

KENNYA GENNE SANTOS LOPES

**HEPATITE E SUÍNA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E
DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA O USO EM
DIAGNÓSTICO**

**RECIFE
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

KENNYA GENNE SANTOS LOPES

**HEPATITE E SUÍNA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E
DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA O USO EM
DIAGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Laura Helena Vega G. Gil

Co-orientador: Prof. Dr. Giovani Rota Bertani

**RECIFE
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**HEPATITE E SUÍNA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E
DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA O USO EM
DIAGNÓSTICO**

Dissertação de Mestrado elaborada por:

KENNYA GENNE SANTOS LOPES

Aprovada em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Orientadora – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE)

Prof. Dr. Giovani Rota Bertani
Co-Orientador – Departamento de Bioquímica (UFPE)

Dra. Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE)

Dr. Renato Antônio dos Santos Oliveira
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE)

Dedico este trabalho ao meu esposo Rogério Oliveira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela bênção da existência, pela proteção e pela força que me fez seguir em frente.

Ao meu esposo e aos meus *pets*, amores incondicionais...

À minha orientadora, Dra. Laura Gil, e ao meu co-orientador, Dr. Giovani Bertani, pela paciência, incentivo, confiança e compreensão.

Ao prof. Dr. Hélio Manso e a sua aluna Mônica Hunka (grande amiga) por não me terem deixado desistir.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo suporte técnico, financeiro e humano.

A UFRPE e aos amigos da Rural: Deivson, Vitor, Mychelli, Mudinho, George, Floriano, Lili e Karin por todo apoio e coleguismo.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

À Dra. Virginia Santiago (Emprapa Suínos e Aves) pela colaboração.

À Dra. Marli Tenório e a Priscila Castanha pelos ensinamentos sobre ELISA.

À Geórgia Guimarães e Amanda Oliveira pela montagem da estratégia.

À Bruna Caiado e André Pastor por TUDO que fizeram e fazem por mim!

Aos meus companheiros do LaViTE pelos ensinamentos, experiências trocadas e pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos meus grandes amigos “pernambucanos”: Verônica, Diégina, May, Doris, Clintiano, Valter, Rangel, Teca, Laís, André, Jana, Renato, Débora, Fábria, Telissa, Suzy, Tâmisa, Camilla e Cheysa pelo prazer em conviver, estudar e aprender com vocês.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A hepatite E é uma doença aguda do fígado, causada pelo vírus da hepatite E (HEV). Este vírus é membro da família *Hepeviridae*, cujo genoma consiste de uma fita simples de RNA positivo envolto por um capsídeo não envelopado. O HEV possui quatro genótipos (genótipos 1-4), sendo os genótipos 1 e 2 encontrados apenas em humanos, e os genótipos 3 e 4 considerados zoonóticos. Os suínos parecem ser o principal reservatório animal para os genótipos zoonóticos, embora o vírus tenha sido identificado também em outros animais. Devido ao seu potencial zoonótico, a preocupação dos órgãos de saúde pública tem aumentado com esta infecção. Objetivando avaliar a presença do HEV em suínos confinados e javalis livres, realizou-se ensaio imunoenzimático (ELISA) para verificação da presença de IgG anti-HEV nesses animais. Do total de amostras analisadas, 100% das amostras de javalis foram negativas para a presença deste anticorpo, enquanto que 50% das amostras de suínos domésticos foram positivas. Embora métodos de diagnósticos tenham sido desenvolvidos e aplicados na investigação da infecção pelo HEV suíno, os kits disponíveis são importados e de alto custo para serem aplicados em pesquisa e na rotina de laboratórios. Objetivando contribuir no desenvolvimento de ferramentas para o uso em diagnóstico da hepatite E suína, este trabalho também realizou a clonagem e expressão em *Escherichia coli* de um segmento do gene que codifica o capsídeo do HEV. A proteína foi expressa e purificada, embora em pequena quantidade. Esse trabalho é a primeira análise sorológica da presença do HEV envolvendo suínos selvagens no Brasil. Os resultados obtidos confirmam a circulação desse vírus em rebanhos brasileiros, bem como a ausência do mesmo na população de javalis selvagens estudada. Assim, esse trabalho alerta para o risco de transmissão zoonótica, contribui para estudos de epidemiologia do HEV no Brasil, e no desenvolvimento de ferramentas para fins biotecnológicos no estudo da infecção pelo HEV.

Palavras-chave: hepatite E, suínos, expressão de proteína recombinante, diagnóstico.

ABSTRACT

Hepatitis E is an acute liver disease caused by hepatitis E virus (HEV). This virus is a member of family *Hepeviridae*, whose genome consists of a single-stranded RNA surrounded by a non-enveloped capsid. The HEV has four genotypes (genotypes 1-4), the genotypes 1 and 2, are found only found in humans, and genotypes 3 and 4 are considered as zoonotic. The pigs appear to be the main animal reservoir for zoonotic genotypes, although the virus has been identified in other animals. The concern of public health agencies with this infection has increased considerably due to its zoonotic potential. To evaluate the presence of HEV in confined pigs and wild boars, the enzyme immunoassay (ELISA) was used to identify anti-HEV IgG antibody in these animals. Among all samples in the present study, wild boar samples were negative (100%) for the presence of this antibody, whereas 50% of domestic pigs were positive. Although diagnostic methods have been developed and applied in the investigation of swine HEV infection, the available kits are imported and expensive to be use in research and routine laboratories. To contribute for the development of tools for diagnosis, this work also performed the cloning and expression methods in *Escherichia coli* bacteria system of a segment gene encoding the capsid HEV. The protein was expressed and purified although in small quantities. This work is the first serologic report about the HEV in wild boars from Brazil. These results confirm the circulation of HEV in Brazilian herds of domestic pigs and demonstrates that the virus is not circulating among wild boars. This study shows that the risk of zoonotic transmission exist. Also, contributes to the HEV epidemiology studies in Brazil and to the development of biotechnological tools in the HEV infection.

Keywords: hepatitis E, swine, expression of recombinant protein, diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Genótipos do HEV.	16
Figura 2 – Esquema do genoma do HEV.	17
Figura 3 – Eventos clínicos e sorológicos da hepatite E.	25
Figura 4 – Anticorpos (IgG, IgM e IgA) e curva cinética da viremia do HEV.	26
Figura 5 – Gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação por PCR do segmento da ORF2 do HEV.	38
Figura 6 – Gel de agarose 1% mostrando os clones (Vetor pGEM-T <i>Easy</i> + CapHEV) digeridos com a enzima de restrição <i>Sac</i> I.	39
Figura 7 – Clones (Vetor pGEM-T <i>Easy</i> + CapHEV) digeridos com a enzima de restrição <i>Eco</i> R I.	39
Figura 8 – Gel de agarose 1% mostrando a amplificação por PCR dos segmentos clonados no vetor pGEM-T <i>Easy</i> .	39
Figura 9A – Construção no vetor pGEM (CapHEV+pGEM-T <i>Easy</i>).	40
Figura 9B – Midiprep do vetor pRSET A. C: Vetor pRSET A digerido com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.	40
Figura 10 – Gel de agarose 1% mostrando os clones (Vetor pRSET A + CapHEV) digeridos com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.	41
Figura 11 – Géis SDS-PAGE 20% mostrando o ensaio de expressão a 25°C por 4 horas, com diferentes quantidades de IPTG (0,1; 0,5 e 1 mM).	42
Figura 12 – Géis SDS-PAGE 20% mostrando o ensaio de expressão a 30°C por 4 horas, com diferentes quantidades de IPTG (0,1; 0,5 e 1 mM).	42
Figura 13 – Géis SDS-PAGE mostrando o ensaio de expressão a 37°C por 4 horas, com diferentes quantidades de IPTG (0,1; 0,5 e 1 mM).	42
Figura 14 – Gel SDS-PAGE mostrando o ensaio de expressão a 25°C por 4 horas, com 0,1 e 0,5mM de IPTG, tendo amostras coletadas a cada uma hora pós indução.	43
Figura 15 – <i>Immunoblot</i> realizado com as amostras do ensaio de expressão nas três diferentes temperaturas (25°; 30° e 37°C) e quantidades de IPTG (0,1 mM; 0,5mM e 1 mM).	43
Figura 16 – Análise das amostras oriundas da expressão em larga escala.	44
Figura 17 – Gel SDS-PAGE com amostras oriundas do processo de purificação.	45
Figura 18 – <i>Immunoblot</i> com as amostras da indução em larga escala, purificadas.	45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Oligonucleotídeos externos utilizados na amplificação do gene da ORF2 do HEV.
32
- Tabela 2** – Oligonucleotídeos internos utilizados na amplificação do gene da ORF2 do HEV.
32
- Tabela 3** – Sorologia por IgG Anti-HEV. 37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: por cento
°C: Grau Celsius
3': três linha
5': cinco linha
β: beta
ALT: Alanina-amino transferase
AMP: Ampicilina
Bam HI: Endonuclease de restrição de *Bacillus amyloli*
BR: Brasil
C-terminal: Carboxi-terminal
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
Eco RI: Endonuclease de restrição de *Escherichia coli*
EIA: Ensaio Imuno-Enzimático
ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay* (Ensaio por imunoadsorvência ligado a enzima)
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
HAV: *Hepatite A Vírus* (Vírus da hepatite A)
HEV: *Hepatite E Vírus* (Vírus da hepatite E)
Hind III: Endonuclease de restrição de *Haemophilus influenzae*
HIV: *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)
HNANB: Hepatite não A e não B
IEA: *Enzyme immunoassay* (ensaio imunoenzimático)
IgA: Imunoglobulina A
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
IPTG: IsoPropil-beta-D-TioGalactopiranosídeo
kb: quilo base
kDa: quilo Dalton
LB: Luria-Bertani
Leu: Leucina
Met: Metiltransferase
Miniprep: Minipreparação de plasmídeo bacteriano contendo o gene clonado
mL: mili Litro
mM: mili Molar
mRNA: RNA mensageiro
nm: nanômetro
NoV GI: Norovírus genótipo 1
NPT: Núcleo de Plataformas Tecnológicas
N-terminal: Amino-terminal
OD: *optical density* (densidade ótica)
ORFs: *open reading frames* (regiões de leitura aberta)
PAGE: *Polyacrylamide gel eletrophoresis* (Gel de Poliacrilamida para eletroforese)
pb: pare de bases
PBS: *phosphate buffered saline* (Tampão salino fofatado)
PCP: Protease de cisteína semelhante a papaína
PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PE: Pernambuco

pGEM-T Easy: Vetor de clonagem

pRSET A: Vetor de clonagem

PVDF: *Polyvinylidene fluoride* (Fluoreto de polivinilideno)

RdRp: *RNA-dependent RNA polymerase* (RNA polimerase dependente de RNA)

RJ: Rio de Janeiro

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RNAv: RNA Viral

RPM: Rotações Por Minuto

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction* (Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase)

Sac I: Endonuclease de restrição de *Streptomyces achromogenes*

SC: Santa Catarina

SDS: *sodium dodecyl sulfate* (Dodecil-sulfato de sódio)

SOC: *Super Optimal Broth with Catabolite repression*

Taq Polymerase: Enzima de *Thermus aquaticus*

TMB: Tetrametilbenzidina

tRNA: RNA transportador

UTRs: *untranslated regions*(regiões não traduzidas)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Hepatites Virais	15
3.2. Estrutura e Classificação Viral	15
3.3. Biologia Molecular do Vírus	17
3.4. Epidemiologia: Distribuição Mundial e no Brasil	18
3.5. Transmissão e Infecção Zoonótica	20
3.6. Infecção em Humanos e Animais	24
3.7. Diagnóstico	27
3.8. Tratamento e Profilaxia	28
4. METODOLOGIA	30
4.1. Estudo Epidemiológico	30
4.4.1. População Estudada	30
4.1.2. Fase Laboratorial	30
4.1.3. Interpretação do Ensaio	31
4.2. Desenvolvimento de Ferramentas para uso em Diagnóstico	31
4.2.1. Obtenção do RNA Viral	31
4.2.2. Amplificação do Segmento do Capsídeo do HEV suíno	32
4.2.3. Sequenciamento do DNA	33
4.2.4. Clonagem do Gene da ORF2 em Vetor Comercial	33
4.2.5. Subclonagem do Gene da ORF2 em Vetor de Expressão	34
4.2.6. Ensaio de Expressão	34
4.2.7. Purificação da Proteína Recombinante	36
4.2.8. Ensaio de <i>Immunoblot</i>	36
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	50
8. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A hepatite E é uma doença aguda do fígado, cujas manifestações clínicas variam desde a forma subclínica até a forma mais grave: a hepatite fulminante. O agente etiológico dessa infecção é o HEV (*Hepatitis E Virus*), um vírus de RNA fita simples, envolto por um capsídeo não envelopado. Este vírus pertencente à família *Hepeviridae* e apresenta 4 genótipos principais: os genótipos 1 e 2 estão associados apenas a casos em humanos, enquanto que os genótipos 3 e 4 são considerados zoonóticos e responsáveis por infecções em humanos e em várias outras espécies de animais.

A primeira cepa do HEV encontrada em animais foi caracterizada em suínos por Meng e colaboradores, em 1997. Desde então, diversas outras cepas tem sido descritas em suínos em todo o mundo (Lu *et al.*, 2006). Os suínos domésticos são conhecidos como um dos principais reservatórios animal para os genótipos zoonóticos do HEV (Sonoda *et al.*, 2004). Considerando a semelhança taxonômica entre os suínos domésticos e os suínos selvagens (javalis), estudos tem revelado que estes podem ser tão susceptíveis ao HEV quanto os suínos domésticos.

Devido ao seu potencial zoonótico, os órgão de saúde pública tem voltado sua atenção para a infecção pelo HEV, que pode ocorrer por meio do contato direto com animais infectados, pela água ou pelo consumo de alimentos contaminados. O HEV suíno é comum nas diversas categorias de produção de suínos, especialmente na fase de crescimento, reforçando a possibilidade de que suínos assintomáticos sejam, provavelmente, uma fonte de infecção desse vírus para humanos (Gardinali *et al.*, 2012).

Este trabalho teve como objetivo verificar a prevalência de anticorpos IgG anti-HEV em suínos domésticos criados em sistema de confinamento, e em suínos selvagens capturados de uma Unidade de Conservação Federal, em Santa Catarina (Brasil). Evidências sorológica e molecular do HEV em suínos no Brasil foram relatadas por –dos Santos e colaboradores (2009), confirmando a circulação do HEV em rebanhos suínos brasileiros. No entanto, estudos envolvendo animais selvagens são mais difíceis de realizar devido a dificuldade na obtenção de amostras de animais de vida livre.

Estudos envolvendo diferentes populações animais são necessários no sentido de contribuir na investigação da epidemiologia da hepatite E, assim como na disseminação do vírus entre animais reservatórios. Contudo, pesquisas com esse objetivo são dificultadas pelo

alto custo dos testes de diagnósticos disponíveis no mercado, uma vez que estes são importados. Nesse contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de testes para uso em diagnóstico que sejam economicamente acessíveis para serem utilizados na identificação do HEV.

Embora estudos tenham demonstrado que a maioria dos animais atingem a idade de abate já imune a este vírus, foi relatado que um número significativo de animais apresentam infecção atual em idade comercial, apesar de não apresentarem sinais clínicos ou histopatológicos (dos Santos *et al.*, 2009). A existência natural do HEV em suínos domésticos e javalis, bem como em outras espécies animais, levanta preocupações de saúde pública para zoonose e segurança alimentar (Meng, 2010b), alertando para a necessidade de uma inspeção mais eficaz, além da inspeção visual que é rotineiramente realizada nos animais e nas carcaças oriundas de matadouros.

Métodos de diagnósticos tem sido desenvolvidos e aplicados na investigação da infecção pelo HEV tanto em suínos como em humanos, todavia o desenvolvimento de métodos que sejam mais sensíveis, específicos, simples, padronizados e de baixo custo se faz necessário. Neste sentido, esse trabalho é a primeira análise sorológica da presença do HEV envolvendo suínos selvagens do Brasil, contribuindo na investigação da epidemiologia desse vírus no país, assim como no desenvolvimento de ferramentas para uso em diagnóstico da hepatite E suína.

2. OBJETIVOS

- Realizar um estudo epidemiológico envolvendo amostras de suínos domésticos e suínos selvagens;
- Amplificar um segmento da ORF2, que codifica o capsídeo do vírus da hepatite E suína;
- Clonar o segmento do capsídeo do HEV em vetor de expressão;
- Expressar segmento da ORF2 em sistema procaríoto;
- Purificar a proteína recombinante para fins biotecnológicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Hepatites Virais

As hepatites virais são doenças provocadas por diferentes agentes etiológicos, sendo os principais designados por letras do alfabeto (vírus A, vírus B, vírus C, vírus D, e vírus E). Esses vírus têm em comum a predileção pelo fígado, porém divergem quanto às formas de transmissão e as consequências clínicas advindas da infecção, entretanto afetam milhões de pessoas em todo mundo, provocando hepatopatias agudas e crônicas e causando a morte de cerca de 1,4 milhões de pessoas a cada ano (PAHO, 2014). Hepatites virais têm grande importância para a saúde pública pelo número de indivíduos atingidos e pela possibilidade de complicações das formas agudas e crônicas. Por isso, são doenças incluídas na lista de notificação compulsória e, portanto, todos os casos suspeitos devem ser notificados por um profissional de saúde e encaminhados ao órgão responsável pela vigilância epidemiológica municipal, regional, estadual ou federal (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2009).

No início da década de 1980, estudos de transmissão humana demonstraram que casos de hepatites não-A não-B (HNANB), de transmissão entérica, eram causados por um novo vírus, que ficou conhecido como vírus da hepatite E (*Hepatite E Vírus*, HEV). A ocorrência de infecção por este vírus tem sido bem documentada em todo o mundo, fazendo com que esta doença não seja mais considerada uma doença de países em desenvolvimento, mas como uma virose de ampla distribuição geográfica (Clemente-Casares *et al.*, 2003).

