



Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado em Biociência Animal

SIMONE GONÇALVES DA SILVA DUARTE

**DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E EM AMOSTRAS DE
FÍGADO DE SUÍNOS PROCEDENTES DO ESTADO DE MATO GROSSO**

Cuiabá, 2016

SIMONE GONÇALVES DA SILVA DUARTE

**DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E EM AMOSTRAS DE
FÍGADO DE SUÍNOS PROCEDENTES DO ESTADO DE MATO GROSSO**

Dissertação apresentada à UNIC, como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em Biociência Animal.

Orientadora: Profª Drª Michele Lunardi

Cuiabá
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais para Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecária Elizabete Luciano / CRB1-2103

D812d Duarte, Simone Gonçalves da Silva.

Detecção Molecular do Vírus da Hepatite E em Amostras de Fígado de Suínos Procedentes do Estado de Mato Grosso./ Simone Gonçalves da Silva Duarte. Cuiabá-MT, 2016.

55p.

Inclui Lista de Tabelas.

Dissertação apresentada à UNIC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Profª Drª Michele Lunardi

1.Mato Grosso. 2.Suínos. 3.HEV. 4.RT-PCR.

CDU 619

SIMONE GONÇALVES DA SILVA DUARTE

DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E EM AMOSTRAS DE FÍGADO DE SUÍNOS PROCEDENTES DO ESTADO DE MATO GROSSO

Dissertação apresentada à UNIC, no Mestrado em Biociência Animal, área de concentração em Saúde Animal como requisito parcial para obtenção do título de mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Michele Lunardi
UNIC

Profª Drª Andréia Lima Tomé Melo
UNIC

Profª Drª Michelle Igarashi
UFMT

Cuiabá, 06 dezembro de 2016.

Dedico este trabalho a

Todos, que de uma forma ou de outra, me motivaram e me motivam na busca por conhecimento e aprimoramento, com a finalidade de me tornar uma profissional e um ser humano melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus... sempre, em primeiro lugar.

Aos meus pais, Celso e Dorcas, meus grandes amigos e motivadores... Muito obrigada!

Ao meu amor Duarte, meu maior incentivador e parceiro, sempre apoiando meus projetos de vida.

Aos meus filhos Kairo e Fernanda, as duas pessoas que sempre me inspiram na busca em me tornar um ser humano melhor.

À minha família querida, em especial às minhas irmãs, pelo apoio e incentivo.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Michele Lunardi, pelo imensurável apoio e pelos ensinamentos, paciência e compreensão. Minha eterna admiração pela profissional e pessoa, sempre trabalhando com empolgação e amor neste universo tão complexo que é a Biologia Molecular.

Agradeço ao professor Dr Lazaro Camargo, pela oportunidade de novos horizontes e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr Givago, à Dr^a Liana e à Dr^o Jose Vitor, médicos veterinários ligados ao Serviço de Inspeção Federal (SIF), que nos permitiu realizar as coletas nos frigoríficos, prestando auxílio e apoio durante o processo.

Em especial aos alunos Adolfo, Marcos e Jucileide, pelo comprometimento e dedicação na coleta de amostras, etapa importantíssima para a realização deste trabalho.

Às mestrandas, Gabriela Darold e Karyta Bertii, pela dedicação e disponibilidade no processamento das análises.

Aos colegas e amigos do mestrado, pelo apoio e pela troca de experiências.

Aos professores do mestrado, por contribuírem com seus conhecimentos neste momento especial.

Aos colegas docentes da Universidade de Cuiabá, pela troca de ensinamentos e incentivo durante esta árdua etapa da minha vida.

Meus sinceros agradecimentos a todos vocês.

“Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E EM AMOSTRAS DE FÍGADO DE SUÍNOS PROCEDENTES DO ESTADO DE MATO GROSSO

RESUMO

DUARTE, S. G. S. **Detecção molecular do vírus da hepatite e em amostras de fígado de suínos procedentes do estado de Mato Grosso**. 2016. Dissertação (Mestrado Biociência Animal) – Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2016.

A hepatite E é uma doença aguda de transmissão fecal-oral causada pelo HEV (*hepatitis E virus*), endêmica em países em desenvolvimento, com péssimas condições sanitárias, onde o acesso à água potável é insuficiente. Casos esporádicos têm sido relatados em países desenvolvidos. No homem, geralmente ocasiona infecção aguda e autolimitante, que pode ocorrer na forma inaparente, com rápida eliminação viral, ou evoluir para formas mais graves, incluindo hepatite fulminante fatal. De ocorrência rara no Brasil e comum na Ásia e na África, a infecção pelo HEV em humanos e em outros mamíferos ocorre não somente através da água e de alimentos contaminados por fezes, mas também pela ingestão de carne de animais infectados, sendo os suínos os animais mais estudados, com elevada prevalência de anticorpos contra hepatite E (anti-HEV), em criações em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Com o objetivo de identificar a infecção de suínos pelo HEV por meio da caracterização molecular, foram coletadas 72 amostras de fígado de suínos criados em sistema de integração, de duas regiões do Estado de Mato Grosso e abatidos em matadouro-frigorífico com inspeção sanitária federal no período de 3 a 12 de maio de 2016. A presença do RNA do HEV foi detectada por RT-PCR, com *primers* para a ORF2 do genoma viral. Dentre as 72 amostras analisadas, duas foram positivas (2,8%), identificando-se o genótipo 3. Os resultados corroboram a hipótese de que o HEV está circulando em rebanhos suínos inspecionados no estado de Mato Grosso, demonstrando o potencial desses animais como reservatório para esse agente zoonótico.

Palavras-chave: Mato Grosso. Suínos. HEV. RT-PCR.

ABSTRACT

DUARTE, S. G. S. **Molecular Detection of Hepatitis E virus in faecal and pork liver samples providing from several regions in the state of Mato Grosso.** 2016. Thesis (Master Degree in Animal Bioscience) - University of Cuiabá, Cuiabá, 2016.

Hepatitis E is an acute disease with faecal-oral transmission caused by hepatitis E virus (HEV), which is endemic in countries in development where the access to drinking water and satisfactory sanitary conditions is insufficient and with sporadic cases reported in developed countries. In general, it causes an acute and self-limiting infection in unapparent form in human-beings with a fast viral elimination or which can evolve into more serious forms, including fatal fulminant hepatitis. Uncommon in Brazil and common in Asia and Africa, the infection with HEV in humans and other mammals occurs not only through water and food contaminated by feces, but also by eating meat from infected animals. In this context, swine are the most studied animals, with a high prevalence of antibodies against hepatitis E (anti-HEV) in herds from various parts of the world, including in Brazil. In order to identify the swine contamination by HEV through molecular characterization, we collected 72 samples of livers from pigs slaughtered under Federal Health Inspection in Mato Grosso state in 2016 May. The presence of HEV RNA was detected by RT-PCR, with primers aiming the ORF2 of HEV genome. From 72 samples of liver analyzed, two were classified as positive (2.8%), being the genotype 3 characterized from both infected animals. The results support the hypothesis of HEV circulation in swine herds from Mato Grosso, representing a potential reservoir for this zoonotic viral agent.

Keywords: Mato Grosso. Swine. HEV. RT-PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Classificação proposta para modificação da nomenclatura atual do HEV, com inclusão de gêneros distintos relacionados às espécies hospedeiras	15
Tabela 2	– Ocorrência de anticorpos IgG anti-HEV em humanos no Brasil	18
Tabela 3	– Identificação de anticorpos IgG anti-HEV e RNA do HEV em suínos no Brasil	19
Tabela 4	– Identificação de anticorpos IgG anti-HEV e RNA do HEV em suínos no Brasil	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO DA HEPATITE E	14
2.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MODOS DE TRANSMISSÃO DE HEV	16
2.3	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS DA HEPATITE E	26
2.4	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	29
2.5	TRATAMENTO E PROFILAXIA	30
2.6	PERSPECTIVAS	30
	REFERÊNCIAS	31
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	ARTIGO	42
4.1	INTRODUÇÃO	44
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.4	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Em 2015, o Brasil produziu 3,6 milhões de toneladas de carne suína e exportou 550 mil toneladas de produto *in natura*, cerca de 10% do volume mundial, com um lucro de mais de US\$ 1 bilhão, ocupando a quarta colocação no *ranking* mundial do setor. Apesar da crise vigente no país, a suinocultura tem boas perspectivas para 2016, face a alta do câmbio, melhorando a rentabilidade dos exportadores na conversão para a moeda nacional (ABPA, 2016).

Após 20 anos de evolução genética, a carne suína teve uma redução de 31% da gordura, 10% do colesterol e 14% de calorias, tornando-se mais magra e nutritiva, além de saborosa, refletindo no aumento do consumo *per capita*, que, atualmente, está em torno de 15 kg no país (ABPA, 2016).

A oferta de alimentos seguros ao consumidor passa pela garantia de sua inocuidade, e deve ser também contemplada em programas de qualidade de produção. Diversas zoonoses que afetam os animais de produção podem ser transmitidas por alimentos e causar danos a saúde do consumidor, como o vírus da hepatite E. Essas zoonoses, além de causar um impacto na saúde pública, representam barreiras na comercialização de produtos de origem animal (CARDOSO; KICH, 2013).

O HEV é um vírus pequeno, não envelopado, cujo genoma do RNA é constituído por uma cadeia simples, de polaridade positiva, medindo em torno de 7,2 KB de extensão, apresentando três regiões abertas de leitura ou ORFs (*open reading frames*). Esse vírus está classificado na família *Hepeviridae*, gênero *Orthohepevirus*, com genoma relativamente variável, e em mamíferos apresenta um sorotipo dividido em diferentes genótipos denominados de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (MENG et al., 2013; HELDT et al., 2016).

Os genótipos 1 e 2 são comumente relatados em formas de surtos e/ou epidemias em países subdesenvolvidos, afetando exclusivamente humanos; os genótipos 3 e 4 afetam tanto humanos quanto diferentes espécies animais, em especial os suínos, conferindo à doença um caráter zoonótico. Diferentemente, os genótipo 5 e 6 têm sido identificados somente em furões e ratos (MENG, 2013; JOHNE et al., 2010; RAJ et al., 2012).

O primeiro isolamento do HEV suíno foi realizado nos Estados Unidos por Meng et al. (1997). Desde então, o HEV tem sido o único agente causal das

hepatites virais associado a reservatórios animais, tendo sido caracterizado a partir de frangos, javalis selvagens, cervídeos, mangustos, coelhos e roedores, ressaltando a hipótese de que a hepatite E consiste em uma zoonose (NAKAMURA et al., 2006; TEI et al., 2003; ZHAO et al., 2009;).

A hepatite E é uma doença viral aguda e com transmissão fecal-oral, em que discrepâncias epidemiológicas e clínicas são observadas entre os locais onde há a ocorrência da doença. Em países em desenvolvimento, por exemplo, onde o acesso à água potável é insuficiente e há péssimas condições higiênicas e sanitárias de populações pobres, a doença é endêmica (DALTON et al., 2008; MANSUY et al., 2008), e em países desenvolvidos, apenas casos esporádicos têm sido relatados (AGGARWAL, 2011; KUMAR et al., 2013).

De ocorrência rara no Brasil, e comum na Ásia e na África, a infecção pelo HEV em humanos, e em outros mamíferos, ocorre não somente através da água e alimentos contaminados, mas também pela ingestão de carne de animais infectados (DEEST et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2010). Assim sendo, os suínos são os animais mais estudados, com elevada prevalência de anticorpos anti-HEV, em criações de todos os continentes (LU; LI; HAGEDORN, 2006; OKAMOTO, 2007).

No homem, o HEV geralmente ocasiona infecção aguda e autolimitante, a qual pode se apresentar na forma inaparente, com a eliminação viral rápida, mas pode, também, evoluir para formas mais graves, incluindo hepatite fulminante fatal (PAVIO, N.; MERBAH, T.; THÉBAULT, A., 2014). Os índices de mortalidade associados às infecções pelo HEV variam de 1 a 4%, sendo mais frequente em pacientes com doença hepática crônica anterior à infecção (MUSHAHWAR, 2008; PURCELL; EMERSON, 2008), e 20% durante a gestação, em que a transmissão do HEV da mãe para o feto pode resultar em abortamento (KHUROO; KAMILI; JAMEEL, 1995; NAVANEETHAN; AL MOHAJER; SHATA, 2008). Os suínos são animais assintomáticos, com infecção autolimitante, sem lesões macroscópica, embora, em alguns casos, seja possível identificar lesões hepáticas microscópicas (DE DEUS, 2008; HALBUR et al., 2001; MENG et al., 1997).

