62,5 UI, 31,25 UI e 12,5 UI a partir do ponto de diluição de 250 UI. Tendo todos estes pontos diluídos e o ponto de 25 UI, os mesmos foram submetidos à reação de *Nested* PCR em 10 replicatas.

3.5.3 Detecção do DNA amplificado

A detecção do DNA amplificado foi realizada em agarose UltraPure™ Low Melting Point (Invitrogen, Life Technologies) 4% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), no qual se realizou a eletroforese das amostras juntamente com o marcador de tamanho molecular 50 pb DNA Ladder (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para identificação do tamanho do amplicon gerado.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis obtidas foram codificadas e digitadas em banco de dados (MS-Excel, 2013), onde tiveram sua consistência averiguada. Os dados categóricos foram descritos através de suas frequências absolutas e relativas. Os dados contínuos foram descritos através de suas medianas como medida de tendência central e intervalos interquartílicos como medida de dispersão. Como prova estatística para comparação de proporções foi utilizado o teste de Qui-quadrado de Pearson. As variáveis contínuas foram comparadas entre si através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os valores calculados do “ p ” foram bicaudados, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. A análise estatística das variáveis em estudo foi realizada através do software SPSS versão 20.0 (SPSS inc, 2011).

3.7 ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA

Todos os experimentos foram executados no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da Faculdade de Medicina da USP, o qual possui as condições de biossegurança necessárias para a manipulação de todo o material utilizado neste trabalho. O

descarte de material biológico e químico seguiu todas as normas de biossegurança já empregadas no IMT.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 Grupos de estudo

Neste trabalho foi proposta a distribuição das amostras estudadas (coletadas retrospectivamente e prospectivamente) em dois grupos: coinfectados (Coinfectados HIV/ HCV, Coinfectados HIV/ HBV e Coinfectados HIV/ HBV/ HCV) e monoinfectados pelo HIV (Monoinfectados HIV). Com base no resultado das sorologias para infecção pelos vírus B e C de cada paciente, foi possível locar todas as amostras entre os subgrupos de coinfectados.

A casuística analisada, então, segue organizada em dois grupos: Coinfectados (n=261) e Monoinfectados (n=93) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Organização das amostras em grupos de estudo.

4.2 PESQUISA DOS MARCADORES SOROLÓGICOS

Todas as 354 amostras foram submetidas à técnica de ELISA para detecção dos anticorpos anti-HEV IgM e IgG, dentre as quais, algumas apresentaram critérios para confirmação através do Immunoblotting (Tabela 1).

Tabela 1 – Amostras que apresentaram critérios para confirmação dos resultados obtidos pelo ELISA através do Immunoblotting.

Immunoblotting IgM		Immunoblotting IgG	
<i>Amostra</i>	<i>Crítérios para repetição</i>	<i>Amostra</i>	<i>Crítérios para repetição</i>
CC_22	ELISA IgM Positivo Isolado	CC_22	ELISA IgM Positivo Isolado
ER_64	ELISA IgM Positivo Isolado	CB_34	ELISA IgG Indeterminado
ER_143	ELISA IgM Positivo Isolado	ER_64	ELISA IgM Positivo Isolado
ER_160	ELISA IgM Positivo Isolado	ER_89	ELISA IgG Indeterminado
		ER_143	ELISA IgM Positivo Isolado
		ER_160	ELISA IgM Positivo Isolado

Após a realização dos testes sorológicos e confirmação dos resultados indefinidos, encontrou-se uma prevalência de anticorpos anti-HEV IgM e IgG de 1,4% (5/ 354) e 10,7% (38/ 354), respectivamente, sendo que apenas duas das amostras analisadas apresentaram soropositividade simultânea para os anticorpos de ambas as classes.

4.3 PESQUISA DO HEV RNA

4.3.1 PCR quantitativo em tempo real

Todas as 354 amostras coletadas foram submetidas à pesquisa de HEV-RNA empregando-se a metodologia de PCR quantitativo em tempo real descrita anteriormente.

Para determinar a sensibilidade da técnica de PCR quantitativo em tempo real, os pontos de diluição com cargas virais de 125 UI, 62,5 UI, 31,25 UI, 25 UI e 12,5 UI foram submetidos, em 10 replicatas cada, à reação de PCR em tempo real. Obteve-se, então, uma porcentagem de amplificação bem variável desses pontos, destacando-se o ponto de 125 UI, do qual se obteve amplificação em 90% das replicatas. Os pontos com cargas virais de 62,5 UI, 31,25 UI, 25 UI e 12,5 UI apresentaram porcentagens de amplificação baixas: 30%, 30%, 20% e 40%, respectivamente. Sendo assim, foi determinado que o limite de detecção desta técnica é de 125 UI/ml.

A carga viral de cada amostra foi determinada através da plotagem do resultado do Ct obtido por amostra contra os Cts obtidos a partir da curva padrão (Figura 13). Os resultados foram expressos em UI (Unidades Internacionais) por ml.

Figura 13 – Esquematização gráfica do PCR quantitativo em tempo real para amplificação de um fragmento da ORF3 do HEV RNA. Os números de 1 a 5 referem-se à curva de amplificação dos pontos de diluição com cargas virais de 250.000 UI, 25.000 UI, 2.500 UI, 250 UI e 25 UI, respectivamente. Destaca-se, também, uma das curvas de amplificação referente a uma das amostras testadas em que o HEV RNA foi detectado nesta placa.

Observa-se, além das curvas de amplificação correspondentes aos pontos de diluição, uma curva de amplificação referente a uma das amostras testadas.

Em 38 (10,7%) amostras foi possível detectar o HEV RNA pela PCR em tempo real. A média da carga viral detectada foi de 20,8 UI/ml (0,74 - 173,87). Dentre as amostras com HEV RNA detectável, apenas seis apresentaram simultaneamente algum marcador sorológico (1 anti-HEV IgM e 5 anti-HEV IgG).

As amostras em que foram detectados marcadores de infecção pelo HEV foram classificadas em quatro grupos: Sorologia positiva (anti-HEV IgM e/ ou IgG) ($n=35$), PCR HEV RNA detectável ($n=32$), Sorologia positiva e PCR HEV

RNA detectável ($n=6$) e Sem marcadores ($n=281$). Entretanto, para a análise estatística, o grupo Sorologia positiva e PCR HEV RNA detectável ($n=6$) foi excluído por apresentar uma amostragem muito pequena, e inserido no grupo PCR HEV RNA detectável, já que a pesquisa de marcador molecular apresenta maior valor diagnóstico em pacientes com quadro de imunossupressão. O gráfico abaixo demonstra a distribuição relativa dos marcadores de infecção pelo HEV entre os grupos de infecção pelo HIV (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Distribuição relativa dos grupos de infecção pelo HIV de acordo com o grupo de marcadores de infecção pelo HEV.

Pôde-se observar, através da leitura do gráfico acima, uma frequência maior de Coinfectados HIV/ HCV no grupo PCR HEV RNA detectável. Não houve diferença estatística entre a presença de marcadores sorológicos para infecção pelo HEV nas populações de coinfectados pelo HIV.

4.3.2 Nested PCR

Com a finalidade de gerar amplicons para posterior sequenciamento e caracterização do genótipo viral, as amostras que apresentaram carga viral detectada por PCR em tempo real foram submetidas à reação de *One Step Nested PCR*.

A fim de se determinar a sensibilidade desta técnica, a amostra (250.000 UI) e os pontos diluídos (25.000 UI, 2.500 UI, 250 UI e 25 UI) a partir da mesma, foram submetidos a reação de *Nested PCR*. Foi possível amplificar a amostra e todas as diluições com essa metodologia. Posteriormente foi realizada a diluição de pontos internos com cargas virais de 125 UI, 62,5 UI, 31,25 UI e 12,5 UI a partir do ponto de diluição de 250 UI. Tendo todos estes pontos diluídos e o ponto de 25 UI, os mesmos foram submetidos à reação de *Nested PCR* em 10 replicatas. Obteve-se, então, uma porcentagem de amplificação bem variável desses pontos diluídos. Os pontos com cargas virais de 125 UI, 62,5 UI, 31,25 UI, 25 UI e 12,5 UI apresentaram porcentagens de amplificação baixas: 20%, 10%, 10%, 10% e 0, respectivamente. Sendo assim, foi determinado que o limite de detecção desta técnica é de 250 UI/ ml.