3.2. Estrutura e Classificação do HEV.

O HEV é um vírus pequeno, com aproximadamente 27-34nm de diâmetro, não envelopado e de simetria icosaédrica. Este vírus é classificado na família *Hepeviridae*, a qual é composta apenas pelo gênero *Hepevirus*. Atualmente, neste gênero são reconhecidos quatro genótipos em mamíferos: os genótipos 1 e 2 encontrados apenas em humanos, e os genótipos 3 e 4 encontrados em humanos e em animais, sendo estes considerados zoonóticos. O genótipo 1 consiste em cepas epidêmicas de países em desenvolvimento da Ásia e da África; O genótipo 2 foi encontrado no México e na África; O genótipo 3 é amplamente distribuído em todo o mundo e tem sido isolado de casos esporádicos de infecção aguda de Hepatite E em

suínos nos Estados Unidos, em vários países europeus e no Japão. E o genótipo 4 é encontrado principalmente em países asiáticos, oriundo de humanos e suínos (Meng *et al.*, 1998; Schlauder & Mushahwar, 2001; Lu *et al.*, 2006; Lorenzo *et al.*, 2007; Okamoto, 2007). Uma cepa do HEV isolada de um frango com hepatoesplenomegalia tem sido sugerida pertencer a um novo genótipo (genótipo 5) (Billam *et al.*, 2005). Em 2009, uma outra cepa, possivelmente variante do genótipo 3 e capaz de infectar espécies susceptíveis (humanos, suínos, etc), foi caracterizada em coelhos de uma granja na China (Zhao *et al.*, 2009).

Analisando 421 sequências disponíveis no *Genbank*, Lu e colaboradores (2006) propuseram 5, 2, 10 e 7 diferentes subtipos para os respectivos genótipos (1, 2, 3 e 4). A maior variabilidade foi observada para os genótipos 3 e 4, cujos vírus de origem humana e animal foram caracterizados como *relacionados*, indicando uma fonte infecciosa comum. Na figura abaixo, Meng (2010b) define os quatro genótipos do HEV de mamíferos, com pelo menos 24 subtipos (Figura 1).

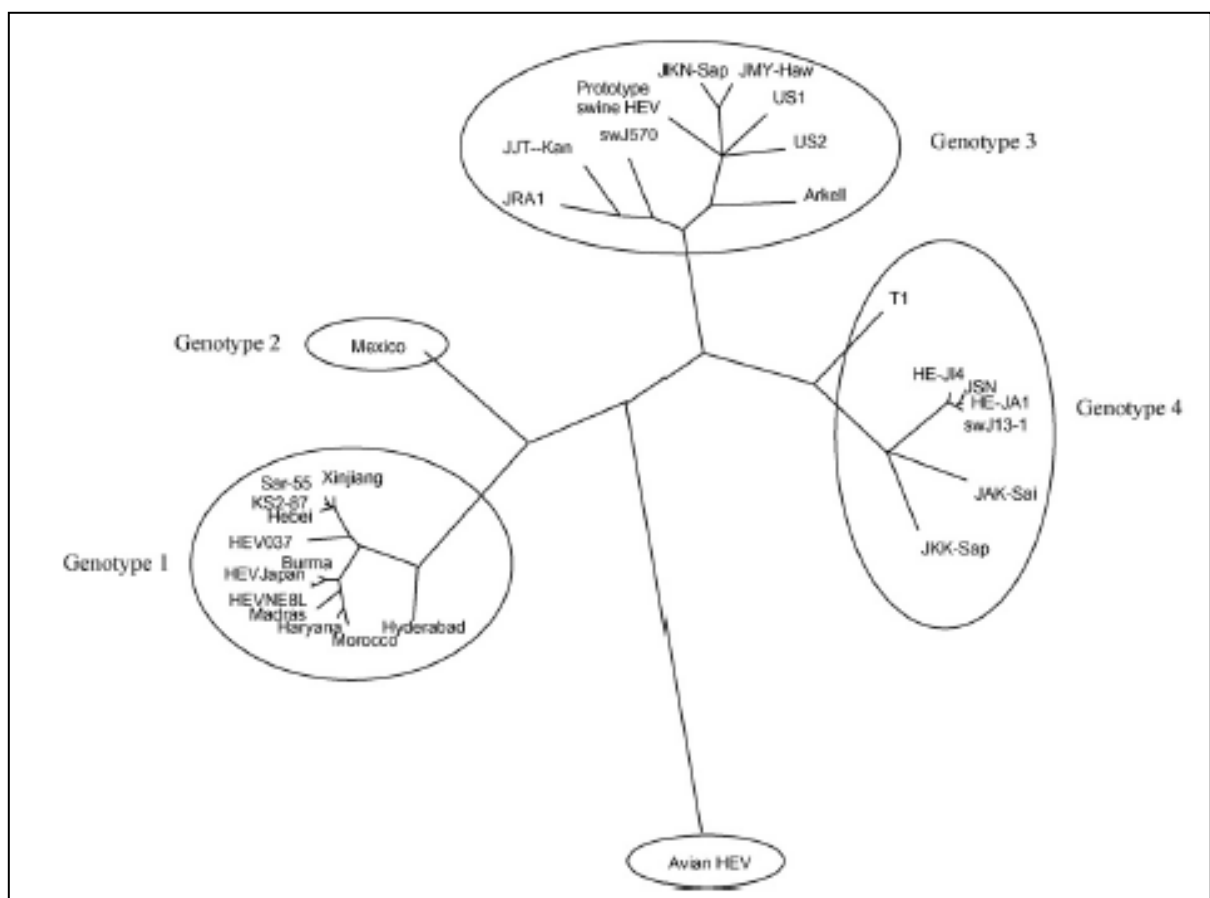


Figura 1 – Genótipos do HEV. Árvore filogenética baseada em 30 sequências genômicas completas de cepas humanas, suínas e aviárias. *Genotype* = genótipo.

Fonte: Meng, 2010b.

3.3. Biologia Molecular do Vírus

O genoma do HEV é composto de um RNA linear de cadeia simples, polaridade positiva, com aproximadamente 7,2 kb (Figura 2). A região codificante possui três sequências de leitura aberta (*open reading frames* – ORFs). A ORF1 tem tamanho aproximado de 5 kb, a ORF2 mede aproximadamente 2 kb, e a ORF3, que está sobreposta às outras ORFs, possui apenas 123 aminoácidos. O RNA genômico contém também pequenas regiões não-traduzidas (*untranslated regions* – UTRs) nas extremidades 5' (26 nucleotídeos) e 3' (68 nucleotídeos), que são capeadas e poliadeniladas, respectivamente (Santos *et al.*, 2008).

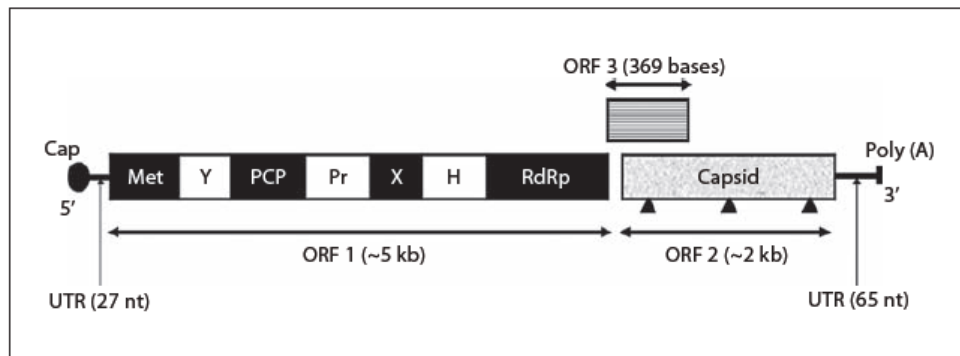


Figura 2 – Esquema do genoma do HEV. (Met = Metiltransferases; Y = Domínio Y; PCP = Proteases de cisteína semelhantes a papaína; X = Domínio X; H = Helicase de RNA; RdRp = RNA Polimerase dependente de RNA. *Capsid* = Capsídeo.

Fonte: Kaba *et al.*, 2013.

A ORF1, localizada na extremidade 5' do genoma, codifica poliproteínas virais não estruturais que estão envolvidas na replicação do vírus. Vários domínios funcionais característicos de metiltransferases, proteases de cisteína semelhantes a papaína, helicases e RNA polimerases dependentes de RNA foram identificados nesta ORF. Os processos de tradução e pós-tradução da poliproteína da ORF1 permanecem desconhecidos (Sehgal *et al.*, 2006).

A ORF2 é localizada na extremidade 3' do genoma e codifica a principal proteína do capsídeo viral, uma glicoproteína de aproximadamente 71-88 kDa que contém uma sequência sinal para o retículo endoplasmático, e três sítios de glicosilação. Graff e colaboradores, em 2005, demonstraram que as mutações nos sítios de glicosilação inibem a formação de partículas virais infecciosas. Os aminoácidos (Leu477 e Leu613) da proteína do capsídeo são importantes na formação dos epítomos que induzem anticorpos neutralizantes (Zhang *et al.*,

2008). Dois anticorpos monoclonais neutralizantes contra a proteína do capsídeo reconhecem epítomos situados entre os aminoácidos 578 e 607 (Schofield *et al.*, 2000). Tem sido relatado que homodímeros da proteína truncada do capsídeo do HEV, E2 (segmento entre os aminoácidos 394-606) e P239 (segmento entre os aminoácidos 368-606), contêm determinantes antigênicos dominantes que protegeram macacos *rhesus* imunizados contra a infecção pelo HEV. A proteína do capsídeo se liga ao RNA viral e desempenham papel importante na encapsidação do genoma viral e formação da partícula viral (Surjit *et al.*, 2004).

A ORF3 codifica uma fosfoproteína pequena que se encontra associada ao citoesqueleto da célula (Zafrullah *et al.*, 1997). A região N-terminal desta fosfoproteína se liga ao RNA viral formando um complexo com a proteína do capsídeo. A porção C-terminal desta proteína é multifuncional e parece estar envolvida na morfogênese e patogênese do vírion (Tyagi *et al.*, 2002; 2004; 2005). Os anticorpos monoclonais contra a proteína da ORF3 podem capturar partículas do HEV em sobrenadante de cultura e em soro, porém não em fezes, sugerindo que a proteína da ORF3 está presente na superfície do vírus (Takahashi *et al.*, 2008). A proteína ORF3 mostrou ser responsável pela liberação da partícula viral em células infectadas (Yamada *et al.*, 2009). A ORF3 codifica uma proteína essencial para a infectividade do vírus *in vivo* (Graff *et al.*, 2005), embora sua expressão não seja necessária para a replicação viral, montagem do vírion, ou infecção *in vitro* (Emerson *et al.*, 2006).

3.4. Epidemiologia: Distribuição Mundial e no Brasil

O vírus da hepatite E foi descoberto em amostras de soro humano que haviam sido estocadas de uma grande epidemia de hepatite viral aguda, ocorrida em Nova Delhi, Índia (1955), a qual afetou 29.000 pessoas. Essa epidemia ocorreu após uma acidente de contaminação de água potável por esgotos, e inicialmente considerou-se ter sido causada pelo vírus da hepatite A (*Hepatitis A virus*, HAV). Contudo, estudos sorológicos mostraram que os pacientes possuíam evidências sorológicas de uma infecção recente, e a epidemia não era então causada pelo vírus que se desconfiava. A doença inicialmente descrita em indianos foi então denominada de hepatite entérica não-A não-B, e apenas no início dos anos 90 foi identificado o agente etiológico (*Hepatitis E virus*, HEV) e determinado a sequência do seu genoma (Santos *et al.*, 2008).

O desenvolvimento subsequente de testes sorológicos mostrou que as infecções pelo HEV foram endêmicas em todos os países tropicais e subtropicais, com epidemias periódicas

relatadas a partir do subcontinente indiano, sudeste da Ásia, África e México. Nessas regiões, a hepatite E ocorreu em grandes surtos que afetaram centenas a milhares de pessoas. Na Índia, a infecção pelo HEV foi responsável por 50% a 70% de todos os pacientes com hepatite viral aguda. Um grande surto de hepatite E foi identificado na China (província de Xinjiang), em 1986-1988, e surtos menores foram observados no Oriente Médio, norte e oeste da África, e América do Norte (México) (Krawczynski, 1993).

Onde os surtos não ocorreram, a doença foi responsável por menos de 1% dos casos notificados de hepatite viral aguda, e estes casos de hepatite E quase sempre estavam associados com viagens para regiões endêmicas. Casos esporádicos de hepatite E foram observados em vários países, incluindo Egito (Goldsmith *et al.*, 1992), Hong Kong (Lok *et al.*, 1992), Senegal (Pillot *et al.*, 1992) e Turquia (Coursaget *et al.*, 1993). Entretanto, nos Estados Unidos (Kwo *et al.*, 1997), Itália (Zanetti *et al.*, 1999) e na Grécia (Schlauder *et al.*, 1999) casos isolados de hepatite E foram relatados em pacientes sem qualquer histórico de viagem.

Nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina a infecção pelo HEV é considerada uma das principais causas de hepatite viral e ocorre tanto na forma epidêmica quanto na forma esporádica. A população mais acometida é composta por jovens adultos, homens, pacientes com doenças hepáticas crônicas e mulheres grávidas (Guthmann *et al.*, 2006; Martolia *et al.*, 2009; Vivek *et al.*, 2010). Já nos países desenvolvidos, casos de hepatite E ocorrem esporadicamente, apesar de aglomerados de casos agudos terem sido relatados. A população afetada por infecção pelo HEV nessas regiões é composta por idosos, homens, doentes imunocomprometidos e pacientes com doenças hepáticas crônicas, apresentando uma taxa de mortalidade alta, de 2-13% (Peron *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2010; Lewis *et al.*, 2010).

A presença do HEV na América Latina foi evidenciada pela investigação da prevalência por detecção de marcadores sorológicos. Na Bolívia, uma pesquisa realizada por Konomi e colaboradores (1999) com 574 doadores de sangue sadios, demonstrou uma prevalência de 16,2% de IgG anti-HEV e de 1,7% para IgM. Ibarra e colaboradores, em 1997, realizaram um estudo envolvendo três cidades chilenas, com um total de 1.773 pessoas, e demonstraram anticorpos anti-HEV em 8% dos doadores de sangue, 12,5% dos trabalhadores da saúde, 7,5% dos presidiários, e 17% em indígenas. Este estudo revelou que o HEV constitui infecção endêmica no sul do Chile, acometendo grupos étnicos e populações de baixo nível sociocultural.

No Uruguai, de 252 doadores de sangue examinados, notou-se uma prevalência do anti-HEV de 1,2% (Cruells *et al.*, 1997). Na Nicarágua, a prevalência em indivíduos sadios variou de 4,6% a 8% (Perez *et al.*, 1996). No Brasil, casos esporádicos foram relatados, sendo os três primeiros registrados em Salvador/BA (Paraná *et al.*, 1995). No Mato Grosso (BR), em 1995, foram descritos casos de infecção pelo vírus E em um grupo de mineiros que moravam em acampamentos com condições sanitárias precárias (Pang *et al.*, 1995). Os primeiros casos de hepatite aguda pelo HEV na Amazônia Brasileira foram relatados em 1997, durante investigação de surto de hepatite em uma vila da região (Souto *et al.*, 1997).

Em Campinas (São Paulo/BR), avaliou-se a prevalência de anticorpos IgG anti-HEV em 205 doadores de sangue sadios, em 214 mulheres em risco para HIV (vírus da imunodeficiência humana) e em 170 empregados do Hospital de Campinas. Os resultados demonstraram 3% de soro-positividade para o primeiro grupo, 17,7 % em mulheres em risco para o HIV, e de 2,6% em funcionários do hospital. Esse estudo revelou também uma elevada prevalência de anti-HEV no grupo de empregados da higienização do hospital, cuja taxa alcançou 13,2% (Gonçales *et al.*, 2000). Em 2011, num estudo retrospectivo realizado no Rio de Janeiro (BR), avaliou-se a prevalência da doença em diferentes grupos de risco. Foi encontrado IgG anti-HEV em 2,1% dos pacientes com hepatite aguda não B e não C; 6,2% dos pacientes em hemodiálise crônica; 4,3% dos doadores de sangue; 11,8% dos usuários de drogas injetáveis e em 1% das mulheres grávidas (Trinta *et al.*, 2001).

O Ministério da Saúde do Brasil disponibiliza o número de casos confirmados de hepatite E no país apenas entre os anos de 1999 a 2011, somando-se um total de 967 casos. A região Sudeste possui o maior número, com 470 (48,6%) e, na sequência, encontram-se as regiões Nordeste (173 casos), Sul (130 casos), Norte (106 casos) e Centro-Oeste (88 casos). O estado de São Paulo apresenta 36,5% (353 casos) de todos os casos confirmados no país (Ministério da Saúde, 2012). Entre as mortes atribuídas especificamente à hepatite E no Brasil, registrou-se 51 óbitos (SIM, 2012).

3.5. Transmissão e Infecção Zoonótica

A hepatite E é transmitida principalmente por via fecal-oral. A água é considerada o principal meio de transmissão do HEV, pois pode ser contaminada por dejetos humanos e de animais, fazendo com que o vírus se dissemine rapidamente. A transmissão entre pessoas é incomum e não há evidência de transmissão sexual. Até o momento, quatro grandes rotas de

transmissão foram relatadas: pela água, a transmissão zoonótica por alimentos e não por alimentos (contato direto com animais), transmissão sanguínea e a vertical (Kaba *et al.*, 2013). Grandes epidemias ocorreram em países tropicais e subtropicais, em que milhares de pessoas desenvolveram hepatite aguda após a ingestão de água contaminada (Mushahwar *et al.*, 1993; Bile *et al.*, 1994).

Uma epidemia fluvial bem documentada foi investigada na Somália (início de 1988), onde um aumento da incidência de hepatite aguda foi observado em aldeias ao longo do rio Shebeli, na região da Baixa Shebeli. Tal evento representou uma grande epidemia que durou até final de 1989. Em pesquisa envolvendo 142 aldeias, com uma população de 245.312 pessoas, 11.413 casos ictericos foram registrados, dos quais 146 indivíduos morreram. O papel etiológico do HEV nesta epidemia foi comprovado pela demonstração de anticorpo anti-HEV em 128, de 145 casos da amostra, como um sinal de infecção recente pelo vírus. O pico da epidemia coincidiu com a subida do nível do rio durante a precipitação, o que sugere que o vírus estava na água. A taxa de infecção foi maior (6,0%) em aldeias abastecidas com água do rio, enquanto que um número menor de casos foram registrados em aldeias que dependiam de poços ou lagoas para seu abastecimento de água, 1,7% e 1,2%, respectivamente (Mushahwar, 2008).

Pesquisas tem revelado a possibilidade de alguns animais servirem como reservatórios do HEV. Em 1997, a primeira linhagem animal do HEV suíno foi identificada e caracterizada a partir de suínos, nos Estados Unidos (Meng *et al.*, 1997). Cepas humanas de áreas não-endêmicas demonstraram ter relação filogenética com cepas autóctones de suínos, evidenciando que estes podem desempenhar um papel de reservatório da infecção (Clemente-Casares *et al.*, 2003). Outros animais como veados (Tei *et al.*, 2003), javalis (Sonoda *et al.*, 2004), galinhas (Payne *et al.*, 1999; Haqshenas *et al.*, 2001) e outras aves (Nakamura *et al.*, 2006), coelhos (Zhao *et al.*, 2009), ratos (John *et al.*, 2010), trutas (Batts *et al.*, 2011), morcegos (Drexler *et al.*, 2012), bovinos (Hu & Ma, 2010) e ovelhas (Wang & Ma, 2010) foram relatados como reservatórios animais do HEV. Evidências sorológicas de infecção por este vírus também foram relatadas em outras espécies animais, incluindo macacos *rhesus* (Tsariev *et al.*, 1995), cães (Arankalle *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009), gatos (Kuno *et al.*, 2003) e cabras (Shukla *et al.*, 2007; Peralta *et al.*, 2009; Geng *et al.*, 2010).

