



**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

ALEX JUNIOR SOUZA DE SOUZA

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E EM SUÍNOS NO
ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

**Belém
2011**

ALEX JUNIOR SOUZA DE SOUZA

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E EM SUÍNOS NO
ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de Concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira

**Belém
2011**

ALEX JUNIOR SOUZA DE SOUZA

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E EM SUÍNOS NO
ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Universidade Federal Rural da Amazônia. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental.

Data da aprovação. Belém - PA: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira
Instituto da Saúde e Produção Animal - UFRA
Orientador e Presidente

Profa. Dra. Debora Regina Lopes dos Santos
Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária - UFRRJ
Membro Titular

Profa. Dra. Conceição de Maria Almeida Vieira
Instituto da Saúde e Produção Animal - UFRA
Membro Titular

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Francisco Cintra e Ana Maria Cintra (*in memoriam*) por todo o apoio, amor e incentivo necessários para minha formação como um ser humano.

À minha irmã Alessandra por toda cumplicidade incondicional e por ser para mim um exemplo de lealdade.

À minha afilhada Julia que mesmo tão pequena já significa uma grande benção em minha vida.

Ao meu orientador e amigo e Dr. Washington Pereira por todos esses anos acompanhando e incentivando meu desenvolvimento profissional. Obrigado, professor.

A todos os membros da Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas pelo suporte e amizade. As contribuições diretas e indiretas de todos vocês, sem exceções, foram indispensáveis para realização deste projeto. Muito obrigado!

Ao Dr. Manoel Soares por ser um exemplo de competência, serenidade, humildade e por ter confiado em meu potencial.

À amiga e co-orientadora Liliane Carneiro pelo suporte e ajuda dispensada. Muito obrigado.

À Andreza Malheiros pela paciência e colaboração com o processamento das análises.

À Dra. Debora Regina Lopes dos Santos por disponibilizar os controles positivos para as reações PCR.

Ao Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical da Faculdade de Medicina da USP e, em especial, à Michele Gomes por toda contribuição com as análises. Sua paciência, dedicação, boa vontade e incentivo foram essenciais durante essa jornada.

À Médica veterinária Géleri Galeão por toda disponibilidade em contribuir para a realização deste projeto.

Aos funcionários do matadouro Centauro e dos abates clandestinos pela contribuição durante as coletas.

A todos os amigos que acompanharam e colaboraram com as atividades de coleta. Sem a ajuda de vocês nada disso seria possível. Muito obrigado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o Mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPA.

Aos meus amigos do Mestrado que tive o privilégio de conhecer e conviver durante esses dois anos, especialmente a Julianne Silva, Henry Manrique e Silvia Pedroso.

A todos os amigos e familiares que contribuíram e incentivaram a conclusão de mais essa etapa da minha vida profissional.

Muito obrigado!

RESUMO

O vírus da Hepatite E (HEV) é um RNA-vírus entericamente transmissível do gênero *Hepevirus* causador de hepatite aguda em humanos que apresenta ampla distribuição em diversas regiões do mundo. Suínos são relatados como a principal fonte de infecção para humanos relacionadas aos genótipos 3 e 4 em regiões consideradas não-endêmicas. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo demonstrar a infecção pelo HEV em suínos no Estado do Pará através de métodos sorológicos e moleculares aplicados a amostras de soro, fezes e fígado de 151 suínos abatidos na região Metropolitana de Belém. A investigação sorológica abrangeu a pesquisa de anticorpos anti-HEV das classes IgM e IgG e o diagnóstico molecular inclui a detecção do HEV-RNA, sequenciamento nucleotídico e análise filogenética das sequências obtidas. Como resultado, não foram detectados anticorpos anti-HEV IgM e a prevalência de animais sororeativos para IgG foi de 8,6% (13/151). A detecção molecular amplificou fragmentos do HEV genoma em 4,8% (22/453) das amostras testadas e a prevalência de animais positivos a pelo menos uma amostra foi de 9,9% (15/151). A análise filogenética concluiu que todas as sequências analisadas pertencem ao genótipo 3 do vírus, descrito como zoonótico. Foram identificados os subtipos 3c e 3f ocorrendo simultaneamente entre as amostras, de acordo com as duas regiões do genoma amplificadas. Estes resultados constam como as primeiras evidências sorológicas e moleculares da circulação do HEV entre suínos no Norte do Brasil e também como a primeira detecção e genotipagem do HEV na região.

