

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**

**Curso de Medicina Veterinária**

**RAYSSA DE MOURA BARBOSA**

**DETECÇÃO DO VÍRUS DE HEPATITE E EM AMOSTRAS FECAIS DE  
QUEIXADAS PROVENIENTES DE ABATEDOURO LOCALIZADO NO  
SUL DO ESTADO DE SÃO PAULO**

**SÃO PAULO**

**2016**

**RAYSSA DE MOURA BARBOSA**

**DETECÇÃO DO VÍRUS DE HEPATITE E EM AMOSTRAS FECAIS DE  
QUEIXADAS PROVENIENTES DE ABATEDOURO LOCALIZADO NO  
SUL DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof. Dra. Adriana Cortez.

**SÃO PAULO**

**2016**

**RAYSSA DE MOURA BARBOSA**

**DETECÇÃO DO VÍRUS DE HEPATITE E EM AMOSTRAS FECAIS DE  
QUEIXADAS PROVENIENTES DE ABATEDOURO LOCALIZADO NO SUL DO  
ESTADO DE SÃO PAULO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA sob orientação da Prof. Dra. Adriana Cortez da Área de Concentração \_\_\_\_\_.

Data de Aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Adriana Cortez

---

(nome do professor e Titulação)

CONCEITO FINAL: \_\_\_\_\_

*Dedico esse trabalho a minha família, que sempre esteve comigo, e a todas as outras pessoas maravilhosas que me acompanharam e ajudaram ao longo dessa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelas oportunidades que colocou em meu caminho, e por todas as pessoas que conheci durante essa jornada.

Aos meus pais, Maria e Raymundo, pelo amor, compreensão, e por todos os sacrifícios que fizeram para que eu chegasse até aqui. Sobretudo, a minha mãe por ter me criado para sempre fazer o melhor, e nunca desistir.

A minha querida irmã, Paula, meu maior exemplo, agradeço por todo cuidado e carinho que sempre demonstrou, e por ter me estimulado a aprender sempre mais. Agradeço também pelo Eduardo, que trás tanta alegria para nossa família, e pela Fernanda, que nos trará ainda mais.

Agradeço ao meu companheiro de jornada, Igor, por permanecer ao meu lado, ter secado as minhas lágrimas, e ter me dado forças para continuar nessa reta final. Você sempre compreendeu a importância desse desafio, e esteve comigo desde o começo, sempre apoiando as minhas escolhas.

Aos meus professores, sou grata por todo o conhecimento adquirido, tanto acadêmico quanto profissional. Acredito que só poderei retribuí-los propagando esse conhecimento, e respeitando essa profissão todos os dias.

Em especial, agradeço imensamente a minha orientadora, Adriana Cortez, por toda a sua calma, paciência, e pelos seus conselhos. A oportunidade que a senhora forneceu me fez crescer como profissional e como pessoa. Tenho a senhora como um exemplo de profissional, e espero um dia ser tão ética e tão consciente do meu papel como Médica Veterinária quanto a senhora.

Aos professores Marcos Bryan, e Paulo Brandão, agradeço pela oportunidade de trabalhar com os senhores, mas principalmente agradeço por ter conhecido e trabalhado com Antônio F. de Souza Filho, Juliana A. Abreu, Gisele O. de Souza, Sheila O. de Souza, Sueli A. T. Miyagi e todos os outros profissionais do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS).

Por último, agradeço a, Erica Leite, Renata Negraes e Thiago Santana, pela amizade ao longo desses 5 anos, e por compartilharem suas histórias de vida comigo. À Erica, agradeço pelos conselhos, as caronas, e por todas as

oportunidades que colocou no meu caminho. Ao Thiago, obrigada por todos os momentos de descontração, pela sua força e perseverança. À Renata, saiba que suas palavras me mantiveram forte em muitos momentos de dificuldade nessa etapa final, e por isso te agradeço.

*“Se compararmos o homem e os animais, em relação a inteligência, parece difícil estabelecer a linha de demarcação, porque certos animais têm, nesse terreno, notória superioridade sobre certos humanos”.*

*Allan Kardec*

## RESUMO

A hepatite E é uma doença viral que está distribuída mundialmente, e representa uma ameaça à saúde pública, principalmente para grávidas e pessoas imunossuprimidas. O HEV (Hepatitis E virus) afeta diversas espécies de mamíferos, aves e trutas, sendo os genótipos 1, 2, 3, 4 e 7 responsáveis por acometer seres humanos. Os genótipos 1 e 2 estão presentes em humanos de países em desenvolvimento, e são transmitidos pelo consumo de água e alimentos contaminados com fezes de pessoas infectadas. Enquanto os genótipos 3 e 4 são considerados zoonóticos por serem detectados tanto em humanos, quanto em suínos, javalis e cervos, assim como o genótipo 7, que já foi detectado em camelos e em um humano com hepatite E crônica. Os genótipos 3 e 4 causam infecções esporádicas e casos autóctones em países industrializados, e são transmitidos, sobretudo, pelo consumo de carne crua ou mal cozida de animais infectados. No Brasil, a presença do HEV já foi relatada em suínos domésticos e em humanos, incluindo um caso de transmissão autóctone em humanos. Contudo, não há nenhuma descrição relacionada aos taiassuídeos, como os queixadas (*Tayassu pecari*). Logo, o objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência do vírus em amostras de fezes de queixadas provenientes de um abatedouro no sul do estado de São Paulo. As cinquenta e quatro amostras de fezes foram submetidas a RT-PCR direcionada à ORF-1 e todas foram negativas. Os resultados encontrados não são suficientes para afirmar que não há circulação do HEV em queixadas, no entanto, os animais do presente estudo não estão excretando o vírus para o meio ambiente.