Considerando que o estado do Mato Grosso é um dos principais polos da cadeia produtiva de suínos do Brasil, com crescente aumento do consumo da carne suína e, ainda, que os suínos são portadores assintomáticos do HEV, sendo estes considerados a principal fonte de transmissão de HEV para humanos, principalmente a partir do consumo de produtos e subprodutos da espécie, o

presente estudo objetivou identificar a infecção de suínos de criação intensiva pelo HEV por meio da detecção molecular do genoma viral em amostras de fígado coletadas em matadouro-frigorífico com inspeção sanitária federal no estado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO DA HEPATITE E

2.1.1 Classificação e filogenia

HEV é o agente etiológico da hepatite E. Até meados de 1998, o vírus pertenceu à família *Caliciviridae*, com base em sua organização genômica (TAM et al., 1991). Entretanto, a partir de 2004, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) classificou o HEV como pertencente à família *Hepeviridae*, gênero *Orthohepevirus* (MENG, 2013; EMERSON et al., 2004).

O HEV tem um genoma significativamente variável, e em mamíferos apresenta um sorotipo dividido em quatro diferentes genótipos (LU; LI; HAGEDORN, 2006). Os genótipos 1 e 2 são comumente relatados em formas de surtos e/ou epidemias em países subdesenvolvidos, afetando exclusivamente humanos; e os genótipos 3 e 4, que afetam tanto humanos quanto diferentes espécies de animais, em especial os suínos, conferindo à doença um caráter zoonótico (MENG, 2011).

Em aves, o HEV foi inicialmente considerado como um quinto genótipo do vírus. Porém, durante o nono relatório do ICTV, de 2009, determinou-se que o HEV aviário é uma nova espécie dentro da família *Hepeviridae*, haja vista a similaridade de 50% com o genoma do HEV isolado em mamíferos, constituindo, assim, um grupo geneticamente distinto no gênero *Hepevirus* (PAVIO; MENG; RENOU, 2010).

Em seu estudo, Meng (2013) aborda as novas linhagens identificadas em mamíferos (humanos, suínos, mangustos, cervos, ratos, coelhos e furões). Mais recentemente, outras linhagens geneticamente distintas foram identificadas em outras espécies animais, como camelos e ovinos (WOO et al., 2014; Xu et al., 2014). Sob condições experimentais, Mejido (2014) detectou a presença de HEV de origem suína em macacos *cynomolgus* e, de acordo com Meng (2013), as linhagens e os genótipos podem ser classificados em gêneros, conforme as diferentes espécies hospedeiras relacionadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação proposta para modificação da nomenclatura atual do HEV, com inclusão de gêneros distintos relacionados às espécies hospedeiras

GÊNEROS PROPOSTOS	HOSPEDEIROS NATURAIS
<i>Orthohepevirus</i>	Espécies relacionadas
Genótipo 1	Homem
Genótipo 2	Homem
Genótipo 3	Homem, suíno doméstico e selvagem, mangusto, coelho e rato
Genótipo 4	Homem, suíno doméstico e selvagem, bovino e ovelha
Genótipo 5	Rato e furão
Genótipo 6	Suíno selvagem
<i>Avehepeviris</i>	Espécies relacionadas
Genótipo 1	Galinha (Austrália e Coreia)
Genótipo 2	Galinha (EUA e Canadá)
Genótipo 3	Galinha (Europa e China)
<i>Piscihepevirus</i>	Espécies relacionadas
Vírus da HE de trutas	Trutas
<i>Chiropteranhepevirus</i>	Espécies relacionadas
Vírus da HE de morcego	Morcego

Fonte: adaptada de Meng (2013).

2.1.2 Morfologia e organização genômica

A identificação e a caracterização do HEV foram realizadas em 1990, por meio do isolamento de partículas virais da bile de macacos cynomolgus infectados experimentalmente com o vírus oriundo de casos de hepatite entérica, constituindo um marco para estudos conseguintes sobre a hepatite E (REYES et al., 1990).

Na microscópica eletrônica, utilizando o método rotacional das partículas do HEV, observam-se imagens que demonstram partícula viral medindo de 27 a 34 nm de diâmetro, vírion de forma esférica e simetria icosaédrica não envelopada (LI et al., 1997).

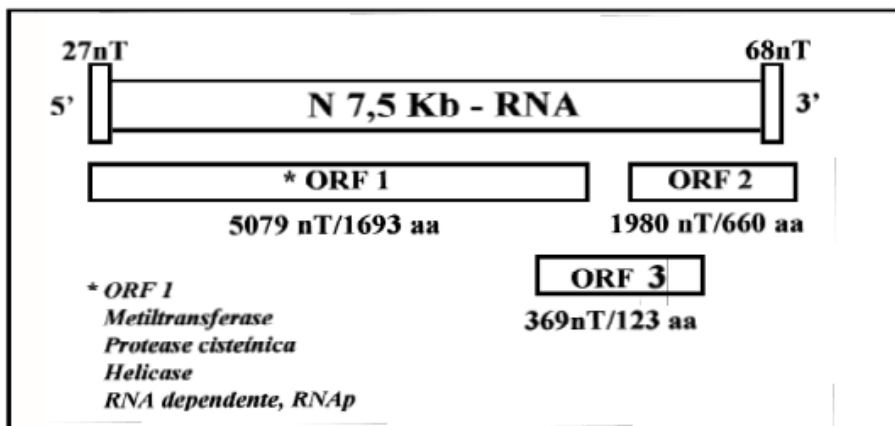
Seu genoma, de aproximadamente 7,5 quilobases (kb), é composto por uma fita simples de RNA com polaridade positiva, formado por três regiões de leitura genômica, ou “*open reading frames*” (ORF1, ORF2 e ORF3) (Figura 1), responsáveis pela expressão de proteínas estruturais e não estruturais do vírus. A ORF1 é a primeira região e a maior de todas, codificando uma proteína com 1.693 aminoácidos, tendo 5.079 nucleotídeos de extensão, responsável pela síntese de

proteínas não estruturais envolvidas na replicação viral. A ORF2 codifica as proteínas do capsídeo viral, com 660 aminoácidos, contém epítomos que são alvo da resposta imunológica do hospedeiro e, depois de sintetizada no retículo endoplasmático, é transportada à superfície celular, diretamente ou através do complexo de Golgi. A ORF3 é a menor região, com 123 aminoácidos, e sua função ainda não se encontra definida (ZAFRULLAH; OZDENER; PANDA, 1997; PARANÁ; SCHINONI, 2002).

Ahmad, Holla e Jameel (2011), em sua pesquisa sobre replicação de RNA genômico produzido *in vitro*, identificaram que a ORF3 era dispensável para a replicação, no entanto, foi necessária para o desenvolvimento de infecção em macacos que receberam uma inoculação intra-hepática. Diante dessas observações, os autores concluíram que a ORF3 pode ser uma proteína acessória, estando relacionada à resposta do hospedeiro à infecção.

Khudyakov et al. (1994) destacam que as ORF são expressas durante a infecção viral, uma vez que anticorpos contra essas regiões foram detectados em seres humanos naturalmente infectados.

Figura 1 – Organização genômica do HEV apresentando as três regiões de leitura genômica denominadas de ORF1, ORF2 E ORF3.



Fonte: Paraná e Schinoni (2002).

2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MODOS DE TRANSMISSÃO DO HEV

A hepatite E é descrita por vários autores como uma doença emergente, principalmente pelo fato de ter seu reconhecimento viral há pouco mais de duas décadas. Entretanto, há relatos de dados históricos datados de 1794 referentes ao

primeiro surto com relação etiológica confirmada entre os anos de 1955 e 1956, consistentes com o caráter epidemiológico da doença (PURCELL; EMERSON, 2008; KMUSH et al., 2013).

Até 1980, o vírus da hepatite A (HAV) era o único tipo de hepatite viral conhecido por ser transmitido através de água contaminada. No entanto, de acordo com Reyes (1993), grandes epidemias de hepatite nas décadas de 1950 a 1960, ocorridas em Bombaim e em Calcutá, tiveram o HEV como agente etiológico.

A primeira epidemia bem documentada de hepatite E ocorreu em 1955-1956 em Nova Délhi, na Índia, onde foram reportados 29.000 casos de hepatite após a ingestão de água contaminada, tendo sido considerada, na época, hepatite A, por causa da transmissão entérica e do quadro clínico dos envolvidos (VISHWANATHAN, 1957 apud MEJIDO, 2014, p. 4).

Outros surtos na Índia passaram a ser relacionados a um agente etiológico até então desconhecido, causador de hepatite entérica, designado inicialmente como vírus da hepatite entérica *não-A* e *não-B*, dadas a similaridade da infecção e a apresentação clínica com os já conhecidos vírus da hepatite A e B (MYNT et al., 1985).

O HEV tem a capacidade de infectar humanos e animais, principalmente o suíno, sendo este considerado reservatório natural para o vírus (PURCELL; EMERSON, 2008; PAVIO; MENG; RENOU, 2010; MUSHAHWAR, 2008).

Os principais genótipos da doença são responsáveis por casos esporádicos e infecções subclínicas até surtos de grande magnitude, com milhares de casos (KMUSH et al., 2013).

A hepatite E é uma doença viral aguda com transmissão fecal-oral, com evolução endemoepidêmica em certas regiões tropicais e subtropicais, em populações pobres de países em desenvolvimento, onde o acesso à água potável é insuficiente, e as condições higiênicas e sanitárias, precárias (CHANDRA et al., 2008; DALTON et al, 2008; MANSUY et al, 2008).

Em países industrializados, na Europa, Ásia e América do Norte, apesar do seu caráter autolimitante, casos esporádicos e autóctones da hepatite E têm sido cada vez mais frequentes, sendo uma das principais causas de hepatites entéricas atualmente, com enorme impacto à saúde pública global (AGGARWAL, 2011; KUMAR et al., 2013).

O HEV tem distribuição geográfica mundial, predominantemente em formas epidêmicas em regiões endêmicas de áreas com condições precárias de saneamento (Ásia e África – genótipo 1; México e África – genótipo 2) e formas não epidêmicas em regiões não endêmicas, em países desenvolvidos, sendo o genótipo 3 de ampla distribuição geográfica mundial, e o genótipo 4 encontrado na China, Europa e Japão, ambos associados ao consumo de carnes cruas ou malcozidas de suínos (PURCELL; EMERSON, 2008; AHMAD et al., 2011).

No Brasil, a presença de HEV vem sendo identificada em humanos e suínos através de pesquisas distribuídas em vários estados do território nacional, conforme demonstrado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Ocorrência de anticorpos IgG anti-HEV em humanos no Brasil

População	Número de humanos			Referência	Estado
	Testados	Positivos	%		
Doadores de sangue	200	2	12	Paraná et al. (1999)	Bahia
Doadores de sangue	165	5	3	Gonçales et al. (2000)	São Paulo
Mulheres gestantes	304	3	1	Trinta et al. (2001)	Rio de Janeiro
Crianças (2-9 anos)	487	26	4,5	Assis et al. (2002)	Mato Grosso
Indivíduos de baixa renda	699	17	2,5	Santos et al. (2002)	Rio de Janeiro
Manipuladores de suínos	32	2	6,2	Vitral et al. (2005)	Rio de Janeiro
Doadores de sangue	996	23	2,3	Bortoliero et al. (2006)	Paraná
Mulheres consideradas de risco para HIV	193	35	18,1	Gonçales et al. (2000)	São Paulo
Doadores de sangue	93	4	4,3	Trinta et al. (2001)	Rio de Janeiro
Doadores de sangue	110	5	4,5	Silva et al. (2012)	Mato Grosso

Fonte: Lana et al. (2013).

Tabela 3 – Identificação de anticorpos IgG anti-HEV e RNA do HEV em suínos no Brasil

Número de suínos			Técnica	Referência/estado
Testados	Positivos	%		
260	211	81,2	ELISA	Guimarães et al. (2005)/MT
70	17	24,2	ELISA	Vitral et al. (2005)/RJ
151	13	8,6	ELISA	De Souza et al. (2012)/PA
26	9	34	PCR	Dos Santos et al. (2009)/MT
118	2	1,17	PCR	Gardinali et al. (2012b)/PR
151	15	9,9	PCR	De Souza et al. (2012)/PA

Fonte: Lana et al. (2013).