A análise de amostras mais antigas de suínos mostrou que o HEV tem circulado em populações de suínos na Espanha e na Índia pelo menos desde 1985 (Casas *et al.*, 2009). No Brasil, o vírus da hepatite E suína foi isolado pela primeira vez a partir de amostras de fezes de suínos do estado de São Paulo (Paiva *et al.*, 2007). A primeira evidência molecular de

infecção pelo HEV em rebanhos suínos brasileiros foi detectada por -dos Santos e colaboradores em 2009. O primeiro relato de infecção autóctone humana pelo HEV registrado no Brasil foi em 2010, após estudo envolvendo amostras de pacientes do Grupo de Atendimento para Hepatites Virais (dos Santos *et al.*, 2010). Desde então, vários estudos tem demonstrado a presença do HEV em rebanhos suínos brasileiros e a prevalência de anticorpos contra o HEV em humanos (dos Santos *et al.*, 2010; 2011; Souza *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2012; Gardinali *et al.*, 2012).

Suínos são geralmente positivos para a presença do RNA do HEV quando são jovens (2-3meses), mas alta prevalência também foi relatada em estudos realizados com suínos mais velhos, na fase de abate (Wilhelm *et al.*, 2011; Kaba *et al.*, 2009, 2011; Nakai *et al.*, 2006). Do mesmo modo, a detecção de anticorpos anti-HEV em suínos varia com a idade. A maioria dos suínos com menos de 2 meses são anti-HEV negativos, enquanto que a maioria dos suínos com mais de três meses são soropositivos (Nakai *et al.*, 2006; Pavio *et al.*, 2010). Vitral e colaboradores (2005) demonstraram que suínos com cerca de 20 semanas de idade, que é a idade de abate no Brasil, são mais soropositivos para IgG anti-HEV, sugerindo que o HEV pode se disseminar no meio do rebanho comercial.

Uma avaliação feita a partir de amostras de fígado e bile de suínos abatidos na região oeste do Paraná, demonstrou que animais considerados saudáveis podem ser uma fonte de infecção do HEV (Gardinali *et al.*, 2012). Isso corrobora com a pesquisa de -dos Santos e colaboradores (2009) que demonstraram que embora a maioria dos animais atinjam a idade de abate já imune ao HEV, um número significativo deles apresentam infecção nesta idade e não apresentam sinais clínicos ou histopatológicos.

Pesquisa realizada nos Estados Unidos revelou que aproximadamente 23% dos veterinários que trabalham com suínos foram positivos para IgG anti-HEV, em comparação com apenas 17% de doadores de sangue normais. Os veterinários que participaram desta pesquisa, e que relataram terem sofrido acidentes envolvendo ferimentos com agulha durante a execução de procedimentos em suínos, apresentaram cerca de 1,9 vezes mais chances de serem soropositivos do que aqueles que não sofreram nenhum tipo de acidente envolvendo perfuro-cortante (Meng *et al.*, 2002).

Além disso, pesquisas tem revelado que indivíduos de regiões tradicionalmente produtoras de suínos são mais propensos a serem soropositivos ao HEV do que os indivíduos de regiões não produtoras. Por exemplo, na Moldávia, investigaram a presença de anticorpos IgG anti-HEV em 264 agricultores produtores de suínos juntamente com 255 controles, e descobriram que aproximadamente 51% dos produtores de suínos foram positivos em

comparação com apenas 25% dos indivíduos controles (Drobeniuc *et al.*, 2001). Withers e colaboradores (2002) também relataram que trabalhadores de suínos da Carolina do Norte tiveram uma taxa de prevalência de IgG anti-HEV 4,5 vezes maior do que os indivíduos controles.

Essas evidências caracterizam a hepatite E como uma doença zoonótica, aumentando a preocupação dos órgãos de saúde pública para esta infecção, seja por meio de contato direto com animais infectados, ou pelo consumo de água e alimentos contaminados pelos genótipos zoonóticos (Meng *et al.*, 2009, 2010a, 2010b; Pavio *et al.*, 2010). A evidência mais forte de transmissão zoonótica do HEV vem de estudos realizados no Japão, no qual a infecção foi associada ao consumo de carne mal cozida de veado e javali. Neste estudo, seqüências genômicas dos vírus, isoladas das amostras de carnes congeladas e de amostras dos pacientes infectados com o HEV, se mostraram idênticas (Li *et al.*, 2005; Pavio & Mansuy, 2010).

Em estudo realizado na Indonésia, Surya e colaboradores (2005) já haviam verificado um aumento significativo da soroprevalência anti-HEV em povos hindu, os quais consomem carne suína, comparado com pessoas muçulmanas, que não consomem esse tipo de carne. Outra evidência da transmissão zoonótica do HEV é através do consumo de alimentos derivados de suínos, crus ou mal cozidos, comprados em supermercados (Colson *et al.*, 2010; Miyashita *et al.*, 2012). Sequências genômicas do HEV recuperados a partir de fígados e embutidos de carne suína, vendidos comercialmente, foram semelhantes ou idênticas com as sequências genômicas de cepas isoladas a partir de amostras de pacientes infectados com este vírus (Wilhelm *et al.*, 2011).

Apesar da percepção de que infecções entéricas são geralmente relacionadas a produtos de origem animal (Sivapalasingam *et al.*, 2003), Brassard e colaboradores (2012) investigou a presença de vírus humanos e zoonóticos em morangos cultivados em campo, e verificou que das 60 amostras de morangos analisadas, 16 foram positivas para NoV GI (Norovírus Genótipo 1), 2 amostras positivas para rotavírus humano, e 1 amostra foi positiva para o HEV suíno. A água de irrigação foi suspeita como a origem da contaminação, uma vez que os frutos não estavam em contato com dejetos, mas apenas com fertilizantes minerais, e as medidas de assepsia foram aplicadas com rigor para evitar a contaminação durante a amostragem.

Recentemente, em Quebec, uma equipe de pesquisa na área de gastroenterologia demonstrou uma alta prevalência do HEV nos receptores pediátricos de órgãos (pacientes pediátricos/crianças que receberam transplante de algum órgão), os quais desenvolveram hepatite crônica causada pelo HEV (genótipo 3). Os autores desse estudo sugerem potencial

de transmissão zoonótica do vírus através dos alimentos fornecidos às crianças imunodeprimidas (Halac *et al.*, 2012). Também foi relatado que os indivíduos com comprometimento do sistema imune, incluindo crianças, idosos, mulheres grávidas e pessoas infectadas pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), são mais suscetíveis a tais infecções mesmo que baixos níveis de vírus entéricos estejam presentes no ambiente ou na comida (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2012)

Diante do exposto, certas práticas agrícolas, como o uso de água de fonte não confiável para irrigação ou o uso de dejetos animais para adubação, também podem ter impacto sobre a segurança dos produtos hortícolas. Como os vírus entéricos e hepáticos são persistentes no ambiente, eles podem contaminar a água após eventos de chuva, e conseqüentemente resultar na contaminação de plantações (Tyrrel *et al.*, 2003). A detecção do HEV em produtos industrializados e produtos agrícolas abre caminho para a investigação epidemiológica em outras possíveis fontes de contaminação que poderiam explicar o aumento de casos autóctones de hepatite causada pelo HEV genótipo 3 em países onde a doença não é endêmica (Lewis *et al.*, 2010).

3.6. A Infecção em Humanos e Animais

Em humanos, a hepatite E pode ser assintomática ou sintomática com características clínicas de uma hepatite aguda, podendo o paciente apresentar icterícia, náuseas, dor abdominal, vômito e febre. Assim como a hepatite A, a hepatite E é considerada benigna por normalmente não evoluir para a forma crônica da doença, porém em sua forma mais grave (hepatite fulminante) causa coagulação intravascular disseminada e alta letalidade (Foccacia *et al.*, 2006). Em pacientes gravemente imunocomprometidos, há registros da evolução da doença para a cronicidade e cirrose (Kamar *et al.*, 2008; Gerolami *et al.*, 2008; Colson *et al.*, 2009; 2011; Mallet *et al.*, 2010; Dalton *et al.*, 2009; Kaba *et al.*, 2011). O nível de mortalidade associado com infecção pelo HEV (1-4%) é maior que pelo vírus da hepatite A (0,1-2%). Pacientes com doença hepática crônica, imunodeprimidos e transplantados de fígado, pâncreas e rim também apresentam mortalidade alta (de até 67%) quando se infectam com o HEV (Ramachandran *et al.*, 2004; Abravanel-LeGrand *et al.*, 2010). Mais importante, no entanto, é a gravidade da hepatite E em mulheres grávidas, cuja mortalidade aumenta com o tempo de gestação e pode chegar a até 20% (Santos *et al.*, 2008).

Não há relato de que outros vírus da hepatite possam causar taxa tão alta de mortalidade em mulheres grávidas. A causa dessa alta taxa ainda não é bem conhecida, especulando-se que esteja associada a alterações imunológicas e hormonais que envolvem o período gestacional (Pal *et al.*, 2005). Um estudo realizado com o objetivo de comparar mulheres grávidas e não grávidas com hepatite viral aguda relatou que a viremia pelo HEV parece ser mais prolongada nas mulheres grávidas, sugerindo novas avaliações sobre essa observação (Begum *et al.*, 2009).

A patogênese do HEV é pouco conhecida. Acredita-se que o vírus entra no hospedeiro pela via oral, e que o local primário de replicação do vírus seja no trato intestinal. Nos hepatócitos, o vírus se replica no citoplasma das células infectadas e é liberado na bile e no sangue (Halbur *et al.*, 2001). O HEV pode ser detectado no sangue por uma a duas semanas, e nas fezes por três a quatro semanas. As respostas específicas mediadas por imunoglobulinas IgM e IgG ocorrem no início da doença, normalmente concomitante ao início dos sintomas clínicos. O anticorpo IgM atinge o pico durante a fase sintomática e desaparece depois de alguns meses. A imunoglobulina G (IgG) persiste, mas decai de título rapidamente logo após a infecção, porém pode ser detectada por 2 até 14 anos após a infecção (Figura 3; Santos *et al.*, 2008).

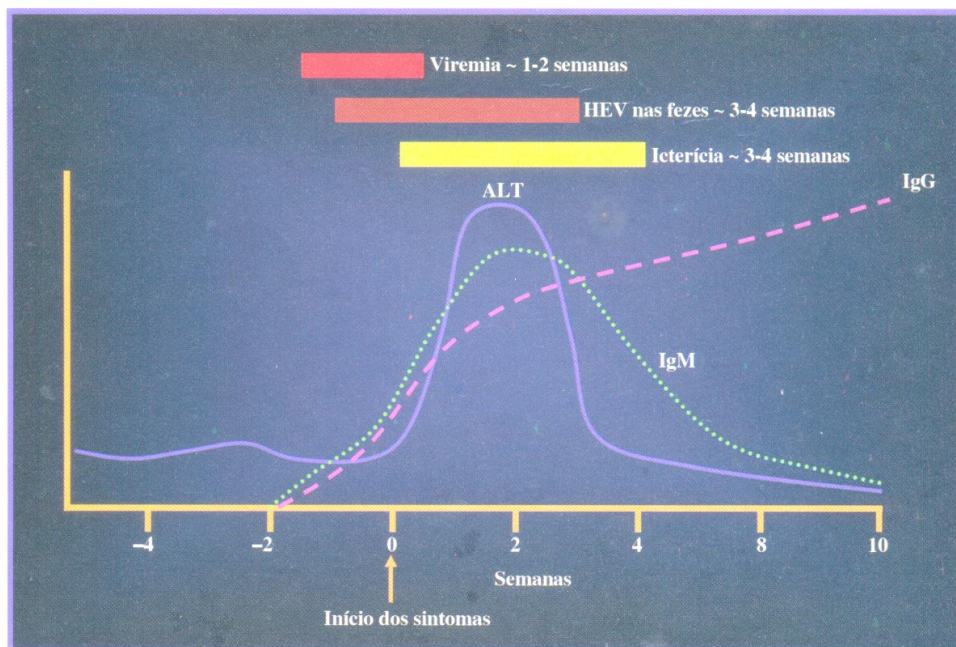


Figura 3 - Eventos clínicos e sorológicos da hepatite E. (IgM e IgG = Anticorpos; ALT = alanina-aminotransferase).

Fonte: Santos *et al.*, 2008.

Tal como nos seres humanos, a hepatite E em suínos é transmitida principalmente pela via fecal-oral ou por contacto direto com animais infectados (Kasorndorkbua *et al.*, 2004). Sabe-se que intestino delgado, cólon, fígado e nódulos linfáticos são os lugares onde o vírus se replica nos suínos (Williams *et al.*, 2001); no entanto, a patogênese do HEV nesses animais ainda não é bem caracterizada. Uma vez que o suíno é infectado, o vírus pode ser detectado nas fezes após 2-3 semanas, podendo durar até 7 semanas, com prevalência de no máximo 16 semanas (Fernandez-Barredo *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos envolvendo suínos infectados naturalmente pelo HEV tem sido focada na prevalência da infecção viral e na soroprevalência em animais de diferentes grupos etários. De Deus e colaboradores (2008) demonstraram a dinâmica de infecção do HEV envolvendo suínos de 1 a 22 semanas de idade, relatando que anticorpos IgG duraram nos animais com até 9 semanas de vida, e anticorpos IgA foram detectados apenas em leitões com 1 semana. Nenhum dos leitões foram positivos para anticorpos IgM antes de 12 semanas de idade. Quando os anticorpos maternos desapareceram, os leitões foram infectados novamente pelo vírus e desenvolveram uma resposta sorológica detectável (Figura 4).

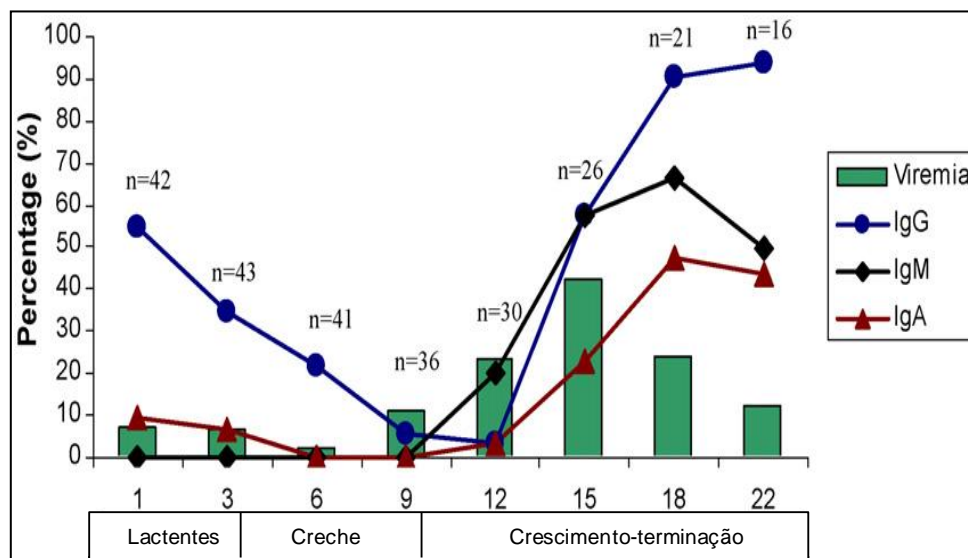


Figura 4 - Anticorpos (IgG, IgM e IgA) e curva cinética da viremia do HEV. Porcentagem de amostras positivas *versus* idade dos animais (em semanas) (n = número de animais analisados; Lactentes, Creche, Crescimento-terminação = grupos etários em sistema intensivo de criação; *Percentage* = porcentagem).

Fonte: De Deus *et al.*, 2008 (adaptado).

Entre todos os principais vírus das hepatites conhecidos (A, B, C e D), o vírus da hepatite E tem a particularidade de ser o único com reservatório em animais (Pavio *et al.*, 2010). A primeira cepa do HEV encontrada em animais foi caracterizada em suínos (Meng *et*

al., 1997). Desde então, diversas outras cepas tem sido descritas, isoladas de suínos em todo o mundo. Manifestações clínicas não são observadas nesses animais, sugerindo que a infecção neles também seja assintomática (Pavio & Mansuy, 2010).

3.7. Diagnóstico

Os primeiros métodos utilizados para o diagnóstico de infecção pelo HEV foram a imunoelctromicroscopia (IEM) e os ensaios de *immunoblot* com anticorpos fluorescentes, porém os dois métodos mostraram-se trabalhosos e com baixa sensibilidade (Foccacia *et al.*, 2006). Testes sorológicos e moleculares foram desenvolvidos tanto para fins diagnósticos quanto epidemiológicos. Os ensaios sorológicos são utilizados para a detecção de anticorpos contra o HEV (IgA, IgM e IgG), e os testes moleculares para detectar, no soro, na bile e/ou em fezes, o RNA viral. Estes ensaios permitem a diferenciação entre uma infecção recente ou em curso, facilitando o diagnóstico (Mushahwar, 2008).

Os ensaios de RT-PCR convencional e em tempo real têm sido utilizados para detectar RNA do HEV em amostras clínicas e parecem ser mais sensíveis que a sorologia para o diagnóstico da hepatite E (El-Sayed *et al.*, 2006; Jothikumar *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011). Excluindo uma possível contaminação, um resultado positivo é a prova de uma infecção ativa pelo vírus, e permite um estudo mais aprofundado quando realizado sequenciamento e genotipagem.

Tanto para humanos quanto para animais, o diagnóstico da infecção pelo HEV baseia-se, portanto, na demonstração de IgM específica, no aumento dos níveis de IgG, e na detecção do RNA viral. A definição de um caso de hepatite E aguda de um paciente é determinada por uma ou mais dessas condições, acompanhada por uma concentração elevada de transaminases no soro (Dalton *et al.*, 2007).

Para humanos, outra estratégia inclui sorologia para IgA e confirmação por EIA (Ensaio Imuno-Enzimático) positivo com um ensaio de *immunoblot*, embora isso produza alguns resultados duvidosos (Herremans *et al.*, 2007). Um estudo comparativo utilizando 12 testes de EIA, disponíveis no mercado, foi realizado em 1998 por Mast e colaboradores. Esse trabalho envolveu uma coorte de amostras de soro codificadas, e os testes analisados empregavam proteínas recombinantes do HEV ou peptídeos sintéticos, os quais diferiam em tamanho, região correspondente no genoma, e região geográfica. Os resultados desse estudo demonstraram que a sensibilidade desses testes variou de 17-100%, e a concordância nos resultados variou de 41-94%.

