

Gabriela Filipa Engenheiro Rodrigues

Hepatite E: Caracterização e Reservatórios Zoonóticos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Gabriela Filipa Engenheiro Rodrigues, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2008011374, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 19 de junho de 2014

(Gabriela Filipa Engenheiro Rodrigues)

Hepatite E: Caracterização e Reservatórios Zoonóticos

Ano letivo 2013/2014

Professor Responsável:

(Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia)

Aluna:

(Gabriela Filipa Engenheiro Rodrigues)

AGRADECIMENTOS

A partilha de ideias e experiências permite a evolução do ser humano. Um agradecimento a todas as pessoas que me acompanharam nesta longa caminhada académica, pelo apoio, carinho e amizade.

Um enorme obrigada à minha família que me motiva todos os dias e me faz sentir especial. Esta conquista não é minha mas sim nossa! A ti Michael, obrigada por me ajudares a construir enquanto pessoa e pela tua presença constante.

Por fim, um agradecimento muito especial à Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia por toda a sua disponibilidade e dedicação.

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

IgG - Imunoglobulina do tipo G

IgM - Imunoglobulina do tipo M

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF - Opening Reading Frame

RNA - Ácido Ribonucleico

RT-PCR - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

UTR - Untranslated Region

VHA - Vírus da Hepatite A

VHE - Vírus da hepatite E

ÍNDICE

1. Resumo/Abstract	3
2. Introdução.....	4
3. Contextualização Histórica.....	5
4. Caracterização do Vírus	5
4.1 Ciclo Replicativo	6
5. Epidemiologia e Distribuição dos Genótipos	7
6. Epidemiologia da Infecção pelo VHE nos Animais	8
6.1 Infecção pelo VHE nos Porcos Domésticos	9
6.2 Infecção pelo VHE nos Animais Selvagens	9
7. Vias de Transmissão	10
7.1 Transmissão Via Fecal-Oral.....	11
7.2 Transmissão Zoonótica.....	11
7.3 Transmissão Interspecie	12
8. Sintomas e Curso Clínico.....	13
8.1 Hepatite E Aguda	13
8.2 Hepatite E Crónica em Doentes Imunodeprimidos	14
8.3 Infecção por VHE em Doentes com Doença Hepática Crónica Pré-existente	14
8.4 Manifestações Extra-hepáticas	15
8.5 Patogénese na Grávida	15
9. Diagnóstico.....	16
10. Tratamento.....	17
11. Prevenção	18
11.1 Vacinação	19
12. Visão Geral em Portugal e na Europa	20
12.1 Detecção do VHE em Suínos	20
12.2 Análise Retrospectiva da Infecção por VHE em Portugal	22
13. Conclusão	23
14. Bibliografia	24

I. RESUMO/ABSTRACT

RESUMO

O vírus da hepatite E (VHE) foi descoberto na década de 80, contudo o reconhecimento do seu impacto na saúde pública é uma questão recente. Até à data foram descritos cinco genótipos, os genótipos 1 a 4 responsáveis pela infecção nos mamíferos e o genótipo 5 detetado apenas em aves. A apresentação clínica da infecção por VHE varia desde a forma assintomática até hepatite fulminante, sendo a taxa de mortalidade cerca de 3%. A principal via de transmissão nos países em desenvolvimento é a via fecal-oral e o número crescente de casos nos países industrializados tem sido associado à existência de reservatórios zoonóticos. O vírus tem sido detetado em diferentes animais cuja capacidade de transmissão ao Homem e outras espécies animais tem sido investigada.

ABSTRACT

The hepatitis E virus (HEV) was discovered in the 80s even though the recognition of impact on public health is a recent issue. Five different genotypes have been described, genotypes 1 to 4 infect mammals and genotype 5 has only been detected in birds. The clinical course of infection by HEV ranges from asymptomatic to fulminant hepatitis and the mortality rate is about 3%. The main route of transmission in developing countries is fecal-oral route and the growing number of cases in industrialized countries has been associated with the existence of zoonotic reservoirs. The virus has been detected in different animals whose ability passed to humans and other animal species has been investigated.

2. INTRODUÇÃO

A hepatite E é uma doença hepática inflamatória causada pelo vírus da hepatite E, sendo uma das principais causas de hepatite aguda a nível global^{1,2}. Tem sido caracterizada como uma doença aguda, autolimitada e com baixa taxa de mortalidade, apenas com quadro clínico agravado em grupos de alto risco, nomeadamente grávidas, indivíduos imunodeprimidos e indivíduos com doença hepática crónica pré-existente². Os fatores que determinam a severidade da doença não estão totalmente esclarecidos mas incluem fatores virais e do hospedeiro. A gravidez, uso de contraceptivos orais, idade, doença hepática pré-existente e reposta imune são fatores relativos ao hospedeiro de grande relevância. Relativamente aos fatores virais, o genótipo e a dose infectante são dos mais relevantes³.

Esta doença representa um importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento especialmente no sul da Ásia e África Subsariana onde é frequentemente epidémica e associada ao consumo de água contaminada. Inicialmente pensava-se que esta não era uma infeção adquirida nos países industrializados, sendo o número limitado de casos reportados associados a viagens a áreas endémicas. Contudo, estudos mais recentes têm revelado um acréscimo do número de casos esporádicos nos países desenvolvidos, incluindo a Europa, em indivíduos sem histórico de viagens a zonas endémicas^{3,4,5}.

O desenvolvimento e uso combinado de métodos serológicos e moleculares têm permitido confirmar um nível de incidência e prevalência muito mais elevados do que o expectável nos países desenvolvidos, justificado pela existência de reservatórios zoonóticos⁶. Desta forma, várias questões têm sido levantadas na sequência desta alteração de paradigma, e a hepatite E é atualmente considerada uma ameaça à saúde global⁷. Pretendo, portanto, caracterizar a infeção pelo VHE dando ênfase aos reservatórios zoonóticos do vírus e suas implicações na transmissão ao Homem. No final será apresentada uma visão geral da infeção pelo VHE na Europa e concretamente em Portugal.

3. CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA

Um dos primeiros surtos de hepatite E documentados ocorreu em Nova Deli em 1955, mas apenas foi associado ao VHE na década de 80 após a análise sanguínea de amostras provenientes de indivíduos afetados pelo surto³. Foi descrito pela primeira vez em 1983 após a sua observação por microscopia eletrónica. O vírus foi obtido através da ingestão de fezes contaminadas provenientes de indivíduos suspeitos de hepatite não-A e não-B por voluntários⁸. Em 1990 comprovou-se a existência de RNA (ácido ribonucleico) do VHE em amostras provenientes de indivíduos infetados na Birmânia, Somália, México e Paquistão. Recentemente há referência da ocorrência de um surto epidémico em Darfur no Sudão devido à superlotação de refugiados³.

A designação de hepatite E deve-se ao facto de as hepatites virais A, B, C e D já terem sido anteriormente identificadas mas também devido ao facto de a letra E fazer referência às características entéricas, endémicas e epidemiológicas da doença³.

4. CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS

O VHE inicialmente reconhecido como agente etiológico da hepatite entérica não-A e não-B pertence ao género *Hepevirus* e à família Hepeviridae, embora havendo novas classificações propostas. É um vírus nú (não envelopado), com cápside icosaédrica e diâmetro compreendido entre 27-34nm. O seu genoma é constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples de polaridade positiva com aproximadamente 7.2 kb de comprimento, apresentando 5' m⁷G-cap (7- methylguanosine cap) e cauda poliadenilada na extremidade 3' ^{1,4,7,9}.