Um número cada vez maior de estudos sugere que a hepatite E é uma zoonose (MENG et al., 1998; DOS SANTOS et al., 2010). Os anticorpos para HEV foram encontrados na população humana de países não endêmicos (THOMAS et al., 1997), o que reforça a tese de animais como reservatórios para HEV. Nesse sentido, tem-se relatado, por meio de infecções experimentais, que o HEV é capaz de atravessar a barreira entre espécies, visto que primatas foram infectados por HEV suíno (MENG et al., 1998), e suínos, por cordeiros (USMANOV et al., 1994) e ratos (MANEERAT et al., 1996) com HEV humano.

Estudos realizados por vários pesquisadores constataram a viabilidade da transmissão do HEV para humanos a partir do consumo de produtos industrializados à base de carne e fígado de suínos, como salsichas, figatellu, fígado seco e salgado, assim como consumo de carne de suínos e de outras espécies de animais de forma crua ou malcozida, sendo essa via responsável pela maioria dos casos de infecção autóctone (MENG, 2013; PAVIO; MERBAH; THÉBAULT, 2014; WILHELM et al., 2014; BARTOLO et al., 2015).

No sudeste do Brasil, Vitral et al. (2005) identificaram anticorpos anti-HEV IgG nas principais espécies produtoras de carne de consumo, como vacas (1,42%), galinhas (20%) e suínos (24,3%). No estado do Rio de Janeiro, Dos Santos et al. (2010) relatam o primeiro caso autóctone de infecção por HEV em humanos, identificado como genótipo 3, em amostra de soro por meio do uso de PCR. Em entrevista realizada após o diagnóstico, o paciente relatou o consumo de carne de suíno, sugerindo que a transmissão se deve ao consumo de carne de suínos contaminada por HEV.

2.2.1 Ocorrência do HEV em suínos

A principal via de infecção em suínos é fecal-oral, e o período de incubação é de 2 semanas a 2 meses, com uma média de 40 dias (PURCELL; EMERSON, 2008; PAVIO; MENG; RENO, 2010).

A ocorrência do HEV em suínos é comum tanto em países em desenvolvimento como nos industrializados (Tabela 4), principalmente pelo genótipo 3, embora haja também relatos de infecção pelo genótipo 4 (LU; LI; HAGERDORN, 2006; OKAMOTO, 2007).

Tabela 4 – Prevalência de anticorpos IgG anti-HEV em suínos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) detectado por meio de imunoenensaio enzimático de acordo com a região geográfica.

País	Número de			Referência
	Testados	Positivos	%	
Argentina	97	22	22,7	Munne et al. (2006)
Brasil	357	227	63,6	Vitral et al. (2005)
Canadá	998	594	59,5	Yoo et al. (2001)
China	419	330	78,8	Wang et al. (2002)
Coreia	140	57	40,7	Meng et al. (1999)
Espanha	60	15	25	Pina et al. (2000)
EUA	293	202	68,9	Meng et al. (1997)
EUA	84	29	34,5	Withers et al. (2002)
Grã-Bretanha	256	219	85,5	Banks et al. (2004)
Holanda	34	8	23,5	Banks et al. (2004)
Índia	284	122	43	Arankalle et al. (2002)
Indonésia	99	71	72	Wibawa et al. (2004)
México	125	8	6	Cooper et al. (2005)
Nova Zelândia	72	54	75	Garkvenko et al. (2001)
Suécia	204	118	58	Banks et al. (2004)
Taiwan	275	102	37,1	Hsieh et al. (1999)
Tailândia	76	10	13	Cooper et al. (2005)
TOTAL	3.873	2.188	56,4	

Fonte: Lana (2013).

Em áreas geográficas onde a doença não é endêmica em humanos, a soroprevalência em suínos é variável e pode chegar a 90%, variando conforme a idade e o tipo de ambiente (CHOI; CHAE, 2003; COOPER et al., 2005; DE SOUZA

et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2005; VITRAL et al., 2005). Uma vez que o HEV apresenta caráter extremamente contagioso entre os animais, devem ser adotadas medidas de biossegurança para limitar a disseminação do vírus no ambiente (BOUWKNEGT; ENGEL; HERREMANS., 2008).

Embora a porcentagem de animais infectados pelo HEV varie conforme a idade, o vírus pode ser identificado em animais de 1 a 22 semanas de idade (DE DEUS et al., 2008), com uma maior prevalência entre 3 e 4 meses de vida (CHOI; CHAE, 2003; HUANG et al., 2002), em razão da diminuição dos anticorpos maternos e do aumento da probabilidade de infecção por meio da contaminação fecal do ambiente, alimentos e água (WILLIAMS et al., 2001).

Em uma granja convencional, a dinâmica da infecção pelo HEV é similar à de outros agentes virais (DE DEUS et al., 2008). Uma elevada proporção de animais adultos é soropositiva, e os leitões lactantes apresentam anticorpos IgG e IgA anti-HEV, adquiridos de maneira passiva. Esses anticorpos têm duração variável, dependendo da quantidade de anticorpos maternos transferidos (MENG et al., 1997). Estudo realizado por Vitral et al. (2005) detectou prevalência de IgG anti-HEV em 100% dos suínos avaliados com idade de até 7 dias, ocorrendo um declínio gradual entre a 2ª e a 8ª semanas de idade (presumivelmente, por perda de IgG materna), e posteriormente ocorreu um constante aumento da prevalência de IgG anti-HEV. Inicialmente foi observado a prevalência de IgG anti-HEV em 13% de amostras de suínos com idade 9-10 semanas, aumentando para 15,2% dos animais com idade entre 11-13 semanas. Em seguida, a prevalência aumentou acentuadamente para 83,3% das amostras de suíno de 15-16 semanas, até atingir 97,3% entre os animais com idade de 25 semanas

Leitões nascidos de mães com títulos de anticorpos muito elevados podem ser soropositivos até a 9ª semana de idade. Uma vez que os animais perdem os anticorpos maternos e se infectam no ambiente, ocorrendo soroconversão aproximadamente por volta da 12ª e da 14ª semanas de idade, após uma semana anticorpos IgG anti-HEV são observados, podendo ser detectados até a idade do abate (5 meses) (DE DEUS et al., 2008; MENG et al., 1997).

Entretanto, a detecção de anticorpos IgM pode ser observada em um período de 5 a 7 semanas, sendo relacionada à presença do vírus no sangue, indicando a fase aguda da infecção. O pico da infecção pode ser observado entre a 12ª e a 15ª semanas de idade, quando o vírus pode ser detectado no sangue, na

bile, nos nódulos linfáticos mesentéricos, nos fígado e nas fezes em mais de 50% dos animais infectados. Nessa idade, também é possível observar lesões hepáticas que variam de leve a moderada (DE DEUS et al., 2008).

Estudos apontam que mais de 20% dos suínos de variadas regiões do Brasil, como Paraná, Pará, Rio de Janeiro e Mato Grosso, excretam o HEV nas fezes (DOS SANTOS et al., 2009; GARDINALI et al., 2012a; LANA et al., 2014; PAIVA et al., 2007; RUTJES et al., 2007), fato que pode contribuir para a contaminação de córregos e rios próximos das granjas (SHIELDS et al., 2015).

Adicionalmente, o HEV também foi detectado em lagoas de chorume em explorações suinícolas e efluentes de matadouro de suínos (DOS SANTOS et al., 2011; WIBAWA et al., 2004), demonstrando ser também uma fonte de contaminação ambiental, já que a água tratada pelos efluentes normalmente retorna ao curso original.

Paiva et al. (2007) analisaram amostras de fezes de oito suínos jovens em fazendas no interior de São Paulo quanto à presença do HEV por RT-PCR, utilizando-se oligonucleotídeos para amplificação da sequência parcial do ORF2 viral. A análise filogenética revelou que a cepa encontrada nas fezes de sete suínos apresentou relação próxima com cepas do genótipo 3, que são detectadas com frequência em suínos. De maneira semelhante, análises da sequência de aminoácidos realizadas com os mesmos segmentos também mostraram maior identidade com o isolado de genótipo 3. Os autores sugeriram que os suínos podem ser a fonte de transmissões para os seres humanos, exclusivamente de genótipos HEV 3 e 4, havendo, ainda, a necessidade de se pesquisarem outros genótipos de HEV no Brasil.

Investigando a infecção por HEV em suínos de diferentes regiões do estado do Pará, de Souza et al. (2012) realizaram, além de sorologia, análises moleculares de amostras de fezes e fígado de 151 suínos adultos abatidos no ano de 2010 em matadouros na região metropolitana de Belém. Entre os animais testados, 18% foram positivos para anti-IgG HEV, mas não para a presença de anti-IgM HEV. Além disso, o RNA do HEV foi detectado em 27% dos fígados e 54% das fezes, sendo que todos foram sequenciados e classificados como genótipo 3.

Gardinali et al. (2012a) detectaram a presença do HEV em 23,5% das amostras de fezes de suínos com 24 semanas de idade, em idade de abate, em granjas no oeste do Paraná, sendo esta a idade na qual a maioria dos suínos são

abatidos no Brasil, gerando preocupação sobre o risco de transmissão do HEV para os indivíduos que entram em contato estreito com as vísceras e fezes dos suínos infectados, e também dos que consomem produtos contaminados, principalmente fígado e carne crus ou malcozidos.

Em outro estudo, Gardinali et al (2012b) pesquisaram HEV em amostras de fígado e bile de 118 suínos adultos assintomáticos em um matadouro-frigorífico do oeste do Paraná e detectaram o HEV em duas amostras de fígado (1,7%) e uma amostra biliar (0,84%). As cepas virais que foram detectadas como HEV pertenciam ao subtipo 3b, com base em suas sequências de nucleotídeos.

Lana et al. (2014) realizaram estudo para pesquisar a presença de HEV em fezes, bile, fígado e outros órgãos de suínos de matadouros de Mato Grosso, provenientes de granjas de grande escala com controle sanitário e de propriedades familiares, e a infecção pelo HEV foi detectada por RT-PCR em 44% (11/25) dos porcos de fazendas em escala familiar do Mato Grosso, detectada com maior frequência na bile, seguida pelo fígado e pelas amostras fecais.

Dos Santos et al. (2009) estudaram uma criação comercial de suínos no interior do Rio de Janeiro onde 26 leitões nascidos de 5 porcas positivas para anticorpos anti-HEV foram monitorados desde o nascimento até 22 semanas pós-parto, para detecção de anticorpos anti-HEV e do genoma de HEV através de nested RT-PCR. Inicialmente, foram coletadas amostras de soro dos leitões logo após o parto e 24 horas após serem alimentados com colostro, e posteriormente, com intervalos de 15 dias. A transferência passiva de imunidade foi confirmada, assim como posterior declínio. Na 22^a semana, 23 dos 26 (88,4%) animais apresentavam soroconversão. A identificação do genótipo 3, após amplificação do genoma, foi encontrada em uma amostra de fezes e em outra amostra de soro, em animais de 13 semanas de idade e em uma amostra de fragmento de fígado pós-abate (25 semanas de idade).

Dos Santos et al. (2011) analisaram 115 amostras de bile de suínos abatidos em três matadouros na região Norte do Rio de Janeiro e, ainda, seis amostras de efluentes originadas do abate, identificando, por meio de RT-PCR, a presença do HEV em 9,6% e 50% das amostras de bile e efluentes, respectivamente. As cargas virais observadas para amostras biliares variaram de 101-105 cópias do genoma/mL, e para amostras de efluentes a carga foi de 102 cópias do genoma/mL. As cargas virais identificadas foram classificadas como genótipo 3, subtipo 3b,

intimamente relacionado aos resultados observados na análise por RT-PCR da amostra de soro obtida a partir do primeiro relato de caso autóctone de HEV humana relacionada a consumo de carne suína, proveniente de rebanhos do Brasil (DOS SANTOS et al., 2010). Esses resultados contribuem para a confirmação de que há circulação de HEV em rebanhos suínos do Brasil.