Palavras-chave: Vírus da Hepatite E. Suínos. Sorologia. Genótipo 3. Zoonose.

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is an RNA virus of genus Hepevirus causative agent of enterically transmitted acute hepatitis in humans that is widely distributed in many regions of the world. Pigs are reported as the main source of infection to humans related to genotypes 3 and 4 virus in non-endemic areas. In this sense, the present study aimed to demonstrate the HEV infection among swine in the Pará State by serological and molecular methods applied to samples of serum, stool and liver of 151 pigs slaughtered in metropolitan area of Belém. A serologic investigation included the search for anti-HEV IgM and IgG and molecular diagnostic included the detection of the HEV RNA, nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of sequences obtained. As result we detected no anti-HEV IgM and the prevalence of animal seroreactive for IgG was 8,6% (13/151). Molecular detection of HEV genome amplified positive fragments in 4,8% (22/453) of samples tested and the prevalence of positive animals at least one sample was 9,9% (15/151). Phylogenetic analysis has concluded that all sequences examined belonged to genotype 3 virus, described as zoonotic. We identified the subtypes 3c and 3f occurring both among samples according to the two regions of the genome amplified. These results are the first serological and molecular evidences of the existence of HEV among swine in Northern Brazil and also the first detection and genotyping of HEV in region.

Keywords: Hepatitis E virus. Swine. Serology. Genotype 3. Zoonosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3 DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E (HEV) EM SUÍNOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL BRASILEIRA	23
4 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite E (*Hepatitis E virus* - HEV) é um RNA-Vírus não-envelopado de distribuição endêmica em muitos lugares do mundo (NISHIZAWA et al., 2003). Segundo os autores a transmissão deste agente se dá principalmente por via fecal-oral, sendo veiculado por água contaminada, fazendo com que o HEV seja uma problemática em regiões alagadiças, com baixas condições sanitárias.

Epidemias em humanos são relatadas na Índia, África Central, América Latina, Oriente Médio e Repúblicas independentes da ex-União Soviética (PARANÁ; SCHINONI, 2002). De acordo com Inoue et al. (2006) esse vírus é responsável pela maior causa de hepatite viral entericamente transmissível no mundo. Estima-se que só na Índia mais de 2 milhões de casos ocorrem por ano (KHUROO, 2011). Em regiões consideradas como não-endêmicas é observado na forma de casos esporádicos (CLEMENTE-CASARES et al., 2003; TURNER et al., 2010).

A doença manifesta-se, geralmente, como hepatite aguda, de sintomatologia similar a hepatite A, que incluem icterícia, dores abdominais, elevação de enzimas hepáticas e febre (PANDA et al., 2007).

De um modo geral a doença apresenta curso auto-limitante, com baixa taxa de mortalidade, porém, em casos especiais como, por exemplo, em mulheres grávidas, o HEV pode ser transmitido verticalmente e/ou induzir a falha hepática aguda e morte. (KUMAR et al., 2004). Em pacientes imunossuprimidos a doença pode evoluir para quadros crônicos com infecções persistentes e cirrose (HAAGSMA et al., 2008; GÉROLAMI; MOAL, 2008)

Meng et al. (1997) diagnosticaram pela primeira vez o HEV em suínos e, após análise filogenética do vírus, foi constatado que este apresentava grande similaridade genética com os vírus isolados de humanos..

Os ciclos epidemiológicos da doença ainda não estão completamente determinados, porém atualmente o HEV também é considerado como um vírus zoonótico, e os suínos domésticos são relatados como os principais reservatórios do agente, apesar do vírus também já ter sido identificado em javalis, cervos, mangustos, ratos e coelhos e até mesmo em aves (HALBUR et

al., 2001; TAKAHASHI et al., 2004; NAKAMURA et al., 2006; ZHAO et al., 2009; KABA et al., 2010).