Contém duas regiões não traduzidas (5' e 3' Untranslated Regions- UTR) e três regiões de leitura (Opening Reading Frames- ORFs)³. A região ORF1 codifica uma poliproteína de 1693 aminoácidos que posteriormente é clivada em proteínas não

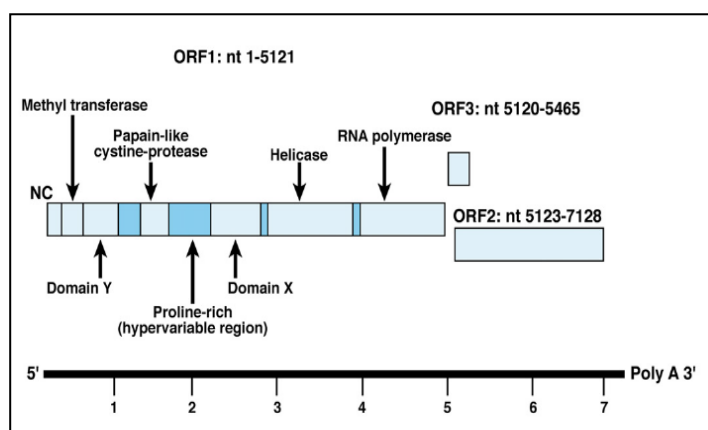


Figura 1- Organização genómica do VHE (Wedemeyer et al, 2012).

estruturais necessárias para a replicação e processamento proteico (RNA helicase, RNA-dependente RNA polimerase, metiltransferase e cisteína protease)^{2,3,10}. A ORF2 codifica a cápside viral que permite a ligação à célula hospedeira e pode induzir a produção de anticorpos neutralizantes⁵. A ORF3 codifica uma pequena fosfoproteína (pORF3) associada à

patogenicidade do VHE, nomeadamente sobrevivência e proliferação celular, modulação da resposta na fase aguda e imunossupressão³.

4.1. CICLO REPLICATIVO

Os sistemas disponíveis para cultura do vírus são ainda bastante ineficientes e por isso o recetor viral ainda não foi identificado e a forma como se processa a entrada no hepatócito é ainda desconhecida². O ciclo replicativo do VHE ainda não está totalmente esclarecido devido à dificuldade de cultura celular. Contudo, já foi possível induzir infeção e replicação em algumas linhas celulares incluindo células hepáticas. A principal porta de entrada do vírus é a via oral e pensa-se que após a replicação nas células do intestino, atinge o fígado através da veia porta. A replicação viral no hepatócito inicia-se 7 dias após a infeção³.

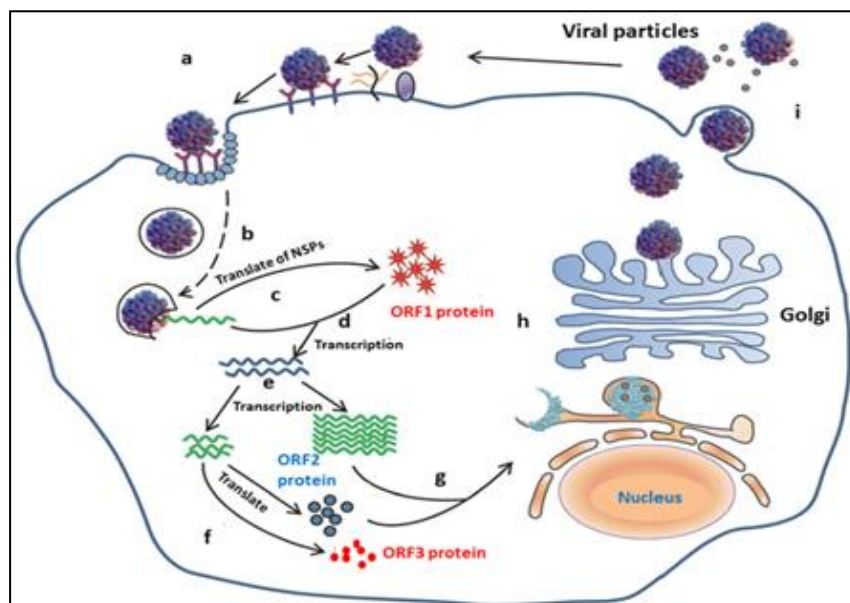


Figura 2- Ciclo replicativo do VHE (adaptado de Péres-Gracia *et al*, 2014).

As partículas virais concentram-se na superfície das células alvo através de proteoglicanos de sulfato de heparina que atuam como agentes de fixação (a). O VHE liga-se a outro recetor viral ainda por caracterizar e entra célula por endocitose, libertando a cadeia de RNA viral no citoplasma (b). O RNA é traduzido na poliproteína não estrutural ORF1 (c). A RNA-dependente RNA polimerase sintetiza cadeias intermediárias de polaridade negativa (d) que por sua vez servem de molde para a síntese de RNA subgenómico bem como para o transcrito de polaridade positiva (e). O RNA subgenómico de polaridade positiva é traduzido na precursor proteico proORF2 e pORF3 no citoplasma (f), a proORF2 migra para o retículo endoplasmático e dá-se o empacotamento do RNA genómico dando origem a novos viriões (g). Estes são transportados até à membrana celular e as partículas virais são então libertadas, a pORF3 poderá estar envolvida na saída do vírus (h, i)³.

5. EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS

A infecção pelo VHE é uma causa global de morbidade e mortalidade³. Anualmente verificam-se cerca de 20 milhões de casos de hepatite E, com aproximadamente 57 000 mortes associadas (OMS, 2013).

Até à data foram descritos 5 genótipos, os genótipos 1 a 4 como responsáveis por infecção nos mamíferos e o genótipo 5 apenas detetado em aves². Os genótipos 1 a 4 têm sido divididos em diferentes subtipos de acordo com a análise filogenética de isolados do vírus. Os genótipos responsáveis pela infecção em mamíferos infetam principalmente o Homem, porco doméstico, javali, veado, coelho e mangustos. Contudo, estirpes geneticamente distantes têm sido recentemente identificadas no rato, furão, javali, morcego e trutas⁵. Embora o VHE detetado nas aves apresente apenas 50-60% de homologia com o VHE encontrado nos mamíferos, anticorpos específicos apresentam reação cruzada com a proteína da cápside o que demonstra a presença de epítomos comuns³.

Este vírus tem sido detetado em praticamente toda a população do globo mas os genótipos encontrados variam de acordo com a região³. Os genótipos 1 e 2 são característicos dos países em vias de desenvolvimento enquanto os genótipos 3 e 4 são predominantes nos países desenvolvidos e associados a reservatórios zoonóticos⁴.

O genótipo 1 é responsável pela maioria dos casos endémicos e epidémicos de hepatite E no norte de África e no sul e centro da Ásia e o genótipo 2 é prevalente no México e oeste da Ásia³. Não são conhecidos reservatórios animais para estes genótipos e portanto a contaminação ocorre maioritariamente por via fecal-oral, podendo ocorrer surtos de elevada dimensão particularmente associados ao consumo de água contaminada^{2,5}.

Nos países industrializados os casos humanos autóctones estão associados aos genótipos 3 e 4 que são ainda os únicos considerados genótipos zoonóticos⁵. O genótipo 4 é maioritariamente encontrado na China e o genótipo 3 no norte e sul da América, Europa e Japão³. A seroprevalência está compreendida entre 5-20% mas a percentagem pode na realidade ser mais elevada e traduzida pela utilização de testes laboratoriais com maior sensibilidade. O genótipo 3 foi identificado pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA) em casos autóctones e apresentava 74-75% de homologia com os genótipos 1 e 2⁵.

O genótipo 3 para além do Homem pode infetar outras espécies animais como porcos, veados, javalis, mangustos, crustáceos e roedores, sendo atualmente avaliada a sua capacidade de atravessar a barreira entre espécies. A transmissão zoonótica é um modo de transmissão importante deste genótipo viral, sendo considerada principal causa de infecção autóctone na Europa e América do Norte².

O genótipo 4 tem sido também detetado em suínos e está maioritariamente presente na Ásia Oriental². A crescente prevalência deste genótipo na Europa é considerada um problema de saúde pública levantando a questão se de alguma forma foi introduzido nos suínos domésticos e é expectável a sua disseminação pelas suinoculturas, ou se por outro lado é restrito à carne de porco de origem asiática importada para a Europa⁵.