Atualmente, kits comerciais de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e *immunoblot* estão disponíveis para o diagnóstico da hepatite E em humanos. Esses kits são baseados em curtos fragmentos da ORF2 e ORF3 dos genótipos 1 e 2, mas tem baixa sensibilidade para detectar infecções com cepas do genótipo 3 (genótipo mais prevalente em suínos e humanos de países industrializados). Apesar desses kits serem específicos para detectarem anticorpos anti-HEV em soro e plasma humanos, estudos soropidemiológicos são complicados pelo fato dos diferentes testes de ELISA serem amplamente variáveis quanto a sensibilidade e especificidade, sendo necessário a combinação de ELISA e *immunoblot* para o diagnóstico da infecção (Herremans *et al.*, 2007).

A importância do diagnóstico do HEV em suínos tem sido subestimada, uma vez que animais infectados permanecem clinicamente normais (Halbur *et al.*, 2001). Em medicina veterinária, apenas o teste ELISA é normalmente aplicado como teste de triagem em grandes populações suínas, todavia os kits para ELISA em suínos são muito caros para serem aplicados em pesquisa e/ou na rotina de testes em laboratórios. Ainda não existe um teste de *immunoblot* de referência para detecção de anticorpos contra HEV suíno, entretanto Thiry e colaboradores (2014) adaptou um teste humano para utilização em suínos, em um estudo de soroprevalência realizado na Bélgica.

A concordância e sensibilidade de alguns ensaios para detecção de infecção pelo HEV é baixa, possivelmente devido ao uso de antígenos derivados da ORF3, a região mais variável do genoma, na confecção de alguns kits (Mast *et al.*, 1998). Embora métodos de diagnósticos tenham sido desenvolvidos e aplicados na investigação da infecção pelo HEV, o desenvolvimento de métodos que sejam sensíveis, específicos, simples, padronizados e de baixo custo se faz necessário.

3.8. Tratamento e Profilaxia

No tratamento da hepatite E recomenda-se repouso até a normalização das transaminases, liberando progressivamente o paciente para atividades físicas. O tratamento também envolve uma dieta pobre em alimentos gordurosos e a ausência total de bebidas alcoólicas. Não há evidências de que as drogas que possuem capacidade de inibir a replicação viral *in vitro* (cianidanol 3, ribavirina, isoprinosina) sejam eficazes nas hepatites agudas. Em pacientes transplantados, há relatos de tratamento com interferon peguilado resultando numa resposta satisfatória em 4 dos 5 casos estudados (Haagsma *et al.*, 2010; Kamar *et al.*, 2010).

Um possível desenvolvimento futuro de terapia antiviral contra o HEV seria baseado na caracterização bioquímica e estrutural das proteínas não-estruturais desse vírus (proteases, helicases e replicases) e desenvolvimento de inibidores potenciais destas proteínas. Esse tipo de drogas já está em uso clínico para outras infecções e poderia ser usado também para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento da infecção pelo vírus da hepatite E (Rodríguez-Frias *et al.*, 2012).

Uma vez que a contaminação de água potável com material fecal é a principal forma de transmissão do HEV, as medidas principais de prevenção desta infecção são saneamento e adequação na distribuição da água potável, assim como medidas de educação em higiene pessoal para a população. Também é importante a manipulação correta dos alimentos em geral, e evitar o consumo de carne crua ou mal cozida. O HEV suíno (genótipo 3 ou 4) pode infectar principalmente os grupos que trabalham com suínos, onde a principal prevenção é a lavagem das mãos durante e após o trabalho (Fitzsimons *et al.*, 2010). Nesse sentido, uma vacina para o HEV aplicada em suínos ajudaria na prevenção da infecção em humanos (Meng *et al.*, 2010b).

Em dezembro de 2011, uma vacina para humanos (*HEV 239*) contra o HEV foi aprovada pelo Ministério da Ciência e Tecnologia Chinês, a qual é vendida como Hecolin® pela Xiamen Innovax Biotech Company, Ltd. O princípio ativo desta vacina é um peptídeo recombinante do HEV genótipo1 (correspondente aos aminoácidos 368-606 da ORF2 – região imunogênica da proteína E2), expresso em uma cepa da bactéria *Escherichia coli*, que quando injetado em seres humanos estimula o sistema imunológico do organismo contra o vírus da hepatite E (Li, S.W. *et al.*, 2005). Embora a China produza esta vacina e disponibilize para a população menor de 30 anos e grupos considerados de risco para adquirir a doença, a Hecolin® não está disponível a nível mundial. Tal fato reforça a necessidade de um controle adequado da cadeia de transmissão no domicílio e na comunidade, bem como entre grupos vulneráveis.

4. METODOLOGIA

4.1. Estudo Epidemiológico

4.1.1. População Estudada:

Foram recebidas 32 amostras de soro de suínos domésticos (*Sus scrofa domesticus*), oriundas de matrizes (fêmeas reprodutoras) de descarte, estando a maioria com mais de dois anos de idade. A coleta do sangue foi por punção na veia cava cranial. Esses animais pertenciam a uma granja localizada na região oeste de Santa Catarina. Além das amostras de suínos domésticos, foram recebidas 68 amostras de soro de javalis (*Sus scrofa scrofa*), sendo aproximadamente 70% machos e 30% fêmeas, de diversas idades, estando em sua maioria em fase reprodutiva. Esses animais haviam sido abatidos com armas de fogo, e a coleta de sangue ocorreu *post mortem*, direto da área da incisão dos vasos do pescoço. Os javalis eram de vida livre, procedentes de uma Unidade de Conservação Federal em Santa Catarina e imediações, região próxima à fronteira com o Paraná.

As amostras envolvidas nesse estudo foram cedidas gentilmente pela Dra. Virgínia Santiago Silva, pesquisadora da EMPRAPA Suínos e Aves, Santa Catarina, Brasil.

4.1.2. Fase Laboratorial:

Para estimar a prevalência de anticorpos contra o vírus da hepatite E nas amostras de soro dos suínos desse estudo, utilizou-se do kit PrioCHECK® HEV Ab (PRIONICS). Trata-se de um ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo Captura Direto, baseado em antígenos da ORF2 e ORF3 do HEV genótipos 1 e 3, para verificação da presença de IgG anti-HEV.

O ensaio foi realizado em duplicata, seguindo as instruções do fabricante, cumprindo quatro etapas básicas (descritas abaixo). Como controles, foram utilizados controles reativo (contendo anticorpos IgG específicos para HEV) e não reativo, inclusos no kit.

Etapa 1 - Preparação das amostras e Primeira Incubação: As amostras de soro foram diluídas em uma solução tampão e posteriormente colocadas nos poços das microplacas, os quais estavam revestidos com antígenos do HEV. O tempo de incubação foi de 60 minutos a 37°C. Nessa etapa, os anticorpos específicos presentes na amostra, se unem aos antígenos imobilizados. Posteriormente, os poços foram lavados para remoção de materiais não-ligados.

Etapa 2 – Segunda Incubação das Amostras: Após lavagem dos poços, um anticorpo monoclonal anti-IgG suíno, marcado com peroxidase, foi adicionado aos mesmos, ficando sob incubação por 30 minutos a 37°C. Este anticorpo marcado reconhece os complexos antígeno-anticorpo. Após esse período de incubação, os poços foram novamente lavados para remoção das ligações não-específicas.

Etapa 3 - Incubação do Conjugado: Após lavagem, uma solução de substrato contendo TMB (Tetrametilbenzidina) foi adicionada em cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos a 22°C, coberta com papel alumínio e mantida em ambiente escuro. A presença de reação deste substrato com a enzima peroxidase resulta em uma mudança de cor.

Etapa 4 - Detecção de Anticorpos: A reação foi então interrompida, após incubação, pela adição da Solução *Stop*. A intensidade da cor (amarela), que é proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra, foi então medida espectrofotometricamente em filtro de 450nm.

4.1.3. Interpretação do Ensaio:

Amostras com valores de absorvância inferiores ao ponto de corte (*Cut off*) foram consideradas não reativas (Amostras negativas para a presença de IgG anti-HEV). Amostras com valores de absorvância iguais ou muito próximas ao ponto de corte foram consideradas inicialmente reativas, e foram retestadas. Amostras com valores de absorvância superiores ao ponto de corte foram consideradas positivas para a presença de IgG anti-HEV.

4.2. Desenvolvimento de Ferramentas para uso em Diagnóstico

4.2.1. Obtenção do RNA Viral

O RNA Viral (RNA_v) do HEV foi extraído de uma amostra de fezes suína, oriunda de um animal naturalmente infectado com o HEV suíno. Esta amostra foi cedida gentilmente pelo Dr. Marcelo Alves Pinto (FIOCRUZ/RJ). O processo de extração do RNA_v foi realizado utilizando TRIzol Reagente (INVITROGEN), seguindo as instruções do fabricante.

4.2.2. Amplificação do Segmento Gênico do Capsídeo do HEV suíno

Após a extração do RNA_v, foi realizada uma reação de *nested* RT-PCR (Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase em “*nested*”), objetivando amplificar uma região da ORF2 do genoma viral.

A transcrição reversa e a primeira PCR foram realizadas em um único passo (*One Step*), utilizando o kit *Access RT-PCR system* (PROMEGA), conforme instruções do fabricante, resultando na amplificação de um fragmento de 813 pares de bases (pb). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados são citadas na tabela 1.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos externos utilizados na amplificação do gene da ORF2 do HEV.

<i>Primer</i>	Orientação	Sequência
8I3	<i>Forward</i>	5'-TCCCCGCTTACATCATCTGTTGC-3'
8I4	<i>Reverse</i>	5'-CTTTACTGTTGGCTCGCCATTGG-3'

A Transcrição Reversa ocorreu a 45°C por 45 minutos. Em seguida, a temperatura foi elevada para 94°C por 2 minutos, para que ocorresse a inativação da enzima *Transcriptase Reversa*. Foram programados 40 ciclos de amplificação da PCR: desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento dos oligonucleotídeos a 55°C por 1 minuto; extensão a 68°C por 2 minutos. Seguido no final por uma extensão a 68°C por 7 minutos.

Na segunda PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) – PCR2, 3µL do produto da primeira PCR foi diluído em água ultra pura nas proporções de 1:50 e 1:100 e depois 3µL do produto desta primeira reação foram adicionados ao MIX da segunda reação, a qual teve um volume final de 20µL, contendo: 4µL do 5X Phusion *Buffer*, 0,4µL dNTPs 10mM, 0,2µL da Enzima Phusion® *High-Fidelity DNA Polimerase* (Invitrogen), 8,4µL de Água ultra pura, 2µL do *Primer Forward* (5 pmol) e 2µL do *Primer Reverse* (5 pmol). Estes oligonucleotídeos continham sítios para enzimas de restrição *Hind* III e *Bam*HI, e suas sequências estão citadas na tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos internos utilizados na amplificação do gene da ORF2 do HEV.

<i>Primer</i>	Orientação	Sequência
8I5	<i>Forward</i>	5'-ACCGgctagcGGATCCaacctctcttgcctcttcaggatgg-3'
8I6	<i>Reverse</i>	5'ACCGAAGCTTTCATAACTCGA Gaggcgaggagtaaaatagttagcccc-3'

As condições da PCR2 foram: 5 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Seguido de mais 35 ciclos com desnaturação (94°C / 1 min.), anelamento (55° / 1 min.), extensão (72°C / 1 min. e 30 seg.), e uma extensão final a 72°C / 7 minutos.

O produto final da amplificação, correspondente a uma banda de 738 pb, foi purificado através do kit *MinElute PCR Purification* (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante, e submetido ao sequenciamento gênico.

4.2.3. Sequenciamento do DNA

Todos os sequenciamentos gênicos envolvidos neste trabalho foram realizados no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT), PDTIS - FIOCRUZ/PE, através da utilização do kit *BigDye terminator cycle sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA). O produto desta reação foi resolvido em um sequenciador *ABI 3100 Genética Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA), analisado através do programa *Ape-A plasmid Editor* v1.10.4, e comparado com seqüências depositadas no *GenBank*.

4.2.4. Clonagem do Gene da ORF2 em Vetor Comercial

O produto da PCR2, correspondente a um segmento gênico do capsídeo viral (ORF2), foi tratado com *Taq* DNA polimerase (GE Healthcare) para adição de nucleotídeos adeninas às extremidades do produto da PCR. Esse tratamento realizou-se em 5 µL da amostra (produto da PCR), na qual se adicionou 1 µL do tampão (10x) da enzima *Taq* com MgCl₂ (1,5mM), 0,2 µL de dATP (0,2 mM), 1 µL da enzima *Taq DNA Polimerase* e água (q.s.p. 10µL). As amostras foram incubadas a temperatura de 70°C por 30 minutos. Após esse tratamento, o segmento foi então ligado ao Vetor pGEM-T *Easy*, seguindo as instruções do fabricante (PROMEGA), em diferentes proporções inserto: vetor (1:1, 3:1, 5:1).

O DNA recombinante foi introduzido em células procarióticas (*Escherichia coli*) da cepa NEB 5-alfa, tratadas quimicamente com cloreto de cálcio para receber plasmídeos exógenos através de choque térmico (30 minutos em gelo, seguido de 5 minutos a 37°C). Em seguida, as células foram inoculadas em placa de Petri contendo meio Luria-Bertani com 100mg/mL de Ampicilina (Meio LB-AMP), e incubadas a 37°C por 16 horas.

Colônias foram selecionadas, inoculadas em 5mL de meio LB líquido com 100mg/ml de ampicilina, e incubadas em *shaker* a 37°C sob agitação orbital de 150 RPM (rotações por

minuto), durante 16 horas. Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação (3500RPM / 10minutos), e o DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *QIAprep®Spin Miniprep* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

A clonagem foi avaliada e confirmada por digestão enzimática, PCR e sequenciamento gênico.

4.2.5. Subclonagem do Gene da ORF2 em Vetor de Expressão

As enzimas envolvidas na estratégia de clonagem e subclonagem foram *BamH I* e *Hind III* (BIOLABS). Utilizando-se destas, o gene clonado foi removido do vetor comercial pGEM-T *Easy*, e subclonado no vetor de expressão em procariotos pRSET A. Este vetor adiciona uma sequência de seis histidinas na região N-terminal da proteína de interesse, as quais funcionam como domínio de ligação a metais como o níquel. O gene clonado é então inserido posteriormente a este peptídeo, permitindo a expressão das proteínas fusionadas a uma sequência de seis histidinas na porção N-terminal. A ligação inserto: vetor de expressão foi realizada em diferentes proporções (1:1, 3:1, 5:1), com auxílio da T4 DNA ligase (INVITROGEN), ficando sob incubação 20 horas a 16°C.

O DNA recombinante foi introduzido por eletroporação (5 pulsos de 2750volts) em células de *E. coli* eletrocompetente da cepa TOP10. Estas células foram incubadas em meio SOC (*Super Optimal Broth with Catabolite repression*) por uma hora, e em seguida inoculadas em placa de Petri contendo meio LB-AMP, e incubadas a 37°C por 16-24 horas.

Colônias foram selecionadas, inoculadas em 5 mL de meio LB Líquido com 100mg/ml de ampicilina, e incubadas em *shaker* a 37°C sob agitação orbital de 150 RPM por 16 horas. As células oriundas desse cultivo foram concentradas por centrifugação (3500RPM / 10minutos), e o DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *QIAprep®Spin Miniprep* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

A subclonagem foi avaliada e confirmada por digestão com enzimas de restrição e sequenciamento gênico.

4.2.6. Ensaios de Expressão

Após a confirmação da subclonagem, um clone foi escolhido para a transformação na linhagem BL21 StarTM de *Escherichia coli*. As bactérias foram transformadas, por choque térmico, e selecionadas em meio seletivo LB-AMP. Escolheu-se uma colônia isolada da

construção (CapHEV+ Vetor pRSET A), a qual foi inoculada em 20mL de meio LB-AMP líquido (pré-inóculo), e incubadas a 37°C, sob agitação (150 RPM), por pelo menos 16 horas.

No dia seguinte, o pré-inóculo foi transferido para um volume maior de meio LB-AMP e deixado sob agitação a 37 °C, até atingir a densidade óptica (*optical density - OD*) de 0,5 – 0,8, no comprimento de onda de 600nm. O volume do cultivo foi dividido em tubos de ensaio, cada um contendo cerca de 20mL da cultura, e a expressão da proteína recombinante foi induzida em três diferentes temperaturas (25°; 30° e 37°C) e com três diferentes quantidades (0,1mM; 0,5mM e 1mM) de IsoPropil-beta-D-TioGalactopiranosídeo (IPTG) durante 4 horas. Esse ensaio foi realizado com a construção envolvendo o segmento gênico do HEV (CapHEV+ Vetor pRSET A), em paralelo com o Vetor Vazio (pRSET A), funcionando como um controle negativo. Como controle positivo dos ensaios experimentais foi utilizado uma construção também no Vetor pRSET A, a qual resultava na expressão da proteína artificial *Top7*, oriunda de estratégia computacional (Kuhlman *et al.*, 2003).

Após a indução, as culturas foram centrifugadas (10.000RPM / 2minutos / 4°C). Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 80 µL de tampão de proteína (Laemmli 2X com β-mercaptoetanol) e submetidos a corrida em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 20%. Os géis foram corados com azul de Comassie a 0,1% para verificação da melhor condição de expressão para a proteína da construção no pRSET A, cujo tamanho esperado era de 27 kDa.

Escolhida a melhor condição de expressão, induziu-se a expressão da proteína em larga escala por 4 horas. Após a indução, 1mL de cada cultivo foi centrifugado (10.000RPM / 2minutos / 4°C) e ressuspensos em 500 µL de tampão de proteína para serem visualizados através da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 20%, corados com azul de Comassie a 0,1% . A cultura foi centrifugada (8.000RPM / 20minutos / 4°C) e os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em **tampão de equilíbrio** (50mM de NaH₂PO₄, 300mM de NaCl, 20mM de Imidazol, 8M de Uréia - pH 8,0) suplementado com inibidor de protease (SIGMA-ALDRICH) para uma concentração final de 1X. A lise celular foi realizada através de ultrasonicação, (6 pulsos de 30 segundos e amplitude 50). Em seguida, os extratos bacterianos foram novamente centrifugados (10.000RPM / 10minutos, a 4°C), e os sobrenadantes, contendo o extrato protéico total, foram submetidos à purificação.