**Palavras-chave: Hepatite E, queixadas, RT-PCR**

## **ABSTRACT**

Hepatitis E is a viral disease that is spread worldwide, and poses a threat to public health, especially for pregnant women and immunosuppressed people. HEV (Hepatitis E virus) affects several species of mammals, birds and trout, being that genotypes 1, 2, 3, 4 and 7 are responsible for affecting humans. Genotypes 1 and 2 are present in humans from developing countries, and are transmitted by the consumption of water and food contaminated with feces of infected people. While genotypes 3 and 4 are considered zoonotic because they are detected in both humans, pigs, wild boars and deer, as well as genotype 7, which has already been detected on camels and in a human with chronic hepatitis E. Genotypes 3 and 4 cause sporadic and autochthonous infections in industrialized countries and are mainly transmitted by the consumption of raw or undercooked meat from infected animals. In Brazil, the presence of HEV has been reported in domestic pigs and humans, including one case of autochthonous transmission in humans. However, there is no description related to peccaries, such as white-lipped peccary (*Tayassu peccary*). Therefore, the aim of this study was to verify the occurrence of the virus in white-lipped peccary stool samples from a slaughterhouse in the south of the state of São Paulo. The fifty-four stool samples were submitted to RT-PCR directed to ORF-1, and were all negative. The results found are not enough to affirm that there is no circulation of HEV in the peccary, however, the animals of the present study are not excreting the virus into the environment.

**Keywords: Hepatitis E, white-lipped peccary, RT-PCR**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
2.1. A descoberta da Hepatite E .....	12
2.2. Morfologia e Genoma do HEV .....	12
2.3. Classificação .....	13
2.4. Genótipos e Vias de Transmissão .....	13
2.5. Manifestações Clínicas.....	14
2.6. Diagnóstico .....	15
2.7. Tratamento.....	16
2.8. Prevenção .....	17
2.9. Hepatite E, uma zoonose .....	17
2.10. Queixadas.....	19
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>21</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	<b>21</b>
4.1. Controle Positivo .....	21
4.2. Amostras Biológicas .....	21
4.2.1. Preparo da Amostra – Clarificação .....	21
4.3. Extração do Material Genético e Realização do cDNA Complementar .....	21
4.4. Detecção da ORF-1 do Vírus da Hepatite E .....	22
4.4.1. PCR.....	22
4.4.2. Condição de Amplificação.....	22
4.4.3. Nested ORF-1 .....	22
4.4.4. Eletroforese em Gel de Agarose .....	23
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A hepatite E é uma doença viral transmitida entericamente, causada pelo HEV (Hepatitis E virus). Trata-se de um vírus RNA de fita simples senso positivo, não envelopado <sup>(1,2)</sup>.

Seu genoma apresenta três fases abertas de leitura ou ORFs (open reading frame). A ORF-1 codifica uma proteína não estrutural de 1.693 aminoácidos, a ORF-2 codifica uma proteína do cápside viral de 660 aminoácidos e a ORF-3 codifica uma fosfoproteína de 114 aminoácidos <sup>(3)</sup>.

Atualmente, o HEV pertence à família *Hepeviridae*, que é composta por dois gêneros, o *Piscihepevirus*, e o *Orthohepevirus*. Entre as diversas espécies e genótipos do HEV, apenas cinco dos sete genótipos da espécie *Orthohepevirus A* são capazes de acometer seres humanos <sup>(4)</sup>.

Os genótipos 1 e 2 infectam somente seres humanos, e ocorrem em países em desenvolvimento, estando ligados a falta de saneamento básico observada nas regiões endêmicas. Por outro lado, os genótipos 3 e 4 acometem suínos e humanos, sendo considerados zoonóticos e são responsáveis por casos autóctones em países industrializados <sup>(1,2,5)</sup>.

Além desses genótipos, recentemente foi descoberta a transmissão zoonótica do genótipo 7 em um paciente com transplante de fígado que apresentou hepatite E crônica e tinha histórico de consumir carne e leite de camelos <sup>(6)</sup>.

A transmissão dos genótipos 1 e 2 acontece, sobretudo, pela ingestão de água e alimentos contaminados <sup>(1,2,5)</sup>, enquanto que os genótipos 3 e 4 são transmitidos pelo consumo de carne crua ou mal cozida de animais infectados <sup>(7,8)</sup>.

O vírus da hepatite E afeta vários hospedeiros <sup>(9-17)</sup>, porém, considera-se que os principais reservatórios dos genótipos 3 e 4 do HEV são os suínos domésticos, javalis e cervos <sup>(2)</sup>.

Normalmente, a hepatite E cursa de forma assintomática em humanos, mas pode levar a casos agudos e autolimitantes de hepatite até quadros de hepatite

fulminante, especialmente em gestantes. Já nos suínos, a infecção é considerada subclínica <sup>(1,2)</sup>.

No Brasil, a presença desse vírus já foi relatada em suínos domésticos <sup>(5,18-22)</sup> e em humanos <sup>(23,24)</sup>, incluindo um caso de hepatite em humanos onde foi detectada transmissão autóctone <sup>(25)</sup>, entretanto, a sua dinâmica nos animais silvestres ainda é bastante obscura.

Considerando que em muitas regiões do Brasil existem pessoas que se alimentam de animais silvestres, como os queixadas (*Tayassu pecari*), demonstra-se a necessidade de realizar pesquisas voltadas para a detecção do HEV nesses animais.

Portanto, o presente trabalho foi feito com intuito de tentar compreender o papel dos queixadas na transmissão do HEV no Brasil, averiguando se esses animais podem ser hospedeiros desse vírus, e conseqüentemente, se eles representam um risco para as pessoas que consomem a carne desse animal.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A descoberta da Hepatite E**

Ao longo dos anos, vários surtos de hepatite associadas ao consumo de água contaminada foram registrados na Índia. Eles eram caracterizados por casos agudos e autolimitantes, exceto em mulheres grávidas, que manifestavam alterações mais graves, como hepatite fulminante <sup>(3)</sup>.

Muitos desses surtos de hepatite provavelmente foram causados pelo HEV. Um bom exemplo foi a epidemia de hepatite que ocorreu em Caxemira, Índia, em 1978. A epidemia afetou mais de 600.000 pessoas, sendo que 52.000 apresentaram icterícia, e cerca de 1.700 morreram <sup>(26)</sup>.

Por desconhecer o agente etiológico e os fatores epidemiológicos envolvidos em sua transmissão, muitos casos foram erroneamente diagnosticados como hepatite A. Posteriormente, foram realizados testes sorológicos para hepatite A e B, sendo os resultados negativos, a partir disso, esses casos foram denominados de hepatite não-A e não-B <sup>(27)</sup>. Somente após a descoberta do HEV, em 1983, pôde-se diagnosticar a hepatite E <sup>(28)</sup>.