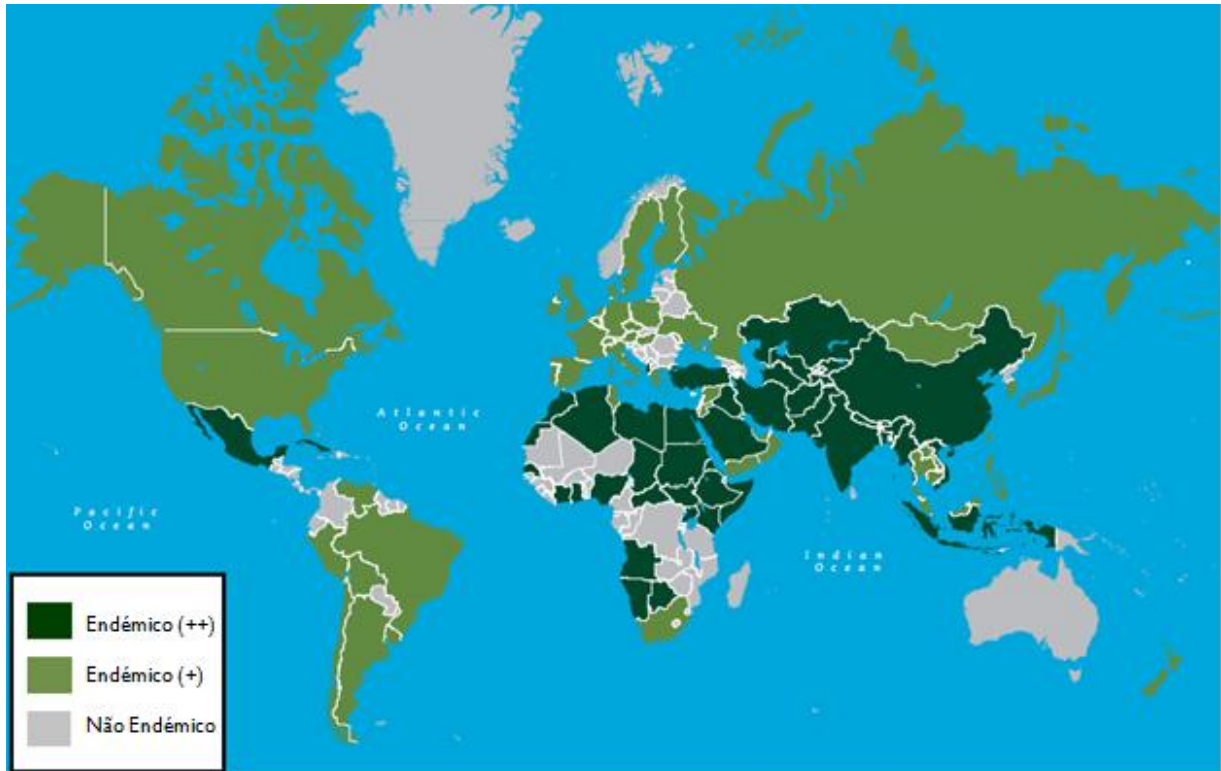


Figura 3- Distribuição da infecção por VHE (CDC, 2012).

6. EPIDEMIOLOGIA DA INFEÇÃO PELO VHE NOS ANIMAIS

O vírus da hepatite E tem sido identificado num número crescente de espécies animais. Foi detetado inicialmente em porcos e posteriormente em diversos animais como referido anteriormente. Todas estas espécies são potenciais hospedeiros naturais do vírus mas apenas algumas têm sido identificadas como reservatórios. Um reservatório é definido como uma população em que o agente patogénico é mantido permanentemente e a partir da qual é transmitido a uma população alvo. Desta forma, apenas o porco doméstico, javali e veado são considerados verdadeiros reservatórios zoonóticos, tendo sido apenas provada a capacidade de circulação e persistência do vírus numa população fechada no caso dos suínos^{5,12}.

Tendo em conta a possibilidade de transmissão zoonótica do vírus, quanto maior a sua prevalência nos animais maior é o risco de transmissão ao Homem. A sua propagação a diversas espécies é uma preocupação devido à possibilidade de contacto com animais

infetados e à contaminação ambiental sobretudo das águas pelas fezes animais. Além disso, a presença ubíqua do vírus nas espécies animais apresenta relevância na cadeia de produção alimentar⁵.

6.1. INFEÇÃO PELO VHE NOS PORCOS DOMÉSTICOS

O VHE foi detetado em suínos pela primeira vez em 1995, através da identificação de RNA viral no soro e amostras fecais. Contudo, só se começou a utilizar o termo “VHE suíno” 2 anos mais tarde⁴. Desde a identificação da infeção em 1997 nos EUA, várias estirpes têm sido isoladas em diversos locais do planeta. Os genótipos 3 e 4 encontram-se definitivamente identificados e caracterizados a partir de suínos de diversas regiões⁵. O primeiro VHE isolado apresentava 79-80% e 90-92% de homologia com as sequências de nucleótidos e aminoácidos respetivamente com o VHE humano. Os suínos não manifestam sinais clínicos da infeção mas apresentam virémia e anticorpos⁴.

As estirpes suínas têm sido frequentemente associadas a casos de doença no Homem nos países industrializados em situações em que não foi identificada nenhuma fonte específica de infeção. Nos países onde o VHE tem sido alvo de estudos serológicos, a maior parte dos suínos com idade superior a 3 a 4 meses apresenta anticorpos anti-VHE. Suínos com idade inferior a 2 meses são geralmente seronegativos, enquanto os suínos com idade superior apresentam taxas de seropositividade que frequentemente ultrapassam os 80%. O vírus tem sido detetado numa grande proporção de amostras provenientes de animais aparentemente saudáveis nos matadouros, prestes a entrar na cadeia de produção alimentar e ser sujeitos a comercialização⁵.

6.2. INFEÇÃO PELO VHE NOS ANIMAIS SELVAGENS

Uma vez que o VHE é excretado nas fezes dos animais infetados, pode-se considerar a sua transmissão pelo contacto com animais selvagens e com as suas fezes. Desta forma, e tendo em conta que a infeção é geralmente subclínica, torna-se preocupante a possibilidade de transmissão ao Homem através do contacto direto mas também por intermédio do consumo de carne de caça contaminada e mal cozinhada⁵.

A deteção do VHE em ratos representa uma enorme preocupação na medida em que estes coabitam com os suínos, podendo facilmente ser o foco de propagação da infeção. Recentemente foram identificadas sequências do VHE em fezes de raposas na Holanda com elevada homologia com o VHE detetado no rato. O VHE tem também sido identificado em coelhos, furões e diferentes espécies de morcegos⁵.

7. VIAS DE TRANSMISSÃO

A via de transmissão maioritária nos países em vias de desenvolvimento é a via fecal-oral, responsável pela transmissão dos genótipos 1 e 2 através do consumo de água contaminada. Esta via de transmissão está associada a inundações e chuvas torrenciais em que existe mistura da água de consumo com águas provenientes de esgotos animais. Contudo, é de referir que mesmo em épocas sem inundações ocorre contaminação contínua da água potável. A transmissão por intermédio da alimentação pode ocorrer devido ao consumo de carne crua de animais infetados ou legumes e frutas em contacto com água contaminada, sendo o primeiro caso a forma de transmissão privilegiada dos genótipos 3 e 4, especialmente nos países desenvolvidos³. As transfusões sanguíneas ou de produtos derivados de sangue e o transplante de órgãos são também fatores de risco para a hepatite E^{13,14}. A transmissão vertical da mãe para o feto tem sido frequentemente descrita e pode resultar em morte fetal⁵.

