

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE E EM FEZES DE SUÍNOS ABATIDOS**  
**SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA**

**PEDRO MADY BERTOLINI**

Botucatu-SP  
Novembro 2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE E EM FEZES DE SUÍNOS ABATIDOS**  
**SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA**

PEDRO MADY BERTOLINI

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Veterinária, para  
obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes  
de Almeida Nogueira Pinto

Botucatu-SP  
Novembro 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bertolini, Pedro Mady.

Detecção do vírus da hepatite E em fezes de suínos abatidos sob  
inspeção sanitária / Pedro Mady Bertolini. -  
Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto  
Capes: 50505009

1. Suíno - Abate. 2. Hepatite E. 3. Hepatite por vírus.  
4. Inspeção Sanitária. 2. Saúde pública.

Palavras-chave: HEV; Hepatite E; Inspeção sanitária;  
Suíno.

Nome do Autor: Pedro Mady Bertolini

Título: DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE E EM FEZES DE SUÍNOS  
ABATIDOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA.

### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Assistente Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Departamento de Ciências Veterinárias

UFPR - Palotina

Data da defesa: 20 de novembro de 2017.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Esquema de organização do genoma do HEV.....	19
<b>Figura 2 -</b> Positividade para HEV na amostra nº 36, CN- controle negativo e a direita o <i>Ladder</i> e controle positivo.....	41

## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Julio (*in memoriam*) e Yara, à minha esposa Amanda, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram para mim ao longo de minha vida. Desejo poder ter sido merecedor do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação pessoal e profissional.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto, pela confiança, pelos ensinamentos, diretrizes e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

À Profa. Dra. Adriana Cortez pela infinita disponibilidade, por todos os seus ensinamentos, auxílio prático e teórico laboratorial e pelo direcionamento na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabio Sossai Possebon, por esclarecer minhas dúvidas referentes às dissertações em pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Marcos Bryan pela colaboração e total disponibilidade junto ao laboratório de zoonoses da USP.

Aos colegas, Gisele, Camila e Antônio do laboratório de zoonoses pelo acolhimento e ensinamentos na condução das análises deste trabalho.

À minha esposa Amanda, pelo amor incondicional, apoio, incentivo, por cuidar de mim e de meus prazos acadêmicos.

À minha mãe Yara, por permitir o início de tudo na minha vida, por estar sempre presente e ser um porto seguro.

## Lista de Abreviaturas e símbolos

µl	microlitro
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartase aminotransferase
cDNA	DNA complementar
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
FDA	Food and Drugs Administration
g	força gravitacional
HEV	vírus da hepatite e
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
nm	nanômetro
nt	nucleotídeos
OIE	World Organization for Animal Health
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	open reading frame
pb	pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	ácido ribonucleico
RT	transcriptase reversa
UV	ultravioleta
VLP	vírus like particle
WHO	World Health Organization



## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. Vírus da Hepatite E .....	15
2.2. Epidemiologia .....	20
2.3. Transmissão .....	23
2.3.1 Transmissão por alimentos e inocuidade alimentar.....	25
2.4. Infecção em suíno e patogenia.....	27
2.5. Sinais Clínicos no suíno e no homem.....	27
2.6. Lesões em suínos.....	29
2.7. Testes Diretos utilizados na detecção do HEV em suínos.....	30
2.8. Testes indiretos para detecção do HEV em suínos .....	31
2.9. Imunidade pós exposição em suínos.....	31
2.10. Proteção cruzada.....	32
2.11. Prevenção e Controle em suínos.....	32
2.12. Controle e prevenção do HEV em humanos.....	33
3. OBJETIVOS .....	35
3.1 Geral: .....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Coleta das amostras .....	35
4.2. Preparo da amostra - Clarificação. ....	37
4.3. Controle positivo .....	37
4.4. Extração de material genético e realização de cDNA complementar .....	38
4.5. Detecção de ORF-1 do HEV.....	38
4.5.1. PCR .....	38
4.5.2 Condição de amplificação.....	39
4.5.3 Protocolo Nested RT-PCR para HEV .....	39
4.5.4. Eletroforese em gel de agarose.....	39
4.6. Genotipagem das amostras.....	40
5. RESULTADOS.....	40

6. DISCUSSÃO .....	41
7. CONCLUSÃO .....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	61

Bertolini, P.M. **Detecção do vírus da hepatite E em fezes de suínos abatidos sob inspeção sanitária.** Botucatu, 2017. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

O vírus da hepatite E (HEV) é um importante problema para a saúde pública e uma das principais causas de hepatite entérica em todo o mundo, podendo ser transmitido pelo consumo de carne suína contaminada. O trabalho teve por objetivos avaliar a prevalência do HEV em suínos de criações intensivas e tecnificadas, abatidos em matadouro-frigorífico sob Inspeção Sanitária. Foram coletadas 140 amostras de fezes de suínos de 14 propriedades distintas dos estados de São Paulo e Santa Catarina. As técnicas de diagnósticos moleculares nas amostras de fezes foram *Nested* RT-PCR e sequenciamento de Sanger para identificação da presença do vírus da hepatite E e o genótipo para elucidar os dados epidemiológicos. Os suínos não apresentaram doenças ou sinais clínicos no exame *ante mortem* e no exame *post mortem*. Os fígados não apresentaram lesões macroscópicas e contaminações gastrointestinais visíveis, portanto, as vísceras e carcaças foram destinadas ao consumo humano. Foram identificados 1,4% de suínos infectados pelo HEV genótipo 3. O vírus da Hepatite E, genótipos 3 e 4 tem caráter zoonótico, podendo gerar grande impacto na Saúde Pública. Diante disso, deve-se haver cuidados na manipulação de produtos possivelmente contaminados pelo HEV, evitando assim a contaminação cruzada, e, também, tratando termicamente a carne e derivados de suínos, a fim de garantir a inocuidade alimentar.

**Palavras-chave:** HEV, hepatite E, suínos, inspeção sanitária.

Bertolini, P.M. **Detection of hepatitis E virus in swine feces slaughtered under sanitary inspection.** Botucatu, 2017. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

Hepatitis E virus (HEV) is a major public health problem and one of the leading causes of enteric hepatitis worldwide and can be transmitted through the consumption of contaminated pork. The objective of this study was to evaluate the prevalence of HEV in pigs from intensive and technified farms slaughtered at a slaughterhouse under Sanitary Inspection. A total of 140 swine feces samples were collected from 14 different properties in the states of São Paulo and Santa Catarina. Molecular diagnostic techniques in faecal samples were Nested RT-PCR and Sanger sequencing to identify the presence of hepatitis E virus and the genotype to elucidate epidemiological data. The pigs had no disease or clinical signs on ante-mortem and post-mortem examination. The livers did not present macroscopic lesions and visible gastrointestinal contaminations, therefore the viscera and carcasses were destined for human consumption. A total of 1.4% of HEV genotype 3 infected pigs were identified. The hepatitis E virus, genotypes 3 and 4, is zoonotic in nature and can have a great impact on public health. In view of this, care must be taken in the handling of products possibly contaminated by HEV, thus avoiding cross-contamination, and also by thermally treating meat and pork products in order to guarantee food safety.

**Key words:** HEV, hepatitis E, pigs, sanitary inspection.

## 1. INTRODUÇÃO

Componente da família Hepeviridae, gênero *Hepevírus* e espécie *Hepatitis E virus* é o agente causador de doença hepática em humanos denominada hepatite E. É uma zoonose comum em muitos países em desenvolvimento e mais rara em países desenvolvidos. Os índices de mortalidade normalmente são baixos (<1%), porém, em alguns surtos relatados, a mortalidade chegou a 25%. (BALAYAN et al., 1990).

A hepatite E é um importante problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de hepatite entérica transmitida ao homem em todo mundo. É responsável por mais de 50% dos casos de hepatite viral aguda em países endêmicos e cerca de 2 bilhões de pessoas, um terço da população mundial, vive em áreas endêmicas do HEV e estão sob risco de infecção. Estima-se que ocorram, a cada ano, cerca de 20 milhões de casos com infecção pelo HEV, com 3,3 milhões de casos sintomáticos e aproximadamente 57 mil mortes (WHO, 2017).

A infecção pelo HEV nos países em desenvolvimento é primariamente uma doença transmitida pela água, associada a grandes epidemias devido a água contaminada e abastecimento em condições sanitárias precárias. Em contraste, os países industrializados, incluindo muitos países europeus, EUA e Japão, a hepatite E ocorre de forma esporádica e a transmissão ocorre pelo consumo de carnes contaminadas. As viagens a países endêmicos e a presença de diferentes genótipos do HEV nos países industrializados em contrapartida com países em desenvolvimento suportam uma origem autóctone de casos esporádicos. O HEV é o único dos principais vírus da hepatite (A, B, C e D) com reservatório animal, e tendo sido relatado em suínos (HEV suíno), frangos (HEV aviário) e, mais recentemente, em coelhos, roedores, javalis, furões, morcegos, ovinos e trutas (MENG, 2010; PEREZ-GRACIA et al., 2015). A transmissão experimental bem-sucedida do HEV suíno para macacos, modelo para transmissão do HEV em humanos, sustenta fortemente a origem zoonótica da hepatite E. Esta teoria é reforçada por estudos filogenéticos no Japão, em que o vírus foi associado à carne

crua (suínos e veados), sendo que os humanos se tornaram infectados depois de consumirem tais carnes (MENG, 2011; PEREZ-GRACIA et al., 2015).

O principal mecanismo de transmissão durante os surtos de hepatite E não zoonótica é pela via oro-fecal, pela ingestão de água e alimentos contaminados. A transmissão também ocorre pelo consumo de carne suína contaminada, constituindo neste caso, transmissão zoonótica. Os indivíduos eliminam vírus via fecal durante a fase aguda da infecção, sintomáticos ou não, e são provavelmente aqueles que mais contribuem para a manutenção do agente no ambiente. Indivíduos que eliminam o HEV nas fezes por um período prolongado também podem contribuir para esta manutenção (TEO, 2007). A transmissão vertical entre indivíduos não é comum, mas quando há infecção pelo HEV, a mortalidade de crianças nascidas de mães infectadas pelo HEV é alta (PATRA et al., 2007).

O HEV constitui uma importante preocupação de saúde pública, com casos da doença associados ao manuseio de suínos infectados, ao consumo de carnes cruas e mal cozidas, como fígado de suíno, linguiças, carne de cervos. Além disso, grandes quantidades de vírus excretados nas fezes de animais contaminam a água potável ou de irrigação. O HEV tem sido identificado em numerosas fontes de interesse, incluindo fezes de animais, água de esgoto, água inadequadamente tratada, mariscos e produtos contaminados, bem como carnes de animais (MENG, 2011; YUGO e MENG, 2013). Casos esporádicos de hepatite E começaram a ser descritos e associados à transmissão zoonótica do HEV a partir de reservatórios animais, principalmente suínos. Desta forma a hepatite E é a única hepatite viral em que foi evidenciada a transmissão zoonótica (DOS SANTOS, OLIVEIRA FILHO e PINTO, 2013).

Foram detectados anticorpos contra o HEV em diversas espécies de animais domésticos e silvestres em várias regiões do mundo, com soroprevalências variando de 8 a 80%. Dentre as espécies animais incluem-se os suínos, javalis, roedores, cervos, caprinos, bovinos, camelos, aves domésticas e primatas não-humanos (MENG, 2010; VITRAL et al., 2005).

A infecção em suínos se apresenta de modo assintomático. Contudo já foi provado que a excreção de partículas virais viáveis nas fezes de animais representam um risco de transmissão desse vírus aos animais e o homem (HALBUR et al., 2001).

Independente das prevalências observadas em populações humanas clinicamente saudáveis de regiões onde a hepatite E é endêmica ou não, as altas soroprevalências anti-HEV frequentemente observadas em suínos demonstraram que o HEV é enzoótico em animais desta espécie (MENG et al., 1997).

As provas laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo HEV incluem testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG, além de testes moleculares para a detecção do genoma do vírus nas fezes e no soro (MUSHAHWAR, 2008).

Devido à importância do HEV genótipo 3 e 4 em suínos para a transmissão zoonótica e relevância em saúde pública através de consumo de carnes contaminadas, pretende-se com este estudo avaliar a prevalência da hepatite E em suínos abatidos em frigorífico sob inspeção sanitária permanente, registrado no SIF - Serviço de Inspeção Federal, localizado no município de Cerqueira César-SP, Brasil.

## **2.REVISÃO DA LITERATURA.**

### **2.1. Vírus da Hepatite E**

O HEV é um RNA, pequeno, esférico, não envelopado, fita simples com 27 a 34nm de diâmetro que apresenta uma simetria do capsídeo icosaédrica. O HEV foi classificado como um membro da família Caliciviridae até o ano de 1980, devido as semelhanças morfológicas que eram compartilhadas com outros vírus desta família.

Observou-se que o genoma do HEV não se assemelhava com qualquer outro vírus conhecido, exceto a organização do vírus da rubéola, que hoje é classificado na família *Togaviridae*. O Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) aprovou em 2004 a nova classificação do HEV (Hepatitis E-like viroses) no gênero *Orthohepevirus*, família Hepeviridae (SMITH, et al 2014; TRABULSI, 2015).

A família Hepeviridae é dividida em dois gêneros: o gênero *Orthohepevirus* que contém os HEVs que afetam as espécies de mamíferos e aves e o gênero *Piscihepevirus* que contém os HEVs que afetam as trutas. O gênero *Orthohepevirus* possui quatro espécies: *Orthohepevirus A* contém os HEVs de seres humanos, suínos, javalis, veados, mangusto, coelho e camelo; *Orthohepevirus B* contém o HEV de frango; *Orthohepevirus C* contém HEVs de ratos, musaranhos, furão e vison; e *Orthohepevirus D* contém o HEV isolado de morcegos (SMITH et al, 2014).

Dentro do *Orthohepevirus A* existem pelo menos sete genótipos diferentes, os quais são classificados através de análises filogenéticas direcionadas as regiões da ORF1 e ORF2. Os HEV1 e HEV2 infectam restritamente os seres humanos, enquanto HEV3 e HEV4 são zoonóticos e os suínos servem como reservatório. Os HEV5 e HEV6 foram encontrados em javalis no Japão e o HEV7 foi encontrado em camelos e dromedários em Dubai. De acordo com a classificação atual, os quatro principais genótipos, HEV1, HEV2, HEV3 e HEV4, são subdivididos em subtipos definidos em reconstruções filogenéticas. Existem aproximadamente 11.000 sequências humanas e animais do HEV disponíveis na *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (ZANETTI et al., 1999; SCHLAUDER e MUSHAWAR, 2001; LU, LI e HAGEDORN, 2006; PEREZ-GRACIA et al., 2015; THIRY et al., 2015).

As variações de genótipos dos HEV1, HEV2, HEV3 e HEV4 foram encontrados em Myanmar, México, Estados Unidos e China, respectivamente (SONG et al., 2010).



O vírus da hepatite E foi descoberto depois de um surto da enfermidade em humanos de etiologia desconhecida, no vale de Caxemira, Índia, em 1978. A epidemia envolveu cerca de 52.000 casos de hepatite icterica com 1700 mortes. Na época foi denominada hepatite não-A, não-B, entericamente transmissível (ET-NANB) (KHUROO, 1980). Em 1983 foi realizada a caracterização molecular de um novo vírus de hepatite não-A e não-B pela via de transmissão fecal-oral (BALAYAN et al., 1983).

No início da década de 80, foram desenvolvidos testes sorológicos para hepatite A e hepatite B que confirmaram a existência de um novo vírus de transmissão entérica, que eram hepatite não-A e não-B em análises de 69 soros humanos, em um estudo retrospectivo, com associação à ocorrência de um surto de hepatite em Nova Deli na Índia em 1955 (WONG et al., 1980; BRADLEY, 1990). O HEV foi caracterizado a partir da detecção de partículas semelhantes a vírus (VLP), por imunoeletromicroscopia – IEM (BALAYAN et al., 1983).