Sua descoberta foi feita através de uma transmissão experimental, em que voluntários ingeriram um homogeneizado de fezes humanas provenientes de um surto de hepatite não-A e não-B. A partir disso, foi feita a análise das amostras de fezes desses voluntários através da imunomicroscopia eletrônica, na qual se notou a presença de estruturas esféricas semelhantes a partículas virais <sup>(28)</sup>.

Após a identificação do vírus, mais estudos foram feitos na década de 90, como a clonagem do genoma viral <sup>(29)</sup>. A partir disso foi possível desenvolver testes sorológicos que auxiliariam no diagnóstico da doença <sup>(30)</sup>.

### **2.2 Morfologia e Genoma do HEV**

O vírus da hepatite E não é envelopado, apresenta um capsídeo de simetria icosaédrica com cerca de 30 a 34 nm de diâmetro. Trata-se de um vírus RNA de fita simples senso positivo, que tem aproximadamente 7,2 kb <sup>(31)</sup>.

O genoma viral se inicia numa região não codificadora na extremidade 5', seguida por três fases abertas de leitura ou ORF (*open reading frame*). Existe outra região não codificadora, na extremidade 3', composta por uma cauda de poliadenilato <sup>(3, 32,33)</sup>.

A ORF-1 é responsável por codificar proteínas não estruturais envolvidas na replicação viral, como a metiltransferase, protease e helicase. Já a ORF-2 codifica as proteínas do capsídeo, sendo essa região bastante utilizada para desenvolver vacinas, devido à sua antigenicidade. Sobreposta a ORF-2 se encontra a ORF-3 que codifica uma fosfoproteína responsável pela saída do vírus de células infectadas e diversas atividades regulatórias <sup>(3, 32,33)</sup>.

### **2.3 Classificação**

Desde sua descoberta, o vírus da hepatite E já sofreu algumas modificações quanto a sua classificação. Foi primeiramente atribuído a família *Caliciviridae* <sup>(34)</sup>, na qual permaneceu até 1998. A partir disso, o HEV ficou um período sem ser agrupado em nenhuma família até ser classificado como único membro da família *Hepeviridae* <sup>(35)</sup>. No entanto, devido a constante identificação de novas estirpes virais, o sistema de classificação desse vírus recebeu novas sugestões de modificação.

A classificação atual, descrita por Smith et. al. (2014), promove uma divisão da família *Hepeviridae* em dois gêneros, *Piscihepevirus* e *Orthohepevirus*. O gênero *Piscihepevirus*, composto pela espécie *Piscihepevirus A*, acomete algumas espécies de trutas e o gênero *Orthohepevirus* infecta diversos mamíferos e aves, sendo subdividido em 4 espécies (A-D).

A espécie *Orthohepevirus A* infecta humanos e outros mamíferos, como porcos, javalis, cervos, coelhos e camelos, sendo composta por sete genótipos (1 a 7). Já a espécie *Orthohepevirus B* acomete aves, a espécie *Orthohepevirus C* algumas espécies de roedores, e a espécie *Orthohepevirus D* infecta morcegos <sup>(4)</sup>.

### **2.4 Genótipos e Vias de Transmissão**

Os genótipos 1 e 2 são encontrados somente em seres humanos e a principal via de transmissão do agente é oral-fecal através da ingestão de água ou alimentos contaminados. Também existe a possibilidade da transmissão vertical, sendo caracterizada por altas taxas de mortalidade fetal e perinatal <sup>(36)</sup>.

Nos países em desenvolvimento nota-se que o aumento do número de casos pelos genótipos 1 e 2 ocorre principalmente nos períodos chuvosos. Acredita-se que isso aconteça por aumentar o contato das pessoas com o esgoto não tratado. Esses genótipos estão ligados à falta de saneamento básico, condição observada nas regiões endêmicas de hepatite E, sendo responsáveis por surtos no México, e alguns países da Ásia e África <sup>(1,2,5)</sup>.

Os genótipos 3 e 4 são considerados zoonóticos e são encontrados em seres humanos, suínos, javalis e cervos. Esses genótipos causam infecções esporádicas e casos autóctones relatados nos EUA, Argentina, Brasil, Japão, China e países da Europa <sup>(1,2,5)</sup>.

A transmissão dos genótipos 3 e 4 ocorre, principalmente, pela ingestão de carne de animais infectados (porco, javali ou cervo) crua ou mal cozida <sup>(7,8)</sup>. Todavia, ela também pode acontecer através de transplantes de órgãos <sup>(37)</sup>, transfusões de sangue <sup>(23)</sup> e contato de profissionais com suínos domésticos e silvestres que estejam infectados <sup>(24,38)</sup>.

Recentemente, foi descoberta a transmissão zoonótica do genótipo 7 em um paciente com transplante de fígado que apresentou hepatite E crônica. O indivíduo obteve resultados positivos para sorologia e PCR, e o sequenciamento da amostra correspondeu ao genótipo 7 do HEV, presente em camelos. Por não haver histórico do consumo de carne de porco, a rota de transmissão foi atribuída ao fato de que este paciente consumia frequentemente a carne e leite de camelos <sup>(6)</sup>.

No Brasil, um trabalho feito por da Silva et. al. (2012) demonstrou que 8,4% de 310 indivíduos da área rural que tiveram contato com suínos foram soropositivos para HEV, enquanto que de 101 indivíduos da área urbana, 4% tiveram resultado positivo.

## **2.5 Manifestações Clínicas**

Em suínos, a infecção é subclínica e não há lesões graves, tanto em animais naturalmente infectados como em experimentalmente infectados. No entanto, podem ser encontradas lesões microscópicas de intensidade leve a moderada no fígado durante o exame histopatológico <sup>(39,40)</sup>.

Nos humanos, as infecções geralmente são assintomáticas. Em alguns casos, após um período de incubação de 4 a 5 semanas, pode ocorrer hepatite aguda autolimitante com baixa mortalidade, exceto em gestantes cuja evolução pode ser grave. Infecções crônicas são raras, mas são descritas em pessoas imunossuprimidas e possuem uma evolução mais grave <sup>(1,2)</sup>.