Essa metodologia foi aplicada às amostras nas quais foi possível detectar HEV RNA por PCR em tempo real, entretanto, em nenhuma delas foi possível obter o amplicon esperado e, conseqüentemente, não foi possível a caracterização do genótipo viral envolvido nessas infecções.

4.4 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Foi realizado o levantamento dos dados demográficos e clínicos dos pacientes cujas amostras foram incluídas nesse estudo, contudo nem todas as informações de interesse estavam disponíveis nos prontuários dos pacientes ou banco de dados.

Cerca de 72% dos indivíduos envolvidos no estudo são do sexo masculino e a média de idade entre a população avaliada, de 48,4 anos. Entre os grupos de infecção pelo HIV, observou-se uma frequência maior do gênero masculino entre os Coinfectados HIV/ HBV (89,4%) e Coinfectados HIV/ HBV/ HCV (78%) ($p<0,001$). Os níveis de ALT e AST (em medianas) apresentaram significância estatística na comparação entre os grupos de infecção pelo HIV, sendo mais elevados entre os indivíduos dos grupos Coinfectados HIV/ HCV e Coinfectados HIV/ HBV/ HCV ($p<0,001$). Igualmente, as proporções de indivíduos com ALT e AST $>1,5 \times \text{LSN}$ foram maiores nesses dois grupos ($p<0,001$). Embora não tenha sido observado diferença estatisticamente relevante entre os grupos de infecção pelo HIV quanto à idade, contagem de CD4+, carga viral e terapia antirretroviral para o HIV, é interessante ressaltar que, entre os indivíduos que dispunham desses dados clínicos, 83,5% apresentavam carga viral indetectável, 97% faziam uso de terapia antirretroviral e 89,3% tinham níveis de CD4+ >200 cels/mm³ (Tabela 2).

Não houve associação entre sexo e os grupos de marcadores de infecção pelo HEV, entretanto, verificou-se uma tendência a maior frequência de indivíduos do sexo masculino nos grupos Sorologia positiva e Sem marcadores ($p=0,062$). Os níveis de AST e ALT (em medianas) não diferiram entre os grupos, no entanto, a proporção de indivíduos com AST e ALT $>1,5 \times \text{LSN}$ foi significativamente maior no grupo PCR HEV RNA detectável. Não houve diferença estatisticamente relevante entre os grupos de marcadores de infecção pelo HEV em relação à idade, contagem de CD4+, carga viral e terapia antirretroviral para o HIV (Tabela 3). É importante lembrar que para análise estatística o grupo Sorologia positiva e PCR HEV RNA detectável (n=6) foi inserido no grupo PCR HEV RNA detectável

Tabela 2 – Distribuição de características clínicas e laboratoriais de acordo com o grupo de infecção pelo HIV.

Características	Monoinfectados HIV	Coinfectados HIV/HCV	Coinfectados HIV/HBV	Coinfectados HIV/HBV/HCV	Total	p-valor
Sexo masculino (n, %)	48/93 (51,6)	39/69 (56,5)	127/142 (89,4)	39/50 (78)	253/354 (71,5)	<0,001[#]
Idade (mediana, IQR)	48 (41-56)	46 (43-53)	47,5 (42-55)	47,5 (44-53)	48 (42-55)	0,878 ^{\$}
Idade ≥ 40 anos (n, %)	77/93 (82,8)	25/27 (92,6)	107/124 (86,3)	32/34 (94,1)	241/278 (86,7)	0,298 [#]
CD4+ em cel/mm³ (mediana, IQR)	584 (359,2-772,7)	514 (383,5-706)	524 (340-754)	506 (306-872)	530,5 (348,2-763,5)	0,853 ^{\$}
CD4+ ≥ 200 cel/mm³ (n, %)	84/92 (91,3)	54/61 (88,5)	102/115 (88,7)	35/40 (87,5)	275/308 (89,3)	0,896 [#]
Carga viral HIV indetectável (<50 cópias/ml) (n, %)	71/92 (77,2)	58/61 (91,8)	58/70 (82,9)	33/38 (86,8)	218/261 (83,5)	0,109 [#]
Terapia antirretroviral HIV (n, %)	68/68 (100)	57/59 (96,6)	100/104 (96,2)	33/35 (94,3)	258/266 (97)	0,352 [#]
AST em UI/L (mediana, IQR)	22 (17-26) ^a	45 (29-74) ^b	25 (19-34) ^c	37 (26,5-60,5) ^{b,d}	27 (20-39)	<0,001^{\$}
AST (>1.5x LSN) (n, %)	1/92 (1,1)	22/63 (34,9)	7/123 (5,7)	13/45 (28,9)	43/323 (13,3)	<0,001[#]
ALT em UI/L (mediana, IQR)	23,5 (14-28,7) ^a	50 (29-79) ^b	27 (18-44) ^c	38 (28,5-59,5) ^{b,d}	28 (19-49)	<0,001^{\$}
ALT (>1.5x LSN) (n, %)	2/92 (2,2)	25/63 (39,7)	13/123 (10,6)	12/45 (26,7)	52/323 (16,1)	<0,001[#]
Sem marcadores (n, %)	80/93 (86)	48/69 (69,6)	112/142 (78,9)	41/50 (82)	281/354 (79,4)	
Sorologia positiva (n, %)	8/93 (8,6)	5/69 (7,2)	18/142 (12,7)	4/50 (8)	35/354 (9,9)	
PCR HEV RNA detectável (n, %)	5/93 (5,4)	13/69 (18,9)	10/142 (7)	4/50 (8)	32/354 (9)	
Sorologia positiva e PCR HEV RNA detectável (n, %)	0/93 (0)	3/69 (4,3)	2/142 (1,4)	1/50 (2)	6/354 (1,7)	

Dados contínuos apresentados em mediana e intervalo interquartilico (IQR)

Dados categóricos expressos como número absoluto e porcentagem

\$ Teste de Kruskal-Wallis

Teste de Qui quadrado de Pearson

Grupos com letras não compartilhadas correspondem a diferenças estatisticamente significantes

LSN: limite superior da normalidade

Tabela 3 – Distribuição das características clínicas e laboratoriais de acordo com o grupo de marcadores de infecção pelo HEV.

Características	PCR HEV RNA detectável	Sorologia positiva	Sem marcadores	p-valor
Sexo masculino (n, %)	21/38 (55,3)	25/35 (71,4)	207/281 (73,3)	0,062 [#]
Idade (mediana, IQR)	46,5 (40,5-55)	48 (44-57,7)	48 (42-54,2)	0,410 ^{\$}
Idade ≥ 40 anos (n, %)	20/24 (83,3)	26/28 (92,9)	195/226 (86,3)	0,552 [#]
CD4+ em cel/mm³ (mediana, IQR)	477,5 (316,7-800,5)	538 (344,2-773,7)	545,5 (350,7-756)	0,561 ^{\$}
CD4+ ≥ 200 cel/mm³ (n, %)	31/36 (86,1)	25/30 (83,3)	219/242 (90,5)	0,394 [#]
Carga viral HIV indetectável (<50 cópias/mL) (n, %)	28/30 (93,3)	24/26 (92,3)	166/205 (81)	0,104 [#]
Terapia antirretroviral HIV (n, %)	31/34 (97,1)	23/23 (100)	202/209 (96,7)	0,671 [#]
AST em UI/L (mediana, IQR)	39 (20-67,0)	29 (22-38)	26 (19-37)	0,097 ^{\$}
AST (>1.5x LSN) (n, %)	11/35 (31,4)	5/31 (16,1)	27/257 (10,5)	0,003[#]
ALT em UI/L (mediana, IQR)	35 (18-70)	29 (10-49)	27 (19-43)	0,165 ^{\$}
ALT (>1.5x LSN) (n, %)	13/35 (37,1)	4/31 (12,9)	35/257 (13,6)	0,002[#]

Dados contínuos apresentados em mediana e intervalo interquartilico (IQR);

Dados categóricos expressos como número absoluto e porcentagem;

\$ Teste de Kruskal-Wallis;

Teste de Qui quadrado de Pearson;

Grupos com letras não compartilhadas correspondem a diferenças estatisticamente significantes;

LSN: limite superior da normalidade

Discussão

5 DISCUSSÃO

O recente interesse pelo HEV e seu papel na evolução para hepatite crônica em indivíduos imunocomprometidos estimulou o desenvolvimento de estudos de prevalência dos anticorpos anti-HEV em indivíduos portadores do HIV em diversas regiões do mundo.