O HEV é a principal causa de hepatite viral transmitida entericamente e de distribuição mundial. Está presente em países em desenvolvimento há décadas. Nos países desenvolvidos são identificados casos esporádicos e autóctones de infecção com o HEV (CLEMENTE-CASARES et al., 2016).

O genoma do HEV consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com a presença de capsídeo (7-metilguanossina) e de uma cauda poli-A, com aproximadamente 7200 nucleotídeos (nt). O genoma viral possui duas regiões não-codificantes (NC), nas extremidades 5' e 3', que são altamente conservadas e possuem 35 e 68-75 nucleotídeos, respectivamente. Essas regiões são elementos cis regulatórios, envolvidos na replicação do genoma viral, na tradução e encapsidação, comumente observados em outros RNA-vírus. Existem três fases de aberturas de leitura (ORFs), organizadas na ordem 5' – ORF1-ORF3-ORF2 – 3', que compõem o genoma (MENG et al., 1997; MENG, 2010; AHMAD, HOLLA e JAMEEL, 2011).

A ORF1 compõe a maior unidade codificante e está localizada na extremidade 5', possuindo 5000 nucleotídeos (Figura 1). As proteínas codificadas estão envolvidas no processo replicativo do genoma viral como a metiltransferase, uma protease semelhante à papaína, a helicase e a RNA polimerase RNA dependente (KOONIN et al., 1992; AGRAWAL, GUPTA e PANDA, 2001). Existe uma região não codificante hipervariável da ORF1 que apresenta uma diversidade genética significativa, que pode estar envolvida na eficiência da replicação do HEV. Nesta região de hipervariabilidade estão concentradas as diferenças entre genomas observadas para os variados isolados (HUANG et al., 2004).

A ORF2 codifica uma proteína de 600 aminoácidos, que compõe o capsídeo viral que contém uma sequência de sinal típica próxima à região 5' terminal, seguida de uma região com cargas altamente básicas do genoma viral. Acredita-se que esta região esteja envolvida na encapsidação do transcripto genômico. A ORF2 é altamente imunogênica e possui diversos epitopos ou determinantes antigênicos, além de codificar outros epitopos secundários na região central da proteína, portanto alvo para o desenvolvimento de uma vacina (MENG, 2010). O capsídeo viral icosaédrico transcrito pela ORF2 é constituído estruturalmente por três domínios proteicos lineares interligados: S, P1 e P2. O domínio S apresenta conformação homogênea e sem cavitações, o domínio P1 apresenta protusões e o domínio P2 desempenha papel importante na determinação antigênica. Os três domínios possuem sítios de polissacarídeos que se ligam aos receptores das células (GUU et al., 2009).

A ORF3 codifica uma fosfoproteína capaz de se associar ao citoesqueleto da célula, possivelmente servindo como sítio de ancoragem (OKAMOTO, 2007). Essa proteína parece estar envolvida na interação com a proteína fosfatase quinase ativada por mitogênese e outras quinases extracelulares, promovendo a sobrevivência celular através da ativação de cascata de sinalização intracelular (KORKAYA et al., 2001; NAGASHIMA et al., 2011).

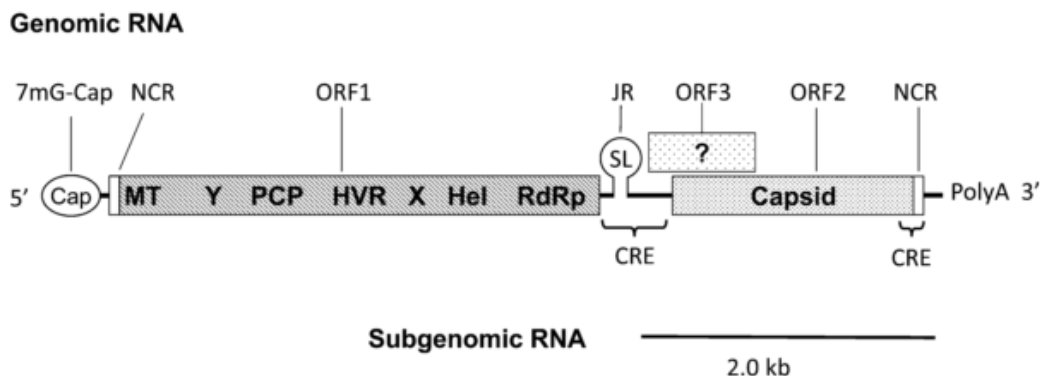


Figura 1: Esquema de organização do genoma do HEV. Fonte: (CAO; MENG, 2012).

O HEV é considerado resistente às condições alcalinas e ácidos leves no trato intestinal, sendo que a sobrevivência do vírus fora do hospedeiro é de resistência moderada. O HEV é potencialmente susceptível à desinfecção com ácidos como ácido acético, aldeídos como o glutaraldeído, álcalis como o hidróxido de sódio e agentes oxidantes como Virkon-S® (PROIETTO; LARSON, 2015).

No entanto, uma vez que o HEV se propaga através da via fecal-oral, o vírus tem uma certa estabilidade no ambiente, semelhante a outros vírus da hepatite (PROIETTO; LARSON, 2015).

O HEV é inativado em produtos suínos por cozimento adequado. É necessário aquecer os produtos a uma temperatura interna de 71°C (160°F) durante 20 minutos para inativar completamente o HEV. Temperaturas mais baixas e/ou durações mais curtas podem não reduzir a infectividade pelo HEV (PROIETTO; LARSON, 2015).

Num trabalho, verificou-se que os fígados de suínos aquecidos a 191°C (376°F) durante 5 minutos ou cozidos em água durante 5 minutos continham HEV infeccioso. De modo semelhante, a incubação de fígados suínos a 56°C (133°F) durante uma hora não reduziu a infecciosidade. O HEV nos produtos suínos permanece infeccioso quando exposto a temperaturas de cozimento de 56°C durante uma hora, temperaturas equivalentes a condições de cozimento mal

passado a médio nos restaurantes (FEAGINS et al., 2008).

## 2.2. Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço da população mundial tem sido exposta ao HEV. (WHO, 2017)

O vírus da hepatite E (HEV) é altamente disseminado nos rebanhos de suínos em todo o mundo. O HEV é também uma ameaça à saúde pública e pode, eventualmente, causar hepatite aguda em seres humanos, principalmente em pacientes imunossuprimidos (VASCONCELOS et al, 2015).

Semelhante ao o que ocorre com a hepatite A, a hepatite E tem sido tradicionalmente considerada como de transmissão entérica. Esse padrão epidemiológico tem sido registrado em países em desenvolvimento, onde foram relatados surtos epidêmicos relacionados à água contaminada. No entanto, a epidemiologia da hepatite E nos países industrializados é diferente e mudou ao longo do tempo. Quando foi relatado pela primeira vez nos países desenvolvidos estava ligado a viagens para áreas endêmicas, mas agora, está se tornando uma infecção ligada a um reservatório animal. Além disso, a soroprevalência nos países industrializados é maior do que se pensava anteriormente em relação ao número de casos autóctones relatados. Na verdade, foi definido uma clara separação entre os dois diferentes tipos de infecção pelo HEV. Os genótipos 1 e 2, prevalentes nos países em desenvolvimento, são responsáveis pelas doenças transmitidas pela água. Já os genótipos 3 e 4 são prevalentes nos países industrializados e produzem infecção zoonótica de origem alimentar (TESHALE, HU e HOLMBERG, 2010).

A infecção pelo HEV genótipos 1 e 2 é endêmica no centro e sudeste da Ásia. Diversos surtos foram relatados no Oriente Médio, no norte e oeste da África e na América Central (México). No resto do mundo, infecções pelo HEV-3 e HEV-4 são consideradas pouco frequentes e restritas a pessoas que viajaram para áreas onde

HEV é endêmica. Os surtos do HEV são duradouros por meses a anos e podem afetar de centenas a milhares de pessoas. Os surtos podem variar de agudos a epidemias de longa duração (> 1 ano). Durante esses surtos, a porcentagem da população afetada pode variar entre 1% e 15%. A gravidade é mais freqüente em adultos (3 a 30%) do que em crianças (0,25 a 10%). Também são verificadas que as infecções anictéricas e/ou subclínicas podem ser mais frequentes em crianças. Os homens são mais comumente infectados do que as mulheres. A transmissão de pessoa para pessoa é rara e é mais frequente entre os membros da mesma família que são infectados por uma fonte de água comum (DUCANCELLE et al., 2007).

Em países não epidêmicos o HEV-3 e HEV-4 são esporádicos e constituem de 1 a 11% dos casos agudos de hepatites, estando principalmente relacionados à viagem para zonas endêmicas, embora tenha sido recentemente relatado um número crescente de hepatites autóctones (PIPER-JENKS, HOROWITZ e SCHWARTZ, 2000; IJAZ et al., 2005; ECHEVARRÍA, FOGEDA e AVELLÓN, 2011).

O HEV-3 é o genótipo mais prevalente que causa infecção autóctone nos países desenvolvidos. Os resultados nas soroprevalências identificadas na Europa mostraram uma alta variabilidade em suas taxas. Num trabalho utilizando meta-análise analisou 73 estudos de soroprevalência HEV na Europa. As estimativas de variaram de 0,6% a 52,5%, com taxas aumentando com a idade, mas não relacionadas ao gênero. Nos EUA, o anti-HEV foi de cerca de 6%, no Reino Unido 3-16% e em algumas regiões de França até 52%. Na Inglaterra, o número de casos confirmados sintomáticos de infecção pelo HEV, vem aumentando constantemente nos últimos 14 anos, de 124 em 2003, para 958 em 2015. No entanto, um estudo do Sudeste da Inglaterra sugeriu que ocorram de 80.000 a 100.000 infecções por ano na Inglaterra, a maioria das quais assintomáticas. A infecção por HEV autóctone não é uma condição benigna, com taxas de mortalidade de até 27% relatadas em pacientes com doença hepática crônica subjacente (DONNELLY et al., 2017; HARTL et al., 2016).

No Brasil, um experimento foi realizado com suínos provenientes de granjas comerciais do Rio de Janeiro e do Mato Grosso, os quais acompanhados sorologicamente, e fragmentos de RNA do HEV genótipo 3 foram identificados em amostras de soro e fezes. (DOS SANTOS et al., 2009).

Dados atuais, demonstraram um aumento na prevalência de infecção de HEV-3. Identificaram o HEV-3 em 34 de 170 suínos (20%), no sul do estado do Paraná, que anteriormente em outra pesquisa apresentava 15%. No norte do Brasil, na bacia Amazônica, foi detectado prevalência de 9,9% (15/151) de HEV-3 em suínos (GARDINALI et al., 2012a; PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017; SOUZA, 2011).

Em relação aos dados sorológicos em animais, foram relatados e detectados anticorpos contra o HEV em suínos de países em desenvolvimento, como o Nepal, México e a Tailândia. Anticorpos contra HEV foram encontrados em suínos de países industrializados, incluindo os EUA, Canadá, Coréia, Taiwan, Austrália e Nova Zelândia (MENG et al., 1997; WU et al., 2002). Também houve a detecção de anticorpos em outras espécies animais, como aves de capoeira, cães, bovinos, cervos, gatos, roedores e mangustos. Todas estas informações sorológicas sugerem que certas espécies animais estão expostas ao HEV, embora a epidemiologia da infecção seja pouco esclarecida e estudada (KABRANE-LAZIZI et al., 1999; FAVOROV et al., 2000; ARANKALLE et al., 2001; WU et al., 2002; SONODA et al., 2004; SUN et al., 2004; VITRAL et al., 2005). O genoma do HEV também foi detectado em aves de capoeira, cavalos, suínos, cervos, javalis, ratos, coelhos e ovelhas ( MENG et al., 1997; HAQSHENAS et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2003; SAAD et al., 2007; ZHAO et al., 2009; LI et al., 2013; WU et al., 2015). Uma grande variabilidade genômica de HEV estão presentes em uma diversidade de espécies animais. A sequenciamento e a análise filogenética de muitas variáveis de HEV mostraram uma estreita relação entre suínos e isolados humanos da mesma área geográfica em países industrializados como o Japão, a Coréia, o Reino Unido, Taiwan e os EUA ( MENG et al., 1997; HSIEH et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2003; AHN et al., 2005; IJAZ et al., 2005) . A infecção por hepatite E foi relacionada pelo consumo de fígado de suíno mal cozido ou cru (YAZAKI et al.,

2003). Há também casos de infecção pela hepatite E por ingestão de carne de cervo e javali (TAKAHASHI et al., 2003). Devido à sua capacidade de atravessar a barreira das espécies, o HEV constitui um importante problema de saúde pública, especialmente para os suínos que apresentam maior risco de infecção e, conseqüentemente de transmissão ao homem (WITHERS et al., 2002; GALIANA; FERNÁNDEZ-BARREDO; PÉREZ-GRACIA, 2010).

O suíno doméstico é o maior reservatório para HEV e o contato ocupacional com suíno infectado é um fator de risco para a infecção zoonótica do HEV em seres humanos. No entanto, a presença de numerosas outras variáveis do HEV na vida selvagem e em outras espécies de animais domésticos sugere mecanismos adicionais de potencial de transmissão zoonótica. Os trabalhadores em contato com suínos tinham uma prevalência de anticorpos anti-HEV significativamente mais elevada do que os controles, sugerindo a transmissão fecal-oral ou zoonótica através do consumo das carnes desses animais (MENG et al., 1997). Assim, é fundamental compreender a história natural e a ecologia da infecção do HEV, a fim de conceber estratégias preventivas e de controle eficazes (MENG, 2016).

Muitos países europeus, EUA e Brasil realizaram estudos soropidemiológico do HEV em suas respectivas populações de doadores de sangue. A maioria dos países relatou aumento na incidência de infecção pelo HEV devido ao aumento da conscientização sobre o HEV, aumento dos testes para o vírus e um verdadeiro aumento no número de novas infecções (DONNELLY et al., 2017).

### **2.3. Transmissão**

A hepatite E é geralmente transmitida pela via fecal-oral devido ao consumo de água contaminada (genótipos 1 e 2) e através do consumo de carnes contaminadas (genótipos 3 e 4) (BOUAMRA et al., 2013). Rotas de transmissão alternativas, como transfusões e transmissão vertical do HEV 1, 2, 3 e 4 estão se

tornando cada vez mais relevantes, uma vez que mais casos são relatados a cada ano. Evidenciou-se na Inglaterra que a transmissão via transfusão de sangue tornou-se uma das principais vias de transmissão nos países desenvolvidos. Um grupo de pesquisa no sudeste da Inglaterra examinou retrospectivamente um total de 225.000 doadores de sangue, dos quais 79 tinham viremia para o HEV-3 (HEWITT et al., 2014). O acompanhamento de 43 receptores mostrou que 18 (42%) tinham evidências de infecção, onde apenas pacientes imunossuprimidos apresentaram morbidade aguda. Outra via de transmissão cada vez mais comum é a transmissão vertical de mulheres grávidas para seus filhos, especialmente porque essas mulheres são susceptíveis à infecção pelo HEV 1 e 2, verificada em epidemias na Índia. (KUMAR et al., 2013). Recentemente a OMS evidenciou nos países em desenvolvimento que o HEV pode ser responsável por mais de 3.000 abortos e natimortos a cada ano (KRAIN et al., 2014).