As manifestações clínicas, quando ocorrem, podem ser divididas em duas fases: a fase pré-ictérica e a fase ictérica. A fase pré-ictérica cursa com febre, perda de apetite, anorexia, vômito, constipação, diarreia e dor abdominal. Na fase ictérica, a febre passa e o apetite retorna. Em alguns casos pode-se notar manifestações não hepáticas, como a pancreatite aguda, hemólise, trombocitopenia, alterações autoimunes e síndromes neurológicas <sup>(41)</sup>.

## **2.6 Diagnóstico**

O diagnóstico da hepatite E pode ser realizado através de métodos diretos ou indiretos, sendo eles escolhidos de acordo com a espécie acometida e o desenvolvimento da infecção, observando se está na fase aguda ou crônica.

Em humanos, normalmente são realizados métodos diagnósticos indiretos, como o ELISA para detecção de IgM e IgG anti-HEV. Nota-se que os níveis de IgM aumentam rapidamente durante as duas primeiras semanas, e permanecem por cerca de 5 meses, por isso é considerado um marcador de infecções recentes ou atuais por HEV. Os níveis de IgG demoram a se elevar, mas podem permanecer por meses ou anos <sup>(2,3)</sup>.

A sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos disponíveis comercialmente variam, sendo influenciadas pelas reações cruzadas, baixa resposta

imunológica dos pacientes com doenças imunes e aplicabilidade devido a presença dos diferentes genótipos <sup>(3)</sup>.

Dentre os métodos diretos disponíveis, os de biologia molecular que identificam o RNA do vírus a partir de amostras biológicas como o soro, fezes, bile e fígado, devem ser realizados no início da infecção em suínos domésticos, devido ao curto período de viremia (1 a 3 semanas) e excreção (4 a 8 semanas) viral através das fezes <sup>(40)</sup>. Esses métodos podem ser aplicados para o diagnóstico da infecção aguda, principalmente em pacientes com doenças imunes, e para avaliar a possibilidade de doenças crônicas e sua resposta ao tratamento com antivirais <sup>(3)</sup>.

Entre os métodos moleculares utilizados estão a RT-PCR, que pode ser aplicada na sua forma convencional ou em tempo real (qRT-PCR). A RT-PCR convencional consiste na síntese de uma cadeia de DNA complementar (cDNA) a partir de uma cadeia simples de RNA, com auxílio da enzima transcriptase reversa. Após a síntese do cDNA realiza-se a amplificação do material genético da mesma forma que na PCR. Já a qRT-PCR apresenta princípio semelhante à RT-PCR, mas além de amplificar o material genético, é possível a quantificá-lo <sup>(42)</sup>.

Nos animais, a maioria dos testes diagnósticos aplicados são destinados a pesquisa científica, sendo a RT-PCR ou qRT-PCR os métodos diretos mais utilizados por serem mais facilmente adaptados às diferentes espécies animais <sup>(43)</sup>.

Em humanos, é possível avaliar os níveis das enzimas hepáticas, como a alanina aminotransferase (ALT); durante a fase aguda da doença, a ALT aumenta de forma expressiva, retornando a níveis normais durante o período de convalescença dos pacientes <sup>(3)</sup>.

## **2.7 Tratamento**

A maioria dos casos de hepatite E é aguda e autolimitante, sendo a enfermidade modulada pela resposta imune do hospedeiro. Normalmente os pacientes não necessitam de tratamento específico, apenas o de suporte <sup>(44)</sup>.

Devido à possibilidade dos casos crônicos progredirem para cirrose, principalmente em pacientes que receberam transplantes de órgãos ou que são

portadores de HIV, recomenda-se a diminuição das drogas imunossupressoras e administração de antivirais <sup>(45)</sup>.

## **2.8 Prevenção**

Nos países em desenvolvimento, a melhor forma de prevenção é o tratamento adequado do esgoto, evitando a contaminação das fontes de água e realizando o tratamento da água que foi contaminada, essas medidas devem ser associadas à educação em saúde para a população vulnerável <sup>(3)</sup>.

Em países industrializados, medidas educativas incentivando o consumo de carne cozidas, seja ela, de porco ou de animais silvestres, principalmente em pacientes transplantados ou imunossuprimidos e a implementação da rotina diagnóstica em doadores de sangue e órgãos deveriam ser instituídas <sup>(3)</sup>.

Outra forma de prevenção é a vacinação dos susceptíveis, como pessoas com risco ocupacional, gestantes, idosos e populações de áreas endêmicas ou pessoas que viajam para essas áreas.

Muitas vacinas para hepatite E já foram desenvolvidas e testadas em primatas, mas apenas duas entraram na fase de ensaios clínicos em humanos, sendo elas a rHEV e a HEV 239 <sup>(46)</sup>. No entanto, a rHEV não foi licenciada e não pode ser comercializada <sup>(47)</sup>.

A vacina HEV 239 é um imunógeno recombinante feito a partir das proteínas do capsídeo viral do genótipo 1 expressas em *Escherichia coli*. Ela está disponível desde outubro de 2012 na China e é recomendada para humanos a partir de 16 anos de idade. Foi observada boa resposta após a administração de três doses da vacina, com 0, 1 e 6 meses, pela via intramuscular <sup>(46)</sup> e foi relatada a proteção cruzada para o genótipo 4 <sup>(3)</sup>.

## **2.9 Hepatite E, uma zoonose**

A suspeita de que a hepatite E poderia ser uma zoonose surgiu quando descobriram que estirpes de HEV presentes em animais eram semelhantes às de

humanos <sup>(48)</sup>, estimulando os pesquisadores a avaliar a capacidade do HEV em cruzar a barreira entre espécies.

Através de um estudo realizado por Meng et al. (1998) foi possível confirmar que o HEV de um suíno era capaz de infectar primatas. Nos anos subsequentes, demonstrou-se que o HEV humano era capaz de infectar suínos que originalmente eram livres desse patógeno <sup>(39,40)</sup>.