No Brasil, os dados referentes à soroprevalência do HEV ainda são bastante limitados, mas é possível observar a variabilidade das taxas de prevalência relatadas nos estudos, as quais variam de acordo com a região geográfica e grupo populacional avaliados. O presente estudo estimou uma prevalência de 10,7% (38/ 354) e 1,4% (5/354) de anticorpos anti-HEV IgG e IgM, respectivamente, na população de portadores do HIV em São Paulo – SP. Utilizou-se, para isso, os kits de ELISA RecomWell HEV IgM/ IgG MIKROGEN® (Mikrogen, Neuried, Germany) e, em casos já especificados, a confirmação dos mesmos através do Immunoblotting RecomLine IgM/ IgG MIKROGEN® (Mikrogen, Neuried, Germany).

A grande variabilidade na sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos disponíveis para pesquisa de anticorpos contra o HEV também está relacionada com a discrepância encontrada na prevalência do HEV no Brasil e em diversas regiões do mundo (115-117). Alguns estudos avaliaram a performance dos diferentes testes sorológicos atualmente disponíveis, contudo algumas questões permanecem controversas em relação à sensibilidade e especificidade dos mesmos. O RecomWell HEV IgM/ IgG MIKROGEN® (Mikrogen, Neuried, Germany) apresenta ótimo desempenho, sendo altamente sensível e específico. No entanto, tem mostrado maior sensibilidade na detecção de anticorpos IgM do que na detecção de anticorpos IgG. Entre os kits disponibilizados recentemente, destaca-se também o WANTAI® (Wantai Biological Pharmacy Enterprise, Beijing, China), cuja performance confere uma sensibilidade ligeiramente maior na infecção aguda em pacientes imunocomprometidos. Técnicas *in house* também já foram realizadas e comparadas aos kits disponíveis comercialmente (115-117).

Não existem estudos publicados acerca da infecção pelo vírus E em pacientes soropositivos no Brasil, apenas um estudo envolvendo transplantados renais, outra população com comprometimento imunológico, foi realizado em São Paulo. Nessa população a pesquisa de anti-HEV IgG foi realizada com o mesmo kit sorológico empregado no presente estudo e a prevalência encontrada foi de 15% (28/96) (81). Um outro estudo utilizando a mesma metodologia foi realizado recentemente em Goiânia, envolvendo uma população de catadores de material reciclável, na qual foi observada uma prevalência de 5,1% de anti-HEV IgG (60). Esses resultados sugerem uma maior prevalência de anticorpos anti-HEV IgG tanto na população de portadores do HIV, quanto entre pacientes submetidos a transplante renal. Ademais, é possível que nessas duas populações de indivíduos com comprometimento imunológico, a infecção pelo HEV ocorra até com maior frequência do que é possível detectar pelos testes sorológicos, haja vista que diante do quadro de imunodepressão e imunossupressão a soroconversão pode não ocorrer.

No Vale do Itajaí, em Santa Catarina, encontrou-se uma prevalência de anti-HEV IgG de 10% (30/ 300) entre doadores de sangue, bem próxima, portanto, à encontrada no presente estudo. Apesar disso, os kits sorológicos utilizados diferem entre ambos os trabalhos. Os autores sugerem que a presença deste marcador na frequência em que foi observada entre doadores provenientes de Santa Catarina pode estar associada, principalmente, ao consumo de carne suína, hábito muito comum na região devido à origem germânica da população (58).

Passos-Castilho et al. (2015b) verificaram também, através da análise de registros laboratoriais de testes para anti-HEV realizados entre 1998 e 2013 em um grande laboratório de análises clínicas de São Paulo, o qual compreende uma extensa área do sul ao nordeste do país, uma prevalência de 2,1% para este anticorpo, similar à encontrada em estudos envolvendo doadores de sangue realizados em períodos anteriores: Campinas (3%), Londrina (2,3%) e Rio de Janeiro (4,3%) (54, 55, 57).

O Brasil, de maneira geral, não é considerado um país endêmico para a infecção pelo HEV, entretanto, determinados grupos, quando analisados,

revelaram uma soroprevalência ligeiramente superior à encontrada na população geral e no presente estudo, como se pode observar em Campinas, uma prevalência de 17,7% entre mulheres com comportamento de risco para aquisição do HIV, e de 11,8% em usuários de drogas injetáveis no Rio de Janeiro (54, 55). Isso pode estar associado, de certa forma, a uma maior exposição ao vírus entre essas populações, bem como às diferenças epidemiológicas entre as regiões analisadas, contudo há necessidade de se realizar estudos com homogeneidade metodológica para excluir a dúvida quanto a influência das diferenças de sensibilidade e especificidade dos diferentes kits sorológicos utilizados.

Em várias regiões do mundo, a prevalência de anticorpos anti-HEV IgG em indivíduos portadores do HIV tem sido discrepante. Alguns trabalhos sugerem que a população de portadores do HIV tende a apresentar uma prevalência maior desse marcador quando comparada à população geral, porém, isso ainda é questionável, já que se trata de indivíduos com comprometimento da resposta imunológica e a soroconversão pode nunca ocorrer (106, 107). Entretanto, alguns trabalhos têm relatado uma soroprevalência semelhante à encontrada no presente estudo (10,7%), como no sul da França (9%), na região leste da Espanha (9%), no sudoeste do Reino Unido (9,4%), em Barcelona (9,2%), em Córdoba (9,6%) e na Grécia (7,3%) (80, 90, 94, 102, 104, 105).

Recentemente, um estudo conduzido na Espanha envolvendo pacientes infectados pelo HIV relatou uma prevalência de 29% nos casos (HIV+, com elevação de enzimas hepáticas) e de 16% nos controles (HIV+, sem elevação de enzimas hepáticas) do anticorpo anti-HEV IgG (118), superiores, portanto, à encontrada no presente trabalho. Fogeda et al., (2012) estimou uma soroprevalência baixa (1,08%) na população geral de Madrid – Espanha, característica do padrão não endêmico da infecção pelo HEV encontrado na Europa e no Brasil. Na Polônia, Europa Central, encontrou-se uma prevalência de 21,3% de anti-HEV IgG entre portadores de HIV (103).

Alguns estudos, porém, têm observado uma baixa prevalência de anticorpos anti-HEV IgG na população de soropositivos, como visto na Suíça

(2,6%), Paris (1,5%), Holanda (3,8%), norte da França (3%) e Alemanha (5%) (91, 94, 99-101).

Como já mencionado anteriormente, é possível que essa divergência possa estar associada à diversidade populacional estudada, bem como às diferenças epidemiológicas entre as regiões, além da variabilidade genotípica do vírus. No entanto, não se pode descartar que outra explicação para este fato se deva, também, às diferenças na sensibilidade e especificidade dos diversos métodos sorológicos utilizados, bem como à depleção da resposta imunológica em indivíduos imunocomprometidos, como acontece nos portadores do HIV.