Em Suínos a infecção geralmente apresenta-se de modo assintomático, entretanto já foi provado que a excreção de partículas virais viáveis nas fezes de animais infectados consiste um risco de transmissão do vírus (MENG et al., 1998a; HALBUR et al. 2001, MENG; HALBUR, 2006; LEBLANC et al., 2007, BOUWKNEGT et al., 2008).

Devido ao fato de que em suínos as taxas de morbidade e mortalidade pelo vírus são pouco conhecidas, apesar de elevadas taxas de prevalência (MENG; HALBUR, 2006), sugere-se que o HEV pode circular silenciosamente em algumas populações em muitos lugares do mundo.

A caracterização dos genótipos circulantes em uma região é importante para verificação das possíveis fontes de infecção (HERREMANS et al., 2007).

Em animais naturalmente infectados o HEV pode ser identificado tanto em órgãos internos como nas fezes e, por tratar-se de uma zoonose, estudos sobre a prevalência deste agente em suínos e outras espécies contribuem para que posteriormente sejam avaliados possíveis fatores de risco aos quais determinadas populações podem estar sendo expostas sem a devida notificação (WILLIAMS et al., 2001)

Dados sobre a circulação do HEV ainda são pouco conhecidos no Brasil, portanto a identificação do HEV em suínos Estado do Pará contribuirá para o entendimento da epidemiologia do HEV no âmbito estadual. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo geral Diagnosticar a prevalência sorológica, molecular e os genótipos do vírus da hepatite E em suínos no Estado do Pará e, como objetivos específicos, detectar a infecção pelo HEV em suínos no Estado do Pará pela pesquisa de anticorpos anti-HEV das classes IgM e IgG e determinar a soroprevalência para esses marcadores nesta população e caracterizar os genótipos das sequências nucleotídicas parciais do genoma do HEV detectados, classificando-as a partir da similaridade com os genótipos do vírus descritos em humanos e animais disponíveis no Genbank.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No final de década de 70 do século passado foi registrada a ocorrência de um surto de hepatite aguda em humanos no vale da Caxemira, na Índia. A doença então foi designada como “hepatite não-A, não-B entericamente transmissível - ET-NANB” em virtude da caracterização da sua rota principal de transmissão por veiculação hídrica (KHUROO, 1980).

Para provar a existência deste agente e verificar o curso da doença, Balayan et al. (1983) inocularam por via oral um pool a 10% de fezes de 9 pacientes presumidamente com hepatite aguda não-A, não-B em um voluntário (o próprio Dr. Balayan) que posteriormente reproduziu quadro típico da doença e eliminou partículas similares ao vírus, identificadas por Imuno-eletromicroscopia. Estudos experimentais com primatas não-humanos também caracterizaram extensivamente estas partículas virais por reações moleculares e Imuno-eletromicroscopia (TSAREV et al., 1992).

Entre os anos de 1986 e 1987 foi registrada pela primeira vez na América a ocorrência de epidemias de hepatite ET-NANB em duas comunidades rurais no México (VELÁZQUEZ et al., 1990).

Entre os anos de 1988 e 1998 o HEV foi classificado na família *Caliciviridae* devido a relativa similaridade morfológica do vírus com os membros desta família, entretanto a análise filogenética de regiões não-estruturais do vírus não deu suporte a esta classificação, fazendo com que o HEV fosse inserido em um gênero separado como *Hepatitis E-like viruses* (BERKE; MATSON, 2000).

O HEV é um vírus RNA não-envelopado de cerca de 27-34 nm de diâmetro que apresenta simetria icosaédrica e ácido nucléico de fita simples e polaridade positiva (BRADLEY, 1990). Atualmente o vírus está classificado na família *Hepeviridae*, como único membro do gênero *Hepevirus* (FAUQUET; FARGETTE, 2005; MAYO, 2005).

O genoma viral de polaridade positiva é dividido em três “fases abertas de leitura” (*open reading frames* - ORFs): ORF1, ORF2 e ORF3 (Figura 1). A primeira, composta por 5079 nucleotídeos, é responsável pela síntese de proteínas não-estruturais relacionadas na replicação viral; a ORF2 codifica o capsídeo viral que contém epítomos que são alvo da resposta imune do

hospedeiro; a ORF3, composta de apenas 369 nucleotídeos codifica uma proteína que parece ter caráter imunossupressor, facilitando a infecção celular (PARANÁ; SCHINONI, 2002; TYAGI et al., 2004).