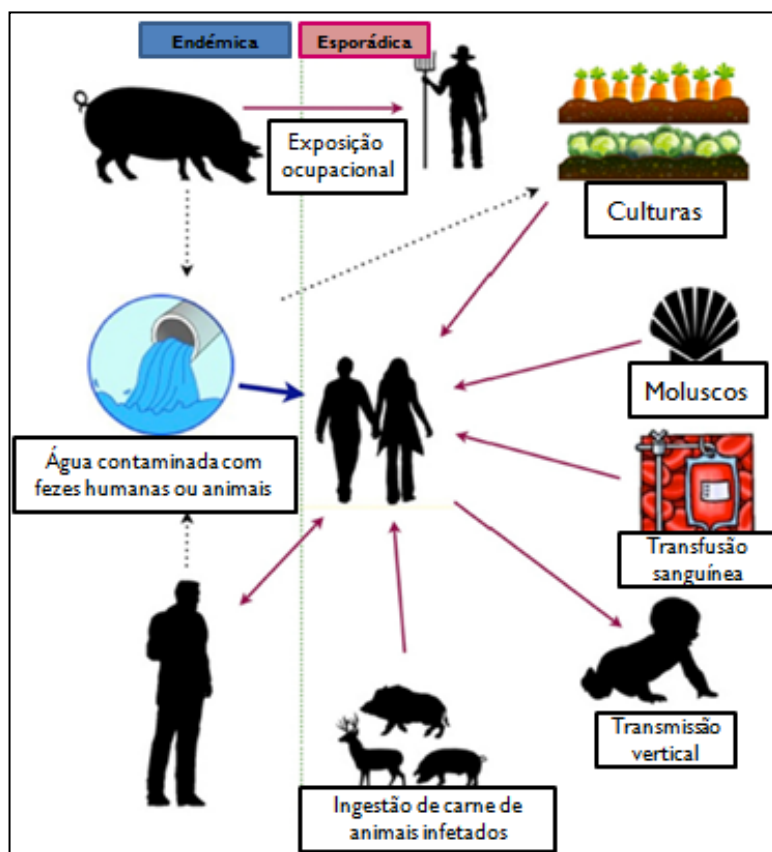


Figura 4- Vias de transmissão do VHE (adaptado de Pères-Gracia *et al*, 2014).

A propagação do VHE está dependente do genótipo do vírus, condições ambientais, condições de higiene e tipo de alimentos consumidos¹². O VHE apresenta estabilidade reduzida quando comparado com outros vírus, nomeadamente o vírus da hepatite A (VHA).

A estabilidade da partícula viral apresenta relevância em termos epidemiológicos, influenciando o nível de prevalência anti-VHE que mesmo em países endêmicos é menor que a prevalência anti-VHA⁹.

7.1. TRANSMISSÃO VIA FECAL-ORAL

Permanece ainda por esclarecer se o contacto direto pessoa a pessoa é uma forma eficiente de transmissão do vírus. A transmissão pode ocorrer por contaminação ambiental com fezes de indivíduos infetados e por contaminação de fômites. Os fluxos migratórios nomeadamente envolvendo zonas endêmicas são relevantes, mas outros aspetos devem ser considerados tal como os hábitos alimentares⁵.

O VHE já foi detetado em vários tecidos animais como suínos, javalis, veados e também em bivalves como mexilhão, berbigão e ostras. Mais recentemente foi detetado em frutos e vegetais, sendo portanto a água de irrigação a potencial origem de contaminação¹². O escoamento das águas para rios ou áreas costeiras pode levar à contaminação dos crustáceos e eventualmente causar infeção aos consumidores, sendo portanto o consumo de marisco crus um fator de risco^{4,5}. Os bivalves, e particularmente as ostras, poderão constituir uma importante via de transmissão uma vez que são consumidas cruas e possuem filtros de alimentação com conseqüente concentração do vírus¹².

Indivíduos com exposição ocupacional a dejetos/resíduos de animais domésticos ou selvagens (veterinários, agricultores, trabalhadores de matadouros, etc.) têm apresentado taxas 4 a 5 vezes superiores de anticorpos anti-VHE em relação a outros indivíduos. Em trabalhadores dos matadouros já foram detetados RNA viral ou anticorpos específicos o que sugere que a transmissão do suíno para o Homem pode ocorrer durante a matança⁵.

7.2. TRANSMISSÃO ZONÓTICA

Depois da descoberta do VHE em suínos em 1997 e posteriormente em outros animais, a existência de reservatórios animais tem sido associada a casos esporádicos da infeção nos países industrializados. Muitos estudos têm demonstrado elevada homologia em nucleótidos e aminoácidos entre estirpes animais e humanas da mesma região geográfica, muitas vezes superior à homologia entre as mesmas espécies mas em diferentes regiões⁵.

Casos esporádicos ou surtos epidémicos têm sido associados ao consumo de alimentos contaminados, nomeadamente carne crua ou mal cozinhada ou órgãos do porco como fígado⁴. Como exemplo, num estudo realizado no Japão, a análise dos fatores de risco e a caracterização molecular do VHE em 10 doentes com hepatite fulminante, revelou que

estes tinham consumido fígado de porco nas 2 a 8 semanas anteriores. As sequências de RNA detetadas nas amostras clínicas foram idênticas às encontradas no mercado no fígado de porco embalado e nas amostras recolhidas nos locais de criação⁵. A associação entre o consumo de fígado de porco, salsichas de fígado ou carne mal cozinhada de diversos animais e hepatite E tem sido demonstrada. A carne de porco representa uma importante fonte de infecção para o Homem e é ainda de referir que pode ocorrer contaminação cruzada nos matadouros nomeadamente envolvendo os utensílios e superfícies. Desta forma, as condições de higiene deficientes e procedimentos culinários incorretos podem ter relevância na manutenção de elevados níveis de contaminação⁵. Relativamente aos animais selvagens também deve ser considerada a possibilidade de aquisição da infecção através da carne, nomeadamente de javali ou de veado, particularmente quando é consumida mal cozinhada⁴. Uma das limitações é que devido ao longo período de incubação do vírus não é viável efetuar a análise em amostras provenientes das potenciais fontes ambientais ou alimentares da infecção¹².

7.3. TRANSMISSÃO INTERESPÉCIE

Atualmente tem-se avaliado a capacidade do VHE atravessar a barreira entre espécies diferentes e quais as espécies animais em que esta transmissão é possível. O genótipo 3 isolado em suínos apresenta capacidade de infetar macacos Rhesus e chimpanzés. Num estudo reverso, foi possível infetar suínos com o genótipo 3 humano, verificando-se situação semelhante com genótipo 4⁴.

Um estudo recente refere a existência de um vírus quimérico com capacidade de infetar tanto células humanas como dos suínos, sugerindo portanto a potencial emergência do vírus quimérico na natureza com sequências humanas e suínas. Os javalis têm sido também largamente infetados com os genótipos 3 e 4⁴.

O VHE foi também isolado em galinhas, tendo sido referido num estudo posterior que 30% das galinhas nos EUA revelaram positividade para anticorpos anti-VHE. A sequência do VHE das aves apresenta aproximadamente 50% de homologia com as sequências do VHE humano e suíno. Um novo VHE foi recentemente isolado a partir de coelhos na China, apresentando similaridade genética com o genótipo 3 humano e capacidade de replicação em linhas celulares humanas, podendo portanto o coelho ser outro reservatório zoonótico⁴.

De acordo com os resultados de um estudo, metade dos suínos inoculados por via intravenosa com o VHE do coelho evidenciaram infecção, enquanto os suínos infetados com o VHE do rato não demonstraram qualquer evidência. Contudo, o rato tem sido implicado

na transmissão da infecção aos suínos. O genótipo 3 capturado em ratos nos arredores de uma suinicultura revelou similaridade genética com o VHE do suíno dessa mesma produção animal. Existe portanto alguma controvérsia em relação à capacidade do rato ser um reservatório zoonótico sendo necessário avaliar se este pode ou não ser transportador do VHE⁴.

8. SINTOMAS E CURSO CLÍNICO

A apresentação clínica da infecção pode variar desde a forma subclínica ou assintomática até hepatite fulminante. Tanto nos países industrializados como nos países em desenvolvimento a hepatite aguda é a forma mais comum. A maioria das infecções são assintomáticas e especificamente durante a infância raramente ocorrem sintomas. Nos casos sintomáticos, o período de incubação do vírus varia entre 2 e 10 semanas com uma média de 40 dias. A virémia é transitória ocorrendo principalmente na fase pré-ictérica e desaparecendo com o início dos sintomas clínicos (exceto na hepatite E crônica). A excreção fecal do vírus começa alguns dias antes da icterícia e diminui dentro de 2 a 3 semanas³.

8.1. HEPATITE E AGUDA

A hepatite E aguda é geralmente uma doença autolimitada durando cerca de 6 a 7 semanas e indistinguível de outras formas de hepatite aguda viral. Os sintomas iniciais são inespecíficos e podem assemelhar-se aos sintomas de gripe. Pode referir-se: mialgia, artralgia, fraqueza, perda de apetite, vômitos, dor abdominal e febre. Nalguns casos, os doentes apresentam icterícia, hepatalgia, hepatomegalia, prurido, fezes descoradas e urina escura, assim como níveis elevados de transaminases, bilirrubina, fosfatase alcalina e γ -glutamilttransferase. Nos países industrializados é mais comum em indivíduos de meia-idade e no idoso, enquanto em áreas endêmicas afeta principalmente adultos jovens. A infecção em indivíduos imunocompetentes não está associada, até ao momento, a cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular^{2,3,4}.