2.2.2 Ocorrência do HEV em humanos

As cepas de HEV relacionadas à infecção em seres humanos são taxonomicamente divididas em quatro genótipos: 1, 2, 3 e 4 (LU; LI; HAGEDORN, 2006). A via de transmissão de HEV de maior evidência é a alimentar, ocorrendo a partir do consumo de água e alimentos contaminados com fezes de indivíduos ou animais, bem como pela ingestão de carne e/ou derivados crus ou malcozidas de animais infectados (COLSON et al., 2010; MANSUY et al., 2011).

Enquanto as epidemias e infecções endêmicas que ocorrem em países do Terceiro Mundo, bem como os casos importados desses países, são causados pelo vírus da hepatite E do genótipo 1 ou 2, infectando somente os seres humanos, as infecções adquiridas em países industrializados são causadas pelo genótipo 3 na Europa e América do Norte ou genótipo 4 na Ásia Oriental. Acredita-se que os suínos domésticos e javalis selvagens constituem um reservatório para o genótipo 3 ou 4 para infecções humanas, em que os seres humanos podem adquirir tal infecção a partir do consumo de carne suína, de javali ou de veado malcozida (WIDÉN et al., 2014). A soroprevalência em humanos é maior em países onde o sistema de saneamento é precário (CHANDRA et al., 2008). Já os genótipos 3 e 4 são considerados casos autóctones (KUMAR et al., 2013). Todavia, em regiões de baixa endemicidade, grupos especiais, como pequenos criadores, veterinários e pessoas que manipulam animais, ou, ainda, consumidores de carne suína malcozida, apresentam soroprevalência maior que a da população em geral (KIM et al., 2015; MIZUO et al., 2005; SILVA et al., 2012).

Na França, produtos alimentares que contenham fígado de suíno têm sido constantemente suspeitos de resultar em casos autóctones de infecção por HEV e podem ser responsáveis por quase 40% desses casos. Recentemente, verificou-se que os casos autóctones aumentaram, de 9 casos em 2002 para quase 800 em 2012 (PAVIO; MERBAH; THÉBAULT, 2014).

Os principais casos de infecção pelo HEV em humanos a partir da ingestão de alimentos referem-se ao consumo da carne suína crua (DEEST et al., 2007) e cozida (DOS SANTOS et al., 2010), de salsichas de fígado suíno (BARTOLO et al., 2015; COLSON et al., 2010; 2012; YAZAKI et al., 2003), de fígado suíno cozido (YAZAKI et al., 2003), e cru (WILHELM et al., 2014), de carne de javali cozida (LI et al., 2005) e carne de veado crua (TEI et al., 2003).

Estudos no Brasil (BORTOLIERO et al., 2006; PARANÁ et al., 1999; SILVA et al., 2012; TRINTA et al., 2001) e no mundo (ARANKALLE et al., 1999; MITSUI et al., 2004) têm demonstrado níveis elevados de soroprevalência de HEV em grupos específicos, como doadores de sangue, levantando a suspeita de que o agente possa ser transmitido pela via parenteral.

No estado do Mato Grosso, Da Silva (2012) analisou, por meio de sorologia, a prevalência de anticorpos anti-HEV em indivíduos da área rural (grupo 1) que mantinham contato com suínos e, simultaneamente, doadores de sangue (grupo 2) residentes em áreas urbanas, dos quais 8,4% e 4%, respectivamente, apresentaram anticorpos anti-HEV-positivos.

No Rio de Janeiro, no Laboratório da Fiocruz, entre 1994 e 1996, foram testados 1.115 indivíduos de diferentes grupos, dentre os quais, 6,2% de pacientes em hemodiálise, 4,3% doadores de sangue, 11,8% de usuários de drogas intravenosas, 1% de mulheres gestantes e 2,1% de moradores de áreas rurais apresentaram anticorpos da classe IgG anti-HEV (TRINTA et al., 2001).

Assis, Souto e Gaspar (2002), em seu estudo realizado no interior do estado do Mato Grosso, constataram, por meio de sorologia, a prevalência de 4,5% de anticorpo IgG anti-HEV em crianças com idade de 2 a 9 anos. Dos Santos (2010) relatam o registro do primeiro caso autóctone de infecção por HEV em um humano, identificando, sorologicamente, IgG e IgM anti-HEV e amplificação do RNA viral a partir do soro do paciente. Martins et al. (2014), em estudo realizado no estado de Goiás com 432 catadores de lixo reciclável de 15 cooperativas diferentes, constataram por ELISA que, 24 participantes tinham IgG anti-HEV. Destes, 22 foram confirmados positivos pelo imunotransferência, resultando em uma soroprevalência de 5,1%.

A transmissão também pode ocorrer por meio de transplante de órgãos, principalmente de fígado (HAAGSMA et al., 2008) e por transmissão vertical, facilitando a difusão viral na espécie humana (MUSHAHWAR, 2008).

2.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS DA HEPATITE E

O HEV, por ser um vírus hepatotrópico, utiliza a via oral para entrada no hospedeiro e tem acesso ao fígado através da circulação portal, replicando-se no citoplasma dos hepatócitos, sendo, posteriormente, excretado na bile e nas fezes (KRAWCZYNSKI; MENG; RYBCZYNSKA, 2011; CHOI, CHAE, 2003).

Estudos experimentais têm demonstrado que a replicação do HEV também ocorre em outros órgãos além do fígado (WILLIAMS et al., 2001), como intestino delgado, intestino grosso e nódulos linfáticos. O vírus também já foi detectado no epitélio do ducto biliar, tonsilas e baço de animais infectados naturalmente (CHOI; CHAE, 2003).

Para a replicação, o HEV liga-se ao hepatócito por receptores ainda não caracterizados, em que a proteína HEV 239 de capsídeo viral, altamente conservada entre os genótipos do HEV em mamíferos, se liga a receptores de superfície do tipo proteoglicanos sulfatados de heparina (HSPGs) e chaperonas, como a Grp78. Após sua adsorção na superfície da célula-alvo, o HEV penetra na célula por endocitose mediada por clatrina, e no citoplasma ocorre o desnudamento do capsídeo, seguido da liberação do RNA viral (MENG, 2011; HOLLA et al., 2013).

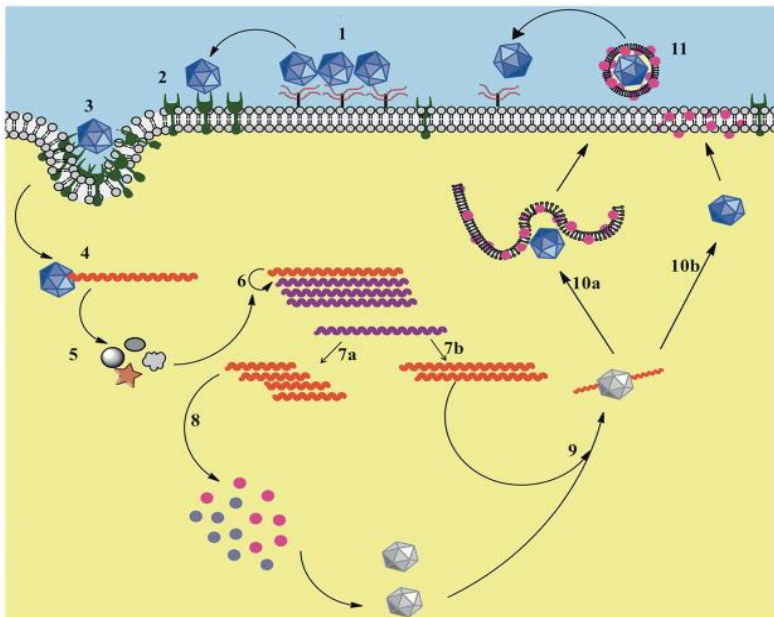
Na Figura 2, é possível observar detalhes dessa replicação, em que as partículas virais são concentradas na superfície de células-alvo através de proteoglicanos sulfatados de heparina na qualidade de fatores de ligação (linhas onduladas em vermelho) (etapa 1) e, subsequentemente, ligam-se a um receptor específico ainda não caracterizado (etapa 2), e em seguida as partículas são internalizadas (etapa 3).

O vírus, então, sofre uma descapsidação (etapa 4) para libertar o RNA genômico que é traduzido no citoplasma em proteínas não estruturais (etapa 5). Essas proteínas não estruturais incluem RNA polimerase dependente de RNA, que replica o RNA genômico de sentido positivo em transcritos de sentido negativo (ondulação na cor roxa) (etapa 6); este último, em seguida, atua como molde para a síntese de um RNA de 2,2 kb subgenômico (etapas 7a e 7b).

O RNA sentido positivo é traduzido em ORF2 (azul) e proteínas ORF3 (vermelho) (etapa 8). A proteína de ORF2 empacota o RNA genômico para formar novos vírions (etapa 9), ao passo que a proteína da ORF3 pode otimizar o ambiente

da célula hospedeira para a replicação viral. A proteína da ORF3 está também associada a endomembranas (etapa 10a) ou membranas plasmáticas (etapa 10b), e pode ajudar na saída da progênie viral. Estudos recentes sugerem que os vírions maduros são associados à proteína da ORF3 e lipídeos (etapa 11), que são, subsequentemente, removidos para retomar um ciclo de infecção recente (AHMAD; HOLLA; JAMEEEL, 2011).

Figura 2 – Ciclo de replicação do Vírus da hepatite E.



Fonte: Ahmad, Holla e Jameeel (2011).

2.3.1 Em suínos

Os suínos são considerados assintomáticos ao HEV, e a infecção em suínos é autolimitante. Estudos experimentais nessa espécie descrevem a ausência de lesões macroscópicas no fígado (MENG, 2003). Entretanto, lesões microscópicas caracterizadas por hepatite periportal linfoplasmocitária focal, com necrose hepatocelular leve, têm sido relatadas (DE DEUS; SEGALES, 2009; HALBUR et al., 2001; MENG et al., 1997).

Em animais naturalmente infectados, o HEV pode ser identificado tanto em órgãos internos como no fígado, nas fezes e na bile, pois, assim que são formadas, as novas partículas do HEV são externizadas por brotamento através da membrana

apical do hepatócito, onde serão conduzidas aos ductos biliares, à bile, à vesícula biliar e ao intestino, sendo eliminadas nas fezes (CAO; MENG, 2012). Por se tratar de uma zoonose, estudos sobre a prevalência desse agente em suínos e em outras espécies contribuem para que, posteriormente, sejam avaliados possíveis fatores de risco aos quais determinadas populações podem estar sendo expostas sem a devida notificação (WILLIAMS et al., 2001).

2.3.2 Em humanos

Nos seres humanos, o HEV é responsável por uma forma aguda, enterotransmissível de hepatite, semelhante à causada pelo vírus da hepatite A. Na maioria dos casos, é uma infecção autolimitante, com eliminação viral rápida, mas pode evoluir para formas mais graves, incluindo hepatite fulminante fatal (; MERBAH; THÉBAULT, 2014).

Os índices de mortalidade associados às infecções pelo HEV variam de 1 a 4%, sendo mais frequente em pacientes com doença hepática crônica anterior à infecção (MUSHAHWAR, 2008; PURCELL; EMERSON, 2008).

Apesar de os vírus causadores de hepatites diferirem quanto à família viral na qual estão classificados, eles apresentam como característica comum o tropismo pelos hepatócitos (MUSHAHWAR, 2008). Os sintomas, quando apresentados, podem aparecer de 15 a 60 dias após a infecção, sendo os mais frequentes cansaço, tontura, enjoo e/ou vômitos, febre, dor abdominal, hepatomegalia, pele e olhos ictericos, urina escura e fezes claras (PURCELL; EMERSON, 2008; MUSHAHWAR, 2008).

A hepatite E determina uma elevada taxa de mortalidade da mãe durante a gestação (cerca de 20%), em que a transmissão do HEV da mãe para o feto pode resultar em abortamento, principalmente durante o terço inicial da gestação (KHUROO et al., 1995; NAVANEETHAN; MOHAJER; SHATA, 2008). Estudos indicam que o HEV diminui a capacidade dos hepatócitos em proteger o organismo contra endotoxinas de bactérias Gram-negativas do trato intestinal, sendo a sensibilidade aumentada de mulheres grávidas ao efeito da endotoxemia, um dos fatores para explicar a alta mortalidade de gestantes mediante a infecção pelo HEV (SMITH, 2001).