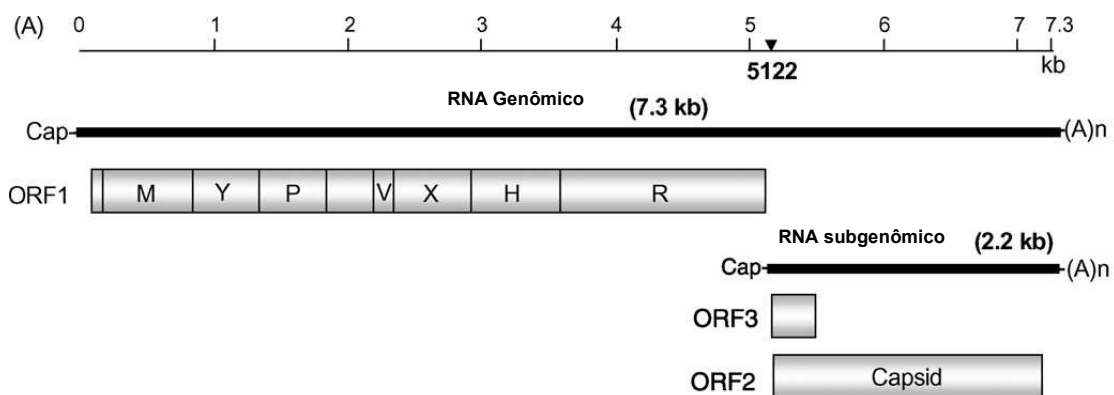


Figura 1 - Esquema da organização do genoma do HEV com tamanho de 7.3 kb, apresentando três fases abertas de leitura gênica (ORFs). M = Metiltransferase; Y = Domínio Y ; P = Protease Cisteína tipo-papaína; V = Domínio V; X = Domínio X; H = Helicase; R = RNA-dependente RNA-polimerase. Fonte: OKAMOTO (2007).

A ORF2 codifica uma proteína de 72 kDa, constituída por 660 aminoácidos e é sugerido que essa região seja alvo de anticorpos neutralizantes do HEV (ZHOU et al., 2004).

O capsídeo viral icosaédrico transcrito pela ORF2, estruturalmente, é constituído por três domínios protéicos lineares interligados: S, P1 e P2 (GUU et al., 2009). O domínio S apresenta conformação homogênea e sem cavitações, P1 contém protusões e o P2 parece desempenhar papel importante na determinação antigênica, porém todos os três domínios apresentam sítios de polissacarídeos que se ligam aos receptores celulares (GUU et al., 2009).

He et al. (2008) em estudo experimental com linhagens de células susceptíveis à infecção, bloquearam a entrada da proteína p239 (encontrada no capsídeo viral) a partir da utilização de anticorpos monoclonais com ação anti-HEV, propondo, portanto, que este peptídeo possa ser um receptor local de ligação.

Uma fosfoproteína codificada pela ORF3 e identificada como vp13 parece interagir eletrostaticamente com os microtúbulos celulares, reforçando a estabilidade destes no intuito de favorecer a infecção pelo HEV (KANNAN et al., 2009).

Após entrada do vírus na célula, imediatamente é produzido um mRNA sub-genômico bicistrônico que responsável pela codificação das proteínas tanto da ORF2 quanto da ORF3 (GRAFF et al., 2006).

O HEV de mamíferos é dividido em 4 genótipos, relacionados com a distribuição geográfica de ocorrência (Figura 3) e com as espécies que acometem. O genótipo 1, restrito a humanos, é considerado endêmico na Ásia e no norte da África. O genótipo 2, que também é exclusivamente humano, foi descrito no México e em epidemias na África central. O genótipo 3 foi encontrado em na América do Norte e do Sul, em regiões da Europa e no Japão e o genótipo 4 é descrito na China, Japão, Taiwan e Vietnã (PURCELL; EMERSON, 2008).