Por volta de 12 a 15 semanas de idade, a maioria dos suínos são naturalmente infectados e disseminam HEV em suas fezes (DE DEUS et al., 2008; ANDRAUD et al., 2013). Os suínos com menos de três meses de idade apresentam maiores níveis de RNA do HEV nas fezes em comparação com animais mais velhos, indicando que os animais jovens podem ser um importante fonte de disseminação viral (GENG et al., 2011). Um suíno dissemina o HEV nas fezes podendo transmitir a 0.15 suíno por dia pelo contato direto, estatisticamente. A transmissão através das fezes contaminadas HEV entre pocilgas adjacentes é 30 vezes menos eficaz do que a transmissão dentro da mesma pocilga (ANDRAUD et al., 2013). Em suínos miniaturas, a infecção experimental foi obtida através de fezes de um javali selvagem inoculado intravenosamente com HEV-3 (SCHLOSSER et al., 2014).

O contato com suínos infectados ou com as fezes positivas para HEV resulta em infecção mais facilmente do que a inoculação oral experimental. Resultados positivos para HEV por Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), através da análise de urina de suínos infectados por contato com outros suínos infectados. A transmissão por aerossol também pode ser possível (BOUWKNEGT et al., 2009). A transmissão vertical foi relatada em coelhas



prenhas infectadas com HEV de coelho, mas não foi demonstrada em suínos. Xia et al 2015 descreveram que as fezes de coelhos neonatais nascidos de coelhos infectados foram positivas para HEV na RT-PCR. Em leitões de uma semana de idade, soropositivos para HEV, o sequenciamento demonstrou que os subgenótipos isolados eram diferentes daqueles isolados das matrizes, demonstrando que essas fêmeas podem ser infectadas por dois ou mais subgenótipos diferentes do HEV durante sua vida produtiva (DE DEUS et al., 2008).

### **2.3.1 Transmissão por alimentos e inocuidade alimentar**

Os produtos de carne dos reservatórios do HEV (suínos, javalis e cervos) são capazes de transmitir HEV para humanos e são uma preocupação de saúde pública (AGGARWAL; NAIK, 2009; TEO, 2009). O HEV replica principalmente no fígado de animais infectados. No entanto, sítios extra-hepáticos de replicação do HEV como tecidos gastrointestinais, linfonodos mesentéricos, hepáticos e baço também foram observados (PAVIO; MENG; RENOUE, 2010). Além do tecido hepático, o RNA do HEV foi detectado no estômago, rim, glândulas salivares, amígdalas, pulmões e múltiplas massas musculares de suínos e de galinhas, quando inoculados por via intravenosa (WILLIAMS et al., 2001; BILLAM et al., 2008).

O HEV é estável em ambientes alcalinos e ácidos, pode ser congelado por mais de 10 anos e permanece infeccioso até 60°C. Os frutos do mar infectados pelo HEV-3, principalmente mexilhões, moluscos e ostras crus, mal cozidos ou ligeiramente cozidos no vapor, podem transmitir hepatite E aos consumidores (EMERSON; ARANKALLE; PURCELL, 2005; SAID et al., 2009; NANSAI et al., 2011).

O consumo de órgãos ou tecidos pouco cozidos de suínos infectados foi associado a numerosos casos de hepatite E em todo o mundo. O consumo de

fígado ou intestino de suíno é considerado como um fator de risco para infecção pelo HEV (MIYASHITA et al., 2012).

A infecção pelo HEV, através do consumo de alimentos contaminados, é suportada por vários casos confirmados de transmissão direta. Quatro relatos de casos sugeriram a transmissão do HEV através do consumo de produtos de carne animal contaminados com sequências com alto grau de similaridade entre os pacientes e carne consumida de animais contaminados. Dois deles foram descritos no início da última década no Japão, através do consumo de carne de javali grelhado ou sashimi de cervo de Sika. Um terceiro foi relatado recentemente na Espanha, através do consumo de carne de suína. E o último na França com o consumo de delicatessen da Córsega (linguiça figatelli produzida com fígado suíno). Além disso, na França, no Japão e na Alemanha, estudos de casos controles, identificaram o consumo de produtos suínos ou miudezas como fatores de risco para infecção pelo HEV (PAVIO; MENG; DOCEUL, 2015).

A presença de RNA HEV foi repetidamente detectada na cadeia alimentar do suíno. No Reino Unido, 10% das linguiças suínas vendidas nas mercearias foram positivas para HEV. Na França, o RNA HEV foi detectado em até 30% de delicatessen da Córsega (linguiça figatelli). O isolamento do vírus a partir de linguiça figatelli foi descrito, indicando que o vírus infeccioso está presente em tais produtos suínos e que podem constituir uma via de transmissão para os seres humanos. Em muitos países, como EUA, Alemanha, França, Japão, Coreia e Holanda, altas porcentagens de fígados contaminados que entraram na cadeia alimentar (até 11%), por se tratar de alimentos que teoricamente deveriam ser inócuos ao consumidor. Recentemente, um número significativo de hepatite E crônica foi relatado, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos, como receptores de transplantes de órgãos sólidos e, sabidamente, quase todos esses casos crônicos estão associados à HEV-3 zoonótica (PAVIO; MENG; DOCEUL, 2015).

## **2.4. Infecção em suíno e patogenia**

A patogenia do HEV em suínos não é totalmente conhecida e a informação é limitada. Após a infecção fecal-oral de suínos jovens (2 a 3 meses de idade), quando há o declínio de anticorpos maternos, a viremia ocorre após 1 a 2 semanas (YUGO; MENG, 2013). A disseminação viral pelas fezes ocorre em 1 a 2 semanas após a inoculação e pode persistir por até 8 semanas (BOUWKNEGT et al., 2009). Infecção do HEV foi relatada em leitões de um mês naturalmente infectados (DE DEUS et al., 2007).

Após a ingestão, o vírus se espalha para o órgão alvo, o fígado, onde ocorre a replicação. As alterações hepáticas são mínimas em suínos. O vírus é então excretado em fezes e bile, servindo como via de transmissão para outros suínos (BOUWKNEGT et al., 2009; YUGO; MENG, 2013).

Reconhecer a infecção por HEV em suínos é difícil por causa da ausência de sinais clínicos (PROIETTO; LARSON, 2015).

## **2.5. Sinais Clínicos no suíno e no homem**

As infecções naturais e experimentais em suínos são assintomáticas (MENG, 2011). A infecção intravenosa experimental em suínos de 3 a 4 semanas de idade não causou sinais clínicos aparentes e nenhuma elevação de enzimas hepáticas ou hiperbilirrubinemia (HALBUR et al., 2001). Há relatos que aumenta as enzimas hepáticas nos suínos após inoculação experimental intravenosa e de contato (SCHLOSSER et al., 2014). O HEV em suínos não mostrou efeitos sobre o tamanho das ninhadas ou abortamentos, no entanto, são necessários estudos adicionais (BOUWKNEGT et al., 2009).

No homem, o período de incubação do HEV varia entre 2 a 10 semanas, com uma média de 5 a 6 semanas. As pessoas infectadas começam a excretar o vírus desde poucos dias até umas 3 a 4 semanas depois do início da doença (WHO, 2017).

Nas zonas endêmicas, conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infecção sintomática é mais frequente em jovens e adultos, em torno de 15 a 40 anos. Nessas áreas, as crianças podem ser afetadas e serem assintomáticas ou apresentar uma enfermidade leve, anictérica e que passa despercebida e sem diagnóstico (WHO,2017).

Os sinais clínicos e sintomas do HEV no indivíduo iniciam-se com febre leve, anorexia, náuseas e vômitos que duram poucos dias. Algumas pessoas podem apresentar dor abdominal, pruridos, erupções cutâneas e dores abdominais. Ocorre um ligeiro aumento do fígado (hepatomegalia) com dor à palpação. Posteriormente, apresentam os sintomas clássicos com icterícia, acolia fecal (fezes esbranquiçadas com diminuição de bilirrubina) e colúria (urina escura com excesso de bilirrubina). Há um aumento significativo dos níveis de enzimas hepáticas na fase aguda da doença (bilirrubina, ALT, AST). Estes sintomas, frequentes da hepatite E no homem, são indistinguíveis de outras enfermidades hepáticas e podem durar entre 1 a 6 semanas (WHO, 2017).

São raras as ocasiões que a hepatite E aguda se converte em hepatite fulminante com uma insuficiência hepática aguda, como ocorre em mulheres gestantes e que pode ser mortal. Mulheres grávidas no 2º ou 3º trimestre de gestação, apresentam maior risco de insuficiência hepática aguda. As taxas de letalidade variam de 20 a 25% e são registradas no 3º trimestre de gestação (WHO, 2017).

São descritos casos de HEV pelos genótipos 3 e 4 em pacientes imunodeprimidos, que são transplantados e em pacientes tratados com imunossupressores. Foram relatadas reinfecção pelo HEV em pacientes, identificando um aumento de IgG anti-HEV, que podem levar a cura ou a uma

infecção crônica dependendo das condições desses pacientes (DONNELLY et al., 2017; PROIETTO; LARSON, 2015).

A infecção por HEV também pode apresentar manifestações extra-hepáticas. Os dados *in vitro* identificaram que o HEV pode replicar em células não hepáticas, incluindo intestino humano. Manifestações neurológicas foram relatadas nos genótipos 1 e 3. O RNA de HEV foi encontrado no fluido cerebrospinal de pacientes com sintomas neurológicos durante a infecção por HEV. Na Holanda associou-se a síndrome de Guillain-Barré com infecção aguda por HEV. Outros distúrbios neurológicos relatados incluíram amiotrofia neurálgica, mielite reversa e paralisia dos nervos cranianos. Há também alguns casos de manifestações extra-hepáticas reconhecidas na infecção pelo HEV e foram insuficiência renal com crioglobulinemia, pancreatite, artrite e anormalidades hematológicas. (DONNELLY et al., 2017).

## **2.6. Lesões em suínos**

As lesões *post-mortem* de suínos infectados com HEV são mínimas, leves, e os animais que apresentaram lesões, geralmente, eram clinicamente normais (PROIETTO; LARSON, 2015). Os suínos infectados experimentalmente exibiram hiperplasia leve a moderada dos linfonodos hepáticos e mesentéricos de 7 a 55 dias após a infecção. A hiperplasia leve a moderada das placas de Peyer no íleo também foi relatada. A hepatite linfoplasmocitária multifocal com necrose hepatocelular focal, as vezes foi verificada. O inchaço e vacuolização hepática grave ocorreram entre 7<sup>o</sup> a 27<sup>o</sup> dias após a infecção. Pequenos infiltrados celulares linfocistocíticos subepiteliais na vesícula biliar foram documentados. Houveram relatos que três suínos inoculados por via intravenosa e necropsiados aos 14 dias após a infecção apresentaram lesões consistentes com o HEV. Nas amostras de fígado de apenas um dos suínos foi positiva para o RNA do HEV por RT-PCR, mas todas foram positivas nas amostras de bile (HALBUR et al., 2001; BOUWKNEGT et al., 2009).

Outro experimento mostrou que mais de 16% de suínos negativos para HEV por RT-PCR tiveram lesões hepáticas microscópicas consistentes com a infecção por HEV (DE DEUS et al., 2007).

## **2.7. Testes Diretos utilizados na detecção do HEV em suínos**

As amostras biológicas utilizadas para detecção do RNA viral são primeiramente as fezes, mas é possível identificá-lo a partir do soro, bile, linfonodos, fígado e fluidos orais, através das técnicas moleculares (DE DEUS et al., 2007). O RNA de HEV também foi identificado em fluidos orais de suínos infectados quando incubados por menos de 24 horas a 4°C e a 30 dias a -20°C (JONES; MUEHLHAUSER, 2014).

Entre os testes de biologia molecular utilizados para a detecção do material genético, a RT-PCR em tempo real utilizando sondas é o método que apresenta maior sensibilidade (JOTHIKUMAR et al., 2006).

O isolamento de HEV é difícil. O vírus dificilmente é cultivável em cultura celular (PROIETTO; LARSON, 2015). No entanto, as proteínas do cápsídeo recombinante podem ser expressas em *Escherichia coli*, clonadas com um gene de capsídeo e purificadas para hiperimunizar animais para diagnóstico (LEE et al., 2013). A imunohistoquímica tem sido usada para detectar antígenos HEV-3 nos tecidos e caracterizar o tipo e a gravidade do processo inflamatório, ligando-se aos receptores de superfície CD3 nas células imunitárias suínas. Os antígenos virais foram detectados usando soro hiperimune de coelho anti-HEV-3 com as proteínas do capsídeo recombinante (SCHLOSSER et al., 2014). A hibridação *in situ* fluorescente também foi usada para detectar RNA HEV nos tecidos (DE DEUS et al., 2007).

## **2.8. Testes indiretos para detecção do HEV em suínos**

O kit ELISA AntibodyCHECK® HEV Antibody usa antígenos HEV-1 e HEV-3 codificados por ORF-2 e ORF-3 para detectar anticorpos. A sensibilidade e especificidade do ELISA comercialmente disponível são maiores que 90% (O'CONNOR; ROCHE; SAMMIN, 2015). Outros testes experimentais do ELISA foram desenvolvidos com especificidade 95% e sensibilidade 97% usando antígenos de proteínas de capsídeo recombinante purificada, soro anti-HEV e IgG de coelho e anti-HEV suíno (LEE et al., 2013).

## **2.9. Imunidade pós exposição em suínos**

Os suínos infectados experimentalmente através do contato desenvolveram anticorpos anti-HEV em cerca de 13 dias. Aqueles inoculados intravenosamente desenvolvem anticorpos anti-HEV mais precocemente por volta de 12 dias. O vírus pode persistir no sangue por quase 11 dias. O RNA do HEV pode ser detectado em fezes cerca de 7 dias após a infecção e pode persistir por 23 dias (BOUWKNEGT et al., 2009).

Os anticorpos maternos de IgA, IgG e IgM foram detectados em suínos em fase de amamentação. Numa fazenda no nordeste da Espanha, verificou-se através de sorologia que 77% dos suínos (10/13) eram positivos para IgG e persistiam até as 9 semanas de idade. Em 8% (1/13) eram positivos para IgA e persistiam até 3 semanas de idade. Cerca de 15% (2/13) eram positivas para IgM e persistiram até menos de 12 semanas de idade. À medida que os anticorpos maternos diminuíram, esses suínos se tornaram naturalmente infectados. Os anticorpos IgG anti-HEV foram detectados por 15 semanas de idade e os animais positivos para IgG aumentaram até o término do estudo. Após a infecção natural, os anticorpos IgM

anti-HEV podem ser detectados por 5 a 7 semanas, enquanto os anticorpos IgA persistem por cerca de 4 semanas (DE DEUS et al., 2008).

### **2.10. Proteção cruzada**

Foram encontrados epítomos antigênicos comuns entre os vírus da hepatite E humanos e aviários e a proteção cruzada ocorre em primatas após a infecção com diferentes genótipos (MENG, 2011). Os anticorpos anti-HEV-1 induzidos por vacina mostraram ser altamente protetores cruzados com o HEV-4 em coelhos (LIU et al., 2014; SRIDHAR; LAU; WOO, 2015).

Um único suíno pode se infectar com outras variações genômicas de HEV, não simultaneamente, durante a sua vida, provavelmente devido ao movimento para diferentes instalações de habitação, dependendo da idade e da fase de produção (DE DEUS et al., 2008).

### **2.11. Prevenção e Controle em suínos**

Existe preocupação sobre a potencial transmissão do HEV através de pulverização de plasma suíno seco nos EUA. O uso desse produto na alimentação como suplemento alimentar em suínos pós-desmame não aumentou o risco de transmissão do HEV. Quase 100% do plasma suíno seco por pulverização disponível no mercado contém anticorpos anti-HEV enquanto apenas 22% eram positivos para o RNA do HEV por RT-PCR. O processo de aquecimento da secagem por pulverização deve inativar o HEV (PUJOLS et al., 2014).