2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Testes laboratoriais de diagnóstico para detectar a infecção pelo HEV compreendem técnicas moleculares (transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase – RT-PCR) em amostras de soro, bile (MENG et al., 1997), fígado (LANA et al., 2014; GARDINALI, 2012a) e fezes (INOUE et al., 2006); imunohistoquímica (em biópsias e em exames *post-mortem*, de humanos e suínos) (GUPTA et al., 2012) e testes sorológicos (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-HEV e/ou IgM anti-HEV. A presença de IgM anti-HEV, com ou sem anticorpos IgG, pode ocorrer durante a fase aguda da doença e dura cerca de 4 ou 5 meses, ao passo que a presença de títulos de anticorpos IgG anti-HEV indica que a fase de viremia já ocorreu. Portanto, o aumento dos níveis de IgM são indicativos de infecção aguda, ao passo que os níveis de IgG estão relacionados a um contato anterior com HEV (CLAYSON et al., 1995).

2.5 TRATAMENTO E PROFILAXIA

Não há tratamento específico para a hepatite E. Quando não ocorre a forma fulminante, a doença evolui para a cura espontânea. À semelhança da conduta adequada às outras hepatites virais, deve-se permitir uma dieta livre, de acordo com a aceitação do paciente. Os antieméticos podem ser utilizados conforme a demanda, na fase aguda, ao passo que os complexos vitamínicos não parecem influenciar a evolução da doença e não devem merecer prescrição rotineira (PARANÁ; SCHINONI, 2002).

A profilaxia do HEV refere-se às medidas de saneamento básico nos países em desenvolvimento, a fim de limitar a contaminação da água potável por materiais contaminados, principalmente fezes e restos de abate de animais, além de vigilância de populações de risco de hepatite fulminante, como mulheres grávidas, crianças e pessoas com doenças hepáticas subjacentes. Suínos representam reservatório do HEV em regiões não endêmicas, e são, provavelmente, uma das fontes de infecção para os casos esporádicos de hepatite aguda E. Nos países industrializados, onde a transmissão zoonótica pode ser a principal via de infecção da hepatite E, os consumidores de carne malcozida e produtos derivados de carne suína devem estar

cientes do risco potencial. Em suínos, uma vez que o HEV parece ser muito contagioso entre os animais, devem ser adotados procedimentos de biossegurança para limitar a disseminação do HEV (ASSIS; SOUTO; GASPAR, 2002; BOUWKNEGT; ENGEL, HERREMANS, 2008; DOS SANTOS et al., 2010).

Como o anticorpo anti-HEV neutraliza todos os genótipos virais, o desenvolvimento de uma vacina de ampla utilização é viável. Ela seria indicada no caso de viajantes que se dirigem a áreas endêmicas e, naturalmente, em gestantes (PARANÁ; SCHINONI, 2002).

2.6 PERSPECTIVAS

Pesquisas realizadas apontam que há evidências da atividade viral do HEV em rebanhos suínos no Mato Grosso e que estes são portadores assintomáticos do HEV, sugerindo que esse vírus pode se disseminar tanto nos rebanhos do estado como em várias regiões do país e do mundo. Além disso, tem-se apontado a soroprevalência positiva em humanos da região para anticorpos anti-HEV, o que pode estar relacionado ao contato com os animais e seus dejetos ou ingestão de produtos desses animais, pois é sabido que, em áreas geográficas onde a doença não é endêmica em humanos, a soroprevalência em suínos é variável e pode chegar a 90%, variando conforme a idade e o tipo de ambiente (DOS SANTOS et al., 2010; DE SOUZA et al., 2012; ECHEVARRÍA et al., 2013; LANA et al., 2014).

REFERÊNCIAS

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatórios anuais**. 2015. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

AGGARWAL, R.; Hepatitis E: historical, contemporary and future perspectives. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26 (Suppl. 1), p. 72-82, 2011.

AHMAD, I.; HOLLA, R. P.; JAMEEL, S. Molecular virology of hepatitis E virus. **Virus Research**, v. 161, n. 1, p. 47-58, 2011.

ARANKALLE, V. A et al. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (197-1993). **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1691-700, 1999.

ASSIS, S. B.; SOUTO, F. J. D.; GASPAR, A. M. C. Prevalence of hepatitis A e and E virus infection school children of Amazonian municipality in Mato Grosso State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 155-8, 2002.

BARTOLO, I. D. et al. Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.193, p.29-33, 2015.

BORTOLIERO, A. L. et al. Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Paraná, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 2, p. 87-92, 2006.

BOUWKNEGT. M.; ENGEL, B.; HERREMANS, M. M. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in the Netherlands. **Epidemiology and Infection**, v. 136, p. 567-6, 2008.

CARDOSO, M. R. de I.; KICH, J. D. Revisão sobre zoonoses com impacto na cadeia de produção de carne suína. **Simpósio Internacional de Suinocultura**, Porto Alegre, UFRGS, v. 8, p. 109-21, 2013.

CAO, D.; MENG, X-J. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 1, n. 8, p.17, 2012.

CHANDRA, V. et al. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. **Journal of Bioscience**, v. 33, p. 451-64, 2008.

CHOI, C.; CHAE, C. Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic Tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. **Journal of Hepatology**, v. 38, p. 827-32, 2003.

CLAYSON, E. T. et al. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 228-32, 1995.

COLSON, P. et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. 825-34, 2010.

_____. et al. Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. **Emerging infectious Disease**, v.18, p.1361-2, 2012.

COOPER, K. et al. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1684-8, 2005.

DALTON, H. R. et al. Hepatitis e: an emerging infection in developed countries. **Lancet Infectious Diseases**, v. 89, p. 698-709, 2008.

DA SILVA, S. M. T. et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 338-341, 2012.

DEEST, G. et al. Autochthonous hepatitis E in France and consumption of raw pig meat. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 31, p. 1095-7, 2007.

DE DEUS, N. et al. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 19-28, 2008.

_____.; SEGALÉS, J. La infección por El virus de La hepatitis E en el cerdo. **Suis**, v. 61, p. 35-9, 2009.

DE 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**, v. 35, p. 477-85, 2012.

DOS SANTOS, D. R. L. et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 474-80, 2009.

_____. et al. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, p.276-284. 2010.

_____. et al. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 236-41, 2011.

ECHEVARRÍA, J. M. et al. Hepatitis E Virus Infection in Latin America: a review. **Journal of Medical Virology**, v. 85, p. 1037-45, 2013.

EMERSON, S. U. et al. Hepevirus. In: FAUQUET, C.M. et al. (Eds.). **Virus taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Londo: Academic Press, 2004. p. 851-5.

_____.; ARANKALLE, V. A.; PURCELL, R. H. Thermal stability of hepatitis E virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 5, p. 930-3, 2005.

FEAGINS, A. R. et al. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. **International journal of food microbiology**, v. 123, n. 1, p. 32-7, 2008.

FOCACCIA, R.; SETTE, J. R. H.; CONCEIÇÃO, O. J. G. Hepatitis E in Brazil. **Lancet**, v. 346. p. 1165, 1995.

GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; CARLINI, E. A. IV **Levantamento sobre uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Psicologia, Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas. Anexo VI: Esclarecimento sobre a escala socioeconômica da ABIPEME, 1977.

GARDINALI, N. R. et al. Molecular detection and characterization of hepatitis E vírus in naturally infected pigs from Brazilian herds. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 1515-9, 2012a.

_____. et al. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.7, p. 935-9, nov. 2012b.

GUIMARÃES, R. F. et al. Hepatitis E virus antibodies in swine herds of Mato Grosso state, central Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 223-6, 2005.

GUPTA, P. et al. Immunohistochemistry for the diagnosis of hepatitis E virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 19, p. 177-83, 2012.

HAAGSMA, E. B. et al. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. **Liver Transplantation**, v. 14, p. 547-53, 2008.

HALBUR, P. G. et al. Comparative Pathogenesis of Infection of Pigs with Hepatitis E Viruses Recovered from a Pig and a Human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 918-23, 2001.

HELDT, F. H. et al. Hepatitis E virus in surface water, sediments, and pork products marketed in southern Brazil. **Food and environmental virology**, v. 8, n. 3, p. 200-5, 2016.

HOLLA R. P. et al. Molecular Virology of Hepatitis E Virus. **Seminars in Liver Diseases**, v. 33, p. 3-14, 2013.

HUANG, F. F. et al. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis E virus from chickens in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 419-4202, 2002.

INOUE, J. et al. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. **Journal of Virology Methods**, v. 2, n. 137, p. 325-33, 2006.

JOHNE, R. et al. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 3, p. 750-8, 2010.

KHUDYAKOV, Y. E. et al. Artificial mosaic protein containing antigenic epitopes of hepatitis E virus. **Journal of Virology**, v. 68, p. 7067-74, 1994.

KHURROO, M. S. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. **Virus Research**, v. 161, p. 3-14, 2011.

_____.; KAMILI, S.; JAMEEL, S. Transmissão vertical do vírus da hepatite E. **Lancet**, v. 345, p. 1025-6, 1995.

KIM, B, S. et al. A Survey on the status of hepatitis E virus infection among slaughterhouse workers in South Korea. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 48, p. 53-61, 2015.

KMUSH, B. et al. Epidemiology of hepatitis E in low-and middle-income countries of Asia and Africa. **Seminars in Liver Disease**, v. 33, p. 18-29, 2013.

KRAWCZYNSKI, K.; MENG, X. J.; RYBCZYNSKA, J. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. **Virus Research**, v. 161, p. 78-83, 2011.

KUMAR, S. et al. Hepatitis E virus: the current scenario. **International Journal of Infectious Diseases**, n. 17, p. 228-33, 2013.

LANA, M. V. C. **Ocorrência de Hepatite E em suínos criados em diferentes sistemas de produção**. 2013.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, 2013

_____. Evaluation of hepatitis E virus infection between different production systems of pigs in Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 46, p. 399-404, 2014.

LI, T. C. et al., Expression and selfassembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. **Journal of Virology**, v. 71, p. 7207-13, 1997.

_____. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. **Emerging Infectious Disease**, v. 11, p. 1958-60, 2005.

LU, L.; LI, C.; HAGEDORN, C. H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. **Reviews of Medical Virology**, v. 16, p. 5-36, 2006.

MANEERAT, Y. et al. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. **Journal of Medical Virology**, v. 2, n.48, p. 121-8, 1996.

MANSUY, J. M. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus anti-hepatite E em doadores de sangue do sudoeste de França. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 289-93, 2008.

_____. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 2309-15, 2011.

MARTINS, R. M. B. et al. Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a population of recyclable waste pickers in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 59, p. 188-91, 2014.

MEJIDO, D. C. P. **Análise do controle viral e caracterização de subpopulações de células imunes em infecções pelo vírus da hepatite e genótipo 3 de origem suína e humana em macacos *Cynomolgus (Macaca fascicularis)***. 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

MENG, X. J. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 278, p. 185-216, 2003.

_____. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus **Virus Research**, v. 161, p. 23-30, 2011.

_____. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. **Seminars in Liver Disease**, v. 33, p. 41-9, 2013.

MENG, X. J. et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 9860-5, 1997.

_____. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. **Journal of Medical Virology**, v. 72, p. 9714-21, 1998.

MYINT, H. et al. A clinical and epidemiological study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Rangoon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, p. 1183-9, 1985.

MITSUI, T. et al. Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. **Journal of Medical Virology**, v. 74, p. 563-72, 2004.

MIZUO, H. et al. Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. **Journal of Medical Virology**, v. 76, p. 341-9, 2005.

MUSHAHAWAR, I. K. Hepatitis E Virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 646-8, 2008.

NAKAMURA, M. et al. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a nucleotide sequence of the complete genome. **Hepatology Research**, v. 34, p. 137-40, 2006.

NAVANEETHAN, U.; AL MOHAJER, M.; SHATA, M. T. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. **Liver International**, v. 28, p. 1190-9, 2008.

OKAMOTO, H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. **Virus Research**, v. 127, p. 216-8, 2007.

PAIVA, H. H. et al. Molecular characterization of swine hepatitis E virus from southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 693-8, 2007.

PANG, L. et al. Hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 5, p. 347-8, 1995.

PARANÁ, R.; SCHINONI, M. I. Hepatitis E. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 247-53, maio/jun. 2002.

_____. et al. Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in Northeastern Brazil: etiology and natural history. **Hepatology**, v. 30, p. 289-93, 1999.

PAVIO, N.; MENG, X. J.; RENOU, C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. **Veterinary Research**, v. 41, p. 46, 2010.