Em regiões de alta endemicidade, o vírus é responsável por cerca de >50% dos casos esporádicos de hepatite aguda (CLEMENTE-CASARES et al., 2003).

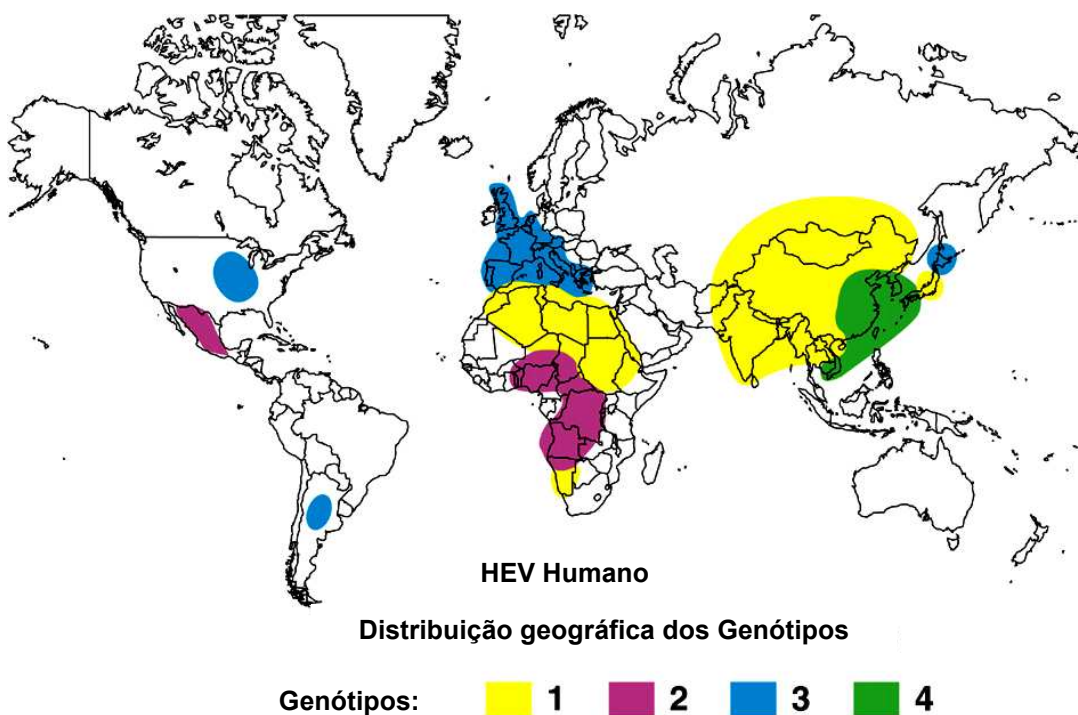


Figura 2 – Distribuição geográfica dos 4 genótipos do HEV em humanos no mundo.

Fonte: PURCELL; EMERSON (2008).

Os genótipos 3 e 4 são descritos como zoonóticos, pois apresentam estreita relação filogenética entre isolados humanos e de animais de uma mesma região geográfica(Figura 3) (PURCELL; EMERSON, 2008).

Os genótipos 1 e 2 podem ser categorizados como epidêmicos e apresentam menores diferenças gênicas quando comparados aos genótipos 3 e 4, fato que, pode estar relacionado a diferenças entre os mecanismos de transmissão (LU et al., 2006).

O papel dos suínos como principais reservatórios do HEV faz com que este agente possa mais enzoótico do que se acredita em países industrializados, pois o HEV e anticorpos anti-HEV podem ser observados em animais de diferentes idades, portanto, o HEV parece circular de modo difuso em propriedades positivas (CLEMENTE-CASARES et al., 2003).