Devido a sua ubiquidade e dificuldade de detecção clínica, a prevenção da HEV pode ser difícil. Devem existir medidas padrão de biossegurança, tais como limpeza e desinfecção regulares de pocilgas. As fezes devem ser removidas das



canaletas para evitar a contaminação. O aumento do diagnóstico, especialmente em suínos em terminação, pode facilitar a prevenir a transmissão zoonótica do HEV transmitida por alimentos. A carne suína deve ser cozida completamente a 71°C (160°F) durante 20 minutos em áreas endêmicas (PEREZ-GRACIA et al., 2015).

Um desafio em coelhos usando coelho-HEV-4 e suíno-HEV-4 após imunização com *HEV 239* descobriu que a vacina era altamente imunogênica em coelhos e preveniu a doença em todos os coelhos inoculados. Os animais foram inoculados três vezes em intervalos de duas semanas. A primeira imunização produziu títulos adequados para serem protetores. Nenhum dos coelhos imunizados apresentaram viremia, disseminação fecal ou aumento nos níveis séricos de ALT. Resultados semelhantes foram relatados a partir de um desafio usando camundongos e macacos rhesus, onde foi observado que a vacina *HEV 239* forneceu proteção em animais quando desafiados com diferentes genótipos, podendo ser usada para reduzir a transmissão zoonótica do HEV (LI et al., 2005; LIU et al., 2014).

A vacina *HEV 239* não foi avaliada em suínos.(PROIETTO; LARSON, 2015).

Não há tratamentos veterinários aprovados para infecções HEV em suínos. Atualmente não há disponível uma vacina comercial aprovada para prevenção do HEV 3 e 4 em suínos.(PROIETTO; LARSON, 2015).

## **2.12. Controle e prevenção do HEV em humanos**

Uma vacina de polipeptídeo expressa por bactéria recombinante humano com base em ORF2 de HEV-1, denominada *HEV 239*, é a primeira vacina comercial contra a infecção pelo HEV, aprovada pela Administração de Alimentos e Medicamentos do Estado da China em dezembro de 2011. O polipeptídeo com forma e aparência de uma partícula viral, apresentando epítomos imunogênicos na sua superfície, o qual garante a eficiência da vacina com respostas imunológicas. Verificou-se que a vacina mostrou 100% de eficácia protetora em homens e

mulheres entre 16 a 65 anos de idade e sem nenhum efeito colateral inesperado. Desconhece se a vacina *HEV 239* também protege contra HEV-3. (LIU et al., 2014).

Para o tratamento em humanos infectados pelo HEV são utilizadas terapias anti-virais como interferon peguilado e ribavirina. Para pacientes com hepatite E crônica (genótipo 3) que são transplantados, ou infectados pelo HIV, ou possuem desordens hematológicas devido a quimioterapia, recomenda-se reduzir a imunossupressão (KAMAR et al., 2014).

Para prevenção do HEV 1 e 2 em nível populacional, deve-se manter a qualidade dos sistemas públicos de fornecimento de água e estabelecer sistemas adequados de eliminação de fezes humanas através de saneamento básico (WHO, 2017).

A inspeção sanitária nos abatedouros é de fundamental importância para evitar a elaboração de carnes com presença de contaminações gastrointestinais, através de refile e condenação parcial ou total de carcaças que possam promover a disseminação de doenças transmitidas por alimentos e também doenças e lesões patológicas nos suínos imputáveis a zoonoses (BRASIL, 2017b).

As ações preventivas em abatedouros de suínos devem ser direcionadas em implantações e implementações de requisitos em boas práticas de fabricação, a fim de evitar contaminação cruzada por fezes durante a produção. Os procedimentos padrão de higiene operacional (PPHO) priorizam a higienização industrial de superfícies de contato em equipamentos e utensílios utilizados no elaboração de carnes. Os procedimentos sanitários das operações (PSO), direcionam as ações a fim de evitar contaminações dos produtos desde antes da insensibilização até a expedição de produtos, como a lavagem e banhos de aspersion em suínos nas pocilgas e rampas de acesso a insensibilização, para retirar as sujidades na superfície da pele, escaldagem dos suínos, chamuscamento, oclusão do reto, abertura pré-torácica e abdominal, eventração, evisceração, trocas e esterilizações regulares de facas. A análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) é um programa de autocontrole fundamental para minizar os perigos biológicos,

físicos e químicos. Neste caso, associados a contaminações gastrointestinais, por exemplo, o ponto crítico de controle biológico, reduzem ao máximo a contaminação, através de refile e condenação da parte contaminada, possibilitando a produção de alimentos inócuos ao consumidor (BRASIL, 2017b).

Em relação à prevenção do HEV em nível individual, pode-se diminuir o risco de infecção através de adoção de práticas higiênicas como lavagem das mãos com água salubre, sobretudo antes de manipular alimentos. Deve-se evitar a ingestão de água ou gelo de pureza desconhecida. Observar as práticas recomendadas pela OMS, cozinhando os alimentos adequadamente, principalmente as carnes de suínos, para garantir a inocuidade dos alimentos (WHO, 2017).

### **3. OBJETIVOS**

Tendo em vista a importância dos suínos como fonte de proteína animal na alimentação humana e o papel desses animais como reservatórios do agente viral, o presente trabalho teve como objetivo:

#### **3.1 Geral:**

Verificar a prevalência de hepatite E em suínos abatidos sob inspeção sanitária em matadouro-frigorífico localizado em Cerqueira César-SP.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Coleta das amostras**

Para estimar uma prevalência suposta de 10% com base em uma média de HEV pesquisada em trabalhos nos estados do Paraná, Pará, Mato Grosso e Rio de Janeiro (DOS SANTOS et al., 2009; SOUZA, 2011; GARDINALI et al., 2012b), com uma margem de erro de mais ou menos 5%, chegou-se ao plano amostral onde foram coletadas 140 amostras de fezes de suínos de, aproximadamente, 150 dias de idade, oriundos de 10 propriedades de terminação de suínos, sendo 7 propriedades localizadas no Estado de São Paulo e 3 propriedades em Santa Catarina, abatidos em um frigorífico localizado em Cerqueira César-SP, sob inspeção sanitária permanente, durante o período de agosto a outubro de 2016. O cálculo do tamanho no número de amostras foi realizado com o programa OpenEpi® (SULLIVAN; DEAN, 2009). A prevalência do HEV em suínos foi estimada com respectivo intervalo de confiança de 95%.

As 140 amostras foram oriundas de 10 propriedades distintas de granjas tecnificadas de suínos terminadores (14 amostras por granja), discriminadas a seguir:

- 1º Lote, propriedade A, localizada em Taguaí-SP;
- 2º Lote, propriedade B, localizada em Agudos-SP;
- 3º Lote, propriedade C, localizada em Itu-SP;
- 4º Lote, propriedade D, localizada em Cerqueira César-SP;
- 5º Lote, propriedade E, localizada em Bom Jesus-SC;
- 6º Lote, propriedade F, localizada em Iaras-SP;
- 7º Lote, propriedade G, localizada em Cerqueira César-SP;
- 8º Lote, propriedade H, localizada em Seara-SC;
- 9º Lote, propriedade I, localizada em Ipumirim-SC;
- 10º Lote, propriedade J, localizada em Cerqueira César-SP.

No momento da colheita, verificou-se os fígados dos suínos a partir dos quais as amostras foram coletadas, não apresentavam lesões macroscópicas na inspeção sanitária *post mortem*.

As amostras de aproximadamente 5 gramas de fezes foram coletadas através de corte no final do reto, na linha de inspeção sanitária, com lâminas de bisturi estéril e espátulas de coletas de fezes, individualmente para cada suíno. A colheita foi realizada de modo a evitar possível contaminação cruzada das mesmas. Todo material biológico foi congelado a  $-22^{\circ}\text{C}$  e permaneceu armazenado a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior análise no laboratório de zoonoses bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Universidade de São Paulo (USP).

#### **4.2. Preparo da amostra - Clarificação.**

Para a clarificação das amostras, as mesmas foram descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizadas individualmente com o auxílio de uma espátula plástica e 500  $\mu\text{L}$  foram aliqüotados em um microtubo (Eppendorf®). Em seguida, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de água dietilpirocarbonato (DEPC), sendo realizada a homogeneização em vórtex e centrifugação a 12.000x g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3. Controle positivo**

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

O presente estudo foi desenvolvido de acordo com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FMVZ/UNESP de Botucatu-SP e as atividades

desenvolvidas obedeceram aos pré-requisitos de ética e bem estar animal desta comissão.

#### **4.4. Extração de material genético e realização de cDNA complementar**

Após clarificação das fezes, 750  $\mu$ L de Trizol® (*Life Technologies*) foram adicionados à 250  $\mu$ L da suspensão de fezes, sendo o material incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio e o microtubo foi agitado vigorosamente, incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000xg durante 5 minutos a 4°C.

A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, sendo a seguir adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol gelado, permanecendo a -20°C por 10 minutos; a seguir o material foi centrifugado por 12000xg/10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1mL de etanol a 75%. Descartou-se novamente o sobrenadante e o pellet foi seco em temperatura ambiente por inversão dos tubos e, então, suspenso em 20  $\mu$ L de água DEPC.

O cDNA complementar foi obtido com *primers* randômicos (Promega) e enzima MMLV® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.5. Detecção de ORF-1 do HEV**

##### **4.5.1. PCR**

Foi realizada a amplificação direcionada a ORF-1 do vírus da hepatite E utilizando *primers* desenhados por (Wang et. al 1999).

Num volume final de 25  $\mu$ L, foram adicionados 2,5  $\mu$ L de cDNA, 12,5  $\mu$ L 2x Master Mix Green, 1,0 $\mu$ L Primer senso a 10mM (ORF1-F1 forward 5'

CTGGCATYACTACTGCYATTGAGC 3'), 1,0 µL Primer antisenso a 10Mm (ORF1-F2 forward 5' CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC 3') e 8 µL água DEPC.

#### **4.5.2 Condição de amplificação**

As amostras sofreram uma desnaturação inicial de 4 minutos à 95°C, seguida de 40 ciclos de 95°C/15 seg. 55°C/ 20 seg. e 72°C/ 30 seg. seguida de uma extensão final de 72°C/5min.

#### **4.5.3 Protocolo Nested RT-PCR para HEV**

Num volume final de 25 µL, foi adicionado 1,0 µL do amplicon proveniente da RT-PCR, 12,5 µL 2x Master Mix Green, 1,0µL Primer senso a 10mM (ORF1-R1 reverse 5' CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG 3'), 1,0 µL Primer antisenso a 10Mm (ORF1-R2 reverse 5' GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC 3') e 9,5 µL água DEPC.

As condições de amplificação foram as mesmas anteriormente descritas.

#### **4.5.4. Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos amplificados gerados foram analisados através de eletroforese, em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,045M Tris-Borato, 1mM EDTA). A corrida foi realizada numa voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10 V/cm<sup>2</sup> de gel).

A visualização dos fragmentos amplificados de 287 pb foi realizada por meio de transiluminada do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de 2µl de Sybr safe®. A dimensão dos fragmentos foi comparada a um padrão de tamanho molecular de 50 pb, que foi disposto no gel, juntamente com as amostras analisadas

a cada corrida eletroforética. O gel foi fotografado para demonstração neste trabalho (figura 2).

#### **4.6. Genotipagem das amostras**

Os produtos amplificados a partir do fragmento parcial da ORF-1 foram sequenciados utilizando-se o kit BigDyeTerminator™ (Life Technologies, EUA) com um sequenciador automático (ABI modelo 3031, Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram montadas com o auxílio dos programas PHRED e CAP3 (<http://www.biomol.unb.br/phph/>). As sequências derivadas foram alinhadas usando o programa BioEdit v 7.0.5 (HALL, 2011), comparadas com as disponíveis no GenBank e a análise filogenética foi realizada com o pacote computacional Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013) sem a utilização de grupo externo.

### **5. RESULTADOS**

Após a realização da Nested RT PCR para HEV e a visualização da corrida eletroforética em gel de agarose das 140 amostras de fezes de suínos, na qual foram identificadas duas amostras positivas (2/140). As amostras positivas foram da propriedade C localizada em Itu-SP e de propriedade D localizada em Cerqueira César-SP, demonstrando uma prevalência para este trabalho de 1,42%. Através da reconstrução filogenética (dados não mostrados) foi observado que o HEV pertencia ao genótipo 3.



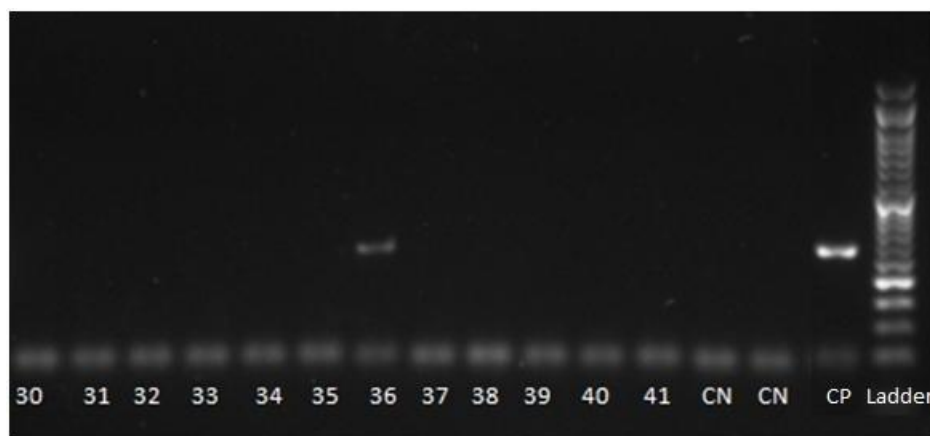


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose – amostra nº 36 positiva com 287 pb; CN – controle negativo; CP – controle positivo; ladder com 50 pb.

## 6. DISCUSSÃO

Através do presente trabalho foi possível identificar o HEV em duas amostras de fezes de suínos infectados, aparentemente saudáveis nos exames *ante* e *post mortem* que foram abatidos em estabelecimento sob inspeção sanitária. A porcentagem de suínos positivos através de análises de *Nested* RT-PCR permitiu avaliar os dados epidemiológicos do HEV, cotejando informações deste trabalho com de outros autores no Brasil e no mundo, comparando prevalências e genótipos.

Os resultados deste trabalho demonstraram um risco baixo, porém, não desprezível para o estado sanitário de suínos infectados com HEV, procedentes de granjas tecnificadas, controladas sanitariamente e enviados ao abate em estabelecimento com inspeção sanitária permanente.

A prevalência encontrada neste trabalho foi de 1,4% e considerada baixa em comparação a outras pesquisas realizadas nos diversos estados e regiões brasileiras, o qual o HEV nos suínos é considerada endêmica, porém pouco estudada pelas dimensões do país e subdiagnosticada em humanos e animais. Um

estudo no sul do estado do Paraná, identificou alta prevalência de HEV, 20%, em 170 fezes de suínos, demonstrando um aumento na prevalência comparada à estudos relatados anteriormente no Brasil. Souza et al 2012 investigou amostras de soro, bile e fezes de 151 suínos no leste da Amazônia, no norte do Brasil, identificando RNA do HEV em 9,9% dos animais (PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017).

No estado do Paraná, realizou-se um estudo para detecção do HEV em amostras de fígado e bile em 118 suínos adultos assintomáticos abatidos em matadouro. Foi utilizada a técnica molecular de RT-PCR e o RNA do HEV identificado em duas amostras de fígado (1,7%) e uma amostra de bile (0,84%), pertencente ao genótipo 3b de acordo com as sequências nucleotídicas. Esses dados sugerem que suínos saudáveis aparentemente, podem ser uma fonte de infecção de HEV para consumidores de fígado suíno e trabalhadores de matadouros no Brasil (GARDINALI et al., 2012a).