_____.; MERBAH, T.; THÉBAULT, A. Frequent hepatitis e virus contamination in food containing raw pork liver, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 11, 2014.

PERON, J. M. et al. Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. **Virchows Archiv**, v. 450, n. 4, p. 405-10, 2007.

PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. **Journal of Hepatology**, v. 48, p. 494-503, 2008.

RAJ, V. S. et al. Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 8, p. 1369-70, 2012.

REYES, G. R. **Hepatitis E virus**. In: _____. Progress in liver disease molecular biology and emerging epidemiology. Philadelphia: WB Saunders, 1993. p. 203-11.

_____. et al. Isolation of a DNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. **Science**, v. 247, n. 4948, p. 1335-9, 1990.

RUTJES, S. A. et al. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 143, p. 112-6, 2007.

SCOBIE, L. E.; DALTON, H. R. Hepatitis E: source and route of infection, clinical manifestations and new developments. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 20, p. 1-11, 2013.

SHIELDS, J. G. et al. Hepatitis E virus and coliphages in waters proximal to swine concentrated animal feeding operations. **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 487-93, 2015.

SILVA, S. M. T. et al. Prevalence of hepatitis e virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 338-41, maio 2012.

SMITH, J. L. A review of hepatitis E virus. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 572-86, 2001.

SOUTO, F. J. D.; FONTES, C. J. F. Prevalence of IgG-class antibodies against hepatitis E virus in a community of the southern Amazon: a randomized survey. **Annals of Tropical Medicine and Pharmacology**, v. 92, p. 623-5, 1998.

TAM, A. W. et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. **Virology**, v. 185, p. 120-31, 1991.

TEI, S. et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to humans beings. **Lancet**, v. 362, p. 371-73, 2003.

THOMAS, D. L. et al. Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1244-7, 1997.

TRINTA, K. S. et al. Hepatitis E Virus infection in selected brazilian populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n.1, p. 25-9, jan. 2001.

USMANOV, R. K. et al. An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus. **Voprosy Virusologii**, v. 4, n. 39, p. 165-8, 1994.

VASCONCELOS, J. et al. Molecular detection of hepatitis E virus in feces and slurry from swine farms, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 777-82, 2015.

VITRAL, C. L. et al. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 117-22, 2005.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2013. **Hepatitis E**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

WIBAWA, I. D. et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: Identification of a pig infected with genotype 4 hepatitis E virus. **Journal of Medical Virology**, v. 73, p. 38-44, 2004.

WIDÉN, F. et al. PCR detection and analyzis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats. **Virology journal**, v. 11, n. 1, p. 1, 2014.

WILHELM, B. et al. A. Survey of Canadian retail pork chops and pork livers for detection of hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus using real time RT-PCR **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 33-40, 2014.

WILLIAMS, T. P. et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3040-6, 2001.

WONG, D. C. et al. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis etiology. **Lancet**, v. 2, p. 867-9, 1980.

WOO, P. C. et al. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. **Emerg Infect Dis**, v. 20, p. 1044-8, 2014.

XU, F. et al. Hepatitis E virus genotype 4 in yak, northwestern china. **Emerging infectious diseases**, v. 20, p. 2182-3, 2014.

YAZAKI, Y. et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 2351-7, 2003.

ZAFRULLAH, M.; OZDENER, M. H.; PANDA, S. K. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. **Journal of Virology**, v. 71, p. 9045-53, 1997.

ZHAO, C. et al. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1371-9, 2009.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a ocorrência da infecção pelo HEV em suínos criados em sistema intensivo e abatidos em matadouro-frigorífico com inspeção sanitária federal no Estado de Mato Grosso.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o percentual de suínos infectados pelo HEV por meio da detecção do RNA genômico viral em amostras de fígado.
- Caracterizar geneticamente as cepas virais de HEV identificadas por meio da RT-PCR, seguida de sequenciamento direto dos *amplicons* obtidos
- Investigar a distribuição dos animais infectados segundo os municípios e macrorregiões do Estado onde os animais estavam alojados.

4 ARTIGO

DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E EM AMOSTRAS DE FÍGADO DE SUÍNOS PROCEDENTES DO ESTADO DE MATO GROSSO

RESUMO

DUARTE, S. G. S. **DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E EM AMOSTRAS DE FÍGADO DE SUÍNOS PROCEDENTES DO ESTADO DE MATO GROSSO**. 2016. Dissertação (Mestrado Biociência Animal) – Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2016.

A hepatite E é uma doença aguda de transmissão fecal-oral causada pelo HEV (*hepatitis E virus*), endêmica em países em desenvolvimento, com péssimas condições sanitárias, onde o acesso à água potável é insuficiente. Casos esporádicos têm sido relatados em países desenvolvidos. No homem, geralmente ocasiona infecção aguda e autolimitante, que pode ocorrer na forma inaparente, com rápida eliminação viral, ou evoluir para formas mais graves, incluindo hepatite fulminante fatal. De ocorrência rara no Brasil e comum na Ásia e na África, a infecção pelo HEV em humanos e em outros mamíferos ocorre não somente através da água e de alimentos contaminados por fezes, mas também pela ingestão de carne de animais infectados, sendo os suínos os animais mais estudados, com elevada prevalência de anticorpos contra hepatite E (anti-HEV), em criações em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Com o objetivo de identificar a infecção de suínos pelo HEV por meio da caracterização molecular, foram coletadas 72 amostras de fígado de suínos criados em sistema de integração, de duas regiões do Estado de Mato Grosso e abatidos em matadouro-frigorífico com inspeção sanitária federal no período de 3 a 12 de maio de 2016. A presença do RNA do HEV foi detectada por RT-PCR, com *primers* para a ORF2 do genoma viral. Dentre as 72 amostras analisadas, duas foram positivas (2,8%), identificando-se o genótipo 3. Os resultados corroboram a hipótese de que o HEV está circulando em rebanhos suínos inspecionados no estado de Mato Grosso, demonstrando o potencial desses animais como reservatório para esse agente zoonótico.

Palavras-chave: Mato Grosso. Suínos. HEV. RT-PCR.

ABSTRACT

DUARTE, S. G. S. **Molecular Detection of Hepatitis E virus in faecal and pork liver samples providing from several regions in the state of Mato Grosso**. 2016. Thesis (Master Degree in Animal Bioscience) - University of Cuiabá, Cuiabá, 2016.

Hepatitis E is an acute disease with faecal-oral transmission caused by hepatitis E virus (HEV), which is endemic in countries in development where the access to drinking water and satisfactory sanitary conditions is insufficient and with sporadic cases reported in developed countries. In general, it causes an acute and self-limiting infection in unapparent form in human-beings with a fast viral elimination or which can evolve into more serious forms, including fatal fulminant hepatitis. Uncommon in Brazil and common in Asia and Africa, the infection with HEV in humans and other mammals occurs not only through water and food contaminated by feces, but also by eating meat from infected animals. In this context, swine are the most studied animals, with a high prevalence of antibodies against hepatitis E (anti-HEV) in herds from various parts of the world, including in Brazil. In order to identify the swine contamination by HEV through molecular characterization, we collected 72 samples of livers from pigs slaughtered under Federal Health Inspection in Mato Grosso state in 2016 May. The presence of HEV RNA was detected by RT-PCR, with primers aiming the ORF2 of HEV genome. From 72 samples of liver analyzed, two were classified as positive (2.8%), being the genotype 3 characterized from both infected animals. The results support the hypothesis of HEV circulation in swine herds from Mato Grosso, representing a potential reservoir for this zoonotic viral agent.

Keywords: Mato Grosso. Swine. HEV. RT-PCR.

4.1 INTRODUÇÃO

Em 2015, o Brasil produziu 3,6 milhões de toneladas de carne suína e exportou 550 mil toneladas de produto *in natura*, cerca de 10% do volume mundial, com um lucro de mais de US\$ 1 bilhão, ocupando a quarta colocação no *ranking* mundial do setor. Apesar da crise vigente no país, a suinocultura tem boas perspectivas para 2016, face a alta do câmbio, melhorando a rentabilidade dos exportadores na conversão para a moeda nacional (ABPA, 2016).

Após 20 anos de evolução genética, a carne suína teve uma redução de 31% da gordura, 10% do colesterol e 14% de calorias, tornando-se mais magra e nutritiva, além de saborosa, refletindo no aumento do consumo *per capita*, que, atualmente, está em torno de 15 kg no país (ABPA, 2016).

A oferta de alimentos seguros ao consumidor passa pela garantia de sua inocuidade, e deve ser também contemplada em programas de qualidade de produção. Diversas zoonoses que afetam os animais de produção podem ser transmitidas por alimentos e causar danos a saúde do consumidor, como o vírus da hepatite E. Essas zoonoses, além de causar um impacto na saúde pública, representam barreiras na comercialização de produtos de origem animal (CARDOSO; KICH, 2013).

O HEV é um vírus pequeno, não envelopado, cujo genoma do RNA é constituído por uma cadeia simples, de polaridade positiva, medindo em torno de 7,2 KB de extensão, apresentando três regiões abertas de leitura ou ORFs (*open reading frames*). Esse vírus está classificado na família *Hepeviridae*, gênero *Orthohepevirus*, com genoma relativamente variável, e em mamíferos apresenta um sorotipo dividido em diferentes genótipos denominados de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (MENG et al., 2013; HELDT et al., 2016).

Os genótipos 1 e 2 são comumente relatados em formas de surtos e/ou epidemias em países subdesenvolvidos, afetando exclusivamente humanos; os genótipos 3 e 4 afetam tanto humanos quanto diferentes espécies animais, em especial os suínos, conferindo à doença um caráter zoonótico. Diferentemente, os genótipo 5 e 6 têm sido identificados somente em furões e ratos (MENG, 2013; JOHNE et al., 2010; RAJ et al., 2012).

O primeiro isolamento do HEV suíno foi realizado nos Estados Unidos por Meng et al. (1997). Desde então, o HEV tem sido o único agente causal das

hepatites virais associado a reservatórios animais, tendo sido caracterizado a partir de frangos, javalis selvagens, cervídeos, mangustos, coelhos e roedores, ressaltando a hipótese de que a hepatite E consiste em uma zoonose (NAKAMURA et al., 2006; TEI et al., 2003; ZHAO et al., 2009;).

A hepatite E é uma doença viral aguda e com transmissão fecal-oral, em que discrepâncias epidemiológicas e clínicas são observadas entre os locais onde há a ocorrência da doença. Em países em desenvolvimento, por exemplo, onde o acesso à água potável é insuficiente e há péssimas condições higiênicas e sanitárias de populações pobres, a doença é endêmica (DALTON et al., 2008; MANSUY et al., 2008), e em países desenvolvidos, apenas casos esporádicos têm sido relatados (AGGARWAL, 2011; KUMAR et al., 2013).

De ocorrência rara no Brasil, e comum na Ásia e na África, a infecção pelo HEV em humanos, e em outros mamíferos, ocorre não somente através da água e alimentos contaminados, mas também pela ingestão de carne de animais infectados (DEEST et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2010). Assim sendo, os suínos são os animais mais estudados, com elevada prevalência de anticorpos anti-HEV, em criações de todos os continentes (LU; LI; HAGEDORN, 2006; OKAMOTO, 2007).

No homem, o HEV geralmente ocasiona infecção aguda e autolimitante, a qual pode se apresentar na forma inaparente, com a eliminação viral rápida, mas pode, também, evoluir para formas mais graves, incluindo hepatite fulminante fatal (PAVIO, N.; MERBAH, T.; THÉBAULT, A., 2014). Os índices de mortalidade associados às infecções pelo HEV variam de 1 a 4%, sendo mais frequente em pacientes com doença hepática crônica anterior à infecção (MUSHAHWAR, 2008; PURCELL; EMERSON, 2008), e 20% durante a gestação, em que a transmissão do HEV da mãe para o feto pode resultar em abortamento (KHUROO; KAMILI; JAMEEL, 1995; NAVANEETHAN; AL MOHAJER; SHATA, 2008). Os suínos são animais assintomáticos, com infecção autolimitante, sem lesões macroscópica, embora, em alguns casos, seja possível identificar lesões hepáticas microscópicas (DE DEUS, 2008; HALBUR et al., 2001; MENG et al., 1997).