Ainda é uma incógnita se todas as estirpes do vírus podem se adaptar e infectar humanos ou se há alguma barreira que limita a infecção. Do mesmo modo, é desconhecido se todos os animais infectados pelos genótipos 3 e 4 podem transmitir o vírus, e quais são os fatores que limitam a exposição <sup>(48)</sup>.

Desde a primeira descrição do vírus em suínos, em 1997 <sup>(9)</sup>, o HEV já foi descrito em diversos animais como: javalis <sup>(10)</sup>, cervos <sup>(11)</sup>, coelhos <sup>(12)</sup>, roedores <sup>(13)</sup>, camelos <sup>(14)</sup>, morcegos <sup>(15)</sup>, galinhas <sup>(16)</sup> e trutas <sup>(17)</sup>. No entanto, considera-se que os suínos domésticos, javalis e cervos são os principais reservatórios do vírus e o homem seria o hospedeiro acidental <sup>(2)</sup>.

Um estudo realizado na Suíça demonstrou que os suínos domésticos desempenham um papel mais importante como reservatório de HEV do que os javalis <sup>(49)</sup>, sendo que a infecção nessas espécies está difundida na Europa <sup>(2,10)</sup>.

Tem sido relatado um aumento crescente dos casos autóctones da doença relacionados a ingestão de carne crua ou mal cozida de animais infectados com o genótipo 3 <sup>(50)</sup>, principalmente, no Japão e Europa. Entre os casos comprovados estão à infecção pela ingestão de *sashimi* de cervo <sup>(11)</sup>, carne de javali grelhada <sup>(51)</sup>, carne de porco <sup>(52)</sup> e linguiça de fígado de porco cru <sup>(53)</sup>.

Lhomme et. al. (2015) testaram amostras de animais silvestres com o intuito de esclarecer o risco de adquirir hepatite E através da ingestão de carne de caça. Para isso foram avaliadas amostras de fígado e bile de 86 javalis, 62 cervos, 20 coelhos, 78 nutrias (*Myocastor coypus*) da região do Sul-Pirenéus, França. A prevalência de hepatite E nas carnes de caça foi de 3,3%, semelhante a prevalência

estimada de 4% (128/3715) observada em amostras de fígado de porcos domésticos do país <sup>(55)</sup>.

A prevalência da infecção varia de acordo com a idade em suínos domésticos e javalis. Nos javalis, é maior em animais mais velhos <sup>(56)</sup> e nos suínos, entre 2 a 4 meses de idade <sup>(57)</sup>. A viremia nos suínos domésticos persiste por 1 a 3 semanas e a excreção nas fezes pode durar de 4 a 8 semanas <sup>(40)</sup>, e contém uma carga viral maior do que a detectada no soro <sup>(43)</sup>.

Atualmente, sabe-se que a hepatite E está distribuída mundialmente, e representa uma ameaça a saúde pública, principalmente para grávidas e pessoas imunossuprimidas <sup>(58)</sup>. Na América Latina, pesquisas com esse agente começaram a ser realizadas de forma mais tardia que nos outros continentes <sup>(59)</sup>.

No Brasil, a presença do vírus foi relatada em suínos domésticos <sup>(5,18 a 22)</sup> e em humanos <sup>(23,24)</sup>. A primeira descrição de caso autóctone humano pelo genótipo 3 ocorreu em 2010 e a principal suspeita de transmissão foi através da ingestão de porco contaminada, apesar de não poder ter sido confirmada por falta da amostra <sup>(25)</sup>.

Esses achados provocaram um questionamento sobre a situação do rebanho suíno brasileiro e muitos trabalhos foram realizados com o intuito de avaliar essa enfermidade nos animais produzidos no país <sup>(18-22)</sup>, porém, não há estudos sobre a presença do vírus em porcos do mato brasileiros, como os taiassuídeos, nem estudos que determinem a prevalência da infecção nos animais silvestres e a dinâmica da infecção nesses animais.

Apesar de não existirem dados oficiais sobre o consumo de carne de caça no país, abatedouros e restaurantes que trabalham com carne de animais silvestres estão sendo implementados e aprimorados. Entre as carnes de caça consumida está a do queixada (*Tayassu pecari*).

## **2.10 Queixadas**

O queixada (*Tayassu pecari*) é um mamífero que se assemelha ao javali que apresenta cerca de 1 metro de comprimento e 40 kg de peso, sendo o queixada caracterizado por sua pelagem preta e queixo branco <sup>(60-62)</sup>.

Trata-se de um animal terrestre, que tem hábitos diurnos, e vive em bandos de até 300 animais. Sua distribuição vai desde o Sul do México até o Nordeste da Argentina <sup>(63,64)</sup>.

Alimenta-se de frutas, sementes, brotos, raízes, folhas, e de pequenos invertebrados. Em algumas regiões do Brasil são consideradas pragas, por devastarem as plantações de milho, mandioca e soja <sup>(64)</sup>.

De acordo com a IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais), o queixada está classificado como espécie vulnerável. Isso ocorre porque a redução da população foi de aproximadamente 30% nos últimos 18 anos, devido à perda de habitat, caça ilegal, competição com outros animais e doenças <sup>(65)</sup>.

Por ser o queixada uma carne de caça apreciada e não existir informações a respeito da infecção desses animais pelo vírus da hepatite E, esse trabalho tem como objetivo procurar o agente em amostras de fezes de animais provenientes de abatedouro.

### **3. OBJETIVO**

Detectar o vírus da Hepatite E por PCR em amostras fecais de queixadas provenientes de abatedouro localizado no sul do estado de São Paulo através da reação em cadeia da polimerase através da Transcriptase Reversa (RT-PCR).

### **4. MATERIAIS E MÉTODO**

#### **4.1 Controle Positivo**

Uma alíquota de fezes suína contendo  $10^7$  partículas virais foi cedida pelo Dr. Marcelo Alves Pinto, laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, FIOCRUZ, RJ sendo utilizada em cada grupo de amostras processadas.

#### **4.2 Amostras Biológicas**

Foram processadas 54 amostras de fezes de queixadas (*Tayassu pecari*) que foram colhidas em 2015 de um abatedouro situado no sul do estado de São Paulo. As amostras foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do processamento.