Esta infecção pode estar associada a doença hepática aguda grave no caso das grávidas ou indivíduos com doença hepática crônica subjacente, podendo evoluir para insuficiência hepática fulminante. Esta evolução no caso da mulher grávida pode estar associada a fatores hormonais e imunológicos².

8.2. HEPATITE E CRÓNICA EM DOENTES IMUNODEPRIMIDOS

A ocorrência de hepatite E crónica tem sido descrita em diversas áreas industrializadas como a Europa e os EUA. Até ao momento considera-se o genótipo 3 como sendo o único responsável pela forma crónica. Esta é definida pela persistência de RNA VHE e/ou anti-VHE IgM (Imunoglobulina tipo M) no sangue ou fezes por um período superior a 6 meses em associação com um aumento dos níveis de enzimas hepáticas³.

A infeção por VHE é portanto passível de progressão para doença hepática crónica em doentes imunocomprometidos (doentes sujeitos a transplante de órgãos sólidos, agentes imunossupressores e corticoterapia; doentes com linfoma, VIH ou imunodeficiência primária). A maioria dos casos são assintomáticos e a deteção de anti-VHE IgG (Imunoglobulina tipo G) e IgM pode ser negativa devido à imunossupressão, sendo possível o diagnóstico através da deteção de RNA viral. A incapacidade de eliminar o vírus do organismo está associada ao grau de imunossupressão e contagem de leucócitos³.

8.3. INFEÇÃO POR VHE EM DOENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÓNICA PRÉ-EXISTENTE

As manifestações clínicas iniciais são semelhantes a hepatite aguda em indivíduos sem doença hepática. Contudo, a situação complica-se com a descompensação da doença hepática crónica pré-existente, aparecimento de ascite e encefalopatia hepática. O consumo de álcool é considerado um fator de risco, favorece o rápido aparecimento de sintomas clínicos e está associado à severidade da hepatite³.

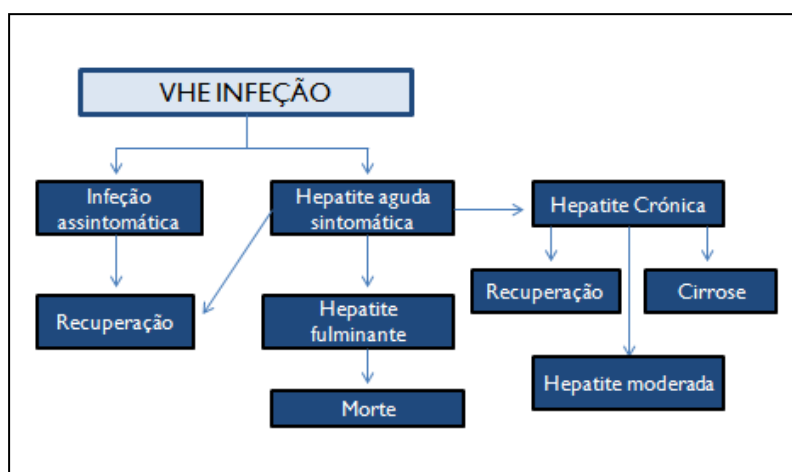


Figura 5- Curso clínico da infeção por VHE (adaptado de Wedemeyer *et al*, 2012).

8.4. MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS

A pancreatite é a manifestação extra-hepática mais comum ocorrendo com maior frequência em países endêmicos. Ocorre geralmente 2 a 3 semanas após o início da icterícia e na maior parte dos casos resolve-se espontaneamente. Para além da pancreatite, referem-se manifestações hematológicas como trombocitopenia e anemia hemolítica, miosite e doença renal³.

Diversas complicações neurológicas foram também já associadas, incluindo síndrome de Guillain-Barré, paralisia de Bell, amiotrofia nevrálgica, mielite transversa aguda e meningoencefalite tendo o VHE sido detetado no líquido cefalorraquidiano^{3,7,15}.

Em Portugal há referência a um caso de hepatite E aguda com manifestações neurológicas, especificamente síndrome de Guillain-Barré que foi confirmado com a deteção de anti-VHE IgM e RNA viral no soro do doente. A crescente associação entre infeção autóctone por VHE na Europa e manifestações neurológicas despertou a atenção para a importância do diagnóstico de hepatite E. A incidência de manifestações neurológicas associadas à hepatite E é desconhecida uma vez que este tipo de hepatite é subdiagnosticado. A infeção é frequentemente subclínica e os sintomas neurológicos prevalecem relativamente às lesões hepáticas, razão pela qual não são realizados os testes diagnósticos de hepatite E¹⁶.

8.5. PATOGÉNESE NA GRÁVIDA

A grávida apresenta um risco acrescido de desenvolvimento de hepatite fulminante e a taxa de mortalidade é superior à observada na população em geral, passando de valores inferiores a 3 % para cerca de 20%. A hepatite E durante a gravidez está associada a nascimentos prematuros, baixo peso e aumento do risco de mortalidade perinatal^{10,17}. Fatores genéticos, imunológicos e nutricionais estão envolvidos na fisiopatologia da hepatite fulminante nos países em desenvolvimento¹⁸. A elevada mortalidade na gravidez tem sido associada a infeções com o genótipo 1, não tendo ainda sido referida com os genótipos 3 e 4⁵.

As alterações hormonais observadas durante a gravidez podem estar envolvidas na desregulação imune facilitando a replicação do vírus. A modulação da imunidade celular permite a proteção do feto mas por outro lado altera a resposta imune da mãe contra infeções³.

9. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial inclui métodos diretos (observação microscópica do vírus, pesquisa de proteínas virais ou ácidos nucleicos) e métodos indiretos através da pesquisa de anticorpos.¹⁴ A confirmação da infecção por VHE baseia-se essencialmente na detecção de anticorpos específicos e/ou pesquisa de RNA VHE no soro ou fezes¹⁰.

Relativamente à pesquisa de RNA viral, a sua detecção no sangue e fezes só é possível durante quatro e seis semanas, respetivamente, maioritariamente durante o período de incubação¹⁹. Desta forma, o diagnóstico baseia-se essencialmente na pesquisa de marcadores serológicos (imunoglobulinas classe G e M) através de ensaios imunoenzimáticos. A dinâmica da resposta imunológica obedece ao padrão clássico, com a detecção de IgM 4 semanas após a infecção (aquando do aparecimento da sintomatologia), seguida da IgG específica detetável 1 a 2 semanas depois. Sendo assim, níveis elevados de IgM são indicativos de infecção aguda, enquanto níveis elevados de IgG são indicativos de exposição prévia^{3,19}. Contudo, existe variabilidade na sensibilidade e especificidade nos ensaios realizados para detecção destes anticorpos. Muitos ensaios são baseados em antígenos expressos por um só genótipo o que representa uma limitação na detecção de todos os genótipos do VHE. Geralmente os testes comerciais para detecção do genótipo 3 apresentam elevados níveis de especificidade mas a

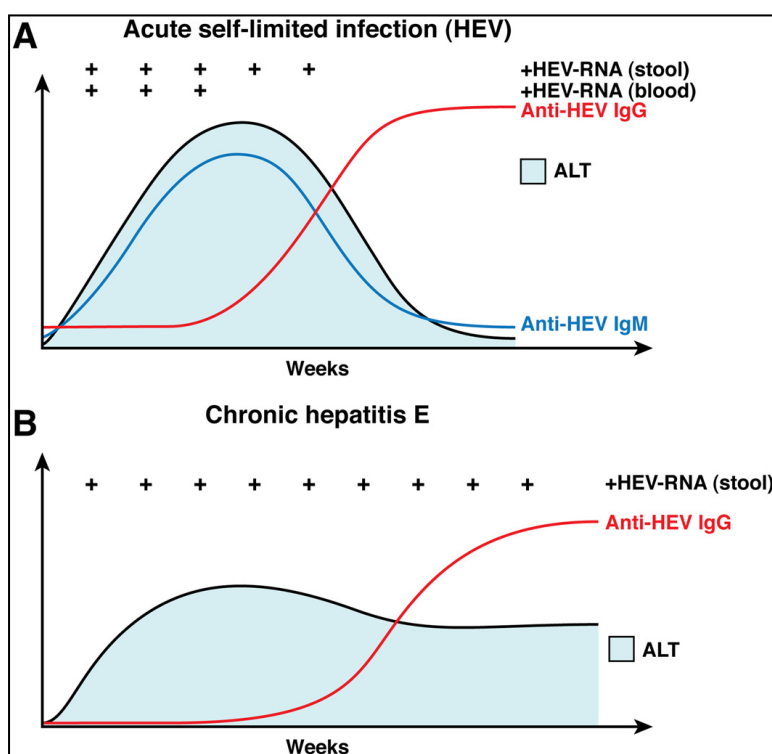


Figura 6 - Padrão de resposta imunológica à infecção por VHE, níveis de ALT (alanina aminotransferase) e presença de RNA viral (Wedemeyer *et al*, 2012).

sua sensibilidade é reduzida o que pode explicar a discrepância observada no que respeita à seroprevalência apresentada em diferentes estudos².