Em um outro estudo no oeste do estado do Paraná, foram coletadas 170 amostras de fezes de suínos de várias categorias (matrizes reprodutoras, leitões em amamentação, suínos desmamados, em crescimento) de 14 granjas de suínos. Realizaram RT-PCR e identificaram na triagem o RNA do HEV em 62,5% das granjas de suínos e em 15,3% das amostras de fezes. Em 15 amostras fecais foi possível amplificar o RNA do HEV-suína agrupadas com o genótipo 3b, o mesmo genótipo descrito em seres humanos no Brasil (GARDINALI et al., 2012b).

A maior taxa de infecção de suínos observada pode ser resultado das condições sanitárias das fazendas de pequena escala, onde ocorrem o contato de suínos de diferentes idades e *status* sanitários diferentes. As infecções por HEV em suínos eram mais freqüentes de 12 a 16 semanas de idade e que, na idade de abate (20-24 semanas), os animais já desenvolveram anticorpos anti-HEV. Verificaram que o RNA do HEV foi mais freqüente em suínos de 10 semanas (40,6 %), embora a freqüência em suínos com 13 semanas ainda estivesse alta (20,8%). No entanto, nenhuma das amostras dos suínos com idade entre 4 ou 16 semanas foram

positivas. Essas observações corroboram um estudo realizado entre os rebanhos de suínos no Rio de Janeiro, no Sudeste do Brasil, mostrando que os suínos recém-nascidos se tornaram suscetíveis à HEV entre as semanas 7 e 9, uma idade em que os níveis séricos dos anticorpos maternos diminuíram. Esses resultados também estão de acordo com pesquisas realizadas no Brasil Central em suínos de 20 a 30 semanas, com 81% de positividade anti-IgG de HEV ( GUIMARÃES et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2009; PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017).

No entanto, as diferenças nas prevalências de positividade para HEV podem ser devido à diferença de metodologia, já que alguns estudos empregaram técnicas convencionais de RT-PCR em oposição à RT-PCR de tempo real mais sensível. Além disso, a técnica de RT-PCR duplex, demonstrou que é 34 vezes mais sensível que a RT-PCR de tempo real, pois usando mais de um conjunto de primers e sondas para aumenta a detecção do HEV durante a triagem (GERBER et al., 2014; PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017).

Portanto, verificou-se neste trabalho, que os dados de prevalências do HEV em suínos são oscilantes e possuem diversas variáveis que alteram tais índices. Conforme as várias pesquisas de referências bibliográficas estudadas, podemos supor que as prevalências do HEV variam devido as técnicas moleculares e sorológicas utilizadas nos experimentos, idade dos animais, diferentes sistemas de criação, manejos sanitários, alimentares e operacionais.

A análise filogenética com a sequência obtida a partir dos produtos amplificados revelou que o HEV isolado pertencia ao genótipo 3, comumente detectado em suínos infectados no Brasil, portanto não alterando os dados epidemiológicos em relação ao genótipo do HEV.

No estado do Rio de Janeiro, considerada área não endêmica, foi realizado uma pesquisa sobre soroprevalência de HEV em diferentes espécies animais sugerindo a infecção zoonótica. Foi detectada IgG anti-HEV em bovinos (1,42%), cães (6,97%), frango de corte (20%), suínos (24,3%), roedores (50%) e manipuladores de suínos nas granjas (6,3%). Além de detectar anticorpos anti-HEV

em várias espécies animais, os resultados demonstraram que a infecção suína pelo HEV parece ser universal dentro da população suína brasileira (VITRAL et al., 2005).

Algumas trabalhos no Brasil revelaram a soroprevalência de HEV em diferentes grupos populacionais como em mineiros na Bacia Amazônica com 6,1%, em pacientes submetidos a hemodiálise em São Paulo apresentaram prevalência de 4,9%, em 2% dos doadores de sangue e 29% de pacientes com hepatite viral aguda em Salvador-Bahia (DOS SANTOS; DE OLIVEIRA-FILHO; PINTO, 2013).

Entre 1999 a 2011 foram registrados 967 casos de HEV na população brasileira e desse total acumulado, 48,6% (470 pessoas) foram notificados nas unidades de saúde pública na região Sudeste. Os óbitos pelo HEV registrados nesse período foram de 51 indivíduos. Os dados epidemiológicos nos anos de 2012 a 2017 não foram notificados, sugerindo uma ausência errônea da doença. O Ministério da Saúde deveria implantar ações a fim de diagnosticar o HEV na população brasileira e impor medidas sanitárias com relação a este agente (BRASIL, 2017a).

A epidemiologia do HEV na América do Sul parece ser complexa e a soroprevalência em humanos e suínos difere muito entre populações dentro de mesmos países e quanto de outros países. O genótipo 3 é o mais comumente detectado e caracterizado molecularmente na América do Sul. Além disso, na Venezuela, ocorreram duas variantes isoladas de casos autóctones de hepatite E aguda que pertenciam ao genótipo 1 (MIRAZO; RAMOS; ARBIZA, 2012).

O HEV é considerado hiperendêmico em muitos países em desenvolvimento, com Índia, China, Bangladesh Egito e México. As prevalências chegam em torno de 25% dos casos de hepatite aguda não-A e não-B. O HEV é considerado endêmico onde existe uma prevalência menor de 25% de todas os casos de hepatites agudas não-A e não-B, os quais incluem grande parte da Europa Ocidental, Estados Unidos, Nova Zelândia, muitos países da América do Sul, grande parte da Ásia e Oriente Médio (TEO, 2009; PEREZ-GRACIA et al., 2015).

As tendências no mundo apontam uma contínua alta na infecção de HEV e na soroprevalência anti-HEV, provavelmente devido ao aumento de interesse em pesquisas e esforços em vigilâncias, além de aumentar o conhecimento nos reservatórios e hospedeiros animais. (MENG, 2010; MANSUY et al., 2011).

No Japão, três casos de hepatite E foram associados ao consumo de carne suína mal cozida ou crua presumivelmente a partir do mesmo restaurante. Nove dos dez casos clínicos de hepatite E de 2001 a 2002 tiveram uma história de consumo de carne de suína pouco cozida 2 a 8 semanas antes do início dos sinais clínicos e 1,9% dos fígados de suíno testados em mantimentos locais em Hokkaido, Japão, foram positivos para Genótipo 3 ou 4 de HEV. Os casos de hepatite E no Japão também foram ligados ao consumo de carne de javali contaminado. As populações de javali na Itália e no Sudeste da França apresentaram níveis detectáveis de RNA de HEV em 2,5% de amostras de fígado e 25% de amostras de bile, respectivamente. O consumo de carne de javali foi associado à infecção HEV em um estudo caso-controle na Alemanha. Casos de hepatite E aguda associada ao HEV genótipo 4 foram confirmados na Coréia do Sul, presumivelmente devido ao consumo de suco de bile de javali cru selvagem. Pacientes humanos com infecção hepática aguda na França foram ligados ao consumo de linguiça de figatellu (prato de fígado de suíno cru). As sequências HEV recuperadas dos produtos figatellu em mercearias locais eram essencialmente indistinguíveis das seqüências virais recuperadas dos pacientes humanos, fornecendo evidências para a transmissão do HEV por alimentos. O HEV presente na linguiça de fígado de suíno de fabricantes na França mostrou ser infeccioso utilizando um sistema de cultura celular 3D HEV (YAZAKI et al., 2003; MIYASHITA et al., 2012).

Devido a importância na transmissão zoonótica do HEV-3 e alta prevalência no Brasil, devem ser alavancados estudos sobre a prevalência e infectividade do HEV em produtos cárneos suínos que passam por processos industriais e tecnológicos de defumação, maturação, dessecação, fermentação, curados e não cozidos, como por exemplo, presuntos crus, copa e salames (PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017).

Os casos de hepatite E, genótipo 3, transmitidos por alimentos em seres humanos são cada vez mais comuns e provavelmente subestimados na comunidade médica. Casos esporádicos e aglomerados de hepatite E ocorrem após o consumo de carnes animais mal cozidas ou cruas. Há necessidade de implantar estratégias em saúde pública para diagnosticar, estimar a real incidência, prevalência de HEV, dados epidemiológicos (genótipos e subgenótipos) nos diversos estados, regiões brasileiras e no mundo para melhorar a compreensão e gerenciamento do problema (YUGO; MENG, 2013). A prevenção da transmissão HEV transmitida por alimentos depende de evitar o consumo de carnes animais mal cozidas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, seguindo boas práticas de higiene e a consciência de riscos aumentados ao viajar para regiões endêmicas ou hiperendêmicas do mundo (WHO, 2017).

Apesar do risco claro, estratégias de prevenção atualmente são minimamente implementadas. Uma vacina contra HEV recentemente ficou disponível na China, com proteção contra o HEV 1 e 4. A vigilância, vacinação, tratamento de esgoto e fontes de água e educação pública ajudarão a prevenir endemias e epidemias atuais e futuras, reduzindo a contaminação humana. O desenvolvimento de uma vacina contra o HEV-3 reduziria os casos de infecção pelo consumo de carnes e pelo contato de animais, suínos e seres humanos, além de diminuir a propagação do vírus entre espécies animais (YUGO; MENG, 2013).

Nos países industrializados, onde as transmissões zoonóticas podem ser a principal via de infecção por hepatite E, os consumidores de carne crua ou pouco cozida devem estar conscientes do risco potencial. Outras populações em risco, como mulheres grávidas, receptores de transplantes e indivíduos com condições hepáticas subjacentes, devem ser informados sobre o possível risco de consumir carne suína crua, veado ou carne de javali ou contato com suínos infectados. As carnes de suínos nessas áreas devem ser cozidas rigorosamente (71°C / 20 min) e devem ser tomadas medidas de segurança adequadas durante o armazenamento, manuseio e preparação de carne suína não cozida (BARNAUD et al., 2012).

Estudos indicam que o HEV pode permanecer infeccioso em carnes quando cozidas à 71°C por 5 minutos, e se os títulos virais forem altos antes do cozimento. O HEV também pode resistir em carnes armazenadas a 4°C e a -20°C, temperaturas estas comumente utilizadas em refrigeração e congelamento destes produtos. Foi evidenciado que o cloro tem efeito sobre a infecciosidade do HEV, mas as condições de desinfecção com o cloro precisam ser mais estudadas para elucidar sua viabilidade na prática (COOK; VAN DER POEL, 2015).

A inspeção sanitária de carnes, por ser macroscópica, possui procedimentos operacionais e normativos bem definidos para coibir algumas zoonoses em carnes de suínos, porém não pode-se desprezar os perigos microscópicos causados pelo HEV. Portanto, há necessidade em mencionar nas rotulagens de carnes suínas, informes relevantes e em destaque, sobre a necessidade de cozimento adequado minimizando os riscos do HEV na saúde pública (BRASIL, 2017b).

Manipuladores de suínos, veterinários e magarefes de frigoríficos expostos ao HEV devem tomar medidas higiênicas após manusear animais e vísceras, principalmente de suínos, uma vez que o HEV parece ser muito contagioso nesses animais. Investigações devem ser realizadas para determinar quais procedimentos de biossegurança preventiva limitariam a disseminação do HEV. Medidas de bioseguridades nas criações de suínos são extremamente úteis a fim de evitar as infecções de animais e contaminação de rios e córregos através dos efluentes (PEREZ-GRACIA et al., 2015).

Outro método de prevenção é melhorar a vigilância estratégica na importação comercial de suínos. Em 2011, um vírus do genótipo 4 foi isolado em suínos na Europa, que comumente identifica o genótipo 3. São necessárias investigações sobre a origem desse genótipo na Europa. Uma vez que os suínos representam um grande reservatório de HEV em regiões não endêmicas e são provavelmente uma fonte de infecção para casos esporádicos de hepatite E aguda. A vigilância de suínos, juntamente com os reservatórios de javali e cervo, deve ser realizada e direcionada nas rotas identificadas de exposição humana ao HEV. Há necessidade

em abranger no Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, recomendações sanitárias sobre o vírus da hepatite E em suídeos e produtos cárneos de suídeos (PEREZ-GRACIA et al., 2015).

## **7. CONCLUSÃO**

Foi possível detectar o HEV em amostras de fezes de suínos infectados, oriundos de granjas tecnificadas e controladas sanitariamente, aparentemente sadios nos exames *ante* e *post mortem*, abatidos em estabelecimento localizado no município de Cerqueira César no estado de São Paulo, sob inspeção sanitária Federal permanente.

A presença de HEV-3 nas amostras demonstra os perigos potenciais na transmissão zoonótica com suas consequências em saúde pública e indica que devem ser tomadas medidas de segurança para prevenir infecções pelo HEV, tanto para a manipulação desses animais como para o consumo de carne suína crua ou mal passada.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, R.; NAIK, S. Epidemiology of hepatitis E: current status. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 24, n. 9, p. 1484–1493, 2009.

AGRAWAL, S.; GUPTA, D.; PANDA, S. K. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). **Virology**, v. 282, n. 1, p. 87–101, 2001.

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

AHN, J. M. et al. Identification of novel human hepatitis E virus (HEV) isolates and determination of the seroprevalence of HEV in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3042–3048, 2005.

ANDRAUD, M. et al. Direct contact and environmental contaminations are responsible for HEV transmission in pigs. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 1, 2013.

ARANKALLE, V. A. et al. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 8, n. 3, p. 223–227, 2001.

BALAYAN, M. S. et al. Evidence for a virus in Non-A, Non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. **Intervirolgy**, v. 20, n. 1, p. 23–31, 1983.

BALAYAN, M. S. et al. Experimental hepatitis E infection in domestic pigs. **Journal of Medical Virology**, v. 32, n. 1, p. 58–59, 1990.

BARNAUD, E. et al. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5153–5159, 2012.

BILLAM, P. et al. Development and validation of a negative-strand-specific reverse transcription-PCR assay for detection of a chicken strain of hepatitis E virus: Identification of nonliver replication sites. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46,

n. 8, p. 2630–2634, 2008.

BOUAMRA, Y. et al. Emergence of autochthonous infections with hepatitis E virus of genotype 4 in Europe. **Intervirology**, v. 57, n. 1, p. 43–48, 2013.

BOUWKNEGT, M. et al. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 1, p. 7, 2009.

BRADLEY, D. W. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. **British Medical Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 442-461, 1990. Review.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Hepatite E**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-sao-hepatites/hepatite-e>>. Acesso em: 02 jul. 2017a.

BRASIL. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 2017. Seção 1, p. 03b.

CAO, D.; MENG, X.-J. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 1, n. 8, p. e17, 2012.

CLEMENTE-CASARES, P. et al. Hepatitis E Virus in Industrialized Countries: The Silent Threat. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–17, 2016.

COOK, N.; VAN DER POEL, W. H. M. Survival and Elimination of Hepatitis E Virus: A Review. **Food and Environmental Virology**, v. 7, n. 3, p. 189–194, 2015.

DE DEUS, N. et al. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 2–4, p. 105–114, 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, n. 1–2, p. 19–28, 2008.

DONNELLY, M. C. et al. Review article: hepatitis E—a concise review of virology, epidemiology, clinical presentation and therapy. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 46, n. 2, p. 126–141, 2017.

DOS SANTOS, D. R. L. et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 3, p. 474–480, 2009.

DOS SANTOS, D. L.; DE OLIVEIRA-FILHO, E. F.; PINTO, M. A. Hepatite E no Brasil e no Mundo: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 416–433, 2013.

DUCANCELLE, A. et al. Intrafamilial hepatitis E in France. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 1, p. 51–53, 2007.