##### **4.2.1 Preparo da Amostra - Clarificação**

As amostras descongeladas foram homogeneizadas individualmente com o auxílio de uma espátula plástica e 500  $\mu\text{L}$  foram aliquoteados em um microtubo (Eppendorf®). Em seguida, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de água DEPC (dietilpirocarbonato), sendo homogeneizadas em vórtex, e centrifugadas a 12.000x g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

##### **4.3 Extração do Material Genético e Realização do cDNA Complementar**

Após clarificação das fezes, 750  $\mu\text{L}$  de Trizol® foram adicionados a 250  $\mu\text{L}$  da suspensão de fezes e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram, então, adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e o microtubo foi agitado vigorosamente, incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000xg/5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa foi transferida para outro microtubo e foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado, permanecendo a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, então, foi centrifugado por 12000xg/10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  para precipitação do RNA. O sobrenadante

foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol a 75%. O sobrenadante foi descartado novamente e o *pellet* foi secado em temperatura ambiente por inversão dos tubos e, então, foi suspenso em 20 µL de água DEPC.

Para síntese do cDNA complementar, as amostras extraídas foram colocadas no termociclador a 95°C por 5 minutos, sendo imediatamente depositadas numa caixa com gelo. Num volume final de 15 µL, foi adicionado 5 µL da amostra extraída, 3 µL de água DEPC, 3 µL de Buffer, 2 µL de dNTP's, 1 µL dos primers randômicos e 1 µL da MMLV (Invitrogen™). As amostras foram colocadas novamente no termociclador a 37°C por 60 minutos, e 70°C por 15 minutos.

#### **4.4 Detecção da ORF-1 do Vírus da Hepatite E**

##### **4.4.1 PCR**

Foi realizada a amplificação direcionada a ORF-1 do vírus da hepatite E segundo o protocolo de Wang et. al. <sup>(66)</sup>, com as seguintes modificações:

Num volume final de 20 µL, foram adicionados 2,0 µL de cDNA (item 4.3), 10 µL 2x Master Mix Green, 0,8µL Primer senso a 10mM (ORF1-F1 forward 5' CTGGCATACTACTGTCYATTGAGC 3'), 0,8 µL Primer antisenso a 10Mm (ORF1-R1 reverse 5' CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC 3') e 6,4 µL água DEPC.

##### **4.4.2 Condição de Amplificação**

As amostras sofreram uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 94°C/15 seg., 50°C/ 15 seg. e 72°C/ 45 seg, e uma extensão final de 72°C/5min.

##### **4.4.3 Nested ORF-1**

Num volume final de 20 µL, foi adicionado 1,0 µL do amplicon proveniente da RT-PCR (item 4.4.1), 10 µL 2x Master Mix Green, 0,8µL Primer senso a 10mM (ORF1-F2 forward 5' CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG 3'), 0,8 µL Primer antisenso a 10Mm (ORF1-R2 reverse 5' GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC 3') e 7,4 µL água DEPC.

As condições de amplificação foram as mesmas anteriormente descritas (item 4.4.2.).

#### **4.4.4 Eletroforese em Gel de Agarose**

##### **Preparação do Gel**

Em uma balança analítica foi pesado 1,5 g de agarose, que foi despejada num frasco Schott contendo 100 mL de TBE (Tris-borato-EDTA) 0,5X, sendo colocado no microondas, com a tampa fechada em meia rosca, até que a solução ficasse homogênea.

O gel de agarose que foi colocado em uma cuba de eletroforese horizontal. Os pentes foram encaixados no gel para formar os pocinhos para a adição da amostra. Em seguida, foi adicionado TBE até que a solução alcançasse os eletrodos laterais da cuba. Aguardou-se 15 minutos e os pentes foram retirados do gel.

A coloração do gel foi feita com SYBR-Safe-Nitrogen® com 1,0 µL para cada 10 mL de gel de agarose

##### **Aplicação das Amostras**

Foram colocados 5,0 µL de amostra no poço do gel de agarose a 1,5% formado pelo dente do pente. Reservou-se o primeiro poço do gel para aplicação de 2 µL do marcador (Ladder) de 100 bp, para futura comparação entre os pesos moleculares.

##### **Eletroforese**

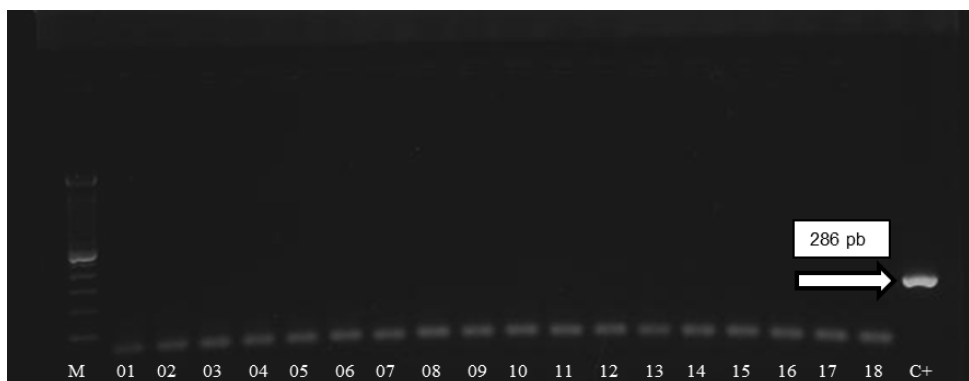
Aplicado às amostras nos poços do gel, a cuba foi fechada e o gel foi submetido à voltagem constante de 90 V/cm e corrente de aproximadamente 400mA, durante tempo variável dependendo do tamanho do gel.

##### **Leitura dos resultados**

A leitura foi obtida através de uma imagem por fluorescência gerada pela radiação da luz ultravioleta, permitindo a visualização do resultado. O gel foi digitalizado.

## 5. RESULTADO

Das 54 amostras analisadas, nenhuma foi positiva para detecção da ORF-1 para o vírus da hepatite E (Figura 1).



**FIGURA 1** – Gel de agarose demonstrando as amostras negativas para o HEV pela ORF-1. C+: Controle positivo. M: marcador de 100 bp.