Nos indivíduos imunodeprimidos, em caso de suspeita de infecção, o diagnóstico deve ser feito com base na detecção de RNA viral uma vez que a seroconversão pode ocorrer mais tarde. A quantificação do RNA viral pode ser utilizada para avaliar a resposta ao tratamento antiviral mas ainda existem variações consideráveis entre os ensaios quantitativos².

A pesquisa do vírus da hepatite E deve ser realizada em todos os doentes com hepatite aguda ou crónica que não é explicada por outras causas².

10. TRATAMENTO

Nos indivíduos imunocompetentes, a hepatite E aguda não requer geralmente terapia antiviral. Nalguns casos realiza-se tratamento sintomático mas na sua maioria a infecção é resolvida espontaneamente².

No caso de infecção por VHE genótipo 3 com desenvolvimento de hepatite aguda grave e função hepática comprometida utiliza-se a ribavarina. O transplante hepático é necessário nos doentes com insuficiência hepática fulminante².

No caso da hepatite E crónica, as opções de tratamento incluem redução da imunossupressão e administração de interferão- α peguilado ou ribavarina, sendo que o primeiro passo do processo de tratamento deve ser a avaliação da possibilidade de redução da imunossupressão. O tratamento com interferão- α peguilado tem duração compreendida entre 3 e 12 meses e embora já tenha sido utilizado com sucesso em alguns indivíduos, pode apresentar reações adversas graves e conduzir a rejeição de transplantes, não estando portanto recomendado em indivíduos sujeitos a este tipo de intervenção².

A monoterapia com ribavarina (600-1000 mg/dia) durante um mínimo de 3 meses é considerada o tratamento de 1ª linha nos doentes com hepatite E crónica em que não se obteve resposta após a redução da imunossupressão. O mecanismo de ação envolvido na supressão da replicação do VHE é ainda desconhecido, assim como a dose diária ótima e duração do tratamento. No entanto, tratamentos com duração inferior à referida anteriormente e redução da dose têm sido associados a reativações ou progressão da doença^{2,7}. Os dados relativos ao tratamento da hepatite E crónica são escassos, sabe-se que é necessário ter em conta estratégias terapêuticas individualizadas com base na severidade da doença e possibilidade de redução da imunossupressão, bem como co-morbilidades e potenciais reações adversas dos fármacos².

II. PREVENÇÃO

Teoricamente, a infecção por VHE é passível de prevenção através da redução da exposição ao vírus ou estimulação da resposta imune através da vacinação. A vacinação é atualmente uma possibilidade viável, encontrando-se duas vacinas candidatas em investigação em fase de ensaios clínicos¹.

Em áreas endémicas a prevenção assenta essencialmente na implementação de medidas adequadas de higiene e sanitárias, incluindo o tratamento de esgotos de forma a evitar a transmissão fecal-oral e evitando o consumo de carne crua. Estas medidas são particularmente importantes nas grávidas, uma vez que a infecção neste estado fisiológico não apresenta bom prognóstico³.

Nos países industrializados, com condições de higiene e sanitárias adequadas, a prevenção torna-se mais complexa na medida em que as potenciais vias de transmissão ainda não se encontram totalmente esclarecidas^{1,3}. O consumo de vegetais, frutas e outros produtos importados de zonas endémicas constitui um risco uma vez que a água utilizada na rega e lavagem pode estar contaminada com esgotos ou fezes animais. Uma medida preventiva essencial é cozinhar a carne de porco a temperaturas superiores a 56°C, dado o potencial reservatório zoonótico que estes animais representam. Os veterinários e pessoas cuja profissão envolve o contacto direto com os animais devem adotar medidas reforçadas de higiene³.

O risco de transmissão do vírus pode ser portanto, reduzido através da correta confeção da carne a elevada temperatura e existem estudos que referem a necessidade de temperaturas ainda superiores à citada anteriormente². O processamento industrial dos alimentos deve assegurar a inativação do vírus. Desta forma, foi realizado um estudo em que preparações de patês foram processadas a diferentes combinações tempo/temperatura que variaram entre 62°C e 71°C e 5 a 20 minutos. Apenas os patês processados a 71°C durante 20 minutos apresentaram completa perda da capacidade infecciosa, sendo que a diferentes condições apenas se verificou uma redução parcial do potencial infeccioso⁵.

Os indivíduos que viajam para zonas endémicas devem adotar medidas de prevenção adequadas nomeadamente a nível de higiene e alimentação, sendo crucial evitar o consumo de água de origem desconhecida (CDC, 2013).

A prevenção da transmissão através de produtos sanguíneos é teoricamente possível através do rastreio dos dadores, contudo por razões de custo-efetividade não é realizado¹.

II.1. VACINAÇÃO

Após a exposição ao VHE (genótipos I-4) podem ser detetados anticorpos no soro que conferem proteção contra uma nova infecção. A imunidade parece persistir durante a vida e os indivíduos seropositivos quando expostos novamente ao vírus não desenvolvem hepatite sintomática². Desta forma, a imunidade protetora pode ser induzida através da vacinação, sendo o VHE um bom candidato ao desenvolvimento de uma vacina efetiva dado que apresenta apenas um serotipo e a infecção natural leva à produção de anticorpos protetores³.

A GlaxoSmithKline e o Walter Reed Army Institute desenvolveram uma vacina recombinante que demonstrou sucesso num ensaio clínico fase II com 96% de eficácia após administração de 3 doses². É uma proteína de 56 KDa codificada pela ORF2 cuja expressão ocorre em células de insetos. Demonstrou boa tolerância e é muito imunogénica, contudo ainda não está concluída necessitando de estudos adicionais até ao seu licenciamento^{1,2}.

Existe uma vacina aprovada na China e é comercializada com o nome “Hecolin”. Um ensaio clínico fase III realizado em mais de 100 000 adultos chineses demonstrou que a vacina recombinante (HEV 239) previne a hepatite E aguda com 94% a 100% de eficácia. Esta vacina é uma proteína de 26 KDa codificada pela ORF2 e é produzida em células bacterianas (*E.coli*). Esta vacina requer ainda avaliação em grupos de risco específicos como doentes com doença hepática terminal ou imunocomprometidos. É ainda necessário estudos adicionais para a determinação dos títulos de anticorpos anti-VHE considerados protetores bem como a velocidade a que diminuem após a vacinação².

Contudo, ambas as vacinas necessitam de um adjuvante, a administração é intramuscular e requerem injeções repetidas para serem eficazes. Estas características acarretam elevados custos, tornando provavelmente a vacinação inacessível às populações onde o VHE é endémico. Um estudo recente refere a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina vetorizada administrada por via nasal. Esta vacina utiliza um vírus adenoassociado (AAV) como vetor para entrega do antigénio (proteína truncada da cápside)²⁰.

Nos países em vias de desenvolvimento, a existência de vacinação seria de grande utilidade devido à endemicidade do vírus. Contudo, a implementação de um programa de vacinação será dificultada pela carência existente nestas regiões do globo. Nos países desenvolvidos a existência de uma vacina seria muito útil em grupos de alto risco bem como em indivíduos que viajam para zonas endémicas. A vacinação porcina pode ser também uma opção caso se torne custo-efetiva^{1,2}.