Considerando que o estado do Mato Grosso é um dos principais polos da cadeia produtiva de suínos do Brasil, com crescente aumento do consumo da carne suína e, ainda, que os suínos são portadores assintomáticos do HEV, sendo estes considerados a principal fonte de transmissão de HEV para humanos, principalmente a partir do consumo de produtos e subprodutos da espécie, o

presente estudo objetivou identificar a infecção de suínos de criação intensiva pelo HEV por meio da detecção molecular do genoma viral em amostras de fígado coletadas em matadouro-frigorífico com inspeção sanitária federal no estado.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais

As amostras de fígado avaliadas neste estudo foram colhidas de suínos com idade entre 21 e 25 semanas, pertencentes a rebanhos comerciais, provenientes de seis granjas que adotam sistema de criação intensiva, todas situadas no estado do Mato Grosso.

A granja 1 está localizada no município de Campo Verde, sudeste do estado, distante 141 quilômetros da capital Cuiabá. A diversidade no agronegócio marca o sistema de produção dessa macrorregião, situada sobre o bioma cerrado. A pecuária e, principalmente, a agricultura, com representativa produção de soja e milho, são as atividades econômicas dominantes na região.

Essa granja é caracterizada por ciclo completo de produção, com matrizes, reprodutores, cria, recria e terminação de suínos. Ela adota procedimentos de biossegurança como barreira sanitária com arco de desinfecção de veículos que adentram a granja, controle de entrada de pessoas através da realização prévia de banhos, práticas higiênicas e uso de vestimentas adequadas, controle de entrada de novos animais, mantendo-os em quarentena, e controle integrado de pragas. O programa nutricional é desenhado para a realidade dos animais dessa granja, com níveis nutricionais que atendam às necessidades específicas de cada categoria, sendo a base da dieta nutricional o milho, a soja e núcleos comerciais. Após o período de recria e terminação, os suínos são encaminhados para o abate com idade média de 150 dias.

As granjas 2, 3, 4, 5 e 6 estão distribuídas entre quatro municípios do estado do Mato Grosso: Tapurah, Ipiranga do Norte, Sorriso e Lucas do Rio Verde, localizados na região do médio norte do estado, com distâncias aproximadas de 330 a 430 quilômetros da cidade de Cuiabá. A região do médio norte destaca-se pela maior concentração de rebanhos comerciais de suínos do Mato Grosso e pela expressiva eficiência agrícola, com destaque para a produção de soja e milho,

viabilizando, assim, a criação de rebanhos comerciais de suínos em sistema intensivo, visto que a soja e o milho constituem a base da alimentação desses animais.

Essas granjas adotam o modelo de integração entre os granjeiros (produtor rural) e o frigorífico. Nesse sistema, o frigorífico fornece aos granjeiros animais com 61 dias de vida, que são posteriormente encaminhados ao abate aos 180 dias de vida. Fica também a cargo do frigorífico o fornecimento da alimentação, devidamente balanceada conforme a idade dos animais, as vacinas e os medicamentos que compõem o manejo sanitário, assim como a assistência técnica por parte dos extensionistas da empresa. Em contrapartida, é de responsabilidade dos granjeiros fornecer a mão de obra necessária para a criação dos suínos até a data do abate, ofertar instalações e equipamentos adequados à criação, disponibilizar a ração, fornecer água limpa e de boa qualidade, cumprir todos os cronogramas relacionados ao manejo nutricional e sanitário e, ainda, obedecer às normas preestabelecidas pelo programa de biossegurança.

Por meio desses programas, são adotadas as boas práticas de produção, tais como isolamento da granja, controle de fluxo de pessoas e de veículos, procedimentos de banho e práticas higiênicas de funcionários e visitantes, controle sanitário dos animais e controle de pragas. O controle de pragas existente nas granjas é sedimentado e realizado de maneira responsável pelos granjeiros integrados e monitorados pelos extensionistas da empresa. Esse controle contempla toda a extensão das cercas interna e externa de biossegurança, e ainda está presente em torno das instalações que albergam os suínos. Falhas nesse programa representam um fator potencial de riscos de contaminação

4.2.2 Frigoríficos

As coletas foram realizadas no período de 3 a 12 de maio de 2016, em dois matadouros-frigoríficos oficiais de abate de suínos do estado do Mato Grosso, sendo mantidos em regime de inspeção federal pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Os estabelecimentos incluídos na investigação estão localizados em diferentes cidades, com 450 quilômetros de distância um do outro, representando, assim, duas regiões distintas do estado: sudeste e médio norte.

O frigorífico 1 está localizado no município de Campo Verde, distante 136 quilômetros de Cuiabá, sendo caracterizado como estabelecimento de pequeno porte, com capacidade diária de abate de 192 animais. Os suínos abatidos nesse frigorífico são oriundos de uma única propriedade rural (granja 1), situada no município de Campo Verde, onde se faz ciclo completo de produção, e instalada na mesma propriedade onde se encontra o frigorífico. Esse estabelecimento produz e comercializa cortes de carne *in natura* resfriados e congelados, além de derivados crus e cozidos. É um frigorífico habilitado para comercialização de seus produtos somente para o mercado interno, não realizando exportação.

O frigorífico 2 está situado no município de Lucas do Rio Verde, região do Médio Norte do Estado, a 330 Km da Capital do Estado, sendo considerado um estabelecimento de grande porte, pois apresenta capacidade de abate de 4.600 animais por dia. É habilitado para o comércio de seus produtos no mercado interno e externo, exportando carne *in natura* congelada e derivados cárneos para diversos países, como Hong Kong, China, Rússia e Japão, entre outros. As amostras de fígado de suínos coletadas nesse local foram originadas de animais de várias granjas de recria (granjas 2, 3, 4, 5 e 6) em regime de criação intensiva, de diversas cidades, assim como de diferentes granjas localizadas em um mesmo município. O frigorífico de Lucas do Rio Verde abate somente animais provenientes de produtores integrados da unidade, sendo realizado o monitoramento de rastreabilidade.

Ambos os frigoríficos trabalham sob o regime de Serviço de Inspeção Federal, com a presença permanente de auditor fiscal instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e equipe própria do setor da Garantia da Qualidade, a qual acompanha e monitora os procedimentos sanitários, higiênicos e tecnológicos do abate.

4.2.3 Coleta das amostras

Foram coletadas, aleatoriamente, 72 amostras de fragmentos de fígado logo após o abate, nas linhas de inspeção de vísceras, antes da realização da inspeção do órgão. Entre os animais avaliados, 25% ($n = 18$) foram abatidos no frigorífico 1, enquanto 75% dos suínos avaliados ($n = 54$) foram abatidos no frigorífico 2.

Os fragmentos do órgão foram retirados manualmente a partir de um único corte, com uso de lâminas de bisturi descartáveis, e em seguida foram

aconicionados individualmente em frasco coletor resistente a temperaturas próximas a -80°C . Durante a coleta, tomou-se o cuidado de realizar trocas de luvas descartáveis entre a coleta de cada animal, evitando a contaminação cruzada com materiais de diferentes animais. Logo após a coleta, as amostras foram acondicionadas temporariamente (durante o período de coleta) em caixas isotérmicas contendo gelo reutilizável. Após o término da coleta, as amostras foram congeladas por 24 horas a -35°C e, posteriormente, armazenadas em ultrafreezer a -80°C .

4.2.4 Extração de RNA

Os ácidos nucleicos presentes nas amostras foram extraídos conforme o protocolo do kit RNeasy Mini Kit, da Qiagen[®]. Para facilitar a lise das células do tecido e a homogeneização das macromoléculas presentes, o disruptor de tecidos Tissuelyser foi empregado na etapa inicial da purificação do RNA.

4.2.5 Transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

Inicialmente, o RNA purificado a partir das amostras de fígado foi submetido à transcrição reversa (RT) utilizando a transcriptase reversa MMLV (Invitrogen). Para tal, foram utilizados 5 μL do RNA purificado, 1 pmol do *primer* específico 3157N, 125 μM de cada dNTP, 2 μL do DTT, 4 μL do tampão 5X, 100U da enzima e água ultrapura estéril para completar o volume de 20 μL . A reação de RT foi realizada a 42°C por 30 min, seguida de inativação da enzima a 94°C por 5 min. A amplificação de um fragmento parcial da ORF2 foi obtida por Nested-PCR utilizando o par de *primers* 3156N e 3157N na primeira etapa de amplificação, e os *primers* 3158N e 3159N na segunda, seguindo estratégia delineada por Huang et al. (2002). As condições de tempo e temperatura para ambas as etapas foram iguais, consistindo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 42°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. A primeira etapa de amplificação foi realizada com 40 ciclos, ao passo que a segunda consistiu de 30 ciclos de amplificação.

4.2.6 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR obtidos a partir da Nested-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris-HCL; 89 mM ácido bórico; 2mM EDTA), sob voltagem constante (90V), por aproximadamente 45 minutos, e visualizados sob luz UV.

4.2.7 Sequenciamento direto dos *amplicons*

Todos os *amplicons* obtidos foram purificados com o kit PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo (Invitrogen). Após a purificação, o sequenciamento direto foi realizado com o kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®), com os mesmos *primers* empregados nas etapas anteriores de amplificação, no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram avaliadas com o programa PHRED, a fim de analisar a qualidade das leituras dos cromatogramas. As sequências consensuais determinadas com o programa CAP3 tiveram a identidade comparada a todas as sequências depositadas no GenBank® por meio do programa BLASTn.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 72 suínos avaliados no presente estudo, utilizando amostras de fígado, dois apresentaram a presença do RNA do HEV, correspondendo a 2,8% do total dos animais investigados.

Os dois suínos infectados faziam parte do grupo de 54 animais avaliados e abatidos no frigorífico 2, originários de granjas integradoras e localizadas na região do médio norte.

Esse frigorífico, onde os dois animais infectados foram abatidos, está localizado na região do médio norte do estado, que concentra 84% dos rebanhos de suínos comerciais do Mato Grosso (ABCS, 2016). Seus produtos são comercializados tanto no mercado interno como no externo, sendo exportados para vários países, como Hong Kong, Japão, China, Rússia etc., sugerindo, assim, ser

esta uma possível fonte de infecção por HEV para consumidores em países desenvolvidos, pois segundo PAVIO, MENG, DOCEUL (2015) esses países são considerados não endêmicos.

A comparação das sequências nucleotídicas geradas a partir dos *amplicons* obtidos para os dois suínos infectados, com todas as sequências depositadas no GenBank, demonstrou que as cepas virais encontradas nesta investigação pertencem ao genótipo 3.

Meng et al. (1997), por meio da amplificação das ORFs 2 e 3 do genoma do HEV, identificou pela primeira vez a presença de HEV, genótipo 3, em amostras de soro da espécie suína de rebanhos comerciais localizados no meio-oeste dos Estados Unidos. Ainda nesse estudo, os autores relatam a semelhança entre sequência nucleotídica do genótipo encontrado nos suínos com as cepas virais previamente identificadas em humanos, sugerindo, pela primeira vez, a possibilidade de o HEV constituir um agente zoonótico.

A partir de então, vários estudos vêm sendo realizados nesse sentido, confirmando a hepatite E como uma doença zoonótica emergente (PURCELL; EMERSON, 2008; MENG, 2013; PAVIO; MENG; DOCEUL, 2015).

O presente estudo, assim como outros semelhantes já realizados no Brasil, confirma a existência da circulação de HEV, genótipo 3, em rebanhos suínos comerciais do país. Inicialmente, essas cepas virais foram identificadas em amostras de fezes e soro de suínos de rebanhos dos estados do Rio de Janeiro e Mato Grosso (DOS SANTOS et al., 2009; PAIVA et al., 2007) e, mais recentemente, De Souza et al. (2012) e Gardinali et al. (2012a) detectaram a presença de HEV (9,9% e 1,7%, respectivamente) em amostras de fígado de suínos criados nos estados do Pará e Paraná, utilizando RT-PCR.

Previamente no estado do Mato Grosso, a investigação conduzida por Lana et al. (2014) constatou, utilizando RT-PCR, que suínos procedentes de sistema de criação intensiva ($n = 25$), apresentaram ausência do agente viral HEV. Diferentemente, 32% dos animais considerados de subsistência familiar ($n = 25$) avaliados para a presença do genoma RNA do HEV foram classificados como infectados. Em conjunto com os achados demonstrados neste estudo, é possível considerar esses dados um indicativo de que a infecção de suínos pelo HEV independe do sistema de criação praticado.