A cada grupo de amostras processadas foram empregados controles negativos e positivos. Os controles negativos foram necessários para demonstrar que não houve contaminação durante o processamento das amostras, enquanto o controle positivo foi fundamental para avaliar se as reações estavam funcionando corretamente. Para isso, foram utilizados 2 controles negativos e 1 controle positivo para cada nove amostras durante a clarificação e extração, sendo adicionados mais dois controles negativos durante a Nested.

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas, no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ, UNESP de Botucatu.

## 6. DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta, a hepatite E se tornou um importante problema de saúde pública e o aumento do número de casos autóctones em países industrializados corrobora a necessidade de desenvolver estudos para entender melhor essa doença.

No Brasil, muitos trabalhos demonstraram a presença do vírus da hepatite E em suínos domésticos, no entanto, não há nenhuma descrição relacionada aos taiassuídeos. Por essa razão, esse foi o primeiro estudo realizado no Brasil com o intuito de detectar o vírus da Hepatite E por RT-PCR em amostras fecais de queixadas.

Todas as amostras foram negativas para Hepatite E, no entanto, os resultados encontrados não foram suficientes para afirmar que não há circulação do HEV nessa espécie, uma vez que esse é o primeiro estudo que avalia a presença do HEV em queixadas, e é possível que os animais não estivessem mais na fase de excreção viral quando as amostras de fezes foram coletadas.

Segundo Meng et. al. (1998), nos suínos domésticos a excreção viral ocorre por um período de 4 a 8 semanas, porém essa informação ainda é desconhecida nos taiassuídeos.

Sendo assim, seria importante realizar mais estudos nesses e em outros animais silvestres no Brasil, para determinar a importância dos mesmos na transmissão do vírus e os riscos que as pessoas correm de contrair hepatite E a partir desses animais, seja pelo consumo de sua carne ou pelo contato direto.

Somente a partir desses estudos será possível estabelecer os fatores de risco envolvidos na transmissão do vírus e a relação entre animais domésticos, silvestres, e humanos. Além disso, eles também ajudariam a desenvolver métodos de controle e vigilância para prevenir a transmissão da hepatite E.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados encontrados não foram suficientes para afirmar que não há circulação do HEV em queixadas, no entanto, os animais do presente estudo não estão excretando o vírus para o meio ambiente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arends JE, Ghisetti V, Irving W, Dalton HR, Izopet J, Hoepelman AIM, Salmon D. Hepatitis E: An emerging infection in high income countries. *J Clin Virol.* 2014, v. 59, n. 2, p 81-88.
2. Pérez-García MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: an emerging disease. *Infect Genet Evol.* 2014, v. 22, p. 40-59.
3. Khuroo MS, Khuroo MS. Hepatitis E: an emerging global disease – from discovery towards control and cure. *Journal of Viral Hepatitis.* 2016, v.23, p.68–79.
4. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng X-J, Okamoto H, Van der Poel WHM, Purdy MA: Consensus proposals for classification of the family hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014, v. 95, p.2223-2232.
5. Santos DL, Oliveira Filho EF, Pinto MA. Hepatite E no Brasil e no Mundo: Revisão de Literatura. *Vet. e Zootec.* 2013, v. 20, n. 3, p. 9-26.
6. Lee GH, Tan BH, Teo ECY, Lim SG, Dan YY, Wee A, Aw PPK, Zhu Y, Hibberd ML. Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver-transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology.* 2015, v.150, p. 355–357.
7. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect Dis.* 2010, v. 202, n. 6, p. 825-834.
8. Van der Poel WH. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Current Opinion Virol.* 2014, v.4, p. 91-96.
9. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. 1997. *Proc Natl Acad Sci.* 1997, v. 94, n. 18, p. 9860-9865.
10. Montagnaro S, De Martinis C, Sasso S, Ciarcia R, Damiano S, Auletta L, Iovane V, Zottola T, Pagnini U. Viral and Antibody Prevalence of Hepatitis E in European Wild Boars (*Sus scrofa*) and Hunters at Zoonotic Risk in the Latium Region. *J Comp Pathol.* 2015, v. 153, n. 1, p. 1-8.
11. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet.* 2003, v. 362, p.371– 373.

12. Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, Lhomme S, Marchandeau S, Boucher S, Kamar N, Bravanel F, Guérin J-L. Hepatitis E Virus Strains in Rabbits and Evidence of a Closely Related Strain in Humans, France. *Emerg Infect Dis.* 2012, v. 18, n. 8, p. 1274-1281.
13. Johne R, Heckel G, Plenge-Bönig A, Kindler E, Maresch C, Reetz J, et al. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2010, v. 6, p. 1452–1455.
14. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tsang AKL, Joseph M, Wong EYM, Tang Y, Sivakumar S, Xie J, Bai R et al. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis.* 2014, v. 20, p 1044-1048.
15. Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbini R, Gloza-Rausch F, Klose SM, Adu-Sarkodie Y et al. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol.* 2012, v. 86, p. 9134–9147.
16. Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* 2001, v. 82, p. 2449–2462.
17. Batts W, Yun S, Hedrick R, Winton J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* 2011, v. 158, p. 116–123.
18. dos Santos DR. et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Veterinary Journal.* 2009, v. 182, p. 474–480.
19. Guimaraes FR. et al. Hepatitis E virus antibodies in swine herds of Mato Grosso state, Central Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2005, v. 36, n.3, p. 223-226.
20. dos Santos DR, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol.* 2011, v. 149, n .1-2, p. 236-241.
21. Gardinali NR, Barry AF, Otonel RA, Alfieri AF, Alfieri AA. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012, v. 107, n. 7, p. 935-939.