12. VISÃO GERAL EM PORTUGAL E NA EUROPA

12.1. DETEÇÃO DO VHE EM SUÍNOS

Existe atualmente evidência que nos países industrializados a hepatite E tem origem maioritariamente nos suínos, sendo as estirpes suínas similares às isoladas no Homem. A transmissão através da alimentação tem sido epidemiologicamente e geneticamente associada ao consumo de carne de porco²¹.

A seroprevalência nos dadores de sangue é de cerca de 21%, aumentando nos veterinários ou indivíduos que trabalham diretamente com estes animais. A produção suína pode ser significativa em termos de reservatório ambiental da infeção, sabendo-se que a seroprevalência nos porcos em diversos países europeus ronda os 80%. Contudo, é de referir que este dado indica que a maior parte dos suínos estiveram em contacto com o vírus mas não significa que este ainda esteja em replicação⁴.

Num estudo realizado por *Berto et al*, foram testadas amostras fecais dos animais com o objetivo de estimar a prevalência do VHE nos suínos em Portugal. Foram utilizadas amostras provenientes de animais em 4 fases diferentes de produção (leitão, fase de desmame, fase de engorda e fase reprodutora) e de 5 suiniculturas diferentes (Aveiro, Coimbra, Guarda, Leiria e Viseu). Todas as amostras fecais foram analisadas por *real-time* RT-PCR. Foram recolhidas um total de 200 amostras, 40 de cada produção animal, e dentro de cada uma das produções 10 amostras de cada fase distinta de produção (Tabela 1)²¹.

	Viseu +/n (%)	Aveiro +/n (%)	Guarda +/n (%)	Coimbra +/n (%)	Leiria +/n (%)	Total
Leitão	3/10 (30)	5/10 (50)	2/10 (20)	2/10 (20)	4/10 (40)	16/50 (32)
Desmame	5/10 (50)	3/10 (30)	1/10 (10)	1/10 (10)	0/10 (0)	10/50 (20)
Engorda	4/10 (40)	1/10 (10)	0/10 (0)	8/10 (80)	3/10 (30)	16/50 (32)
Reprodutora	0/10 (0)	0/10 (0)	1/10 (10)	0/10 (0)	1/10 (10)	2/50 (4)
Total	12/40 (30)	9/40 (22,5)	4/40 (10)	11/40 (27,5)	8/40 (20)	44/200 (22)

Tabela 1- Amostras fecais positivas para VHE em diferentes fases de produção de 5 suiniculturas em Portugal (adaptado de *Berto et al*, 2012). (n=número total de suínos por fase de produção; +=número de amostras fecais positivas para VHE por *real-time* RT-PCR).

No global, 22% das amostras analisadas revelaram-se positivas, sendo encontradas amostras positivas em todos os locais e em suínos de todas as idades com maior prevalência

nos leitões e na fase de engorda. É de referir que o vírus foi caracterizado como pertencente ao genótipo 3, sendo este o mais difundido nas suiniculturas das diversas zonas do globo²¹.

Existe um elevado consumo de carne de porco em Portugal, havendo portanto abate contínuo de suínos com aumento crescente do risco associado ao seu consumo. Pode assim dizer-se que animais infetados com o VHE são suscetíveis de entrar na cadeia de produção de carne de porco e integrar a cadeia alimentar sendo uma crescente preocupação de saúde pública²¹.

Foi também realizado um estudo a nível europeu com o objetivo de avaliar a prevalência e a taxa de transmissão do VHE em suínos de diferentes idades. Os dados recolhidos revelaram que a prevalência na fase de desmame varia entre 20% e 44% e na fase de engorda entre 8% e 73%, sendo estes estágios os que apresentaram maior prevalência. Encontra-se presente em suínos de diferentes idades, enfatizando a relevância da sua presença nos suínos destinados a abate. Os dados obtidos foram consistentes com a informação já divulgada anteriormente, confirmando que a prevalência se tem mantido constante e que o VHE se encontra em circulação em suiniculturas por toda a Europa²².

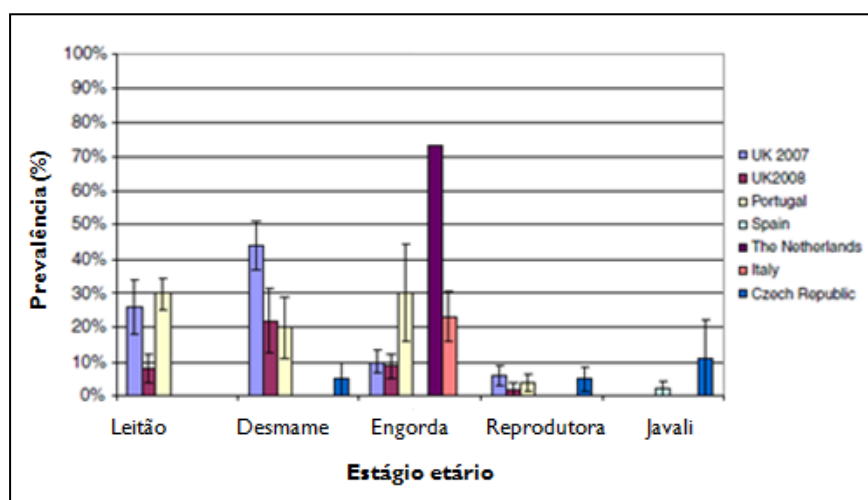


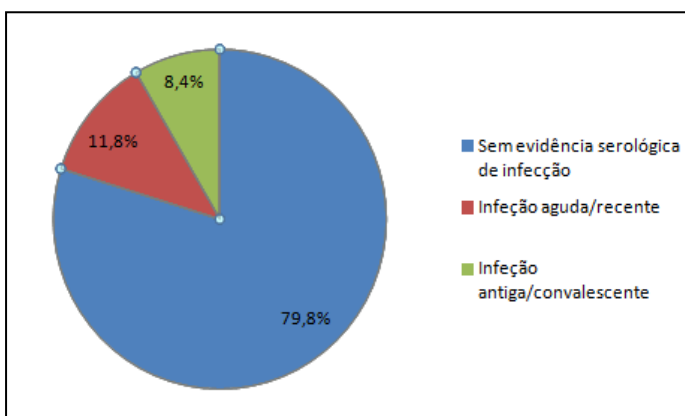
Gráfico 1- Prevalência média do VHE em países da UE (adaptado de Berto *et al*, 2012).

Nos países industrializados, apesar da baixa incidência de hepatite E com sintomatologia clínica, a seroprevalência é relativamente elevada o que revela uma percentagem significativa de casos de doença subclínica e/ou com subdiagnóstico. É provável que uma pequena proporção destes casos seja devido a viagens a regiões endémicas, existindo uma elevada percentagem de casos com origem em exposição indígena. De acordo com o modelo utilizado para avaliação da dinâmica de transmissão do vírus, observou-se que é possível o crescimento exponencial de um surto de infecção nos diversos países sujeitos a esta avaliação, tendo em consideração a existência de um equilíbrio endémico. Em suma,

foram encontradas amostras positivas para o VHE na fase de engorda dos suínos em todos os países europeus integrados no estudo, o que representa um risco em termos de saúde pública especialmente nos países onde a carne de porco é consumida crua ou mal cozinhada²².

12.2. ANÁLISE RETROSPECTIVA DOS CASOS DE INFEÇÃO POR VHE EM PORTUGAL

No INSA realizou-se uma análise retrospectiva com o objetivo de aumentar o conhecimento relativamente à infeção por VHE no nosso país. Foi efetuada a pesquisa de



anticorpos específicos através de ensaios imunoenzimáticos ELISA em 297 amostras de soro de indivíduos com diagnóstico de hepatite de etiologia desconhecida, recebidas entre janeiro de 2000 e dezembro de 2012¹⁹.

Gráfico 2- Distribuição dos casos em estudo de acordo com o estágio de infeção por VHE (adaptado de Ferreira *et al*, 2013).