ECHEVARRÍA, J. M.; FOGEDA, M.; AVELLÓN, A. Diagnosis of acute hepatitis E by antibody and molecular testing: A study on 277 suspected cases. **Journal of Clinical Virology**, v. 50, n. 1, p. 69–71, 2011.

EMERSON, S. U.; PURCELL, R. H. Hepatitis E virus. **Rev. Medical Virology**, v. 13, p. 145–154, 2003.

EMERSON, S. U.; ARANKALLE, V. A.; PURCELL, R. H. Thermal stability of hepatitis E virus. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 5, p. 930–933, 2005.

FAVOROV, M. O. et al. Prevalence of Antibody to Hepatitis E Virus among Rodents in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. July 1999, p. 449–55, 2000.

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. 1–2, p. 32–37, 2008.

GALIANA, C.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S.; PÉREZ-GRACIA, M. T. Prevalencia del virus de la hepatitis E (VHE) y factores de riesgo en trabajadores de explotaciones porcinas y donantes voluntarios. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**

**Clínica**, v. 28, n. 9, p. 602–607, 2010.

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, n. 3, p. 1515–1519, 2012a.

GARDINALI, N. R. et al. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 935–939, 2012b.

GENG, J. et al. Potential risk of zoonotic transmission from young swine to human: Seroepidemiological and genetic characterization of hepatitis e virus in human and various animals in Beijing, China. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 10, 2011.

GERBER, P. F. et al. Comparison of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection of Swine Hepatitis E Virus in Fecal Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1045–1051, 2014.

GUIMARÃES, F. R. et al. Hepatitis E virus antibodies in swine herds of Mato Grosso State, Central Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 223–226, 2005.

GUU, T. S. Y. et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 12992–12997, 2009.

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, n. 3, p. 918–923, 2001.

HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 60–61, 2011.

HAQSHENAS, G. et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly

syndrome in the United States. **The Journal of general virology**, v. 82, n. Pt 10, p. 2449–2462, 2001.

HARTL, J. et al. Hepatitis E seroprevalence in Europe: A meta-analysis. **Viruses**, v. 8, n. 8, 2016.

HEWITT, P. E. et al. Hepatitis e virus in blood components: A prevalence and transmission study in southeast England. **The Lancet**, v. 384, n. 9956, p. 1766–1773, 2014.

HSIEH, S. Y. et al. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with taiwan isolates of human hepatitis E virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 3828–3834, 1999.

HUANG, F. F. et al. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 6, p. 1609–1618, 2004.

IJAZ, S. et al. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 7, p. 1166–1172, 2005.

JONES, T. H.; MUEHLHAUSER, V. Effect of handling and storage conditions and stabilizing agent on the recovery of viral RNA from oral fluid of pigs. **Journal of Virological Methods**, v. 198, p. 26–31, 2014.

JOTHIKUMAR, N. et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. **Journal of Virological Methods**, v. 131, n. 1, p. 65–71, 2006.

KABRANE-LAZIZI, Y. et al. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 2, p. 331–335, 1999.

KAMAR, N. et al. Hepatitis E virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 116–138, 2014.

KHUROO, M. S. Chronic liver disease after non-A, non-B hepatitis. **Lancet**, v. 2, n. 8199, p. 860–861, 1980.

KHUROO, M. S.; KHUROO, M. S. Hepatitis E: An emerging global disease - From discovery towards control and cure. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 23, n. 2, p. 68–79, 2015.

KOONIN, E. V et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 17, p. 8259–8263, 1992.

KORKAYA, H. et al. The ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Binds to Src Homology 3 Domains and Activates MAPK. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 42389–42400, 2001.

KRAIN, L. J. et al. Fetal and Neonatal Health Consequences of Vertically Transmitted Hepatitis E Virus Infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p. 365–370, 2014.

KUMAR, S. et al. Hepatitis E virus: The current scenario. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e228–e233, 2013.

LEE, W. J. et al. Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-IgG against swine hepatitis E virus. **Journal of Veterinary Science**, v. 14, n. 4, p. 467–472, 2013.

LI, S. W. et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: Antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. **Vaccine**, v. 23, n. 22, p. 2893–2901, 2005.

LI, W. et al. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 275–280, 2013.

LIU, P. et al. Management of Hepatitis E Virus (HEV) zoonotic transmission:

Protection of rabbits against HEV challenge following immunization with HEV 239 vaccine. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

LU, L.; LI, C.; HAGEDORN, C. H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. **Reviews in Medical Virology**, v. 16, n. 1, p. 5–36, 2006.

MANSUY, J.-M. et al. Hepatitis E Virus Antibodies in Blood Donors, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 2309–2312, 2011.

MENG, X. J. et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 18, p. 9860–9865, 1997.

MENG, X. J. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 256–265, 2010.

MENG, X. J. From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. **Virus Research**, v. 161, n. 1, p. 23–30, 2011.

MENG, X.-J. Expanding Host Range and Cross-Species Infection of Hepatitis E Virus. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 8, p. 1–6, 2016.

MIRAZO, S.; RAMOS, N.; ARBIZA, J. Molecular Epidemiology of Hepatitis E Virus (Hev) in South America: Current Status. **VIRUS Reviews & Research**, v. 17, n. 1–2, 2012.

MIYASHITA, K. et al. Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. **Hepatology Research**, v. 42, n. 9, p. 870–878, 2012.

MUSHAHWAR ISA K. Hepatitis E Virus: Molecular Virology, Clinical Features, Diagnosis, Transmission, Epidemiology, and Prevention. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 646–658, 2008.

NAGASHIMA, S. et al. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein

sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 12, p. 2838–2848, 2011.

NAMSAI, A. et al. Surveillance of hepatitis A and E viruses contamination in shellfish in Thailand. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 608–613, 2011.

O 'CONNOR, M.; ROCHE, S.-J.; SAMMIN, D. Seroprevalence of Hepatitis E virus infection in the Irish pig population. **Irish Veterinary Journal**, v. 68, n. 8, p. 1–2, 2015.

OKAMOTO, H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. **Virus Research**, v. 127, n. 2, p. 216–228, 2007.

PAIVA, H. H. et al. Molecular characterization of swine hepatitis E virus from Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 693–698, 2007.

PASSOS-CASTILHO, A. M.; GRANATO, C. F. H. High frequency of hepatitis E virus infection in swine from South Brazil and close similarity to human HEV isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 373–379, 2017.

PATRA, S. et al. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. **Annals of internal medicine**, v. 147, n. 1, p. 28–33, 2007.

PAVIO, N.; MENG, X.; RENO, C. Review article Zoonotic Hepatitis E : Animal reservoirs and emerging risks. **Molecular Medicine**, n. November 2009, p. 1–29, 2010.

PAVIO, N.; MENG, X. J.; DOCEUL, V. Zoonotic origin of hepatitis e. **Current Opinion in Virology**, v. 10, n. February, p. 34–41, 2015.

PEREZ-GRACIA, M. T. et al. Current Knowledge on Hepatitis E. **Journal of clinical and translational hepatology**, v. 3, n. 2, p. 117–126, 2015.

PIPER-JENKS, N.; HOROWITZ, H. W.; SCHWARTZ, E. Risk of hepatitis E infection to travelers. **Journal of travel medicine**, v. 7, n. 4, p. 194–199, 2000.



PROIETTO, S.; LARSON, K. L. Hepatitis E virus. **Presse Medicale**, v. 44, n. 3, p. 328–332, 2015.

PUJOLS, J. et al. No transmission of hepatitis E virus in pigs fed diets containing commercial spray-dried porcine plasma: a retrospective study of samples from several swine trials. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p. 232, 2014.

SAAD, M. D. et al. Hepatitis E virus Infection in Work Horses in Egypt. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 3, p. 368–373, 2007.

SCHLAUDER, G. G.; MUSHAHWAR, I. K. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. **Journal of medical virology**, v. 65, n. 2, p. 282–92, 2001.

SCHLOSSER, J. et al. Natural and experimental hepatitis E virus genotype 3 - Infection in European wild boar is transmissible to domestic pigs. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 1–13, 2014.

SONG YOUNG-JO, HYUN-JEONG JEONG, YU-JIN KIM, SANG-WONLEE, JUNG-BOK LEE, SEUNG-YONG PARK; CHANG-SEON SONG, HEE-MYUNG PARK, AND I.-S. C. Analysis of Complete Genome Sequences of Swine Hepatitis E Virus and Possible Risk Factors for Transmission of HEV to Humans in Korea. **Journal of medical virology**, v. 82, p. 583–591, 2010.

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 Prevalence of Hepatitis E Virus ( HEV ) Infection in Wild Boars and Deer and Genetic Identification of a Genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5371–5374, 2004.

SOUZA, A. J. S. DE. Molecular Do Vírus Da Hepatite E Em Suínos No Estado Do Pará , Brasil. p. 0–61, 2011.

SOUZA 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. 477–485, 2012.

SMITH, D. B. et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 2223–2232, 2014.

SRIDHAR, S.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y. Hepatitis E: A disease of reemerging importance. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 114, n. 8, p. 681–690, 2015.

SULLIVAN, K. M.; DEAN, A. OpenEpi: A Web-based Epidemiologic and Statistical Calculator for Public Health. **Public Health Reports**, v. 124, n. June, p. 471–474, 2009.

SUN, Z. F. et al. Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2658–2662, 2004.

TAKAHASHI, M. et al. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 4, p. 851–862, 2003.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TEO, C. G. The two clinico-epidemiological forms of hepatitis E. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 14, n. 5, p. 295–297, 2007.

TEO, C. G. Much meat , much malady : changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. **European Society of Clinical Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 24–32, 2009.

TESHALE, E. H.; HU, D. J.; HOLMBERG, S. D. The two faces of hepatitis E virus. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 3, p. 328–334, 2010.

THIRY, D. et al. Hepatitis E Virus and Related Viruses in Animals. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, p. 37–52, 2015.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 747-748, 2015.

VASCONCELOS ET AL. Molecular detection of hepatitis E virus in feces and slurry from swine. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 67, n. 3, p. 777–782, 2015.

VITRAL, C. L. et al. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 100, n. 2, p. 117–122, 2005.

WANG, Y. et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. **The Journal of general virology**, v. 80 ( Pt 1), n. 1999, p. 169–177, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis E**. Geneva: WHO, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

WILLIAMS, T. P. E. et al. Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3040–3046, 2001.

WITHERS, M. R. et al. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 384–388, 2002.

WONG, D. C. et al. Epidemic and Endemic Hepatitis in India: Evidence for a Non-a, Non-B Hepatitis Virus Aetiology. **The Lancet**, v. 316, n. 8200, p. 876–879, 1980.

WU, J. et al. Molecular detection of hepatitis E virus in sheep from southern Xinjiang, China. **Virus Genes**, v. 50, n. 3, p. 410–417, 2015.

WU, J. C. et al. Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: Two-year survey in Taiwan. **Journal of Medical Virology**, v. 66, n. 4, p. 488–492, 2002.

XIA, J. et al. Experimental infection of pregnant rabbits with hepatitis e virus demonstrating high mortality and vertical transmission. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 22, n. 10, p. 850–857, 2015.

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, n. 9, p. 2351–2357, 2003.

YUGO, D. M.; MENG, X. J. Hepatitis E virus: Foodborne, waterborne and zoonotic transmission. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 10, p. 4507–4533, 2013.

ZANETTI, A R. et al. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. **Journal of medical virology**, v. 57, n. 4, p. 356–60, 1999.

ZHAO, C., ZHONGREN MA, TIM J. HARRISON, RUOFEI FENG, CHUNTAO ZHANG, Z. Q.; JINPING FAN, HONGXIA MA, MINGSHENG LI, AIJING SONG, Y. W. A Novel Genotype of Hepatitis E Virus Prevalent Among Farmed Rabbits in China. **Journal of medical virology**, v. 81, p. 1371–1379, 2009.

## 9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado à revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”

### **DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE E EM FEZES DE SUÍNOS ABATIDOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA.**

#### **RESUMO**

O vírus da hepatite E (HEV) é um importante problema para a saúde pública e uma das principais causas de hepatite entérica em todo o mundo, podendo ser transmitido pelo consumo de carne suína contaminada. O trabalho teve por objetivos avaliar a prevalência do HEV em suínos de criações intensivas e tecnificadas, abatidos em matadouro-frigorífico sob Inspeção Sanitária. Foram coletadas 140 amostras de fezes de suínos de 14 propriedades distintas dos estados de São Paulo e Santa Catarina. As técnicas de diagnósticos moleculares nas amostras de fezes foram *Nested* RT-PCR e sequenciamento de Sanger para identificação da presença do vírus da hepatite E e o genótipo para elucidar os dados epidemiológicos. Os suínos não apresentaram doenças ou sinais clínicos no exame *ante mortem* e no exame *post mortem*. Os fígados não apresentaram lesões macroscópicas e contaminações gastrointestinais visíveis, portanto, as vísceras e carcaças foram destinadas ao consumo humano. Foram identificados 1,4% de suínos infectados pelo HEV genótipo 3. O vírus da Hepatite E, genótipos 3 e 4 tem caráter zoonótico, podendo gerar grande impacto na Saúde Pública. Diante disso, deve-se haver cuidados na manipulação de produtos possivelmente contaminados pelo HEV, evitando assim a contaminação cruzada, e, também, tratando termicamente a carne e derivados de suínos, a fim de garantir a inocuidade alimentar.

**Palavras-chave:** HEV, hepatite E, suínos, inspeção sanitária.

## **DETECTION OF HEPATITIS E VIRUS IN SWINE FECES SLAUGHTERED UNDER SANITARY INSPECTION.**

### **SUMMARY**

Hepatitis E virus (HEV) is a major public health problem and one of the leading causes of enteric hepatitis worldwide and can be transmitted through consumption of contaminated pork. The objective of the present study was to evaluate the prevalence of hepatitis E virus (HEV) in pigs of intensive and technologically manufactured animals slaughtered in a slaughterhouse under Sanitary Inspection. A total of 140 swine feces samples were collected from 14 different properties in the states of São Paulo and Santa Catarina. The diagnostic techniques used were molecular in fecal samples, Nested RT-PCR and Sanger sequencing to identify the presence of hepatitis E virus and the genotype to elucidate the epidemiological data. The pigs showed no disease or clinical signs on ante-mortem examination and post-mortem examination. The livers did not present macroscopic lesions and visible gastrointestinal contaminations; therefore, the viscera and carcasses were destined for human consumption. A total of 1.4% of HEV genotype 3 infected pigs were identified. Hepatitis E virus genotypes 3 and 4 are zoonotic in nature and may have a great impact on public health, without due care being taken to avoid cross-contamination and thermal preparation meat and pork products through the consumption of contaminated meat products.

**Key words:** HEV, hepatitis E, pigs, sanitary inspection.

### **INTRODUÇÃO**

Componente da família Hepeviridae, gênero *Hepevírus* e espécie *Hepatitis E virus* é o agente causador de doença hepática em humanos denominada hepatite E. Assim sendo, é uma zoonose em muitos países, principalmente aqueles em desenvolvimento e não tão comum em países desenvolvidos. Os índices de mortalidade normalmente são baixos (<1%), porém, em alguns surtos relatados, a mortalidade chegou até 25%.(BALAYAN et al., 1990).

A hepatite E é um importante problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de hepatite entérica transmitida ao homem em todo mundo. É responsável por mais de 50% dos casos de hepatite viral aguda em países endêmicos e cerca de 2 bilhões de pessoas, um terço da população mundial, vive em áreas endêmicas de HEV e estão sob risco de infecção. Estima-se que ocorram, a cada ano, cerca de 20 milhões de casos com infecção pelo HEV, com 3,3 milhões de casos sintomáticos e aproximadamente 57 mil mortes (WHO, 2017).