A casuística de portadores do HIV avaliada no presente estudo é composta principalmente de indivíduos coinfectados pelo HBV e/ou HCV, o que se deve ao fato de terem sido incorporadas amostras de pacientes coinfectados coletadas anteriormente.

Em relação aos dados demográficos (idade e sexo) da casuística estudada, observou-se a predominância de indivíduos do sexo masculino (71,5%). Quanto à idade, a predominância foi de indivíduos acima de 40 anos, que constituíram 86,9% da população estudada. Quando esses dados foram avaliados de acordo com o grupo de infecção (monoinfectados ou coinfectados) não se observou variabilidade importante com relação a idade, mas se observou uma associação com significância estatística do sexo masculino com coinfecção pelo HBV.

Um estudo recente, que teve como objetivo estimar a prevalência de coinfecção HIV/ HBV e HIV/ HCV entre os casos notificados de AIDS no Brasil, mostrou a predominância de indivíduos do gênero masculino na população de infectados pelo HIV e também predominância de indivíduos acima de 40 anos. Esse estudo também mostrou a predominância de homens na população de coinfectados HIV/ HBV e HIV/ HCV, o que foi ainda mais frequente na população de coinfectados HIV/ HBV. Os autores relatam que isso está relacionado ao fato da principal fonte de transmissão do HIV e HBV ser sexual, o que também é observado entre os indivíduos coinfectados, particularmente entre homens que fazem sexo com homens, categoria que corresponde a 32% dos homens coinfectados (119).

Portando, a observação feita no presente estudo reflete o que é observado na população brasileira de indivíduos portadores do HIV. A frequência de homens que fazem sexo com homens não foi avaliada na casuística como um todo, mas em parte da casuística de indivíduos coinfectados HIV/HBV, cujas amostras haviam sido coletadas anteriormente, 72,4% dos homens estavam incluídos nessa categoria (120).

Através deste estudo, verificou-se que a presença de marcadores sorológicos do HEV não apresentou associação estatisticamente significativa com a coexistência, simultânea ou não, das infecções pelo HBV e HCV nos indivíduos infectados pelo HIV, o que também foi visto por Politou et al. (2015), em um estudo de soroprevalência do HEV em uma população de infectados pelo HIV na Grécia. Rivero-Juarez et al. (2014) e Mateos-Lindemann et al. (2014) também não observaram essa associação nos grupos de indivíduos infectados pelo HIV com ou sem infecção simultânea pelo HBV e/ ou HCV em estudos conduzidos na Espanha. Isso sugere que as infecções simultâneas pelo HBV e/ ou HCV na população de soropositivos não se associam com a infecção pelo HEV, entretanto, como se tratam de indivíduos com comprometimento imunológico, não se pode afastar a possibilidade, já amplamente observada, de que a soroconversão pode não ser observada nesses casos.

Os trabalhos acerca da infecção pelo HEV em humanos no Brasil têm demonstrado que as cepas circulantes se concentram nos subtipos do genótipo 3 (52, 82). Este genótipo também já foi detectado em amostras de suínos provenientes de diferentes estados brasileiros. No estado de São Paulo, o primeiro registro da circulação do vírus se deu a partir da detecção do HEV RNA nesses animais (64). Em suínos do Rio de Janeiro (62), Pará (63), Mato Grosso (53) e Paraná (121, 122), o HEV RNA já foi pesquisado e detectado. Os casos publicados de infecção aguda e crônica pelo HEV em indivíduos portadores do HIV no mundo também pertencem ao genótipo 3 do vírus (77, 80, 89-91, 123).

A técnica de PCR quantitativo em tempo real padronizada neste trabalho possibilitou a detecção de baixas cargas virais de acordo com os testes

realizados utilizando o padrão da OMS, demonstrando, portanto, ter uma boa sensibilidade.

Um estudo que avaliou diferentes ensaios de PCR incluindo, principalmente testes desenvolvidos “*in house*”, para a detecção do HEV RNA demonstrou diferenças de sensibilidade que variaram de 100 a 1000 vezes (111). Um dos fatores que influenciam a sensibilidade é a região genômica alvo do anelamento dos primers e sondas utilizados na reação, pois o genoma do HEV apresenta regiões de grande variabilidade entre os diferentes genótipos e outras extremamente conservadas. A variabilidade genética dentro do próprio genótipo 3 (diferentes subtipos) tem se mostrado uma limitação para a adequada acurácia na quantificação da carga viral.

Diversos estudos têm demonstrado que a utilização de protocolos baseados na ORF3 são os mais sensíveis para a detecção dos diferentes genótipos do HEV, assim como para a quantificação dos diferentes subtipos do genótipo 3 do HEV (124).

No presente estudo foram utilizados primers e sonda que anelam na ORF3 do genoma viral, o que confere ao método alta sensibilidade e capacidade de detectar os genótipos (1 a 4) que afetam humanos.

Além disso, as amostras destinadas à reação de PCR em tempo real foram avaliadas em triplicata com a finalidade de superar a limitação da distribuição de Poisson, a qual prediz que, em um grande número de replicatas contendo em média uma cópia de template iniciador, aproximadamente 37% das mesmas não devem conter nenhuma cópia. Observou-se um padrão característico entre as amostras em que o HEV RNA foi detectado pela PCR em tempo real, as baixas cargas virais. Essa foi uma importante limitação do estudo, dada a impossibilidade, a partir das mesmas, de se obter os amplicons esperados através da reação de *Nested* PCR para o posterior sequenciamento por Sanger e genotipagem através de análise filogenética.

Outros estudos aplicando técnicas de sequenciamento de nova geração podem ser necessários para se conseguir a genotipagem dos casos com baixas cargas virais. Uma nova técnica que realiza a amplificação sem necessidade do

uso de primers específicos, associada ao sequenciamento de nova geração, tem sido utilizada para a caracterização de vírus RNA em amostras com baixos níveis de carga viral (125, 126). Tal metodologia foi aplicada em um estudo recentemente publicado possibilitando o diagnóstico de infecção pelo HBV e HEV em casos de hepatite aguda, cuja etiologia era desconhecida por não ser possível detectar esses e outros agentes causadores de hepatite através da pesquisa de marcadores sorológicos ou pela detecção dos genomas virais por PCR (127).

Neste estudo, os níveis de CD4, carga viral do HIV e uso de antirretrovirais para o tratamento da infecção pelo HIV não apresentaram associação estatisticamente relevante com a presença e ausência de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo HEV. Contudo, Crum-Cianflone et al. (2012) observaram que a soropositividade do HEV encontrada estava associada diretamente aos altos níveis de HIV RNA no plasma e à baixa contagem de células CD4. A carga viral do HIV e os níveis de CD4 podem, de fato, desenvolver um importante papel na persistência da infecção pelo HEV, já que estão intimamente associados ao grau de imunodepressão do indivíduo, entretanto, nenhuma evidência dessa possível relação tem sido mostrada. Mateos-Lindemann et al. (2014) demonstraram que a presença de marcadores sorológicos não estava associada a níveis baixos de CD4, contudo, o único indivíduo em que o HEV RNA foi detectado apresentou baixa contagem de células CD4.

Considerando os resultados desses estudos, é possível sugerir que o padrão de baixas cargas virais observado no presente estudo possa estar associado aos baixos níveis de imunodepressão dos pacientes avaliados e um maior controle de infecções oportunistas, uma vez que 86,1% dos mesmos apresentavam contagem de células CD4+ superior a 200 cels/mm³, 93,3% apresentavam carga viral do HIV indetectável e 97,1% faziam uso da terapia antirretroviral.

A padronização de uma PCR em tempo real capaz de detectar o HEV RNA é possivelmente a grande base diagnóstica da infecção pelo HEV em indivíduos imunocomprometidos, dada à depleção imunológica e a impossibilidade de soroconversão ou soroconversão tardia. Logo, testes sorológicos poderiam fornecer resultados falso-negativos como diagnóstico. É bem certo que o tempo de viremia dessa infecção é curto, mas diante da possibilidade de progressão para cronicidade nesses indivíduos, a pesquisa de HEV RNA continua sendo o método diagnóstico mais eficiente.