Globalmente constatou-se a presença de anticorpos anti-VHE em 20,2% das amostras analisadas o que permite comprovar a presença da infeção em Portugal e a necessidade de pesquisa do envolvimento do VHE em hepatites de causa desconhecida¹⁹.

Mesquita *et al.*, apresentou um estudo que demonstrou a circulação do vírus nos anos 90, através da pesquisa de anti-VHE IgG no soro de mães de raça caucasiana e nos seus respetivos filhos. Este estudo permitiu também avaliar a possibilidade de transmissão transplacentar. As amostras sanguíneas maternas foram colhidas por punção venosa no momento do parto e as amostras dos recém-nascidos foram obtidas a partir do sangue do cordão umbilical, sendo posteriormente analisadas pelo teste de ELISA. Este estudo tem a limitação de ter englobado um número reduzido de amostras. Contudo, tendo em conta que em aproximadamente 33% das amostras maternas se comprovou a exposição prévia ao vírus e os seus filhos revelaram também positividade, é possível afirmar que o vírus estava presente em Portugal no início dos anos 90 e que existe efetivamente uma eficiente passagem transplacentar⁶. Duque *et al.*, publicou o primeiro caso clínico de hepatite E em Portugal que ocorreu em novembro de 2010 e foi associado ao consumo de salsichas confeccionadas de modo artesanal²³.

13. CONCLUSÃO

O estudo da dinâmica e distribuição da infeção por VHE tem demonstrado que o conceito clássico de que o VHE é responsável por surtos de hepatite aguda em áreas endémicas e casos esporádicos nos países industrializados se encontra desatualizado. De acordo com estudos recentes, a taxa de prevalência e incidência nomeadamente na Europa, EUA e Japão é muito maior do que o expectável, sendo a endemicidade alargada a países industrializados. Desta forma, tem-se investido na investigação das potenciais vias de transmissão do vírus para além da via fecal-oral predominante nos países em desenvolvimento. Encontrou-se nos reservatórios zoonóticos a principal causa para a crescente evidência de infeção por VHE em áreas onde anteriormente se considerava ser apenas adquirida por indivíduos que viajavam para zonas endémicas.

Atualmente considera-se então a hepatite E como um problema de saúde pública a nível global que requer a realização de investigação contínua no sentido de esclarecer questões que continuam em aberto. É necessário o desenvolvimento de uma vacina que demonstre eficácia, segurança e rentabilidade económica, investir em técnicas de diagnóstico avançadas, bem como determinar as fontes de transmissão de infeção. O suíno aparece como sendo o principal reservatório zoonótico do vírus mas muitos outros animais representam potenciais reservatórios cuja dinâmica de aquisição e transmissão do vírus necessita de ser esclarecida. O VHE é responsável por hepatite aguda nos indivíduos imunocompetentes e hepatite aguda e crónica nos indivíduos imunocomprometidos, sendo ainda responsável por diversas manifestações extra-hepáticas, sendo a sua associação a síndromes neurológicas alvo de investigação.

A infeção por VHE é portanto considerada uma zoonose emergente, e dada a elevada prevalência nos animais existe um elevado risco de transmissão ao Homem, concretamente através do consumo de carne contaminada. Particularmente em Portugal foi possível constatar que o vírus está presente numa elevada proporção de suínos, animais estes que entrarão na cadeia de produção alimentar com consequências na saúde do Homem.

Tendo em consideração a distribuição global da hepatite E torna-se imperativo o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controlo da infeção.

14. BIBLIOGRAFIA

- 1- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.-S., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H. R. (2012). Hepatitis E. *Lancet*, 379, 2477-88.
- 2- Wedemeyer, H., Pischke, S., Manns, M. P. (2012). Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infection. *Gastroenterology*, 142, 1388-397.
- 3- Pérez-Gracia, M. T., Suay, B., Mateos-Lindemann, M. L. (2014). Hepatitis E: an emerging disease. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 22, 40-59.
- 4- Song, Y., Park, W., Park, B., Lee, J., Park, S., Song, C. (2014). Hepatitis E virus infections in humans and animals. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 3, 29-36.
- 5- Ruggeri, F. M., Di Bartolo, I., Ponterio, E., Angeloni, G., Trevisani, M., Ostanello, F. (2013). Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *The New Microbiologica*, 36, 33-44.
- 6- Mesquita, J. R., Conceic, N., Gonc, G., (2013). Antibodies to Hepatitis E in Portuguese Mothers and Their Newborns. *Journal of Medical Virology*, 85, 1377-78.
- 7- Dalton, H. R., Pas, S. D., Madden, R. G., Van der Eijk, A. A. (2014). Hepatitis E virus: current concepts and future perspectives. *Current Infectious Disease Reports*, 16.
- 8- Vasickova, P., Psikal, I., Kralik, P., Widen, F., Hubalek, Z., Pavlik, I. (2007). Hepatitis E virus : a review, 9, 365-384.
- 9- Echevarría, J. M. (2014). Light and Darkness: Prevalence of Hepatitis E Virus Infection among the General Population. *Scientifica*, volume 2014,1-14.
- 10- Purdy, M. A., Khudyakov, Y. E. (2011). The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Research*, 161, 31-39.
- 11- Wang, Y., Zhou, X., Debing, Y., Chen, K., Van Der Laan, L. J. W., Neyts, J., ... Pan, Q. (2014). Calcineurin Inhibitors Stimulate and Mycophenolic Acid Inhibits Replication of Hepatitis E Virus. *Gastroenterology*.
- 12- Van der Poel, W. H. M. (2014). Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Current Opinion in Virology*, 4, 91-96.
- 13- De Niet, A., Zaaijer, H. L., Ten Berge, I., Weegink, C. J., Reesink, H. W., Beuers, U. (2012). Chronic hepatitis E after solid organ transplantation. *Netherlands Journal of Medicine*, 70, 261-266.
- 14- Dreier, Jeans., Juhl, David. (2014). Autochthonous Hepatitis E Virus Infections: A New Transfusion-Associated Risk?. *Transfus Med Hemother*. 41, 29-39.

- 15- Kamar, N., Rostaing, L., Izopet, J. (2013). Hepatitis E virus infection in immunosuppressed patients: Natural history and therapy. *Seminars in Liver Disease*, 33, 62-70.
- 16- Santos, L., Mesquita, J. R., Rocha Pereira, N., Lima-Alves, C., Serrão, R., Figueiredo, P., ... Sarmiento, A. (2013). Acute hepatitis E complicated by Guillain-Barre syndrome in Portugal, December 2012-a case report. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles*, 18, 3-6.
- 17- Aggarwal, R. (2011). Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Research*, 161, 15-22.
- 18- Renou, C., Gobert, V., Locher, C., Moumen, A. O., Timbely, O., Savary, J., Roque-Afonso, A.-M. (2014). Prospective study of Hepatitis E Virus infection among pregnant women in France. *Virology Journal*, 11.
- 19- Ferreira, C. M., Santos, J. A., Lourenço, T., Benoliel, C., Matos, R., Martins, H. C. (2013). Diagnóstico da infeção por vírus da hepatite E no INSA, 2000-2012. *Observações-Boletim Epidemiológico (artigos breves nº10)*, 27-28.
- 20- Trabelsi, K., Kamen, A., & Kallel, H. (2014). Development of a vectored vaccine against Hepatitis E virus. *Vaccine*, 32, 2808-11.
- 21- Berto, a, Mesquita, J. R., Hakze-van der Honing, R., Nascimento, M. S. J., van der Poel, W. H. M. (2012). Detection and characterization of hepatitis E virus in domestic pigs of different ages in Portugal. *Zoonoses and Public Health*, 59, 477-81.
- 22- Berto, A., Backer, J. a, Mesquita, J. R., Nascimento, M. S. J., Banks, M., Martelli, F., ... van der Poel, W. H. M. (2012). Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Research Notes*, 5:190.
- 23- Duque, V., Ventura, C., Seixas, D., Cunha, S., Meliço-Silvestre, A. Case Report-First report of acute autochthonous hepatitis E in Portugal. *J Infect Dev Ctries*, 6, 201-203.
- 24- Página Oficial CDC- <http://wwwnc.cdc.gov/travel/diseases/hepatitis-e> (acedido a 31-05-14 às 10:56h).
- 25- Página Oficial WHO- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/> (acedido a 31-05-14 às 10:20h).