A infecção pelo HEV nos países em desenvolvimento é primariamente uma doença transmitida pela água, associada a grandes epidemias devido a água contaminada e abastecimento em condições sanitárias precárias. Em contraste, os países industrializados, incluindo muitos países europeus, EUA e Japão, a hepatite E ocorre de forma esporádica e a transmissão se dá pelo consumo de carnes contaminadas. As viagens a países endêmicos e a presença de diferentes genótipos de HEV nos países industrializados em contrapartida com países em desenvolvimento suportam uma origem autóctone de casos esporádicos. O HEV é o único dos principais vírus da hepatite (A, B, C e D) com reservatório animal, já tendo sido relatado em suínos (HEV suíno), frangos (HEV aviário) e, mais recentemente, em coelhos, roedores, javalis, furões, morcegos, ovinos e trutas (MENG, 2010; PEREZ-GRACIA et al., 2015). A transmissão experimental bem-sucedida de HEV suíno para macacos (modelo para transmissão de HEV em humanos), sustenta fortemente a origem zoonótica da hepatite E. Esta teoria é reforçada por estudos filogenéticos no Japão, em que o vírus foi associado à carne crua (suínos e veados), sendo que os humanos se tornaram infectados depois de consumirem tais carnes (MENG, 2011; PEREZ-GRACIA et al., 2015).

O principal mecanismo de transmissão durante os surtos de hepatite E não zoonótica é pela via oro-fecal, pela ingestão de água e alimentos contaminados. A transmissão também ocorre pelo consumo de carne suína contaminada, constituindo neste caso, transmissão zoonótica. Os indivíduos eliminam vírus entericamente durante a fase aguda da doença, sintomáticos ou não, e são provavelmente aqueles que mais contribuem para a manutenção do agente no ambiente. Indivíduos que eliminam o HEV nas fezes por um período prolongado também podem contribuir para esta manutenção (TEO, 2007). A transmissão vertical entre indivíduos não é comum, mas quando há infecção pelo HEV, a mortalidade de crianças nascidas de mães infectadas pelo HEV é alta (PATRA et al., 2007).

O HEV constitui uma importante preocupação de saúde pública com casos de doença associados ao manuseio de suínos infectados, ao consumo de carnes cruas e malcozidas, como fígado de suíno, linguiças, carne de cervos. Além disso, grandes quantidades de vírus excretados nas fezes de animais contaminam a água potável ou de irrigação. O HEV tem sido identificado em numerosas fontes de interesse, incluindo fezes de animais, água de esgoto, água inadequadamente tratada, mariscos e produtos contaminados, bem como carnes de animais (MENG, 2011; YUGO e MENG, 2013). Casos esporádicos de hepatite E começaram a ser descritos e associados à transmissão zoonótica do HEV a partir de reservatórios animais, principalmente suínos. Desta forma a hepatite E é a única hepatite viral em que foi evidenciada a transmissão zoonótica (DOS SANTOS, OLIVEIRA FILHO e PINTO, 2013).

Foram detectados anticorpos contra o HEV em diversas espécies de animais domésticos e silvestres em várias regiões do mundo, com soroprevalências variando de 8 a 80%. Dentre as espécies animais incluem-se os suínos, javalis, roedores, cervos, caprinos, bovinos, camelos, aves domésticas e primatas não-humanos (VITRAL et al., 2005; MENG, 2010).



A infecção em suínos se apresenta de modo assintomático, contudo já foi provado que a excreção de partículas virais viáveis nas fezes de animais representam um risco de transmissão desse vírus aos animais e o homem (HALBUR et al., 2001).

Independente das prevalências observadas em populações humanas clinicamente saudáveis de regiões onde a hepatite E é endêmica ou não, as altas soroprevalências de anti-HEV frequentemente observadas em suínos demonstraram que o HEV é enzoótico em animais desta espécie (MENG et al., 1997).

As provas laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo HEV incluem testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG, além de testes moleculares para a detecção do genoma do vírus nas fezes e no soro (MUSHAHWAR, 2008).

Devido à importância do HEV genótipo 3 e 4 para os suínos, além de sua importância e relevância em saúde pública através de consumo de carnes contaminadas, pretende-se com este estudo avaliar a prevalência de hepatite E em suínos abatidos em frigorífico sob inspeção sanitária permanente, registrado no SIF - Serviço de Inspeção Federal, localizado no município de Cerqueira Cesar-SP, Brasil.

## **MÉTODOS**

### **Coleta de amostras**

Para estimar uma prevalência suposta de 10% com base em uma média de HEV pesquisada em trabalhos nos estados do Paraná, Pará, Mato Grosso e Rio de Janeiro (DOS SANTOS et al., 2009; SOUZA, 2011; GARDINALI et al., 2012b), com

uma margem de erro de mais ou menos 5%, chegou-se ao plano amostral onde foram coletadas 140 amostras de fezes de suínos de, aproximadamente, 150 dias de idade, oriundos de 10 propriedades de terminação de suínos, sendo 7 propriedades localizadas no Estado de São Paulo e 3 propriedades em Santa Catarina, abatidos em um frigorífico localizado em Cerqueira César-SP, sob inspeção sanitária permanente, durante o período de agosto a outubro de 2016. O cálculo do tamanho no número de amostras foi realizado com o programa OpenEpi® (SULLIVAN; DEAN, 2009). A prevalência do HEV em suínos foi estimada com respectivo intervalo de confiança de 95%.

As 140 amostras foram oriundas de 10 propriedades distintas de granjas tecnificadas de suínos terminadores (14 amostras por granja), discriminadas a seguir:

- 1º Lote, propriedade A, localizada em Taguaí-SP;
- 2º Lote, propriedade B, localizada em Agudos-SP;
- 3º Lote, propriedade C, localizada em Itu-SP;
- 4º Lote, propriedade D, localizada em Cerqueira César-SP;
- 5º Lote, propriedade E, localizada em Bom Jesus-SC;
- 6º Lote, propriedade F, localizada em Iaras-SP;
- 7º Lote, propriedade G, localizada em Cerqueira César-SP;
- 8º Lote, propriedade H, localizada em Seara-SC;
- 9º Lote, propriedade I, localizada em Ipumirim-SC;
- 10º Lote, propriedade J, localizada em Cerqueira César-SP.

No momento da colheita, verificou-se os fígados dos suínos a partir dos quais as amostras foram coletadas, não apresentavam lesões macroscópicas na inspeção sanitária *post mortem*.

As amostras de aproximadamente 5 gramas de fezes foram coletadas através de corte no final do reto, na linha de inspeção sanitária, com lâminas de bisturi estéril e espátulas de coletas de fezes, individualmente para cada suíno. A colheita foi realizada de modo a evitar possível contaminação cruzada das mesmas. Todo material biológico foi congelado a  $-22^{\circ}\text{C}$  e permaneceu armazenado a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior análise no laboratório de zoonoses bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Universidade de São Paulo (USP).

### **Preparo da amostra - Clarificação.**

Para a clarificação das amostras, as mesmas foram descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizadas individualmente com o auxílio de uma espátula plástica e 500  $\mu\text{L}$  foram aliqüotados em um microtubo (Eppendorf®). Em seguida, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de água dietilpirocarbonato (DEPC), sendo realizada a homogeneização em vórtex e centrifugação a  $12.000\times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Controle positivo**

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

O presente estudo foi desenvolvido de acordo com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FMVZ/UNESP de Botucatu-SP e as atividades desenvolvidas obedeceram aos pré-requisitos de ética e bem estar animal desta comissão.

## **Extração de material genético e realização de cDNA complementar**

Após clarificação das fezes, 750  $\mu\text{L}$  de Trizol® (*Life Technologies*) foram adicionados à 250  $\mu\text{L}$  da suspensão de fezes, sendo o material incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram 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 durante 5 minutos a 4°C.

A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, sendo a seguir adicionados 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado, permanecendo a -20°C por 10 minutos; a seguir o material foi centrifugado por 12000xg/10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1mL de etanol a 75%. Descartou-se novamente o sobrenadante e o pellet foi seco em temperatura ambiente por inversão dos tubos e, então, suspenso em 20  $\mu\text{L}$  de água DEPC.

O cDNA complementar foi obtido com *primers* randômicos (Promega) e enzima MMLV® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

## **Deteccção de ORF-1 do HEV**

### **PCR**

Foi realizada a amplificação direcionada a ORF-1 do vírus da hepatite E utilizando *primers* desenhados por Wang (Wang et. al 1999).

Num volume final de 25  $\mu\text{L}$ , foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de cDNA, 12,5  $\mu\text{L}$  2x Master Mix Green, 1,0 $\mu\text{L}$  Primer senso a 10mM (ORF1-F1 forward 5' CTGGCATYACTACTGCYATTGAGC 3'), 1,0  $\mu\text{L}$  Primer antisenso a 10Mm (ORF1-F2 forward 5' CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC 3') e 8  $\mu\text{L}$  água DEPC.

### **Condição de amplificação**

As amostras sofreram uma desnaturação inicial de 4 minutos à 95°C, seguida de 40 ciclos de 95°C/15 seg. 55°C/ 20 seg. e 72°C/ 30 seg. seguida de uma extensão final de 72°C/5min.

### **Protocolo Nested RT-PCR para HEV**

Num volume final de 25 µL, foi adicionado 1,0 µL do amplicon proveniente da RT-PCR, 12,5 µL 2x Master Mix Green, 1,0µL Primer senso a 10mM (ORF1-R1 reverse 5' CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG 3'), 1,0 µL Primer antisenso a 10Mm (ORF1-R2 reverse 5' GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC 3') e 9,5 µL água DEPC.

As condições de amplificação foram as mesmas anteriormente descritas.

### **Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos amplificados gerados foram analisados através de eletroforese, em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,045M Tris-Borato, 1mM EDTA). A corrida foi realizada numa voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10 V/cm<sup>2</sup> de gel).

A visualização dos fragmentos amplificados de 287 pb foi realizada por meio de transiluminada do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de 2µl de Sybr safe®. A dimensão dos fragmentos foi comparada a um padrão de tamanho molecular de 50 pb, que foi disposto no gel, juntamente com as amostras analisadas a cada corrida eletroforética. O gel foi fotografado para demonstração neste trabalho (figura 2).

### **Genotipagem das amostras**

Os produtos amplificados a partir do fragmento parcial da ORF-1 foram sequenciados utilizando-se o kit BigDyeTerminator™ (Life Technologies, EUA) com um sequenciador automático (ABI modelo 3031, Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram montadas com o auxílio dos programas PHRED e CAP3 (<http://www.biomol.unb.br/phph/>). As sequências derivadas foram alinhadas usando o programa BioEdit v 7.0.5 (HALL, 2011), comparadas com as disponíveis no GenBank e a análise filogenética foi realizada com o pacote computacional Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013) sem a utilização de grupo externo.

## **RESULTADOS**

Após a realização da Nested RT PCR para HEV e a visualização da corrida eletroforética em gel de agarose das 140 amostras de fezes de suínos, na qual foram identificadas duas amostras positivas (2/140). As amostras positivas foram da propriedade C localizada em Itu-SP e de propriedade D localizada em Cerqueira César-SP, demonstrando uma prevalência para este trabalho de 1,42%. Através da reconstrução filogenética (dados não mostrados) foi observado que o HEV pertencia ao genótipo 3.

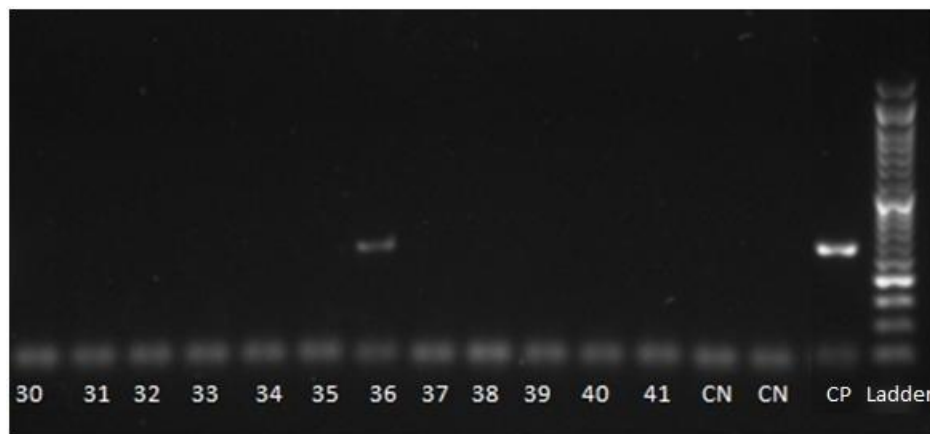


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose – amostra nº 36 positiva com 287 pb; CN – controle negativo; CP – controle positivo; ladder com 50 pb.

## DISCUSSÃO

Através do presente trabalho foi possível identificar o HEV em duas amostras de fezes de suínos infectados, aparentemente saudáveis nos exames *ante* e *post mortem* que foram abatidos em estabelecimento sob inspeção sanitária. A porcentagem de suínos positivos através de análises de *Nested* RT-PCR permitiu avaliar os dados epidemiológicos do HEV, cotejando informações deste trabalho com de outros autores no Brasil e no mundo, comparando prevalências e genótipos.

Os resultados deste trabalho demonstraram um risco baixo, porém, não desprezível para o estado sanitário de suínos infectados com HEV, procedentes de granjas tecnificadas, controladas sanitariamente e enviados ao abate em estabelecimento com inspeção sanitária permanente.

A prevalência encontrada neste trabalho foi de 1,4% e considerada baixa em comparação a outras pesquisas realizadas nos diversos estados e regiões brasileiras, o qual o HEV nos suínos é considerada endêmica, porém pouco estudada pelas dimensões do país e subdiagnosticada em humanos e animais. Um estudo no sul do estado do Paraná, identificou alta prevalência de HEV, 20%, em

170 fezes de suínos, demonstrando um aumento na prevalência comparada à estudos relatados anteriormente no Brasil. Souza et al 2012 investigou amostras de soro, bile e fezes de 151 suínos no leste da Amazônia, no norte do Brasil, identificando RNA do HEV em 9,9% dos animais (PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017).

No estado do Paraná, realizou-se um estudo para detecção do HEV em amostras de fígado e bile em 118 suínos adultos assintomáticos abatidos em matadouro. Foi utilizada a técnica molecular de RT-PCR e o RNA do HEV identificado em duas amostras de fígado (1,7%) e uma amostra de bile (0,84%), pertencente ao genótipo 3b de acordo com as sequências nucleotídicas. Esses dados sugerem que suínos saudáveis aparentemente, podem ser uma fonte de infecção de HEV para consumidores de fígado suíno e trabalhadores de matadouros no Brasil (GARDINALI et al., 2012a).

Em um outro estudo no oeste do estado do Paraná, foram coletadas 170 amostras de fezes de suínos de várias categorias (matrizes reprodutoras, leitões em amamentação, suínos desmamados, em crescimento) de 14 granjas de suínos. Realizaram RT-PCR e identificaram na triagem o RNA do HEV em 62,5% das granjas de suínos e em 15,3% das amostras de fezes. Em 15 amostras fecais foi possível amplificar o RNA do HEV-suína agrupadas com o genótipo 3b, o mesmo genótipo descrito em seres humanos no Brasil (GARDINALI et al., 2012b).