4.2.7. Purificação da Proteína Recombinante

O extrato protéico total foi submetido ao processo de purificação pelo método de cromatografia de afinidade. Neste método, o extrato protéico, contendo a proteína induzida, é incubado com uma resina de níquel (QIAGEN), que liga-se especificamente à sequência de histidina presente na proteína recombinante. Após 1 hora de incubação, sob agitação a 4°C, a resina foi então centrifugada (5.000 RPM / 1 minuto/ 4°C). Lavagens com **tampão de lavagem** (50mM de NaH₂PO₄, 300mM de NaCl, 50mM de Imidazol, 8M de Uréia - pH 8,0) foram realizadas, e as proteínas foram eluídas da resina através de duas incubações com **tampão de eluição** (50mM de NaH₂PO₄, 300mM de NaCl, 0.5M de Imidazol, 8M de Uréia - pH 8,0) sob agitação a 4°C, por 30 minutos. Amostras do processo de purificação foram então analisadas após serem submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE a 20%, corado com azul de Comassie a 0,1%.

4.2.8. Ensaio de *Immunoblot*

Ensaio de *immunoblot* foram também realizados seguindo os seguintes parâmetros: Amostras das proteínas recombinantes, diluídas em tampão de proteína, foram fracionadas em gel SDS-PAGE 20% e transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após a transferência, a membrana hidratada foi incubada em solução de leite 7,5% preparada com PBS+0,05% de Tween-20. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário monoclonal Anti-polyHistidine CloneHIS-1 (SIGMA-ALDRICH) na diluição de 1:3000, por duas horas. Após incubação, a membrana foi lavada três vezes com solução PBS+0,05% de Tween-20 por 15 minutos, e incubada com o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG-Peroxidase (SIGMA-ALDRICH) diluído 1:10.000, por uma hora. Mais três lavagens com solução PBS+0,05% de Tween-20 por 15 minutos foram realizadas na membrana, na qual foi adicionada uma mistura de luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM e peróxido de hidrogênio 0,03% (em DMSO) para a reação de quimioluminescência. Essa incubação se deu por dois minutos e a membrana foi seca e exposta a um filme (Hyperfilm™ Amersham Biosciences) por 2 e 7 minutos, sendo, então, revelado por uma solução de Dektol 1:2 (KODAK) e fixado em solução de ácido acético (SIGMA).

5. RESULTADOS

5.1. Estudo Epidemiológico

O ensaio imunoenzimático (ELISA) para verificação da presença de IgG anti-HEV em suínos confinados e javalis livres demonstrou que 100% das amostras de javalis (68 amostras) foram negativas para a presença deste anticorpo, enquanto que 50% das amostras dos suínos domésticos (16 amostras) foram positivas (Tabela 3).

Tabela 3 - Sorologia por IgG Anti-HEV.

Origem das amostras	Número total de amostras	Número de amostras positivas para IgG anti-HEV	Número de amostras negativas para IgG anti-HEV
Suínos Selvagens	68	0 (0%)	68 (100%)
Suínos Domésticos	32	16 (50%)	16 (50%)

Considerando a possibilidade de dar continuidade a este estudo epidemiológico, mas levando-se em conta o valor elevado dos kits disponíveis no mercado, deu-se início ao desenvolvimento de ferramentas para o uso em diagnóstico, através da expressão em sistema procaríoto de um segmento do capsídeo do HEV suíno (genótipo 3).

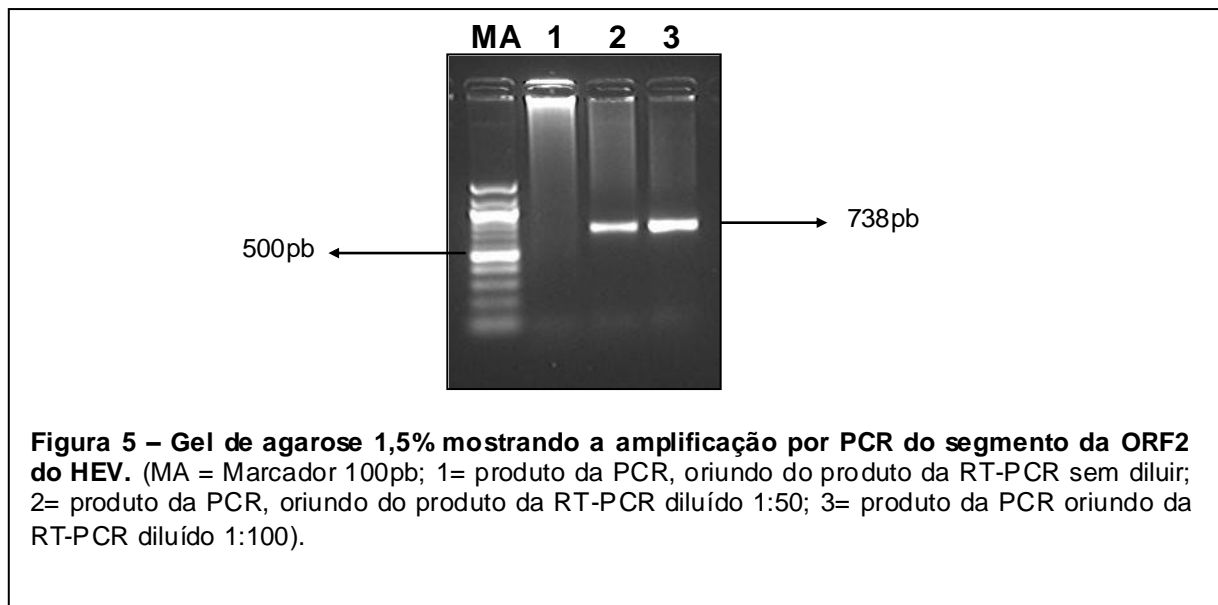
5.2. Desenvolvimento de Ferramentas para uso em Diagnóstico

5.2.1. Obtenção do RNA viral do HEV suíno

O RNA viral utilizado para amplificação do segmento a ser clonado foi extraído de amostra de fezes de suíno positivo ao HEV, genótipo 3, e apresentou quantidade e qualidade satisfatórias após leitura em espectrofotômetro: 0,29 µg/µL, sendo $A_{260/280} = 1,911$. Este RNA foi aliquotado e armazenado a -80C.

5.2.3. Amplificação e sequenciamento da ORF2 do HEV suíno

Conforme descrito no item 4.2.2 da metodologia aplicada nesse estudo, fez-se a amplificação de um segmento do gene que codifica o capsídeo do HEV suíno através de uma reação de *nested RT-PCR*. A banda esperada (738 pb) foi nitidamente visualizada em gel de agarose 1,5% (Figura 5).

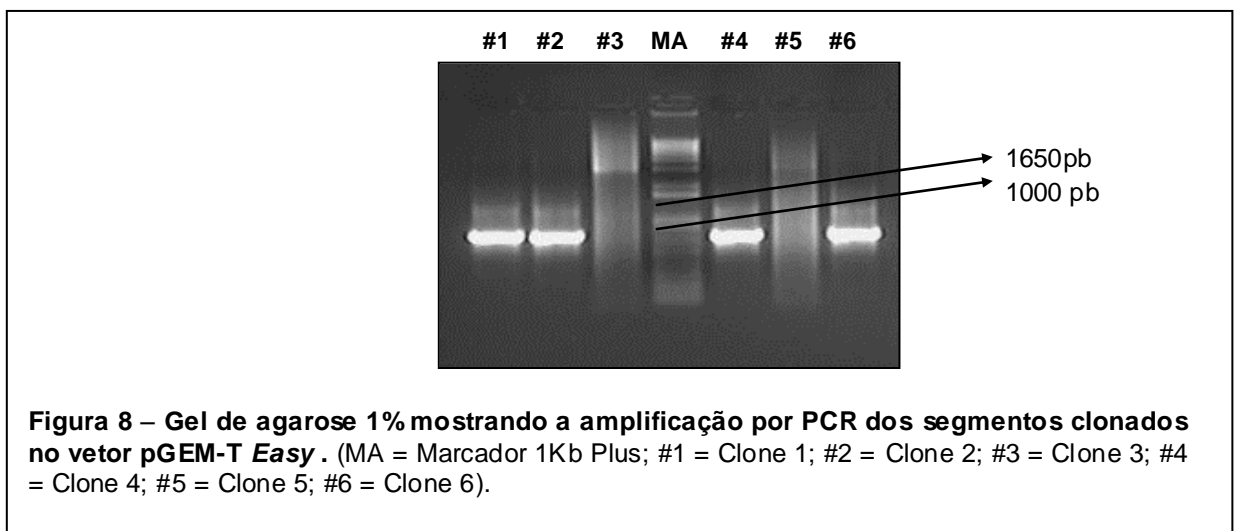
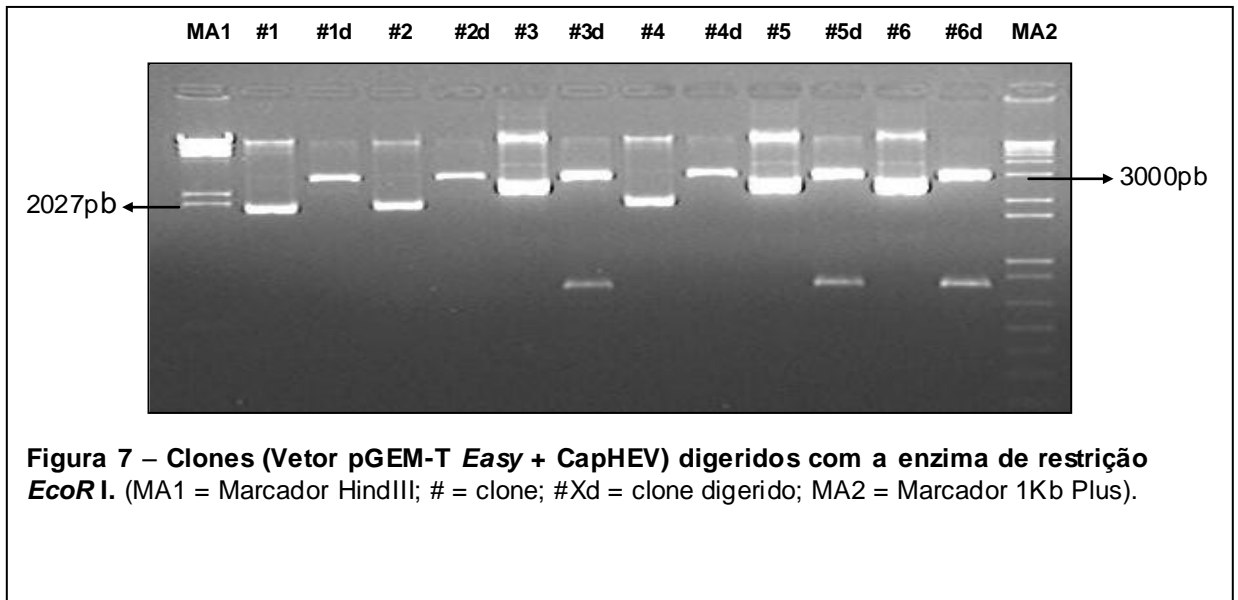
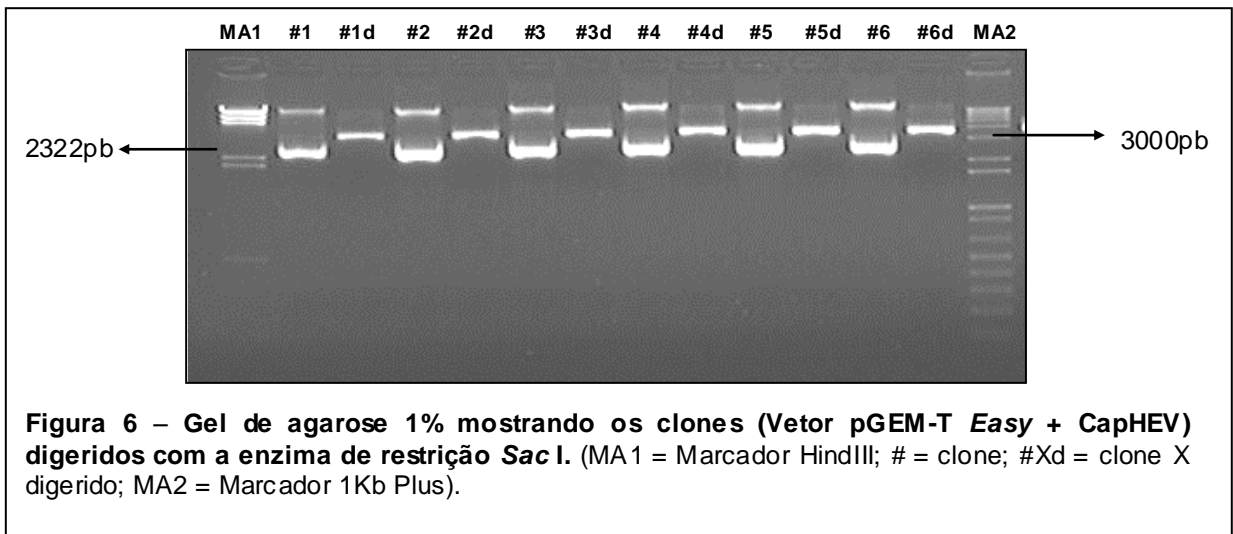


O resultado do sequenciamento foi satisfatório (Id: 51777 - PDTIS/FIOCRUZ), apresentando 90% de identidade com a cepa gb|EF491206.1| (*Hepatitis E virus capsid protein and hypothetical protein genes, partial cds*). Esta cepa tem origem a partir de um estudo envolvendo amostras de fezes suínas, realizado no sudoeste do Brasil, em que o vírus foi detectado e caracterizado molecularmente como pertencente ao genótipo 3 (Paiva *et al.*, 2007). Identidade variando entre 83-86% foi verificada com outros 98 isolados do HEV suíno, também depositados no *Genbank*.

5.2.4. Clonagem do Gene da ORF2 em Vetor Comercial

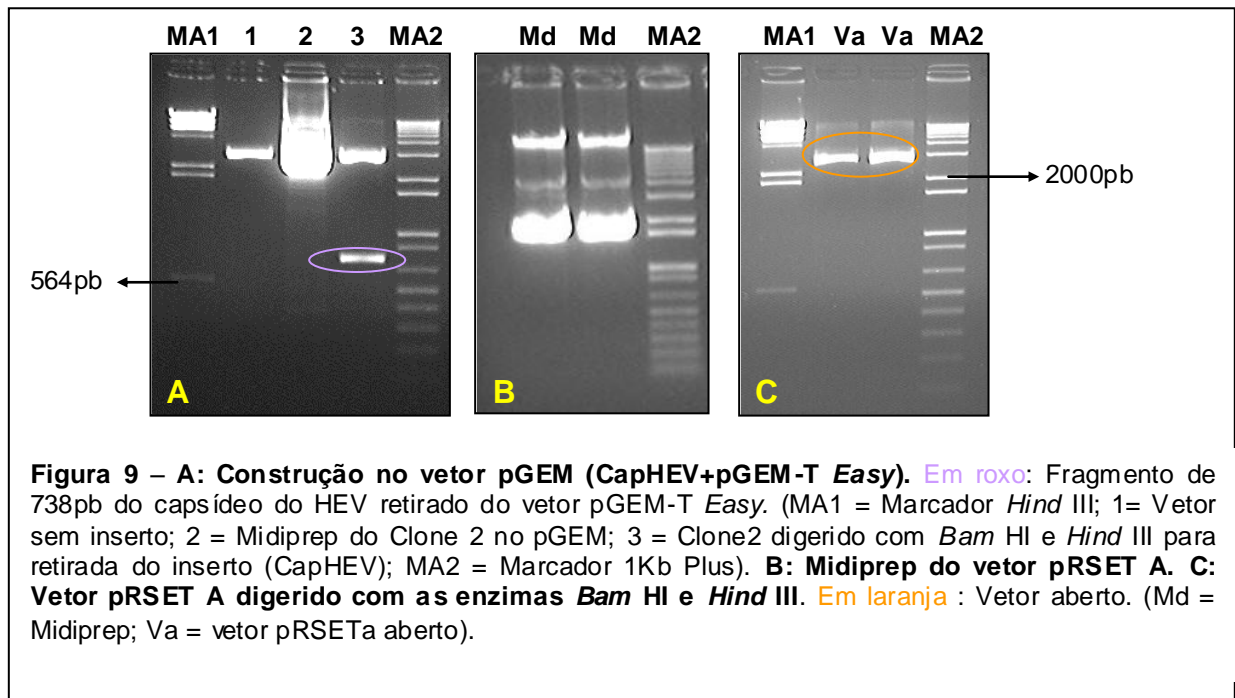
O fragmento do gene do capsídeo amplificado por PCR (Figura 5) foi clonado no vetor pGEM-T *Easy*. Seis clones foram avaliados para a confirmação da clonagem através de digestão enzimática com as enzimas de restrição *Sac I* e *EcoR I*, separadamente. Para digestão realizada com a *Sac I* esperava-se uma banda de 3773 pb, confirmando a clonagem dos cinco clones (Figura 6); Para a digestão realizada com a *EcoR I*, esperava-se três bandas (2997 pb, 560 pb e 216 pb), confirmando apenas a clonagem de três (clones 3, 5 e 6) dos cinco clones (Figura 7). Diante disso, foi realizada a avaliação da clonagem também por PCR (banda esperada: 798 pb), resultando em quatro clones positivos (Figura 8). O sequenciamento

gênico dos clones foi satisfatório (Id: 52596 –PDTIS/FIOCRUZ), sendo então a escolhido o Clone 2 para seguir com a subclonagem.