Além disso, o acompanhamento e o seguimento dos pacientes nos quais o HEV RNA foi detectado são importantes e pode se dar através da análise das possíveis alterações hepáticas por meio de dosagens mais frequentes das enzimas ALT e AST, bem como eventual realização de biópsias para se correlacionar a presença do vírus com lesões no fígado, principalmente pela pesquisa do HEV RNA no mesmo.

Neste estudo, apenas seis (1,7% - 6/354) amostras nas quais o HEV RNA foi detectado apresentaram simultaneamente algum marcador sorológico, anti-HEV IgG ou IgM. Alguns casos com presença de HEV RNA e ausência de anticorpos anti-HEV já foram descritos em portadores do HIV (91, 128). Isso ressalta a importância dos testes moleculares nesses indivíduos que podem apresentar uma soroconversão tardia ou até mesmo nunca soroconverterem. A ausência de anticorpos, apesar da viremia persistente, pode corresponder a baixas contagens de células CD4+. Cerca de 86% dos indivíduos pertencentes ao grupo PCR HEV RNA detectável neste trabalho apresentaram, contudo, níveis de CD4+ superiores a 200cels/mm³.

Encontrou-se no presente estudo uma prevalência de 10,7% (38/354) de HEV RNA na coorte avaliada. Na Inglaterra, um grupo constituído de 138 portadores de HIV foi avaliado através do uso de técnica de PCR em tempo real, entretanto, não foi detectado o HEV RNA em nenhum dos indivíduos (80). Em um estudo conduzido por Crum-Cianflone et al. (2012) envolvendo indivíduos portadores de HIV que recebem cuidados em uma instalação de tratamento militar, o HEV RNA foi detectado em um único caso (1/194), que posteriormente, soroconverteu no momento de elevação da ALT. No Irã, Ramezani et al., (2013)

avaliou um grupo de 100 indivíduos portadores de HIV, nos quais o HEV RNA não foi detectado. Em uma grande coorte de estudo constituída por 1544 adultos soropositivos provenientes de Gana e Camarões, o HEV RNA também não foi detectado (129). É notável a baixa detecção de HEV RNA entre os estudos realizados e isso pode estar associado ao curto período de viremia na infecção pelo HEV, à variabilidade genética do vírus que pode comprometer a especificidade de algumas técnicas moleculares e, principalmente, às baixas sensibilidades das metodologias utilizadas. Através do presente estudo, conseguiu-se padronizar uma PCR em tempo real que suprimisse essas limitações técnicas, o que pode justificar a superior prevalência.

Alguns estudos recentemente publicados envolvendo populações de infectados pelo HIV, tem utilizado a metodologia molecular para detecção do HEV RNA somente nos casos com sorologia previamente positiva (anti-HEV IgM e/ou IgG), não se levando em consideração a possibilidade de resultados sorológicos falso-negativos, dado o quadro de imunodepressão característico da evolução clínica nesses indivíduos. No presente estudo, atentou-se quanto a essa possibilidade, e todas as amostras, com ou sem sorologia previamente positiva, foram submetidas ao teste molecular padronizado, o que pode justificar parcialmente a prevalência de HEV RNA relativamente superior encontrada neste trabalho quando comparada a de outros estudos conduzidos em populações de soropositivos.

Como visto na literatura e nos recentes trabalhos publicados, um aumento moderado das enzimas hepáticas, AST e ALT principalmente, pode estar associado à infecção aguda e crônica pelo HEV. Neste trabalho, verificou-se que essas enzimas hepáticas estiveram mais elevadas no grupo em que o HEV RNA foi detectado, o que pode sugerir, portanto, um quadro de infecção ativa (aguda ou crônica) pelo HEV. Entretanto, essa elevação foi acentuada no grupo de coinfeção HIV/ HCV, podendo ser consequência também da ação do vírus C no fígado. Ramezani et al., (2013) verificou, em uma coorte de infectados pelo HIV, que o anti-HEV IgG foi detectado em 10% (10/100) destes indivíduos, entre os quais três apresentaram coinfeção pelo HCV. Entre os indivíduos com soropositividade para o HEV, dois apresentaram valores de ALT elevados, um

dos quais com infecção pelo vírus C. Em um estudo conduzido na Espanha, demonstrou-se que entre os indivíduos portadores do HIV em que a soropositividade do HEV foi detectada, 50% dos mesmos apresentavam coinfeção pelo HCV, 2,3% pelo HBV e 2,3% por ambos (105). Nota-se, diante dessas informações, que a presença simultânea da infecção pelo HCV e de marcadores sorológicos e/ou moleculares para a infecção pelo HEV é recorrente, e que a elevação de enzimas hepáticas ocorre, geralmente, nestes casos. É possível, também, que o aumento de ALT/ AST encontrado seja devido somente à presença do vírus C no fígado, como mencionado anteriormente. Além disso, não se pode descartar que entre estes vírus possa haver alguma possível relação, entretanto, estudos mais abrangentes são necessários para se esclarecer estes e outros questionamentos.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- Através da pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo HEV, foi possível constatar a circulação desse vírus entre a população de infectados pelo HIV em São Paulo – SP;
- A soroprevalência de anticorpos anti-HEV IgG entre a população de pacientes estudada foi de 10,7% (38/ 354);
- A prevalência de anticorpos anti-HEV IgM na população estudada foi de 1,4% (5/ 354), sendo que apenas dois desses casos apresentaram positividade simultânea para o anti-HEV IgG;
- A presença de HEV RNA foi detectada em 10,7% (38/354) dos indivíduos portadores de HIV estudados;
- A reação de PCR em tempo real padronizada mostrou-se sensível na detecção de baixas cargas virais do HEV;
- Não se observou concordância entre a detecção do HEV RNA e dos marcadores sorológicos na maioria dos pacientes com carga viral detectável;
- Foi observada uma proporção maior de indivíduos com AST e ALT > 1,5X LSN no grupo PCR HEV RNA detectável;
- No grupo PCR HEV RNA detectável houve uma maior frequência de Coinfectados HIV/ HCV em relação aos Monoinfectados HIV, Coinfectados HIV/ HBV e Coinfectados HIV/ HBV/ HCV.

Referências
Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kumar V, Das S, Jameel S. The biology and pathogenesis of hepatitis viruses. *Current Science*. 2010;98(3):312-25.
2. Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus research*. 2011;161(1):3-14.
3. Perez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: an emerging disease. *Infect Genet Evol*. 2014;22:40-59.
4. Fujiwara S, Yokokawa Y, Morino K, Hayasaka K, Kawabata M, Shimizu T. Chronic hepatitis E: a review of the literature. *J Viral Hepat*. 2014;21(2):78-89.
5. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20(1):23-31.
6. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 1991;185(1):120-31.
7. Miyamura T. Hepatitis E virus infection in developed countries. *Virus research*. 2011;161(1):40-6.
8. Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E: current status. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2009;24(9):1484-93.
9. Smith DB, Simmonds P, International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study G, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 10):2223-32.
10. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(1):116-38.
11. Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Journal of biosciences*. 2008;33(4):451-64.
12. Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus research*. 2011;161(1):47-58.

13. Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2007;127(2):216-28.
14. Holla RP, Ahmad I, Ahmad Z, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Seminars in liver disease.* 2013;33(1):3-14.
15. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in medical virology.* 2006;16(1):5-36.
16. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *Journal of hepatology.* 2008;48(3):494-503.
17. Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology.* 2012;142(6):1388-97 e1.
18. Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK. Hepatitis E virus: the current scenario. *Int J Infect Dis.* 2013;17(4):e228-33.
19. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al. Hepatitis E. *Lancet.* 2012;379(9835):2477-88.
20. Kmush B, Wierzba T, Krain L, Nelson K, Labrique AB. Epidemiology of hepatitis E in low- and middle-income countries of Asia and Africa. *Semin Liver Dis.* 2013;33(1):15-29.
21. Sridhar S, Lau SK, Woo PC. Hepatitis E: A disease of reemerging importance. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi.* 2015;114(8):681-90.
22. Teshale EH, Hu DJ. Hepatitis E: Epidemiology and prevention. *World journal of hepatology.* 2011;3(12):285-91.
23. Abravanel F, Lhomme S, Dubois M, Peron JM, Alric L, Kamar N, et al. Hepatitis E virus. *Med Mal Infect.* 2013;43(7):263-70.
24. Darwish MA, Faris R, Clemens JD, Rao MR, Edelman R. High seroprevalence of hepatitis A, B, C, and E viruses in residents in an Egyptian village in The Nile Delta: a pilot study. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;54(6):554-8.
25. Teshale EH, Grytdal SP, Howard C, Barry V, Kamili S, Drobeniuc J, et al. Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2010;50(7):1006-10.

26. Howard CM, Handzel T, Hill VR, Grytdal SP, Blanton C, Kamili S, et al. Novel risk factors associated with hepatitis E virus infection in a large outbreak in northern Uganda: results from a case-control study and environmental analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(5):1170-3.
27. CDC; CFDCa. Investigation of hepatitis E outbreak among refugees—upper Nile, South Sudan, 2012–2013. *Weekly.* 2013;62(29).
28. Arankalle VA, Chobe LP, Walimbe AM, Yergolkar PN, Jacob GP. Swine HEV infection in south India and phylogenetic analysis (1985-1999). *Journal of medical virology.* 2003;69(3):391-6.
29. Shukla P, Chauhan UK, Naik S, Anderson D, Aggarwal R. Hepatitis E virus infection among animals in northern India: an unlikely source of human disease. *Journal of viral hepatitis.* 2007;14(5):310-7.
30. Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *Journal of medical virology.* 2008;80(4):646-58.
31. Fogeda M, Avellon A, Cilla CG, Echevarria JM. Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *Journal of medical virology.* 2009;81(10):1743-9.
32. Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E. *Hepatology.* 2011;54(6):2218-26.
33. Cacciola I, Messineo F, Cacopardo B, Di Marco V, Galli C, Squadrito G, et al. Hepatitis E virus infection as a cause of acute hepatitis in Southern Italy. *Digestive and Liver Disease.* 2011;43(12):996-1000.
34. Tohme RA, Drobeniuc J, Sanchez R, Heseltine G, Alsip B, Kamili S, et al. Acute Hepatitis Associated With Autochthonous Hepatitis E Virus Infection-San Antonio, Texas, 2009. *Clinical Infectious Diseases.* 2011;53(8):793-6.
35. Duque V, Ventura C, Seixas D, Da Cunha S, Melico-Silvestre A. First report of acute autochthonous hepatitis E in Portugal. *Journal of infection in developing countries.* 2012;6(2):201-3.
36. Inoue J, Takahashi M, Ito K, Shimosegawa T, Okamoto H. Analysis of human and swine hepatitis E virus (HEV) isolates of genotype 3 in Japan that are only 81-83 % similar to reported HEV isolates of the same genotype over the entire genome. *The Journal of general virology.* 2006;87(Pt 8):2363-9.
37. La Rosa G, Muscillo M, Vennarucci VS, Garbuglia AR, La Scala P, Capobianchi MR. Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of travel-related

and autochthonous cases. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 7):1617-26.

38. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 2003;362(9381):371-3.

39. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, et al. 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. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 9):2351-7.

40. Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. 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*. 2004;330(2):501-5.

41. Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 3):912-7.

42. Mirazo S, Ramos N, Russi JC, Gagliano G, Arbiza J. Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human hepatitis E virus infection in Uruguay. *Archives of virology*. 2011;156(8):1451-4.

43. Munne MS, Altabert NR, Vladimirovsky SN, Moreira R, Mares LO, Soto SS, et al. Identifications of polyphyletic variants in acute hepatitis suggest an underdiagnosed circulation of hepatitis E virus in Argentina. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;52(2):138-41.

44. Dell'Amico MC, Cavallo A, Gonzales JL, Bonelli SI, Valda Y, Pieri A, et al. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and Swine, Bolivia. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(8):1488-90.

45. Munne MS, Vladimirovsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, et al. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *Journal of medical virology*. 2006;78(12):1579-83.

46. Rey JA, Findor JA, Daruich JR, Velazco CC, Igartua EB, Schmee E, et al. Prevalence of IgG Anti-HEV in Buenos Aires, a Nonendemic Area for Hepatitis E. *Journal of travel medicine*. 1997;4(2):100-1.

47. Cruells MR, Mescia G, Gaibisso R, Ramirez M, Gutierrez M, Kohen S, et al. [Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay]. *Gastroenterologia y hepatologia*. 1997;20(6):295-8.
48. Pujol FH, Favorov MO, Marcano T, Este JA, Magris M, Liprandi F, et al. Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. *Journal of medical virology*. 1994;42(3):234-6.
49. Bartoloni A, Bartalesi F, Roselli M, Mantella A, Arce CC, Paradisi F, et al. Prevalence of antibodies against hepatitis A and E viruses among rural populations of the Chaco region, south-eastern Bolivia. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 1999;4(9):596-601.
50. Lyra AC, Pinho JR, Silva LK, Sousa L, Saraceni CP, Braga EL, et al. HEV, TTV and GBV-C/HGV markers in patients with acute viral hepatitis. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(5):767-75.
51. Souto FJ, Fontes CJ, Parana R, Lyra LG. Short report: further evidence for hepatitis E in the Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997;57(2):149-50.
52. Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol*. 2010;47(3):276-9.
53. da Costa Lana MV, Gardinali NR, da Cruz RA, Lopes LL, Silva GS, Caramori Junior JG, et al. Evaluation of hepatitis E virus infection between different production systems of pigs in Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 2014;46(2):399-404.
54. Goncales NS, Pinho JR, Moreira RC, Saraceni CP, Spina AM, Stucchi RB, et al. Hepatitis E virus immunoglobulin G antibodies in different populations in Campinas, Brazil. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(5):813-6.
55. Trinta KS, Liberto MI, de Paula VS, Yoshida CF, Gaspar AM. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(1):25-9.
56. Assis SB, Souto FJ, Fontes CJ, Gaspar AM. [Prevalence of hepatitis A and E virus infection in school children of an Amazonian municipality in Mato Grosso State]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(2):155-8.
57. Bortoliero AL, Bonametti AM, Morimoto HK, Matsuo T, Reiche EM. Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood

donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Parana , Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2006;48(2):87-92.

58. Passos-Castilho AM, de Sena A, Geraldo A, Spada C, Granato CF. High prevalence of hepatitis E virus antibodies among blood donors in Southern Brazil. *Journal of medical virology*. 2015.

59. Passos-Castilho AM, Sena A, Reinaldo MR, Granato CF. Hepatitis E virus infection in Brazil: results of laboratory-based surveillance from 1998 to 2013. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015:0.

60. Martins RM, Freitas NR, Kozlowski A, Reis NR, Lopes CL, Teles SA, et al. Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a population of recyclable waste pickers in Brazil. *J Clin Virol*. 2014;59(3):188-91.

61. Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AM. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(2):117-22.

62. dos Santos DR, Vitral CL, de Paula VS, Marchevsky RS, Lopes JF, Gaspar AM, et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J*. 2009;182(3):474-80.

63. De Souza AS, Gomes-Gouvêa MS, Soares MCP, Pinho JRR, Malheiros AP, Carneiro LA, et al. Serological detection and molecular characterization of swine hepatitis E virus (HEV) in the Eastern Brazilian Amazon. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, in press. 2012.

64. Paiva HH, Tzaneva V, Haddad R, Yokosawa J. Molecular characterization of swine hepatitis E virus from southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007;38(4):693-8.