No Brasil, a maioria dos estudos realizados com humanos utilizou a sorologia como método de eleição para avaliação de infecção prévia ou ativa pelo HEV (TRINTA et al., 2001; BARTOLIERO et al., 2006; DA SILVA et al., 2012). O primeiro relato realizado no país de infecção aguda humana autóctone pelo HEV foi confirmado por sorologia em que se detectaram anticorpos IgG e IgM anti-HEV positivo e, posteriormente, confirmou-se a presença do agente viral por meio da RT-PCR, seguida de sequenciamento. A cepa viral causadora do quadro clínico foi classificada como pertencente ao genótipo 3, sendo este o mesmo genótipo identificado previamente e confirmado neste estudo em suínos de diferentes sistemas de criação do estado. Na ocasião, o próprio paciente comunicou o consumo de carne suína pouco tempo antes das manifestações clínicas, fato este que contribui para as afirmações de que o HEV genótipo 3 apresenta potencial zoonótico (DOS SANTOS et al., 2010).

Todos esses registros geram preocupações significativas relacionadas à saúde pública, na medida em que a via de transmissão para seres humanos pode se constituir pela água ou alimentos contaminados, representados por produtos industrializados ou *in natura* (COLSON et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2010; MANSUY et al., 2011).

A via de transmissão por produtos à base de carne contaminada é relatada com maior frequência. Na China, Tei et al.(2003) relatam a ocorrência de hepatite E em três pacientes após o consumo de carne de cervo. Na França, quatro derivados cárneos – *figatellu*, fígado seco e salgado, *quenelle* e salsichas de fígado fresco – contendo carne de suíno foram analisados e demonstraram a presença de HEV genótipo 3 (PAVIO; MERBAH; THEBAULT, 2014).

A presença de HEV em produtos industrializados e carne *in natura* expostos à venda no varejo também foi identificada na Itália, na Espanha e no Canadá (BARTOLO et al., 2015; WILHELM et al., 2014; COLSON et al., 2010).

No Brasil, todas as pesquisas envolvendo análises de amostras de fígado suíno *in natura*, de animais provenientes de diversas regiões, demonstraram, em maior e menor proporção, a contaminação desse órgão com o RNA do HEV (LANA et al., 2014; DE SOUZA et al., 2012; GARDINALI et al., 2012a). Heldt et al. (2016) recentemente realizaram pela primeira vez no Brasil uma pesquisa com produtos industrializados, com diferentes formulações de patês à base de produtos suínos (carne e fígado) recolhidos em nove pontos distintos de venda, e 36% das análises

acusaram a presença RNA viral do HEV. Esses resultados são considerados agravantes à saúde pública, pois as sequências nucleotídicas avaliadas foram classificadas como genótipo 3, demonstrando o potencial zoonótico do agente contaminante.

A metodologia tida como eficaz na eliminação da maioria dos agentes patogênicos presente em alimentos de origem animal é o uso de tratamentos térmicos pelo calor (ORDONEZ et al., 2005), sendo importante, portanto, considerar a resistência térmica do HEV ao cozimento. Feagins et al. (2008) analisaram amostras de fígado contaminadas, submetendo-as a temperaturas de cozimento de 56°C por 1 hora, a 191°C por fritura durante 5 minutos, e de fervura, por 5 minutos. A inativação de HEV foi confirmada apenas para o 2º e o 3º protocolos, pois, nesses casos, a temperatura interna das amostras atingiu 71°C, sendo essa temperatura considerada eficiente na eliminação do vírus.

A HEV é passível de ser transmitida também por veiculação hídrica. Em seu estudo, Dos Santos et al. (2011) identificaram a presença do HEV em 50% das amostras de efluentes originados de dois frigoríficos de abate de suínos localizados no estado do Rio de Janeiro. De maneira semelhante, Vasconcelos (2015) analisou, utilizando RT-PCR, amostras de efluentes de lagoas de chorume de oito granjas de criação intensiva de suínos localizadas no Rio Grande do Sul, e todas as amostras de lagoa de chorume foram positivas para a detecção do RNA do HEV. Diferentemente, pesquisa semelhante realizada por Heldt et al. (2016) com água de superfície e sedimentos do rio Sino, região Sul do Brasil, apresentou resultados negativos para a presença do HEV na água e nos sedimentos analisados. No estado do Mato Grosso, assim como no restante do país, os frigoríficos sob Serviço de Inspeção, como é o caso do frigorífico 2, onde as amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas, devem cumprir rígidas normas de tratamento de seus efluentes, com o objetivo de prevenir a contaminação ambiental proveniente de águas utilizadas no processo de abate (BRASIL, 2005). O achado demonstrado neste estudo, da identificação de animais infectados entre os abatidos em frigoríficos do estado, ressalta a importância do cumprimento dessas normas.

Dos Santos et al. (2009) sugerem que o uso de abordagens moleculares seria uma ferramenta interessante na investigação e no controle de HEV em amostras de fígado e carne produzidas nos frigoríficos.

Os estudos são claros em seus relatos e demonstram que o HEV está presente em recursos hídricos e alimentos de origem suína, em ambientes rurais e urbanos, demonstrando a possibilidade de disseminação do agente para os animais suscetíveis, assim como humanos, dados estes que devem ser considerados pelas autoridades ligadas à saúde pública e à defesa sanitária, visando auxiliar na adoção de medidas preventivas e de controle.

4.4 CONCLUSÃO

O presente estudo detectou a presença do RNA genômico do HEV em 2,8% das amostras de fígados coletadas de suínos provenientes de rebanhos comerciais da região do médio norte do estado do Mato Grosso, sendo que as cepas virais identificadas foram classificadas, dada a similaridade apresentada na sequência de nucleotídeos, como pertencentes ao genótipo 3. Aliado ao fato de o Brasil ser um potencial fornecedor de carne suína para o mercado interno e externo, haja vista o agravante de a hepatite E ser considerada uma enfermidade emergente e zoonótica e, ainda, do inerente risco à saúde pública, fica perceptível a necessidade da implementação de métodos efetivos de biossegurança nas granjas e nos abatedouros de suínos, incluindo os estabelecimentos com inspeção sanitária federal, com vistas a garantir a inocuidade e a segurança dos alimentos ofertados ao consumidor.

Novos estudos devem ser desenvolvidos em prol de auxiliar as medidas adotadas.

REFERÊNCIAS

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatórios anuais**. 2015. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

ABCS – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS. **Mapeamento da suinocultura brasileira**. 2016. Disponível em: <http://www.abcs.org.br/images/-01_mapeamento_completo_bloq.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2017.

AGGARWAL, R.; Hepatitis E: historical, contemporary and future perspectives. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26 (Suppl. 1), p. 72-82, 2011.

BARTOLO, I. D. et al. M. Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.193, p.29-33, 2015.

BORTOLIERO, A. L. et al. Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Paraná, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 2, p. 87-92, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Coordenação de Programas Especiais. Circular n. 175, de 16 de maio de 2005.

CARDOSO, M. R. de I.; KICH, J. D. Revisão sobre zoonoses com impacto na cadeia de produção de carne suína. **Simpósio Internacional de Suinocultura**, Porto Alegre, UFRGS, v. 8, p. 109-21, 2013.

COLSON, P. et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. 825-34, 2010.

DALTON, H. R. et al. Hepatitis e: an emerging infection in developed countries. **Lancet Infectious Diseases**, v. 89, p. 698-709, 2008.

DA SILVA, S. M. T. et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 338-341, 2012.

DEEST, G. et al. Autochthonous hepatitis E in France and consumption of raw pig meat. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 31, p. 1095-7, 2007.

DE DEUS, N. et al. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 19-28, 2008.

_____.; SEGALES, J. La infección por El virus de La hepatitis E en el cerdo. **Suis**, v. 61, p. 35-9, 2009.

DE 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**, v. 35, p. 477-85, 2012.

DOS SANTOS, D. R. L. et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 474-80, 2009.

_____. et al. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, p.276-284. 2010.

_____. et al. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 236-41, 2011.

FEAGINS, A. R. et al. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. **International journal of food microbiology**, v. 123, n. 1, p. 32-7, 2008.

GARDINALI, N. R. et al. Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 1515-9, 2012a.

_____. et al. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.7, p. 935-9, nov. 2012b.

HALBUR, P. G. et al. Comparative Pathogenesis of Infection of Pigs with Hepatitis E Viruses Recovered from a Pig and a Human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 918-23, 2001.

HELDT, F. H. et al. Hepatitis E virus in surface water, sediments, and pork products marketed in southern Brazil. **Food and environmental virology**, v. 8, n. 3, p. 200-5, 2016.

JOHNE, R. et al. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 3, p. 750-8, 2010.

KHUROO, M. S.; KAMILI, S.; JAMEEL, S. Transmissão vertical do vírus da hepatite E. **Lancet**, v. 345, p. 1025-6, 1995.

KIM, B. S. et al. A Survey on the status of hepatitis E virus infection among slaughterhouse workers in South Korea. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 48, p. 53-61, 2015.

KUMAR, S. et al. Hepatitis E virus: the current scenario. **International Journal of Infectious Diseases**, n. 17, p. 228-33, 2013.

LANA, M. V. C. et al. Evaluation of hepatitis E virus infection between different production systems of pigs in Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 46, p. 399-404, 2014.

LU, L.; LI, C.; HAGEDORN, C. H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. **Reviews of Medical Virology**, v. 16, p. 5-36, 2006.

MANSUY, J. M. et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 2309-15, 2011.

MENG, X. J. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 278, p. 185-216, 2003.

_____. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus **Virus Research**, v. 161, p. 23-30, 2011.

_____. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. **Seminars in Liver Disease**, v. 33, p. 41-9, 2013.

MENG, X. J. et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 9860-5, 1997.

MUSHAHAWAR, I. K. Hepatitis E Virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 646-8, 2008.

NAKAMURA, M. et al. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a nucleotide sequence of the complete genome. **Hepatology Research**, v. 34, p. 137-40, 2006.

NAVANEETHAN, U.; AL MOHAJER, M.; SHATA, M. T. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. **Liver International**, v. 28, p. 1190-9, 2008.

OKAMOTO, H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. **Virus Research**, v. 127, p. 216-8, 2007.

ORDÓÑEZ, J.A. et al., **Tecnología de Alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PAIVA, H. H. et al. Molecular characterization of swine hepatitis E virus from southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 693-8, 2007.

PARANÁ, R.; SCHINONI, M. I. Hepatitis E. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 247-53, maio/jun. 2002.

_____. et al. Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in Northeastern Brazil: etiology and natural history. **Hepatology**, v. 30, p. 289-93, 1999.

PAVIO, N.; MENG, X. J.; RENOU, C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. **Veterinary Research**, v. 41, p. 46, 2010.

_____.; MERBAH, T.; THÉBAULT, A. Frequent hepatitis e virus contamination in food containing raw pork liver, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 11, 2014.

_____.; MENG, Xiang-Jin; DOCEUL, Virginie. Zoonotic origin of hepatitis E. **Current opinion in virology**, v. 10, p. 34-41, 2015.

PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. **Journal of Hepatology**, v. 48, p. 494-503, 2008.

RAJ, V. S. et al. Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 8, p. 1369-70, 2012.

SILVA, S. M. T. et al. Prevalence of hepatitis e virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 338-41, maio 2012.

SMITH, D. B. et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. **Journal of General Virology**, v. 95, n.10, p. 2223-32, 2014.

SOUTO, F. J. D.; FONTES, C. J. F. Prevalence of IgG-class antibodies against hepatitis E virus in a community of the southern Amazon: a randomized survey. **Annals of Tropical Medicine and Pharmacology**, v. 92, p. 623-5, 1998.

TEI, S. et al. Zoonotic transmission of hepatitis E vírus from deer to humans beings. **Lancet**, v. 362, p. 371-73, 2003.

TRINTA, K. S. et al. Hepatitis E Virus infection in selected brazilian populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n.1, p. 25-9, jan. 2001.

VASCONCELOS, J. et al. Molecular detection of hepatitis E virus in feces and slurry from swine farms, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 777-82, 2015.

VITRAL, C. L. et al. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 117-22, 2005.

WILHELM, B. et al. A. Survey of Canadian retail pork chops and pork livers for detection of hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus using real time RT-PCR **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 33-40, 2014.

WILLIAMS, T. P. et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3040-6, 2001.

ZHAO, C. et al. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1371-9, 2009.