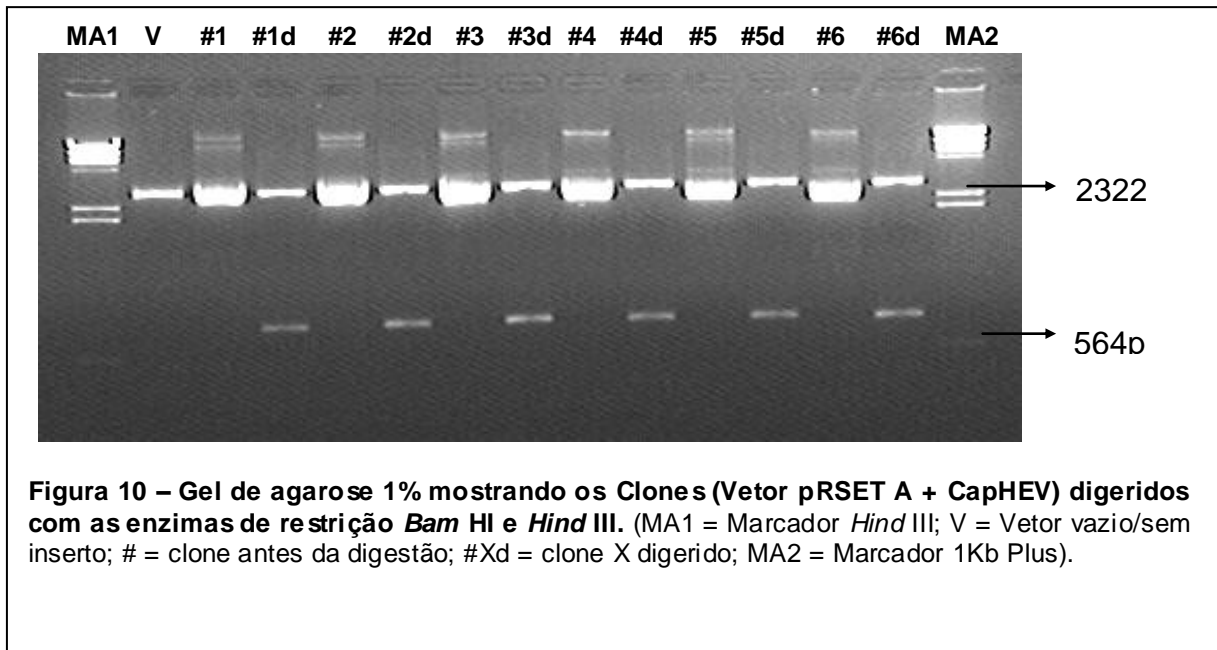


5.2.5. Subclonagem do segmento do gene da ORF2 em vetor de expressão

Utilizando-se das enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III, a sequência que codifica parte do capsídeo viral (738pb) foi removida do vetor comercial pGEM-T *Easy* (Figura 9A). A extração plasmidial em média escala (Midiprep) foi realizada e o plasmídeo referente ao vetor de expressão pRSET A foi visualizado em gel de agarose 1% (Figura 9B). As midipreps foram submetidas a duas reações de digestão (Figura 9C), visando a subclonagem do gene no vetor de expressão em procariotos (pRSET A).



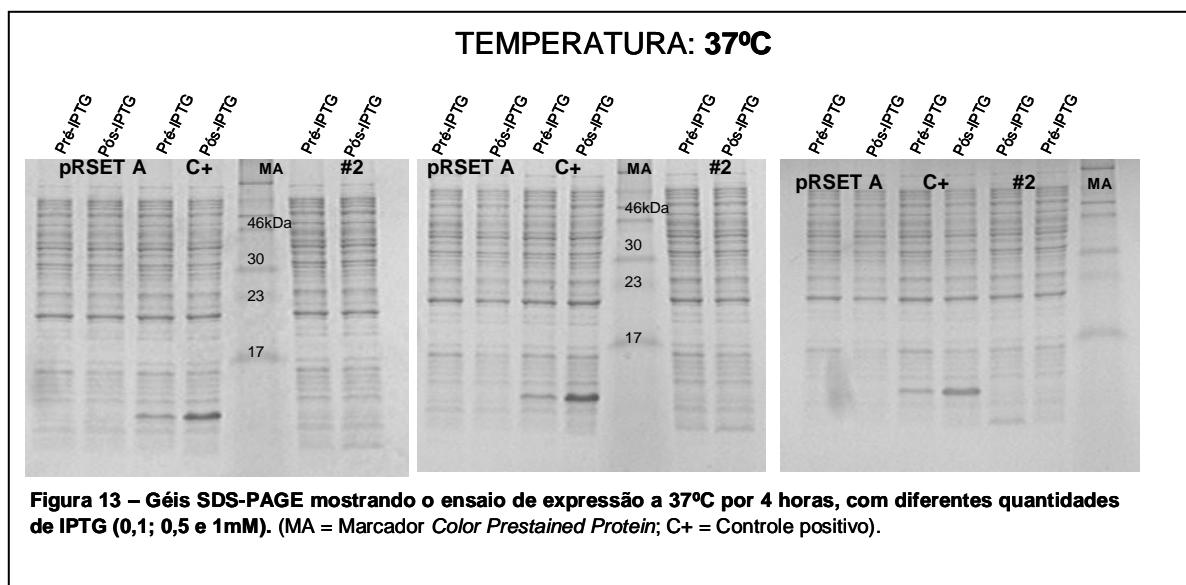
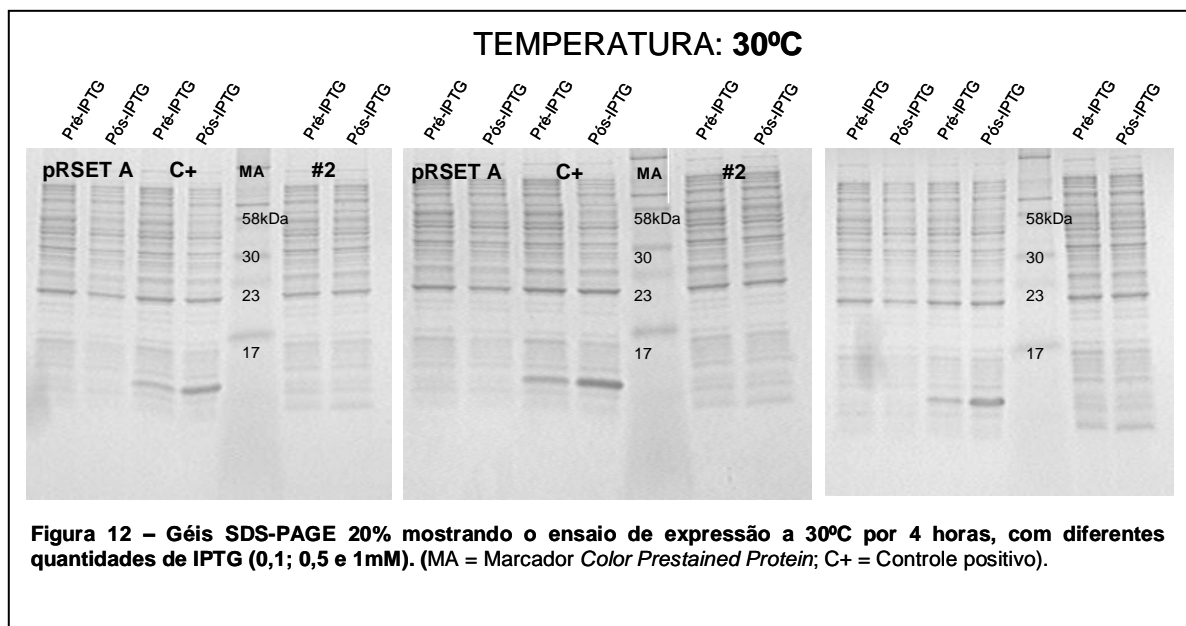
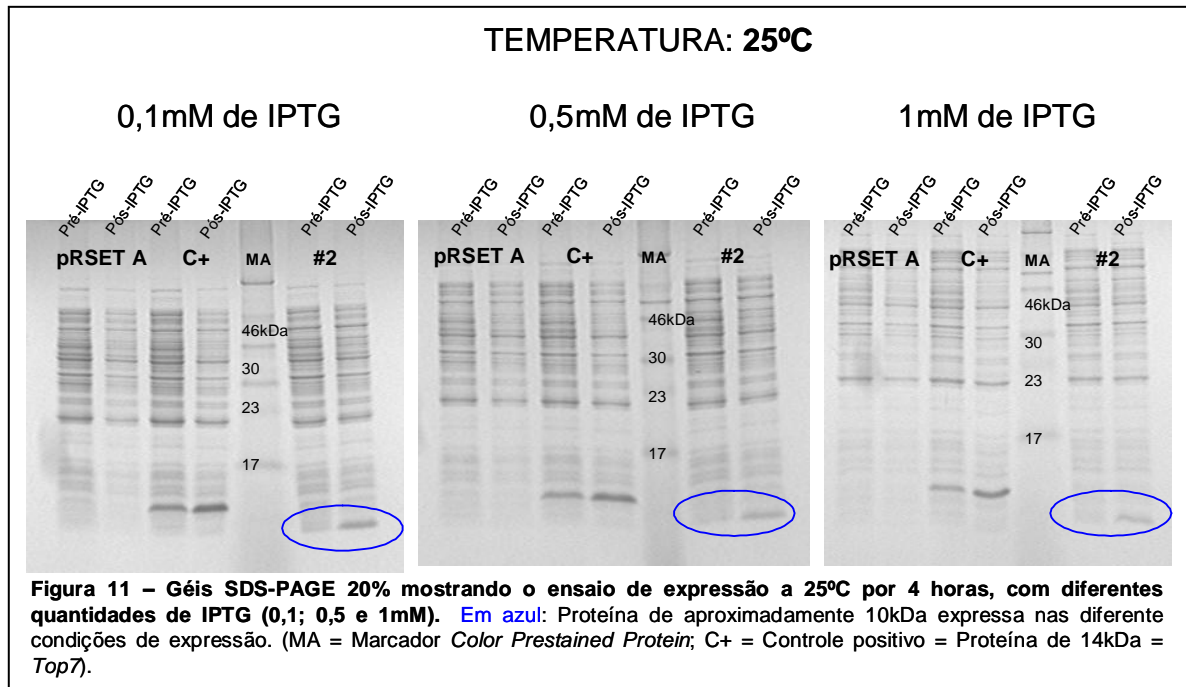
A subclonagem foi avaliada e confirmada por digestão com enzimas de restrição e sequenciamento gênico. Seis clones foram escolhidos aleatoriamente e submetidos à digestão com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III. Dessa digestão, esperava-se a visualização de duas bandas (2856 pb e 732 pb), as quais foram visualizadas em gel de agarose 1%, confirmando o sucesso da clonagem (Figura 10). Três dos seis clones foram submetidos ao sequenciamento gênico, apresentando resultado satisfatório (Id: 60028 – PDTIS/FIOCRUZ), abrindo caminho para dar continuidade às etapas experimentais seguintes.



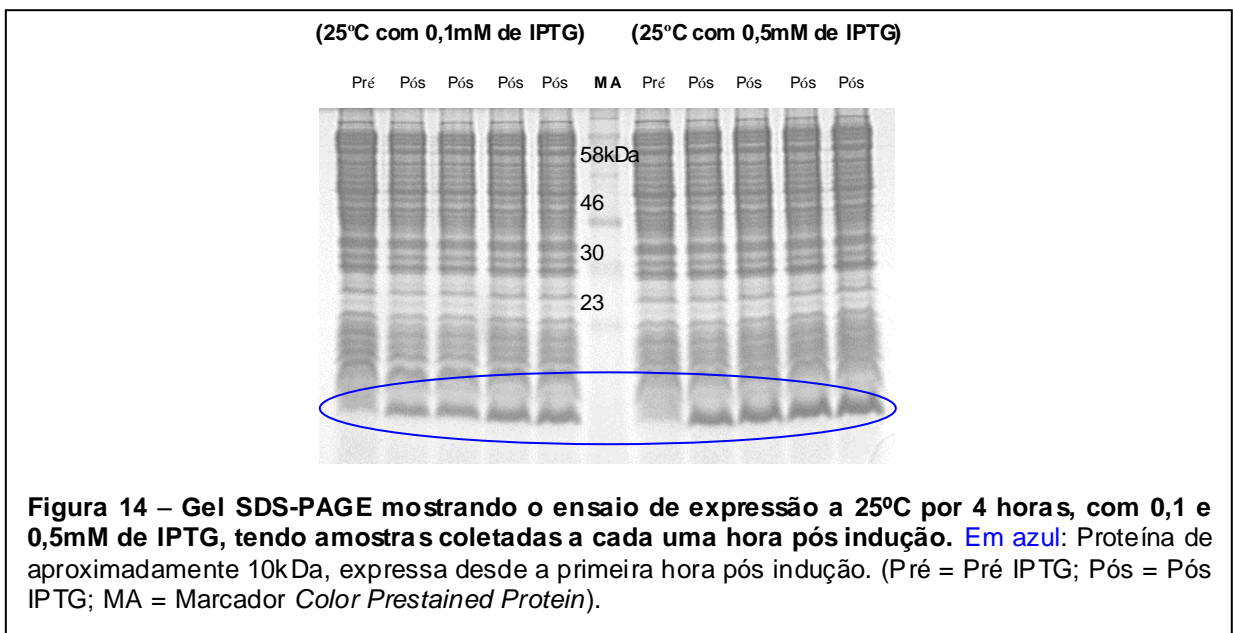
5.2.6. Ensaio de Expressão

Após análise e confirmação da subclonagem, foi escolhido um clone (Clone 2) para a transformação na linhagem BL21 StarTM de *Escherichia coli*. A expressão da proteína recombinante foi induzida em três diferentes temperaturas (25°; 30° e 37°C) e com três diferentes quantidades de IPTG (0,1mM; 0,5mM e 1mM) durante 4 horas. Considerando o tamanho do segmento gênico envolvido nessa estratégia de clonagem e expressão (738pb), esperava-se a expressão de uma proteína com peso molecular de aproximadamente 27 kDa.

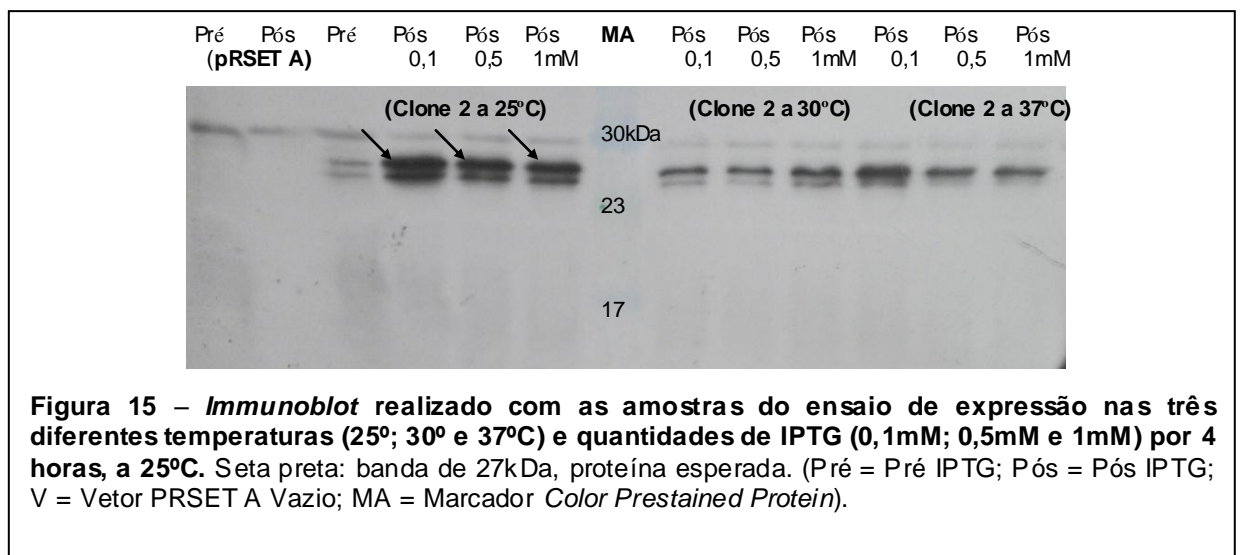
No fracionamento das amostras, oriundas do ensaio de expressão, em gel SDS-PAGE 20%, não foi possível a visualização da proteína predita (27 kDa). Entretanto, houve expressão em grande quantidade de uma proteína com aproximadamente 10 kDa, em todas as condições de expressão testadas (Figuras 11, 12 e 13), principalmente a 25°C com 0,1mM de IPTG (Figura 11, círculo azul).



Considerando que muitas proteínas exógenas são tóxicas às células, suspeitou-se que pudesse ter havido a degradação da proteína esperada durante o tempo de indução. Diante disso, repetiu-se o ensaio de expressão realizando amostragem a cada 1 hora após a indução com IPTG. O fracionamento em gel SDS-PAGE 20% das amostras coletadas não revelou a proteína esperada, mas revelou novamente a proteína de 10 kDa, desde a primeira hora pós indução (Figura 14, círculo azul).

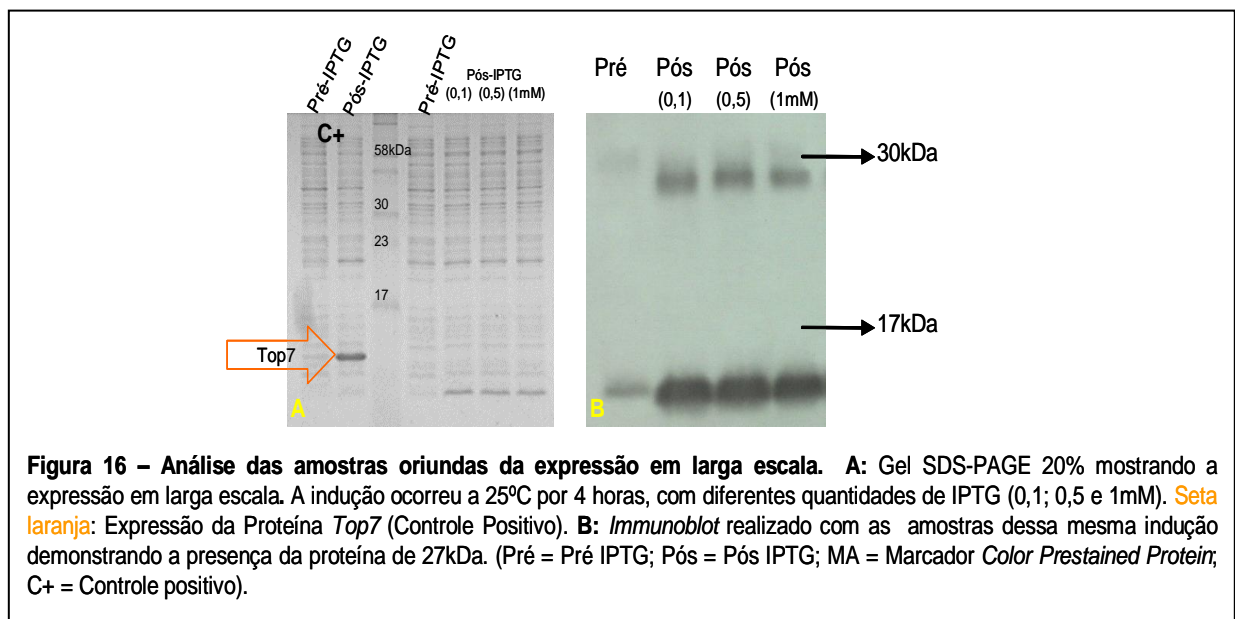


A visualização da proteína esperada (27 kDa) tornou-se possível através de ensaios de *immunoblot*, no qual houve o reconhecimento da proteína pelo anticorpo monoclonal *Anti-polyHistidine* nas três condições de expressão (0,1; 0,5 e 1mM de IPTG). O filme revelado mostrou que a melhor condição de expressão obtida foi a 25°C com 0,1mM de IPTG (Figura 15).