65. Guimaraes FR, Saddi TM, Vitral CL, Pinto MA, Gaspar AMC, Souto FJD. Hepatitis E virus antibodies in swine herds of MATO Grosso State, Central Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2005;36(3):223-6.

66. Sayed IM, Vercouter AS, Abdelwahab SF, Vercauteren K, Meuleman P. Is HEV an emerging problem in industrialized countries? *Hepatology*. 2015.

67. Khuroo MS, Kamili S, Dar MY, Moecklii R, Jameel S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet*. 1993;341(8856):1355.

68. Wang D, Wang X, Geng Y, An C. Detection of enterovirus 71 gene from clinical specimens by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification. *Indian journal of medical microbiology*. 2014;32(2):124-9.

69. Kar P, Jilani N, Husain SA, Pasha ST, Anand R, Rai A, et al. Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am J Gastroenterol*. 2008;103(10):2495-501.
70. Borkakoti J, Hazam RK, Mohammad A, Kumar A, Kar P. Does high viral load of hepatitis E virus influence the severity and prognosis of acute liver failure during pregnancy? *Journal of medical virology*. 2013;85(4):620-6.
71. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int*. 2008;28(9):1190-9.
72. Gad YZ, Mousa N, Shams M, Elewa A. Seroprevalence of subclinical HEV infection in asymptomatic, apparently healthy, pregnant women in Dakahlyia Governorate, Egypt. *Asian journal of transfusion science*. 2011;5(2):136-9.
73. Dalton HR, Bendall RP, Rashid M, Ellis V, Ali R, Ramnarace R, et al. Host risk factors and autochthonous hepatitis E infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(12):1200-5.
74. Kumar Acharya S, Kumar Sharma P, Singh R, Kumar Mohanty S, Madan K, Kumar Jha J, et al. Hepatitis E virus (HEV) infection in patients with cirrhosis is associated with rapid decompensation and death. *J Hepatol*. 2007;46(3):387-94.
75. Peron JM, Dalton H, Izopet J, Kamar N. Acute autochthonous hepatitis E in western patients with underlying chronic liver disease: a role for ribavirin? *J Hepatol*. 2011;54(6):1323-4; author reply 4-5.
76. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *The New England journal of medicine*. 2008;358(8):811-7.
77. Kaba M, Richet H, Ravaux I, Moreau J, Poizot-Martin I, Motte A, et al. Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Journal of medical virology*. 2011;83(10):1704-16.
78. Bihl F, Negro F. Chronic hepatitis E in the immunosuppressed: a new source of trouble? *Journal of hepatology*. 2009;50(2):435-7.
79. Halleux D, Kanaan N, Kabamba B, Thomas I, Hassoun Z. Hepatitis E virus: an underdiagnosed cause of chronic hepatitis in renal transplant recipients. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2012;14(1):99-102.

80. Keane F, Gompels M, Bendall R, Drayton R, Jennings L, Black J, et al. Hepatitis E virus coinfection in patients with HIV infection. *HIV medicine*. 2012;13(1):83-8.
81. Hering T, Passos AM, Perez RM, Bilar J, Fragano D, Granato C, et al. Past and current hepatitis E virus infection in renal transplant patients. *Journal of medical virology*. 2014;86(6):948-53.
82. Passos AM, Heringer TP, Medina-Pestana JO, Ferraz ML, Granato CF. First report and molecular characterization of hepatitis E virus infection in renal transplant recipients in Brazil. *Journal of medical virology*. 2013;85(4):615-9.
83. Geng Y, Zhang H, Huang W, T JH, Geng K, Li Z, et al. Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Hepatitis monthly*. 2014;14(1):e15618.
84. Kamar N, Rostaing L, Izopet J. Hepatitis E virus infection in immunosuppressed patients: natural history and therapy. *Semin Liver Dis*. 2013;33(1):62-70.
85. Moal V, Textoris J, Ben Amara A, Mehraj V, Berland Y, Colson P, et al. Chronic hepatitis E virus infection is specifically associated with an interferon-related transcriptional program. *J Infect Dis*. 2013;207(1):125-32.
86. Khudyakov Y, Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus research*. 2011;161(1):84-92.
87. Herremans M, Bakker J, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007;14(5):562-8.
88. Colson P, Kaba M, Moreau J, Brouqui P. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;45(4):269-71.
89. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *The New England journal of medicine*. 2009;361(10):1025-7.
90. Jardi R, Crespo M, Homs M, Van den Eyden E, Girones R, Rodriguez-Manzano J, et al. HIV, HEV and cirrhosis: evidence of a possible link from eastern Spain. *HIV medicine*. 2012.

91. Kenfak-Foguena A, Schoni-Affolter F, Burgisser P, Witteck A, Darling KE, Kovari H, et al. Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(6):1074-8.
92. Singh GJ, Rockwood N, Atkins M, Gazzard B, Ijaz S, Tedder R, et al. Chronic hepatitis E in HIV as a cause for cryptogenic cirrhosis. *HIV medicine*. 2011;12:44-.
93. Rodriguez-Frias F, Jardi R, Buti M. [Hepatitis E: Molecular virology, epidemiology and pathogenesis.]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2012.
94. Renou C, Lafeuillade A, Cadranel JF, Pavio N, Pariente A, Allegre T, et al. Hepatitis E virus in HIV-infected patients. *AIDS*. 2010;24(10):1493-9.
95. Sellier P, Mazon MC, Tesse S, Badsì E, Evans J, Magnier JD, et al. Hepatitis E Virus infection in HIV-infected patients with elevated serum transaminases levels. *Virology Journal*. 2011;8.
96. Dalton HR, Hunter JG, Bendall R. Autochthonous hepatitis E in developed countries and HEV/HIV coinfection. *Semin Liver Dis*. 2013;33(1):50-61.
97. Payne BA, Medhi M, Ijaz S, Valappil M, Savage EJ, Gill ON, et al. Hepatitis E virus seroprevalence among men who have sex with men, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(2):333-5.
98. Kaba M, Brouqui P, Richet H, Badiaga S, Gallian P, Raoult D, et al. Hepatitis E virus infection in sheltered homeless persons, France. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(11):1761-3.
99. Maylin S, Stephan R, Molina JM, Peraldi MN, Scieux C, Nicand E, et al. Prevalence of antibodies and RNA genome of hepatitis E virus in a cohort of French immunocompromised. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012.
100. van Welzen BJ, Verduyn Lunel FM, Meindertsma F, Hoepelman AI, Arends JE. Hepatitis E virus as a causative agent of unexplained liver enzyme elevations in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;60(2):e65-7.
101. Pischke S, Ho H, Urbanek F, Meyer-Olsen D, Suneetha PV, Manns MP, et al. Hepatitis E in HIV-positive patients in a low-endemic country. *Journal of viral hepatitis*. 2010;17(8):598-9.

102. Politou M, Boti S, Androutsakos T, Valsami S, Pittaras T, Kapsimali V. Seroprevalence of hepatitis E in HIV infected patients in Greece. *Journal of medical virology*. 2015;87(9):1517-20.
103. Bura M, Michalak M, Chojnicki M, Czajka A, Kowala-Piaskowska A, Mozer-Lisewska I. Seroprevalence of anti-HEV IgG in 182 Polish patients. *Postepy higieny i medycyny doswiadczonej*. 2015;69:320-6.
104. Riveiro-Barciela M, Buti M, Homs M, Campos-Varela I, Cantarell C, Crespo M, et al. Cirrhosis, liver transplantation and HIV infection are risk factors associated with hepatitis E virus infection. *PloS one*. 2014;9(7):e103028.
105. Rivero-Juarez A, Martinez-Duenas L, Martinez-Peinado A, Camacho A, Cifuentes C, Gordon A, et al. High hepatitis E virus seroprevalence with absence of chronic infection in HIV-infected patients. *The Journal of infection*. 2015;70(6):624-30.
106. Balayan MS, Fedorova OE, Mikhailov MI, Rytick PG, Eremin VF, Danilova TI, et al. Antibody to hepatitis E virus in HIV-infected individuals and AIDS patients. *Journal of viral hepatitis*. 1997;4(4):279-83.
107. Fainboim H, Gonzalez J, Fassio E, Martinez A, Otegui L, Eposito M, et al. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *Journal of viral hepatitis*. 1999;6(1):53-7.
108. Crum-Cianflone NF, Curry J, Drobeniuc J, Weintrob A, Landrum M, Ganesan A, et al. Hepatitis E virus infection in HIV-infected persons. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(3):502-6.
109. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*. 2006;131(1):65-71.
110. Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, et al. World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(5):729-35.
111. Baylis SA, Hanschmann KM, Blumel J, Nubling CM, Group HEVCS. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol*. 2011;49(4):1234-9.