A maior taxa de infecção de suínos observada pode ser resultado das condições sanitárias das fazendas de pequena escala, onde ocorrem o contato de suínos de diferentes idades e *status* sanitários diferentes. As infecções por HEV em suínos eram mais freqüentes de 12 a 16 semanas de idade e que, na idade de abate (20-24 semanas), os animais já desenvolveram anticorpos anti-HEV. Verificaram que o RNA do HEV foi mais freqüente em suínos de 10 semanas (40,6 %), embora a freqüência em suínos com 13 semanas ainda estivesse alta (20,8%). No entanto, nenhuma das amostras dos suínos com idade entre 4 ou 16 semanas foram positivas. Essas observações corroboram um estudo realizado entre os rebanhos



de suínos no Rio de Janeiro, no Sudeste do Brasil, mostrando que os suínos recém-nascidos se tornaram suscetíveis à HEV entre as semanas 7 e 9, uma idade em que os níveis séricos dos anticorpos maternos diminuíram. Esses resultados também estão de acordo com pesquisas realizadas no Brasil Central em suínos de 20 a 30 semanas, com 81% de positividade anti-IgG de HEV ( GUIMARÃES et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2009; PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017).

No entanto, as diferenças nas prevalências de positividade para HEV podem ser devido à diferença de metodologia, já que alguns estudos empregaram técnicas convencionais de RT-PCR em oposição à RT-PCR de tempo real mais sensível. Além disso, a técnica de RT-PCR duplex, demonstrou que é 34 vezes mais sensível que a RT-PCR de tempo real, pois usando mais de um conjunto de primers e sondas para aumenta a detecção do HEV durante a triagem (GERBER et al., 2014; PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017).

Portanto, verificou-se neste trabalho, que os dados de prevalências do HEV em suínos são oscilantes e possuem diversas variáveis que alteram tais índices. Conforme as várias pesquisas de referências bibliográficas estudadas, podemos supor que as prevalências do HEV variam devido as técnicas moleculares e sorológicas utilizadas nos experimentos, idade dos animais, diferentes sistemas de criação, manejos sanitários, alimentares e operacionais.

A análise filogenética com a sequência obtida a partir dos produtos amplificados revelou que o HEV isolado pertencia ao genótipo 3, comumente detectado em suínos infectados no Brasil, portanto não alterando os dados epidemiológicos em relação ao genótipo do HEV.

No estado do Rio de Janeiro, considerada área não endêmica, foi realizado uma pesquisa sobre soroprevalência de HEV em diferentes espécies animais sugerindo a infecção zoonótica. Foi detectada IgG anti-HEV em bovinos (1,42%), cães (6,97%), frango de corte (20%), suínos (24,3%), roedores (50%) e manipuladores de suínos nas granjas (6,3%). Além de detectar anticorpos anti-HEV

em várias espécies animais, os resultados demonstraram que a infecção suína pelo HEV parece ser universal dentro da população suína brasileira (VITRAL et al., 2005).

Algumas trabalhos no Brasil revelaram a soroprevalência de HEV em diferentes grupos populacionais como em mineiros na Bacia Amazônica com 6,1%, em pacientes submetidos a hemodiálise em São Paulo apresentaram prevalência de 4,9%, em 2% dos doadores de sangue e 29% de pacientes com hepatite viral aguda em Salvador-Bahia (DOS SANTOS; DE OLIVEIRA-FILHO; PINTO, 2013).

Entre 1999 a 2011 foram registrados 967 casos de HEV na população brasileira e desse total acumulado, 48,6% (470 pessoas) foram notificados nas unidades de saúde pública na região Sudeste. Os óbitos pelo HEV registrados nesse período foram de 51 indivíduos. Os dados epidemiológicos nos anos de 2012 a 2017 não foram notificados, sugerindo uma ausência errônea da doença. O Ministério da Saúde deveria implantar ações a fim de diagnosticar o HEV na população brasileira e impor medidas sanitárias com relação a este agente (BRASIL, 2017a).

A epidemiologia do HEV na América do Sul parece ser complexa e a soroprevalência em humanos e suínos difere muito entre populações dentro de mesmos países e quanto de outros países. O genótipo 3 é o mais comumente detectado e caracterizado molecularmente na América do Sul. Além disso, na Venezuela, ocorreram duas variantes isoladas de casos autóctones de hepatite E aguda que pertenciam ao genótipo 1 (MIRAZO; RAMOS; ARBIZA, 2012).

O HEV é considerado hiperendêmico em muitos países em desenvolvimento, com Índia, China, Bangladesh Egito e México. As prevalências chegam em torno de 25% dos casos de hepatite aguda não-A e não-B. O HEV é considerado endêmico onde existe uma prevalência menor de 25% de todas os casos de hepatites agudas não-A e não-B, os quais incluem grande parte da Europa Ocidental, Estados Unidos, Nova Zelândia, muitos países da América do Sul, grande parte da Ásia e Oriente Médio (TEO, 2009; PEREZ-GRACIA et al., 2015).

As tendências no mundo apontam uma contínua alta na infecção de HEV e na soroprevalência anti-HEV, provavelmente devido ao aumento de interesse em pesquisas e esforços em vigilâncias, além de aumentar o conhecimento nos reservatórios e hospedeiros animais (MENG, 2010; MANSUY et al., 2011).

No Japão, três casos de hepatite E foram associados ao consumo de carne suína mal cozida ou crua presumivelmente a partir do mesmo restaurante. Nove dos dez casos clínicos de hepatite E de 2001 a 2002 tiveram uma história de consumo de carne de suína pouco cozida 2 a 8 semanas antes do início dos sinais clínicos e 1,9% dos fígados de suíno testados em mantimentos locais em Hokkaido, Japão, foram positivos para Genótipo 3 ou 4 de HEV. Os casos de hepatite E no Japão também foram ligados ao consumo de carne de javali contaminado. As populações de javali na Itália e no Sudeste da França apresentaram níveis detectáveis de RNA de HEV em 2,5% de amostras de fígado e 25% de amostras de bile, respectivamente. O consumo de carne de javali foi associado à infecção HEV em um estudo caso-controle na Alemanha. Casos de hepatite E aguda associada ao HEV genótipo 4 foram confirmados na Coréia do Sul, presumivelmente devido ao consumo de suco de bile de javali cru selvagem. Pacientes humanos com infecção hepática aguda na França foram ligados ao consumo de linguiça de figatellu (prato de fígado de suíno cru). As sequências HEV recuperadas dos produtos figatellu em mercearias locais eram essencialmente indistinguíveis das seqüências virais recuperadas dos pacientes humanos, fornecendo evidências para a transmissão do HEV por alimentos. O HEV presente na linguiça de fígado de suíno de fabricantes na França mostrou ser infeccioso utilizando um sistema de cultura celular 3D HEV (YAZAKI et al., 2003; MIYASHITA et al., 2012).

Devido a importância na transmissão zoonótica do HEV-3 e alta prevalência no Brasil, devem ser alavancados estudos sobre a prevalência e infectividade do HEV em produtos cárneos suínos que passam por processos industriais e tecnológicos de defumação, maturação, dessecação, fermentação, curados e não cozidos, como por exemplo, presuntos crus, copa e salames (PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017).

Os casos de hepatite E, genótipo 3, transmitidos por alimentos em seres humanos são cada vez mais comuns e provavelmente subestimados na comunidade médica. Casos esporádicos e aglomerados de hepatite E ocorrem após o consumo de carnes animais mal cozidas ou cruas. Há necessidade de implantar estratégias em saúde pública para diagnosticar, estimar a real incidência, prevalência de HEV, dados epidemiológicos (genótipos e subgenótipos) nos diversos estados, regiões brasileiras e no mundo para melhorar a compreensão e gerenciamento do problema (YUGO; MENG, 2013). A prevenção da transmissão HEV transmitida por alimentos depende de evitar o consumo de carnes animais mal cozidas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, seguindo boas práticas de higiene e a consciência de riscos aumentados ao viajar para regiões endêmicas ou hiperendêmicas do mundo (WHO, 2017).

Apesar do risco claro, estratégias de prevenção atualmente são minimamente implementadas. Uma vacina contra HEV recentemente ficou disponível na China, com proteção contra o HEV 1 e 4. A vigilância, vacinação, tratamento de esgoto e fontes de água e educação pública ajudarão a prevenir endemias e epidemias atuais e futuras, reduzindo a contaminação humana. O desenvolvimento de uma vacina contra o HEV-3 reduziria os casos de infecção pelo consumo de carnes e pelo contato de animais, suínos e seres humanos, além de diminuir a propagação do vírus entre espécies animais (YUGO; MENG, 2013).

Nos países industrializados, onde as transmissões zoonóticas podem ser a principal via de infecção por hepatite E, os consumidores de carne crua ou pouco cozida devem estar conscientes do risco potencial. Outras populações em risco, como mulheres grávidas, receptores de transplantes e indivíduos com condições hepáticas subjacentes, devem ser informados sobre o possível risco de consumir carne suína crua, veado ou carne de javali ou contato com suínos infectados. As carnes de suínos nessas áreas devem ser cozidas rigorosamente (71°C / 20 min) e devem ser tomadas medidas de segurança adequadas durante o armazenamento, manuseio e preparação de carne suína não cozida (BARNAUD et al., 2012).

Estudos indicam que o HEV pode permanecer infeccioso em carnes quando cozidas à 71°C por 5 minutos, e se os títulos virais forem altos antes do cozimento. O HEV também pode resistir em carnes armazenadas a 4°C e a -20°C, temperaturas estas comumente utilizadas em refrigeração e congelamento destes produtos. Foi evidenciado que o cloro tem efeito sobre a infecciosidade do HEV, mas as condições de desinfecção com o cloro precisam ser mais estudadas para elucidar sua viabilidade na prática (COOK; VAN DER POEL, 2015).

A inspeção sanitária de carnes, por ser macroscópica, possui procedimentos operacionais e normativos bem definidos para coibir algumas zoonoses em carnes de suínos, porém não pode-se desprezar os perigos microscópicos causados pelo HEV. Portanto, há necessidade em mencionar nas rotulagens de carnes suínas, informes relevantes e em destaque, sobre a necessidade de cozimento adequado minimizando os riscos do HEV na saúde pública (BRASIL, 2017b).

Manipuladores de suínos, veterinários e magarefes de frigoríficos expostos ao HEV devem tomar medidas higiênicas após manusear animais e vísceras, principalmente de suínos, uma vez que o HEV parece ser muito contagioso nesses animais. Investigações devem ser realizadas para determinar quais procedimentos de biossegurança preventiva limitariam a disseminação do HEV. Medidas de bioseguridades nas criações de suínos são extremamente úteis a fim de evitar as infecções de animais e contaminação de rios e córregos através dos efluentes (PEREZ-GRACIA et al., 2015).

Outro método de prevenção é melhorar a vigilância estratégica na importação comercial de suínos. Em 2011, um vírus do genótipo 4 foi isolado em suínos na Europa, que comumente identifica o genótipo 3. São necessárias investigações sobre a origem desse genótipo na Europa. Uma vez que os suínos representam um grande reservatório de HEV em regiões não endêmicas e são provavelmente uma fonte de infecção para casos esporádicos de hepatite E aguda. A vigilância de suínos, juntamente com os reservatórios de javali e cervo, deve ser realizada e direcionada nas rotas identificadas de exposição humana ao HEV. Há necessidade

em abranger no Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, recomendações sanitárias sobre o vírus da hepatite E em suídeos e produtos cárneos de suídeos (PEREZ-GRACIA et al., 2015).

## **CONCLUSÃO**

Foi possível detectar o HEV em amostras de fezes de suínos infectados, oriundos de granjas tecnificadas e controladas sanitariamente, aparentemente sadios nos exames *ante* e *post mortem*, abatidos em estabelecimento localizado no município de Cerqueira César no estado de São Paulo, sob inspeção sanitária Federal permanente.

A presença de HEV-3 nas amostras demonstra os perigos potenciais na transmissão zoonótica com suas consequências em saúde pública e indica que devem ser tomadas medidas de segurança para prevenir infecções pelo HEV, tanto pela manipulação desses animais como para o consumo de carne suína crua ou mal passada.

## **Conflitos de Interesse**

Os autores indicam que não tem conflito de interesse

## **Referências Bibliográfica**

BALAYAN, M. S. et al. Experimental hepatitis E infection in domestic pigs. **Journal of Medical Virology**, v. 32, n. 1, p. 58–59, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Hepatite E**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-sao-hepatites/hepatite-e>>. Acesso em: 02 jul. 2017a.

BRASIL. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 2017. Seção 1, p. 03b.

COOK, N.; VAN DER POEL, W. H. M. Survival and Elimination of Hepatitis E Virus: A Review. **Food and Environmental Virology**, v. 7, n. 3, p. 189–194, 2015.

DOS SANTOS, D. R. L. et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 3, p. 474–480, 2009.

DOS SANTOS, D. L.; DE OLIVEIRA-FILHO, E. F.; PINTO, M. A. Hepatite E no Brasil e no Mundo: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 416–433, 2013.

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, n. 3, p. 1515–1519, 2012a.

GARDINALI, N. R. et al. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 935–939, 2012b.

GENG, J. et al. Potential risk of zoonotic transmission from young swine to human: Seroepidemiological and genetic characterization of hepatitis e virus in human and various animals in Beijing, China. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 10, 2011.

GERBER, P. F. et al. Comparison of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection of Swine Hepatitis E Virus in Fecal Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1045–1051, 2014.

GUIMARÃES, F. R. et al. Hepatitis E virus antibodies in swine herds of Mato Grosso State, Central Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 223–226,

2005.

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, n. 3, p. 918–923, 2001.

HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 60–61, 2011.

MANSUY, J.-M. et al. Hepatitis E Virus Antibodies in Blood Donors, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 2309–2312, 2011.

MENG, X. J. et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 18, p. 9860–9865, 1997.

MENG, X. J. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 256–265, 2010.

MENG, X. J. From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. **Virus Research**, v. 161, n. 1, p. 23–30, 2011.

MIRAZO, S.; RAMOS, N.; ARBIZA, J. Molecular Epidemiology of Hepatitis E Virus (Hev) in South America: Current Status. **VIRUS Reviews & Research**, v. 17, n. 1–2, 2012.

MIYASHITA, K. et al. Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. **Hepatology Research**, v. 42, n. 9, p. 870–878, 2012.

MUSHAHWAR ISA K. Hepatitis E Virus: Molecular Virology, Clinical Features, Diagnosis, Transmission, Epidemiology, and Prevention. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 646–658, 2008.

PASSOS-CASTILHO, A. M.; GRANATO, C. F. H. High frequency of hepatitis E virus infection in swine from South Brazil and close similarity to human HEV isolates.



**Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 373–379, 2017.

PATRA, S. et al. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. **Annals of internal medicine**, v. 147, n. 1, p. 28–33, 2007.

PEREZ-GRACIA, M. T. et al. Current Knowledge on Hepatitis E. **Journal of clinical and translational hepatology**, v. 3, n. 2, p. 117–126, 2015.

SOUZA 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. 477–485, 2012.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TEO, C. G. The two clinico-epidemiological forms of hepatitis E. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 14, n. 5, p. 295–297, 2007.

TEO, C. G. Much meat , much malady : changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. **European Society of Clinical Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 24–32, 2009.

WANG, Y. et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. **The Journal of general virology**, v. 80 ( Pt 1), n. 1999, p. 169–177, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis E**. Geneva: WHO, 2016. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

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, n. 9, p. 2351–2357, 2003.

YUGO, D. M.; MENG, X. J. Hepatitis E virus: Foodborne, waterborne and zoonotic transmission. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 10, p. 4507–4533, 2013.

## NORMAS DA REVISTA INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 2.000,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

- a) o Título deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.
- b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso,

como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;

- c) o ABSTRACT deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;
- d) o RESUMO deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;
- e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;
- f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;
- g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;
- h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar

uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entre-

linha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter

citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano, como por exemplo: (Priester & Haves 1974,

Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada em caixa

alta e baixa, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas

será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. Não há traços verticais, nem fundos cinzas. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.