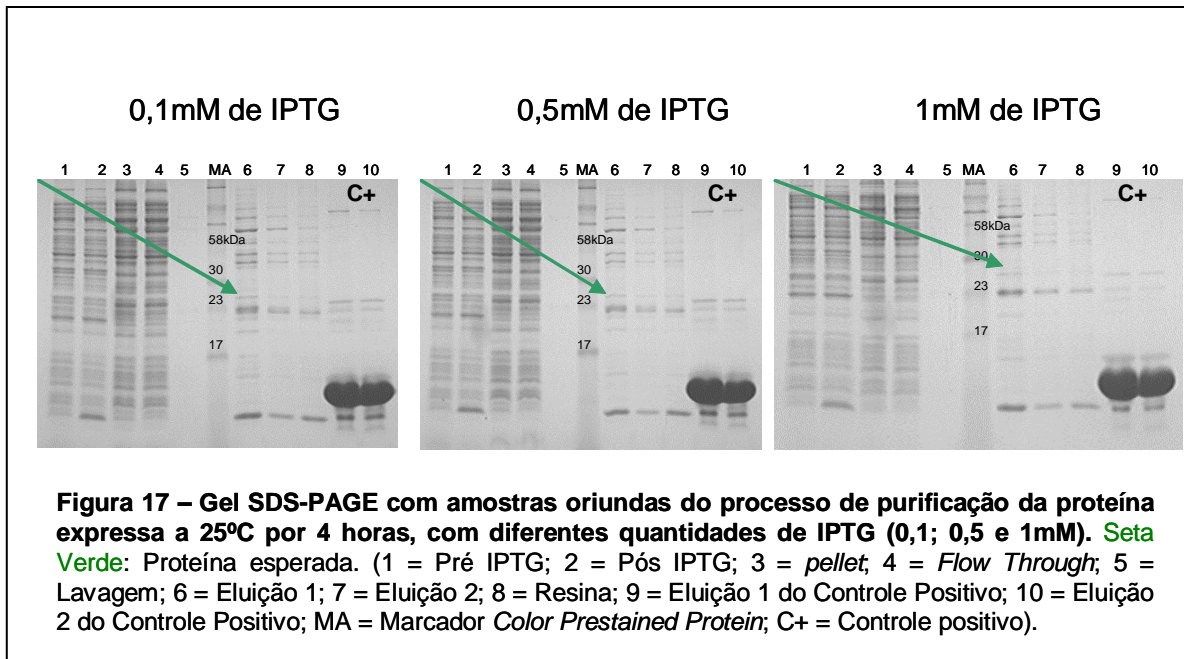


5.2.7. Purificação da proteína recombinante

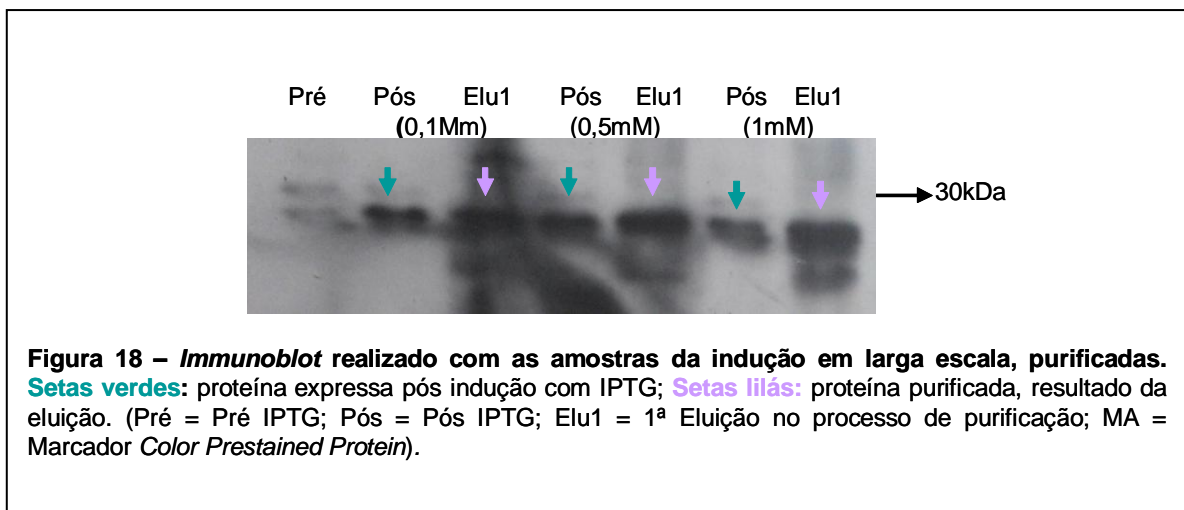
Objetivando purificar o extrato protéico obtido após expressão induzida, realizou-se a expressão em larga escala a 25°C com 0,1; 0,5 e 1mM de IPTG por 4 horas. As amostras coletadas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 20%, no qual não foi possível a visualização da proteína predita. Entretanto, considerando que a proteína poderia estar presente em pequena quantidade, uma vez que o controle positivo *Top7* funcionou perfeitamente (Figura 16A), fez-se ensaios de *immunoblot* com as mesmas amostras resultantes da indução. No filme revelado do *immunoblot* foi possível visualizar a proteína expressa (Figura 20 B), seguindo então para o processo de purificação das amostras. Vale ressaltar, que a proteína de aproximadamente 10 kDa também foi reconhecida neste ensaio de *immunoblot*, e em grande quantidade, parecendo se tratar de parte da proteína de 27 kDa.



O resultado da purificação confirmou a presença de uma sequência de histidina na proteína expressa, a qual finalmente pôde ser visualizada, em gel SDS-PAGE 20%, na forma de uma discreta banda (Figura 17, seta verde). A partir de então a proteína foi denominada *PCapHEV_{sw}* (proteína do capsídeo do vírus da hepatite E suína). A análise em gel das amostras do processo de purificação revelou que a *PCapHEV_{sw}* foi expressa em pequena quantidade (Figura 17, item 6).



No ensaio de *immunoblot*, realizado com as amostras da eluição oriundas do processo de purificação, houve o reconhecimento da proteína *PCapHEVsw* pelo anticorpo monoclonal *Anti-polyHistidine* (Figura 18). Isso confirma o sucesso na expressão da proteína recombinante, porém a tradução parece não ter sido muito eficiente uma vez que a proteína foi expressa em pouca quantidade.



6. DISCUSSÃO

O ELISA é o teste imunoenzimático mais utilizado no diagnóstico sorológico da infecção pelo HEV, porém poucos testes comerciais estão disponíveis. Na detecção do anti-HEV, estes testes utilizam antígenos recombinantes derivados de diferentes cepas do vírus (Dalton *et al.*, 2008). Testes imunoenzimáticos que detectam anti-HEV baseados na proteína da ORF2, ou proteína do capsídeo, têm demonstrado maior reprodutibilidade em laboratório do que os baseados na combinação de antígenos ORF2 e ORF3 do HEV (Meng *et al.*, 2002; Obriadina, 2002). O ELISA tem sido usado para estudos epidemiológicos de infecção pelo HEV em países endêmicos e não endêmicos, apresentando variações na sensibilidade e, conseqüentemente, nas estimativas de soroprevalência, quando considerados os diferentes kits (Mushahwar, 2008; Bendall *et al.*, 2010).

O presente estudo verificou a presença de anticorpos IgG anti-HEV em matrizes oriundas de suinocultura doméstica intensiva, sugerindo que o HEV suíno pode se disseminar no meio do rebanho comercial, fato também evidenciado por dos Santos e colaboradores (2011) ao avaliarem a presença do HEV em suínos e efluentes de matadouros públicos no estado do Rio de Janeiro. Considerando que as matrizes foram descartadas por questão de idade e não por questões sanitárias, fica claro a necessidade de que técnicas de diagnósticos devem ser usadas na triagem de vírus zoonóticos, e não só a inspeção visual dos animais e das carcaças que é realizada rotineiramente nos matadouros. Os resultados apresentados aqui demonstram que animais considerados saudáveis podem ser uma fonte de infecção do HEV, sugerindo que, embora a maioria dos animais atinjam a idade de abate já imune a este vírus, um número significativo destes animais apresentam infecção atual em idade comercial, apesar de não apresentarem sinais clínicos ou histopatológicos (dos Santos *et al.*, 2009).

A análise dos resultados obtidos confirmam a circulação do vírus da hepatite E em rebanhos suínos brasileiros, como foi evidenciado também nos trabalhos de Guimarães *et al.*, 2005; Vitral *et al.*, 2005; Paiva *et al.*, 2007; dos Santos, 2009 e 2011; Souza 2012; e Gardinali *et al.*, 2012. Contudo, a prevalência de anticorpos em 50% das amostras dos suínos domésticos aqui analisadas, conseqüentemente a ausência em 50% das amostras, implica na necessidade de mais análises envolvendo um número amostral maior, afim de complementar os resultados obtidos. Entretanto, esse trabalho não deixa de contribuir para estudos de epidemiologia do HEV suíno no Brasil.

Os suínos domésticos são conhecidos como um dos principais reservatórios do HEV (Takahashi *et al.*, 2004). Considerando a semelhança taxonômica entre suínos domésticos e suínos selvagens (javalis), estudos tem mostrado que o javali pode ser tão susceptível ao HEV como os suínos domésticos. Estudos realizados no Japão (Takahashi *et al.*, 2004), na Alemanha (Kaci *et al.*, 2008), na Espanha (De Deus *et al.*, 2008), na Itália (Martelli *et al.*, 2008), na Holanda (Rutjes *et al.*, 2010) e na França (Capentier *et al.*, 2012) demonstraram a presença de HEV em javalis, concluindo que estes também podem representar um importante reservatório da infecção pelo HEV.

No Brasil, o primeiro trabalho envolvendo suínos selvagens foi realizado em 2012 por Gardinali e colaboradores. Eles investigaram a presença do HEV suíno, por RT-PCR, em nove amostras de fezes de javalis jovens (13 semanas de idade) e adultos (24 semanas de idade), não encontrando a presença do vírus nesses animais. O trabalho aqui descrito é a primeira análise sorológica da presença do HEV envolvendo suínos selvagens no Brasil. O número amostral que parece ser pequeno é estatisticamente considerável, levando-se em conta a dificuldade em conseguir amostras de sangue de javalis livres. A ausência do HEV suíno na população de javalis aqui estudada corrobora com os resultados de Michitaka e colaboradores (2007), os quais encontraram uma taxa de IgG anti-HEV maior em javalis criados do que em javalis capturados.

Pesquisadores defendem que o risco de transmissão de patógenos entre animais criados em sistema intensivo é maior comparado a animais criados livres (Ruiz-Fons *et al.*, 2006 e Vicente *et al.*, 2004). Suínos mais velhos (mais de 20 semanas de idade) são mais positivos para a presença de IgG anti-HEV, sugerindo que o HEV suíno pode se disseminar no meio do rebanho comercial (Vital *et al.*, 2005), o mesmo foi relatado por Clayson *et al.*, 1995; Arankalle *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2003 e Meng *et al.*, 2009. A presença de IgG em suínos confinados e o risco de disseminação de vírus em suínos criados em sistema de confinamento, justifica a necessidade do desenvolvimento de testes de diagnósticos economicamente acessíveis para serem usados na triagem de vírus zoonóticos em rebanhos comerciais.

Os resultados obtidos neste estudo são de grande interesse, uma vez que é necessário saber mais sobre rebanhos negativos e sobre as diferenças entre os rebanhos não infectados e infectados. Estudar as diferenças nas condições de criação, gestão e terceirização de leitões por exemplos, contribui na identificação de fatores de risco para a infecção pelo HEV suíno, bem como para a investigação da introdução do vírus em criações intensivas. A implementação de um sistema adequado de vigilância, baseado em técnicas de diagnóstico

laboratoriais contribuem na coleta de informações sobre o estado infeccioso do animal que será introduzido no rebanho, podendo dessa forma reduzir a prevalência da infecção pelo HEV entre os animais de uma criação.

Métodos de diagnósticos tem sido desenvolvidos e aplicados na investigação da infecção pelo HEV, no entanto o desenvolvimento de métodos que sejam sensíveis, específicos, simples, padronizados e de baixo custo se faz necessário. Neste sentido, conforme proposto nesse trabalho, os primeiros passos foram dados na tentativa de desenvolver ferramentas para uso em diagnóstico da hepatite E suína. Lee e colaboradores (2013) desenvolveram um protocolo de ELISA, utilizando uma proteína recombinante do capsídeo do HEV. A eficácia do método desenvolvido por eles foi avaliada e considerada satisfatória. Baseando-se nesse protocolo, o qual considerou que a região mais imunogênica do vírus é a região da ORF2 do genoma viral, buscou-se expressar parte deste segmento, que codifica o capsídeo do vírus, em sistema procarioto.

A amplificação do segmento gênico e a clonagem em vetor de expressão foram realizadas com sucesso. No entanto, a expressão da proteína recombinante foi considerada insuficiente, uma vez que a proteína expressa foi visualizada em gel SDS-PAGE em pequena quantidade. Apesar do desenvolvimento de vetores de expressão eficientes, existem várias dificuldades associadas à produção de proteínas a partir de genes exógenos clonados em *E. coli*. Esses problemas podem estar relacionados tanto a sequência do gene exógeno, quanto a limitações de *E. Coli* como hospedeira para a síntese de proteínas recombinantes (Brown, 2003).

Campbell & Farrell (2007) alertam para o controle no tempo de expressão, uma vez que muitas proteínas exógenas são tóxicas às células. Contudo, o tempo parece não ter influenciado numa possível degradação da proteína recombinante desejada, uma vez que não foi possível a visualização da mesma, no tamanho esperado, desde a primeira hora de indução. No entanto, foi possível a visualização de uma proteína de aproximadamente 10 kDa desde a primeira hora pós indução com IPTG, ficando a suspeita da possibilidade desta ser parte da proteína esperada (27 kDa).

A presença dessa proteína de ~10 kDa desde os primeiros ensaios de expressão deixam duas possibilidades de explicação: A primeira, de que o gene exógeno pode conter sequências que atuaram como sinais de terminação em *E. coli*. Essas sequências são perfeitamente inócuas na célula hospedeira normal, mas na bactéria resultam em terminação prematura e na perda de expressão gênica. A segunda, seria a possibilidade de na sequência existir códons raros para *E. coli* que também resultariam na terminação prematura da tradução.

Considerando essas possibilidades, verificou-se a presença de *stop códons* (códon de terminação) e de códon raros na sequência gênica amplificada e sequenciada.

Segundo Nakamura (2012), as sequências que codificam códon de terminação nos outros organismos (TGA; TAA; TAG) são as mesmas para *E. coli*. Na sequência utilizada na estratégia aqui descrita, não foi encontrada nenhuma trinca que codificasse um códon de terminação. No entanto, baseando-se nas sequências citadas por Sahdev e colaboradores (2008) como códon raros para *E. coli*, foi possível encontrar uma quantidade considerável deles (16/240 trincas), o que pode justificar a baixa eficiência na tradução.

Apesar de virtualmente todos os organismos utilizarem o mesmo código genético, cada um possui um viés associado à tendência de utilizar preferencialmente determinados códon. Esse viés reflete a eficiência com a qual as moléculas de RNA transportadores (tRNA) são capazes de reconhecer os diferentes códon no organismo. Se um gene clonado contém uma proporção elevada de códon desfavoráveis, os tRNAs da célula hospedeira podem encontrar dificuldades na tradução do gene, reduzindo a quantidade de proteína que é sintetizada (Brown, 2003).

Alguns outros fatores podem explicar a quantidade pequena da proteína esperada; dentre eles, a origem da cepa utilizada na amplificação do segmento gênico viral. No trabalho de Lee e colaboradores (2013), sua sequência gênica teve origem a partir de amostras de soro de suínos de uma fazenda localizada na Coreia. A sequência utilizada no estudo aqui descrito foi oriunda de fezes de um suíno naturalmente infectado pelo HEV na região do Rio de Janeiro (Brasil). Cepas diferentes podem resultar em sequências diferentes na amplificação, consequentemente na tradução.

A produção de uma versão artificial do gene de interesse pode ser uma alternativa na tentativa de garantir que a construção resultante contenha os códon preferidos por *E. coli*, assim como não possui terminadores prematuros que implicam na tradução parcial da proteína esperada. Além disso, existem no mercado cepas derivadas da BL21 que possuem tRNA para códon raros de *E. coli*, resultando no aprimoramento na expressão de proteínas. Estas soluções, assim como a mudança no vetor de expressão, podem ser consideradas possíveis soluções para a obtenção de uma quantidade maior da proteína recombinante aqui apresentada.

Por fim, o presente estudo, que começou com uma análise epidemiológica envolvendo amostras de suínos domésticos e selvagens, possui inúmeras perspectivas uma vez que um dos seus objetivos é o desenvolvimento de ferramentas de diagnósticos para fins biotecnológicos. Diante do exposto, esse trabalho tem grande relevância por ser a primeira análise sorológica

da presença do HEV envolvendo suínos selvagens no Brasil, confirmando a circulação desse vírus em rebanhos brasileiros, bem como a ausência do mesmo na população de suínos selvagens analisada. Com isso, esse trabalho contribui para estudos de epidemiologia do HEV no país, alerta para o risco de transmissão zoonótica desse vírus e sugere a continuidade desse estudo, a fim de complementar os resultados aqui apresentados.

7. CONCLUSÕES

Este trabalho contribui para estudos de epidemiologia do HEV no Brasil, assim como confirma a circulação do vírus da hepatite E em rebanhos suínos brasileiros.

A análise sorológica da prevalência de IgG anti-HEV envolvendo suínos selvagens (*Sus scrofa scrofa*) é um trabalho pioneiro no Brasil e deverá ser continuada.

Os resultados obtidos justificam a necessidade do desenvolvimento de testes de diagnósticos economicamente acessíveis para serem usados na triagem do HEV em rebanhos suínos comerciais.