112. Mokhtari C, Marchadier E, Haim-Boukobza S, Jeblaoui A, Tesse S, Savary J, et al. Comparison of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. *J Clin Virol.* 2013;58(1):36-40.
113. Gerber PF, Xiao CT, Cao D, Meng XJ, Opriessnig T. Comparison of real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of swine hepatitis E virus in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52(4):1045-51.
114. La Rosa G, Fratini M, Muscillo M, Iaconelli M, Taffon S, Equestre M, et al. Molecular characterisation of human hepatitis E virus from Italy: comparative analysis of five reverse transcription-PCR assays. *Virol J.* 2014;11:72.
115. Avellon A, Morago L, Garcia-Galera Del Carmen M, Munoz M, Echevarria JM. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *Journal of medical virology.* 2015;87(11):1934-9.
116. Wu WC, Su CW, Yang JY, Lin SF, Chen JY, Wu JC. Application of serologic assays for diagnosing acute hepatitis E in national surveillance of a nonendemic area. *Journal of medical virology.* 2014;86(4):720-8.
117. Pas SD, Streefkerk RH, Pronk M, de Man RA, Beersma MF, Osterhaus AD, et al. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2013;58(4):629-34.
118. Merchante N, Parra-Sanchez M, Rivero-Juarez A, Cifuentes C, Camacho A, Macias J, et al. High prevalence of antibodies against hepatitis E virus in HIV-infected patients with unexplained liver disease. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica.* 2014.
119. Oliveira SB, Merchan-Hamann E, Amorim LD. HIV/AIDS coinfection with the hepatitis B and C viruses in Brazil. *Cadernos de saude publica.* 2014;30(2):433-8.
120. Silva AC, Spina AM, Lemos MF, Oba IT, Guastini Cde F, Gomes-Gouvea MS, et al. Hepatitis B genotype G and high frequency of lamivudine-resistance mutations among human immunodeficiency virus/hepatitis B virus co-infected patients in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2010;105(6):770-8.
121. Gardinali NR, Barry AF, Otonel RA, Alfieri AF, Alfieri AA. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2012;107(7):935-9.

122. Gardinali NR, Barry AF, da Silva PF, de Souza C, Alfieri AF, Alfieri AA. Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. *Research in veterinary science*. 2012;93(3):1515-9.
123. Neukam K, Barreiro P, Macias J, Avellon A, Cifuentes C, Martin-Carbonero L, et al. Chronic hepatitis E in HIV patients: rapid progression to cirrhosis and response to oral ribavirin. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(3):465-8.
124. Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, Dubois M, Mansuy JM, Izopet J. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(3):897-902.
125. Malboeuf CM, Yang X, Charlebois P, Qu J, Berlin AM, Casali M, et al. Complete viral RNA genome sequencing of ultra-low copy samples by sequence-independent amplification. *Nucleic acids research*. 2013;41(1):e13.
126. Prachayangprecha S, Schapendonk CM, Koopmans MP, Osterhaus AD, Schurch AC, Pas SD, et al. Exploring the potential of next-generation sequencing in detection of respiratory viruses. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(10):3722-30.
127. Ganova-Raeva L, Punkova L, Campo DS, Dimitrova Z, Skums P, Vu NH, et al. Cryptic Hepatitis B and E in Patients With Acute Hepatitis of Unknown Etiology. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(12):1962-9.
128. Jagjit Singh GK, Ijaz S, Rockwood N, Farnworth SP, Devitt E, Atkins M, et al. Chronic Hepatitis E as a cause for cryptogenic cirrhosis in HIV. *The Journal of infection*. 2013;66(1):103-6.
129. Feldt T, Sarfo FS, Zoufaly A, Phillips RO, Burchard G, van Lunzen J, et al. Hepatitis E virus infections in HIV-infected patients in Ghana and Cameroon. *J Clin Virol*. 2013;58(1):18-23.

Apêndice

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo Vírus da Hepatite E (HEV) em indivíduos portadores do Vírus da imunodeficiência humana (HIV).
PESQUISADOR : João Renato Rebello Pinho
CARGO/FUNÇÃO: Coordenador do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical/ Pesquisador
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 51496
UNIDADE DO HCFMUSP: Gastroenterologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO	x	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que visa avaliar a frequência de infecção presente e passada pelo vírus da Hepatite E (HEV) entre diferentes grupos de pessoas na cidade de São Paulo. O vírus da hepatite E se replica nas células do fígado e causa uma hepatite, que normalmente é curada espontaneamente após a eliminação do vírus pelo sistema imunológico da pessoa. Porém, as pessoas que estão com a resposta imunológica prejudicada (pessoas submetidas a transplante de órgãos ou pessoas infectadas pelo HIV), podem não conseguir eliminar o vírus, e então este continua se replicando nas células do fígado causando a inflamação crônica desse órgão. O processo crônico de inflamações do fígado pode resultar em cirrose e perda das funções hepáticas.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Para este estudo, além dos exames de rotina, serão coletados 2 tubos de sangue (1 seco e 1 com EDTA) contendo cerca de 4 ml de sangue cada um. Essas amostras de sangue serão submetidas a exames imunológicos para detecção de anticorpos que o organismo produz quando ocorre a infecção pelo HEV e também a exames de biologia molecular para detecção do material genético do vírus circulante na corrente sanguínea. Esses exames não são realizados de forma rotineira na Instituição.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

A coleta de sangue não envolve risco importante para a sua saúde, no entanto, pode ocasionar desconforto em função da picada da agulha, que é levemente dolorosa. Também pode ocorrer discreto hematoma por extravasamento de sangue sob a pele; caso isto venha a ocorrer, esse problema desaparece em poucos dias sem nenhum cuidado especial.

5 – Benefícios para o participante

O benefício direto para cada participante individualmente ocorrerá no caso de ser detectada a presença de infecção presente pelo HEV (presença de material genético do vírus no sangue). Nesse caso o participante será avaliado e encaminhado para o tratamento que for mais apropriado ao estado clínico do paciente.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

Para este estudo não há procedimentos alternativos mais vantajosos que os propostos anteriormente.

7 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. JOÃO RENATO REBELLO

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

3

PINHO, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar n° 500 prédio 2, 2° andar Telefone(s) (11) 3061-8218. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5° andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas: você tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais deste estudo, assim que os pesquisadores tiverem conhecimento desses resultados.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Solicitamos também a sua autorização para que o material coletado durante o estudo possa, eventualmente, ser utilizado em estudos futuros relacionados ao estudo de vírus causadores de hepatites virais e às mesmas questões que estamos tentando resolver com a presente pesquisa. Todo material coletado será armazenado no laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – FMUSP sob nossa responsabilidade e caso sejam úteis para futuros projetos somente serão utilizados após aprovação do novo projeto ao comitê de ética e de forma anônima. Ressaltamos que o não consentimento para o armazenamento desse material não implica em exclusão do voluntário do estudo.

Autorizo o uso do material armazenado para o desenvolvimento de projetos futuros desde que seja feito de maneira anônima.

() SIM

() NÃO

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Eu discuti com o Dr. João Renato Rebello Pinho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e estou ciente que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha _____ Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____