22. Paiva HH, Tzaneva V, Haddad R, Yokosawa J. Molecular characterization of swine hepatitis e virus from southeastern Brazil. *Braz J Microbiol.* 2007, v. 38, p. 693-698.
23. Bortoliero AL, Bonametti AM, Morimoto HK, Matsuo T, Reiche EM. Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the regional blood bank of Londrina, state of Paraná, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006, v. 48, n. 2, p. 87-92.
24. da Silva SM, Oliveira JM, Vitral CL, Vieira KDEA, Pinto MA, Souto FJ. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012. v. 107, n. 3, p. 338-341.
25. dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MFM, de Sousa PSF, Gaspara AMC, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *Journal of Clinical Virology,* 2010. v. 47, p. 276-279.
26. Khuroo MS, Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.* 1980a. v. 68, p. 818–823.
27. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E. *Fields Virology,* 2001. 4<sup>a</sup> edição. Filadélfia, P.A. p. 3051-3061.
28. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 1983, v. 20, p. 23–31.
29. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP et al. Isolation of cDNA from the virus responsible for enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990, v. 247, p. 1335-1339.
30. Dawson CJ, Chau KH, Cabal CM, Yarbough PO, Reyes GR, Mushawar IK. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *Virology Methods.* 1992, v. 38, p. 175-186.
31. Emerson SU, Anderson D, Arankalle A, Meng XJ, Purdy M, Schlauder GG, Tsarev SA (2005) Hepatitis E virus. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus taxonomy.* Elsevier/Academic Press, London, p. 853–857.

32. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 1991. v. 185, n. 1, p. 120-131.
33. Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S, Tanaka T, Okamoto H. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol*. 2009, v. 90, p. 1880–1891.
34. International Committee on Taxonomy of Viruses; Hepatitis E virus. 1995. <http://www.ictvonline.org/virusTaxInfo.asp>
35. International Committee on Taxonomy of Viruses; Hepatitis E virus. 2009. <http://www.ictvonline.org/virusTaxInfo.asp>
36. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 1995, v. 345, p. 1025–1028.
37. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Péron JM, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel JP, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*, 2008. v. 358, n. 8, p. 811-817.
38. Zheng Y, Ge S, Zhang J, Guo Q, Ng MH, Wang F, Xia N, Jiang Q. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in Eastern China. *J Infect Dis*, 2006. v. 193, n. 12, p. 1643-9.
39. Meng XJ, Halbur PG, Sharipo MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, Purcell RH, Emerson SU. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by the swine hepatitis E virus. *Journal of Virology*, 1998a. v. 72, p. 9714–9721.
40. Meng XJ, Halbur PG, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, Purcell RH, Emerson SU. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strain of HEV. *Archives of Virology*, 1998b. v. 143, p. 1405–1415.
41. Aggarwal R. Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Research*, 2011. v. 161, p. 15-22.
42. Avelino L, Abdalla M, Fontenele T. RT-PCR. *Biologia Molecular*, 2012. (<https://rtpcrbiomol.wordpress.com/>)
43. Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, Lodder WJ, van der Giessen J, Reesink H, Bouwknecht M, de Roda Husman AM. Seroprevalence and molecular detection

- of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *J. Virol. Methods*. 2010, v. 168, p. 197–206.
44. Passos-Castilho AM, de Sena A, Reinaldo MR, Granato CFH. Hepatitis E virus infection in Brazil: results of laboratory-based surveillance from 1998 to 2013. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2015. v. 48, p. 468-470.
  45. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*. 2011, v.140, p.1481–1489.
  46. Li SW, Zhao Q, Wu T, Chen S, Zhang J, Xia NS. The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2015. 11:4, 908-914.
  47. Innis BL, Shrestha MP, McNair-Scott R. Hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*. 2007. 356:2422.
  48. Pavio N, Meng XJ, Doceul V. Zoonotic origin of hepatitis E. *Current Opinion in Virology*, 2015, v. 10, p. 34–41.
  49. Burri C, Vial F, Ryser-Degiorgis MP, Schwermer H, Darling K, Reist M, Wu N, Beerli O, Schöning J, Cavassini M, Waldvogel A. Seroprevalence of hepatitis E virus in domestic pigs and wild boars in Switzerland. *Zoonoses and Public Health*, 2014. v. 61, p.537–544.
  50. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, et al. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*. 2008, v. 8, p. 698–709.
  51. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*. 2005, v. 11, p .1958-1960.
  52. Riveiro-Barciela M, Miñguez B, Girone´s R, Rodriguez-Frías F, Quer J, Buti M: Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J Clin Gastroenterol* 2014.
  53. Renou C, Alfonso AM, Pavio N: Foodborne transmission of HEV from raw pork liver sausage in France. *Emerg Infect Dis* 2014.
  54. Lhomme S, Top S, Bertagnoli S, Dubois M, Guerin J-L, Izopet J. Wildlife Reservoir for Hepatitis E Virus, Southwestern France. *Emerging Infectious Diseases*. 2015. 21(7):1224-1226.

55. Rose N, Lunazzi A, Dorenlor V, Merbah T, Eono F, Eloit M, et al. High prevalence of hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011. v. 34, p. 419–427.
56. Sonoda H. et al. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol*. 2004. v. 42, p. 5371–5374.
57. Wu JC. et al. Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan. *J. Med. Virol*. 2002. v. 66, p. 488–492.
58. Meng, X. J. Zoonotic and food transmission of hepatitis virus. *Seminars in Liver Disease*. 2013. v. 33, p. 41–49.
59. Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res*. 2011. v.161, p.3–14.
60. Sowers LK. Javelinas and other peccaries: their biology, management, and use. Texas A e M University Press. College Station. 1997. 2<sup>o</sup> ed. 325 pp.
61. Oliver WLR. Pigs, peccaries and hippos. IUCN, Gland, Switzerland, 1993. 202p.
62. Bodmer RE, Eisenberg JF, Redford KH. Hunting and the likelihood of extinction of Amazonian mammals. *Conservation Biology*, Cambridge, 1997. v. 11, n. 2, p. 460-466.
63. Mayer JJ, Wetzel RM. *Tayassu pecary*. *Mammalian Species*, 1987. 293:1-7.
64. Mendes Pontes AR. Ecology of a community of mammals in a seasonally dry forest in Roraima, Brazilian Amazon. *Mammalian Biology*, 2004. 69:319-336.
65. Keuroghlian A. et al. Avaliação do risco de extinção do queixada, *Tayassu pecari* Link 1795, no Brasil. *Biodiv. Brasil*. 2012. v. 2, p. 84–102.
66. Wang Y, Huayuan Z, Ling R, Li H, Harrison TJ. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *J Gen Virol*. 2008, v. 81, p. 1675-1686.