A clonagem da sequência de DNA, que codifica a proteína do capsídeo do HEV, possibilitou a expressão e purificação da proteína recombinante (*PCapHEV_{sw}*) para fins biotecnológicos, o que resultará no desenvolvimento de insumos para imunodiagnóstico que serão aplicados a estudos de epidemiologia do vírus da hepatite E suína.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAVANAEL-LEGRAND, F. *et al.* Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis.* 202: 835-844, 2010.
- ARANKALLE V.A. *et al.* Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J. Viral. Hepat.* 8: 223–227, 2001.
- BATTS W.; YUN S.; HEDRICK R.; WINTON J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* 158(1-2): 116-123, 2011.
- BEGUM, N. *et al.* Seroprevalence of subclinical HEV infection in pregnant women from north India: a hospital based study. *Indian J. Med. Res.* 130(6): 709-713, 2009.
- BENDALL, R. *et al.* Comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol.* 82: 799–805, 2010.
- BILE, K. *et al.* Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. *J Tropic Med Hyg.* 51: 466–474, 1994.
- BILLAM, P. *et al.* Systematic pathogenesis and replication of avian hepatitis E virus in specific-pathogen-free adult chickens. *J Virol.* 79:3429–37, 2005.
- BRASSARD, J. *et al.* Detection of Human Food-Borne and Zoonotic Viruses on Irrigated, Field-Grown Strawberries. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(10): 3763-3766, 2012.
- BROWN, T.A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma Introdução.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- BUTI, M. *et al.* Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J. Hepatol.* 41: 126-131, 2004.
- CAMPBELL, M.K. and FARREL, S.O. **Bioquímica.** Vol 1. São Paulo, SP: Thompson Learning, 2007.
- CAMPBELL, M.K. and FARREL, S.O. **Bioquímica.** Vol 2. São Paulo, SP: Thompson Learning, 2007.
- CARPENTIER, A. *et al.* High Hepatitis E Virus Seroprevalence in Forestry Workers and in Wild Boars in France. *Journal of Clinical Microbiol.* 50 (9): 2888-2893, 2012.
- CASAS, M. *et al.* Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Vet Microbiol.* 135: 248-252, 2009.
- CLAYSON, E.T. *et al.* Detection of Hepatitis E virus infection among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg.* 53: 228-232, 1995.

- CLEMENTE-CASARES, P. *et al.* Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries, *Emerg. Infect. Dis.* 9: 448–454, 2003.
- COLSON, P. *et al.* Acute and chronic hepatitis E in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Viral Hepat.* 18: 227–228, 2011.
- COLSON, P. *et al.* Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol.* 45: 269–271, 2009.
- COLSON, P. *et al.* Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis.* 202: 825–834, 2010.
- COURSAGET, P. *et al.* Hepatitis E virus infection in Turkey. *Lancet.* 342(8874): 810-811, 1993.
- CRUELLES, M.R. *et al.* Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay. *Gastroenterology Hepatology.* 206: 295-298, 1997.
- DA SILVA, S.M.T. *et al.* Prevalence of hepatitis E virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 107(3): 338-341, 2012.
- DALTON, H.R. *et al.* Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J. Viral Hepat.* 14(5): 304-309, 2007.
- DALTON, H.R. *et al.* Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis.* 89: 698-709, 2008.
- DALTON, H. R. *et al.* Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med.* 361: 1025–1027, 2009.
- DE DEUS, N. *et al.* Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-tofinish farm. *Vet Microbiol.* 132: 19-28, 2008.
- DOS SANTOS, D.R. *et al.* First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *Journal of Clinical Virology.* 47: 276-279, 2010.
- DOS SANTOS, D.R. *et al.* Hepatitis E virus in swine and affluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Veterinary Microbiology.* 149: 236-241, 2011.
- DOS SANTOS, D.R. *et al.* Sorological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J.* 182: 474-480, 2009.
- DREXLER, J.F. *et al.* Bats worldwide carry hepatitis E-related viruses that form a putative novel genus within the family *Hepeviridae*. *Journal of Virology.* 86 (17): 9134–9147, 2012.
- DROBENIUC, J. *et al.* Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J. Infect. Dis.* 184: 1594–1597, 2001.
- EL-SAYED, M.Z. *et al.* Acute sporadic hepatitis E in children: diagnostic relevance of specific immunoglobulin M and immunoglobulin G compared with nested reverse transcriptase PCR. 48 (1): 16–20, 2006.

- EMERSON, S.U. *et al.* ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J Virol.* 80 (21): 10457–10464, 2006.
- FERNANDEZ-BARREDO, S. *et al.* Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 18: 462-465, 2006.
- FITZSIMONS, D. *et al.* Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology. *Vaccine.* 28: 2062, 2010.
- FOCCACIA, R. and VERONESI, R. **Tratado de Infectologia.** 3 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2006.
- GARDINALI, N.R. *et al.* Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. *Research in Veterinary Science* . 93 (3): 1515–1519, 2012.
- GENBANK. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_257785491>. Acesso em 02 jun. 2014.
- GENG, Y. *et al.* Serological prevalence of hepatitis e virus in domestic animals and diversity of genotype 4 hepatitis E virus in china. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10(8): 765–770, 2010.
- GEROLAMI, R.; MOAL, V.; COLSON, P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med.* 358: 859–860, 2008.
- GOLDSMITH, R.; YARBOUGH P.O.; REYES G.R. Enzymelinked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children. *Lancet* 339: 328-331, 1992.
- GONÇALES, N. *et al.* Hepatitis E vírus immunogloulin G antibodies in different populations in Campinas, Brazil. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology* 7: 813-816, 2000.
- GRAFF, J. *et al.* The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J Virol.* 79(11): 6680–6689, 2005.
- Guia de Vigilância Epidemiológica - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- GUIMARÃES R.F. *et al.* Hepatitis E virus antibodies in swine herds of Mato Grosso state, central Brasil. *Braz J Microbiol.* 36: 223-226, 2005.
- GUTHMANN, J.P. *et al.* A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin Infect Dis.* 42: 1685–1691, 2006.
- HALAC, U. *et al.* Chronic hepatitis E infection in liver transplanted children. *Gut.* 61: 597–603, 2012.

- HALBUR, P.G. *et al.* Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol.* 39(3): 918-923, 2001.
- HALBUR, P.G. *et al.* Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.* 39(3): 918-923, 2001.
- HAQSHENAS, G. *et al.* Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitissplenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* 82: 2449–2462, 2001.
- HERREMANS, M. *et al.* Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin Vaccine Immunol.* 14: 562–568, 2007.
- HU G.D. and MA X. Detection and sequences analysis of bovine hepatitis E virus RNA in Xinjiang Autonomous Region. *Bing Du Xue Bao.* 26(1): 27–32, 2010.
- HAAGSMA, E.B. *et al.* Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl.* 16:474–477, 2010
- IBARRA, D. *et al.* Prevalence of hepatitis E virus antibodies in blood donors and other population groups in southern Chile. *Revista de Medicina Chilena.* 125: 275-278, 1997.
- JOHNE, R. *et al.* Detection of a novel hepatitis E like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 91(3): 750–758, 2010.
- JOTHIKUMAR, N. *et al.* A broadly reactive onestep real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol Methods.* 131: 65-71, 2006.
- KABA, M. *et al.* Epidemiology of Mammalian Hepatitis E Virus Infection. *Intervirology.* 56: 67–83, 2013.
- KABA, M. *et al.* Frequent transmission of hepatitis E virus among piglets in farms in Southern France. *Journal of Medical Virology.* 81(10): 1750–1759, 2009.
- KABA, M. *et al.* Hepatitis E virus genotype 3f in pigs in New Caledonia. *Australian Veterinary Journal.* 89(12): 496-499, 2011.
- KABA, M. Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Med Virol.* 83: 1704–1716, 2011.
- KACI, S.; Nockler, K.; Johne, R. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet. Microbiol.* 128(3-4): 380-385, 2008.
- KAMAR, N. *et al.* Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 358: 811–817, 2008.
- KAMAR, N. *et al.* Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* 50: 30–33, 2010.

- KASORNDORKBUA, C. *et al.* Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin. Microbiol.* 42: 5047- 5052, 2004.
- KONOMI, N. *et al.* Epidemiology of hepatitis B, C, E and G virus infections and molecular analysis of hepatitis G virus isolates in Bolivia. *Journal of Clinical Microbiology.* 37: 3291-3295, 1999.
- KRAWCZYNSKI, K. Hepatitis E. *Hepatology.* 17: 932-941, 1993.
- KUNO, A. *et al.* Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatol. Res.* 26: 237-242, 2003.
- KWO, P.Y.; SCHLAUDER, G.G.; CARPENTER, H.A. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc.* 72: 1133-1136, 1997.
- LEE, W.J. *et al.* Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-IgG against swine hepatitis E virus. *J Vet Sci.* 14(4):467-72, 2013.
- LEWIS H.C.; WICHMANN, O.; DUIZER, E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect.* 138: 145-166, 2010.
- LI, S.W. *et al.* A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine.* 23: 2893-2901, 2005.
- LI, T.C. *et al.* Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis.* 11: 1958-1960, 2005.
- LIN, K. *et al.* Multiplex method for simultaneous serological detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *J Clin Microbiol.* 49: 3184-3190, 2011.
- LIU J. *et al.* Prevalence of antibody to hepatitis E virus among pet dogs in the Jiang-Zhe area of China. *Scand. J. Infect. Dis.* 41(4): 291-295, 2009.
- LOK, A.S.; KWAN, W.K.; MOECKLI, R. Seroepidemiological survey of hepatitis E in Hong Kong by recombinant-based enzyme immunoassays. *Lancet.* 340: 1205-1208, 1992.
- LORENZO F.R. *et al.* Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from farm pigs in Mongolia. *J Med Virol.* 79: 1128-1137, 2007.
- LU, L.; HAGEDORN, C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol.* 16: 5-36, 2006.
- MALLET, V. *et al.* Brief communication: case reports of ribavirin treatment for chronic hepatitis E. *Ann Intern Med.* 153: 85-89, 2010.
- MARTELLI, F. *et al.* Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet. Microbiol.* 126(1-3): 74-81, 2008.

- MARTOLIA, H.C. *et al.* An outbreak of hepatitis E tracked to a spring in the foothills of the Himalayas, India, 2005. *Indian J Gastroenterol.* 28: 99–101, 2009.
- MAST, E.E. *et al.* Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E virus antibody serum panel evaluation group. *Hepatology.* 27: 857-861, 1998.
- MENG X. J. Recent advances in Hepatitis E virus. *J Vir Hepat.* 17: 153 -161. 2010a.
- MENG X.J. *et al.* Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol.* 72: 9714–9721, 1998.
- MENG X.J. *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol.* 40: 117–122, 2002.
- MENG, X.J. *et al.* A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 9860-9865, 1997.
- MENG, X.J. Hepatitis E virus; Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol.* 140: 256-265, 2010b.
- MENG, X.J. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364: 2697–2707, 2009.
- MICHITAKA, K. *et al.* Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatology Research.* 37(3): 214–220, 2007.
- Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. Ano III - nº 1, 2012.
- MUSHAHWAR, I.K. *et al.* Serological studies of an enterically transmitted non-A. Non-B hepatitis in Somalia. *J Med Virol.* 40: 218–221, 1993.
- MUSHAHWAR, IK. Hepatitis E Virus: Molecular Virology, Clinical Features, Diagnosis, Transmission, Epidemiology, and Prevention. *J Med Virol.* 80: 646–658, 2008.
- NAKAI, I. *et al.* Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms. *Am J Trop Med Hyg.* 75: 1171-1177, 2006.
- NAKAMURA, M. *et al.* Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol. Res.* 34: 137–140, 2006.
- NAKAMURA, Y. Escherichia coli/Codon usage, 2012. *Open Wet Ware.* Disponível em: <http://openwetware.org/wiki/Escherichia_coli/Codon_usage>. Acesso em 15 jan. 2015.
- OBRIADINA, A. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. *J Gastroenterol Hepatol.* 17: 360-364, 2002.

- OKAMOTO, H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127: 216–228, 2007.
- PAHO: Pan American Health Organization. Dia Mundial da Hepatite 2014: pense novamente. Washington, D.C., 2014.
- PAIVA, H.H. *et al.* Molecular characterization of swine hepatitis E virus from Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 693-698, 2007.
- PAL, R. *et al.* Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J. Gastroenterol Hepatol*. 20: 1094-1101, 2005.
- PANG, L, *et al.* Short Report: hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 52: 347-348, 1995.
- PARANA, R. *et al.* Etiology of acute sporadic viral hepatitis in Brazil. *Journal of Hepatology* 22: 484, 1995.
- PAVIO, N. and MANSUY, J.M. Hepatitis E in high-income countries. *Curr Opin Infect Dis*. 23: 521-527, 2010.
- PAVIO, N.; MENG, X. J.; RENOU, C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Veterinary Research*. 41(6): 46, 2010.
- PAYNE C.J. *et al.* Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet. Microbiol*. 68: 119–125, 1999.
- PERALTA, B. *et al.* Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. *Vet Microbiol*. 137(1-2): 66–73, 2009.
- PEREZ, O.M. *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis A, B, C, and E viruses in a healthy population in Leon, Nicaragua. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. 55: 17-21, 1996.
- PERON, J.M. *et al.* Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J. Viral Hepat*. 14: 298–303, 2007.
- PILLOT, J.; LAZIZI, Y.; DIALLO, Y. Frequent sporadic hepatitis E in West Africa evidenced by characterization of a virus-associated antigen in the stool. *J. Hepatol*. 15: 420-421, 1992.
- RAMACHANDRAN, J. *et al.* Hepatitis E superinfection produces severe decompensation in patients with chronic liver disease. *J. Gastroenterol Hepatol*. 19: 134, 2004.
- RODRÍGUEZ-FRIAS, F.; JARDI, R. BUTI, M. Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30 (10): 624–634, 2012.

- RODRIGUEZ-LAZARO, D. *et al.* Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews*. 36 (4): 786–814, 2012.
- RUIZ-FONS, F. *et al.* Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*. 65(4): 731–743, 2006.
- RUTJES, S.A. *et al.* Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *Journal of Virology Methods*. 168: 197-206, 2010.
- SAHDEV, S.; KHATTAR, S.K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem*. 307: 249–264, 2008.
- SANTOS, N. S.O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução a Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- SCHLAUDER, G.G. and MUSHAHWAR, I.K. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol*. 65: 282–292, 2001.
- SCHLAUDER, G.G.; DESAI, S.M.; ZANETTI, A.R. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol*. 57: 243-251, 1999.
- SCHOFIELD, D.J. *et al.* Identification by Phage Display and Characterization of Two Neutralizing Chimpanzee Monoclonal Antibodies to the Hepatitis E Virus Capsid Protein. *Journal of Virology*. 74(12): 5548-5555, 2000.
- SEHGAL, D. *et al.* Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein. *Virol J*. 3: 38-47, 2006.
- SHUKLA, P. *et al.* Hepatitis E virus infection among animals in northern India: an unlikely source of human disease. *J. Viral. Hepat*. 14(5): 310–317, 2007.
- SIM: Sistema de Informações sobre Mortalidade. Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. Ministério da Saúde (Brasil). Ano III - nº 1, 2012.
- SIVAPALASINGAM, S. *et al.* A multistate outbreak of Salmonella enterica serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of water-dip disinfection technology. *Clin. Infect. Dis*. 37:1585–1590, 2003.
- SOGABE, S. *et al.* Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. *Hepatol Res*. 42: 870–878, 2012.
- SONODA, H. *et al.* Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J. Clin. Microbiol*. 42: 5371–5374, 2004.

- SOUTO, F.J. *et al.*. Short report: further evidence for hepatitis E in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. 57: 149-50, 1997.
- SOUZA, A.J.S. *et al.* HEV infection in swine from Eastern Brazilian Amazon: Evidence of co-infection by different subtypes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 35: 477– 485, 2012.
- SURJIT, M.; JAMEEL, S.; LAL, S.K. The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA. *J Virol*. 78(1): 320–328, 2004.
- SURYA, I.G. *et al.* Serological markers of hepatitis B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus type-1 infections in pregnant women in Bali, Indonesia. *J Med Virol*. 75: 499–503, 2005.
- 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*. 330: 501–505, 2004.
- TAKAHASHI, M. *et al.* Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol*. 153(9): 1703–1713, 2008.
- TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H. Identification of a Genotype III Swine Hepatitis E Virus That Was Isolated from a Japanese Pig Born in 1990 and That Is Most Closely Related to Japanese Isolates of Human Hepatitis E Virus. *J. Clin. Microbiol*. 41(3): 1342-1343, 2003.
- TAKEDA, H. *et al.* A nationwide survey for prevalence of hepatitis E virus antibody in qualified blood donors in Japan. *Vox Sang*. 99: 307–313, 2010.
- TEI, S. *et al.* Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 362: 371–373, 2003.
- THIRY, D. *et al.* Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium. *Veterinary Microbiology*. 172 (3–4): 407–414, 2014.
- TRINTA, K.S. *et al.* E virus infection in selected Brazilian populations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96: 25-29, 2001.
- TSAREV, S.A. *et al.* Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J. Infect. Dis*. 172: 31–37, 1995.
- TYAGI, S. *et al.* The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-microglobulin/ bikunin precursor (AMBP) and expedites their export from the hepatocyte. *J Biol Chem*. 279 (28): 29308– 29319, 2004.

- TYAGI, S. *et al.* The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem.* 277 (25): 22759–22767, 2002.
- TYAGI, S.; SURJIT, M.; LAL, S.K. The 41-amino-acid C-terminal region of the hepatitis E virus ORF3 protein interacts with bikunin, a kunitz-type serine protease inhibitor. *J Virol* 79 (18): 12081–12087, 2005.
- TYRREL, S.F. and QUINTON, J.N. Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. *J. Appl. Microbiol.* 94(Suppl.): S87–S93, 2003.
- VAN DER POEL, W.H. *et al.* Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 7: 970-976, 2001.
- VICENTE, J. *et al.* Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Research.* 35(2):243-53, 2004.
- VITRAL, C.L. *et al.* Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100: 117-122, 2005.
- VIVEK, R. *et al.* Investigation of an epidemic of Hepatitis E in Nellore in South India. *Trop Med Int Health.* 15: 1333–1339, 2010.
- WANG, Y. and MA, X. Detection and sequences analysis of sheep hepatitis E virus RNA in Xinjiang autonomous region. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 50(7): 937–941, 2010.
- WILHELM, B.J. *et al.* A systematic review/meta-analysis of primary research investigating swine, pork or pork products as a source of zoonotic hepatitis E virus. *Epidemiol Infect.* 139: 1127-1144, 2011.
- WILLIAMS, T.P. *et al.* Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microbiol.* 39(9): 3040-3046, 2001.
- WITHERS, M.R. *et al.* Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 384–388, 2002.
- YAMADA, K. *et al.* ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol.* 8: 1880–1891, 2009.
- ZAFRULLAH, M. *et al.* The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol.* 71(12): 9045–9053, 1997.
- ZANETTI, A.R.; SCHLAUDER, G.G.; ROMANO, L. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol.* 57: 356-360, 1999.
- ZHANG, H. *et al.* The Leu477 and Leu613 of ORF2-encoded protein are critical in forming neutralization antigenic epitope of hepatitis E virus genotype 4. *Cell Mol Immunol.* 5(6): 447–456, 2008.
- ZHAO, C. *et al.* A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J. Med. Virol.* 81(8):1371–1379, 2009.