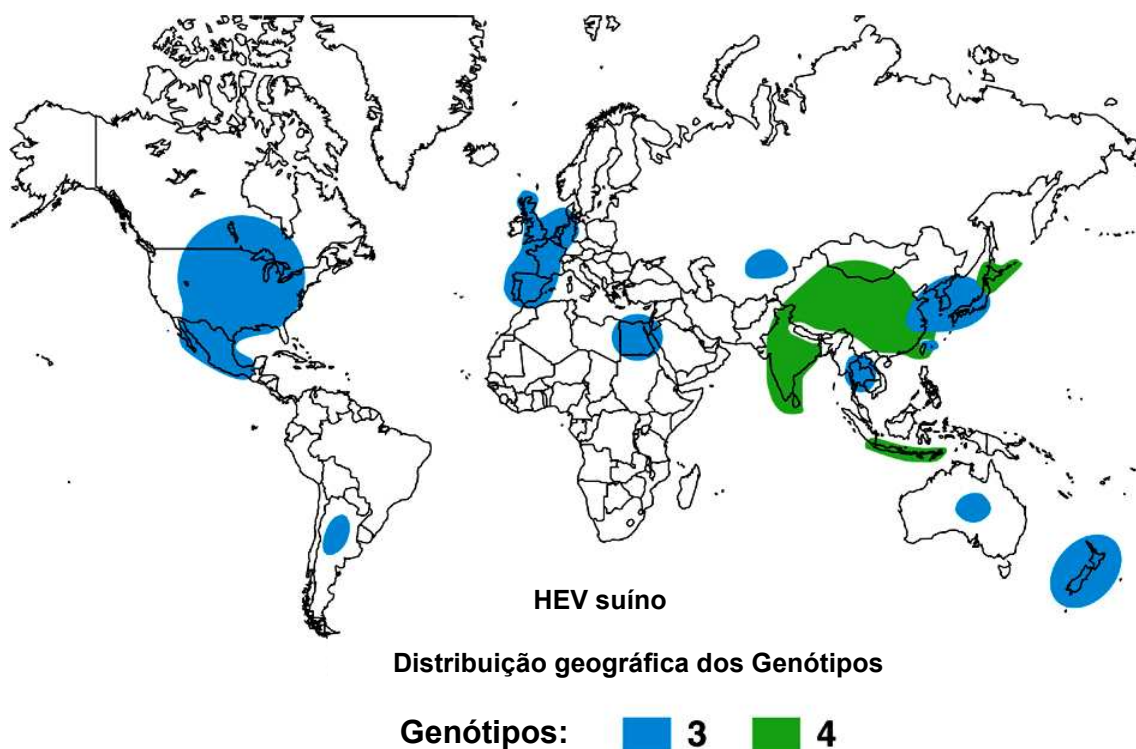


Figura 3 – Distribuição geográfica dos genótipos 3 e 4 do HEV em suínos no mundo.

Fonte: PURCELL; EMERSON (2008).

Isolados do genótipo 4 são considerados mais virulentos, porém com a ocorrência de cepas pertencentes ao genótipo 3 potencialmente virulentas no Japão, provas experimentais e circunstanciais levaram a sugerir a ocorrência

de mutações do vírus, tornando ainda maior a importância da compreensão da cadeia epidemiológica da doença (TAKAHASHI et al., 2009).

Estima-se por análise de relógio molecular com base na ORF2 que o tempo de divergência do ancestral comum entre os genótipos 3 e 4 do HEV date de aproximadamente 416 anos, porém este valor pode ser subestimado, já que suínos vem sendo domesticados há cerca de ~10.500 anos (ZEDER, 2008; PURDY; KHUDYAKOV, 2010).

De acordo com similaridades filogenéticas e geográficas os 4 genótipos do HEV foram divididos em subtipos designados alfabeticamente: 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f e 4g (LU et al., 2006).

Recentemente a identificação do HEV em ratos na Alemanha e coelhos na China abriram questionamentos sobre a possibilidade de existência de genótipos adicionais do vírus em mamíferos (ZHAO et al., 2009; JOHNE et al., 2010).

Pesquisa desenvolvida por Smith et al. (2002) com moradores de rua do subúrbio de Los Angeles, EUA, demonstrou uma soroprevalência de 13,5% ao HEV e esta evidência sorológica foi associada à exposição que estas pessoas estão submetidas a ratazanas (*Rattus norvegicus*), também consideradas como portadores do agente.

Sorologicamente, o HEV em roedores já havia sido registrado nos EUA em áreas urbanas e rurais (77% de positividade dos roedores testados na região de Maryland, 90% no Hawaii e 44% na Louisiana) com evidências de que anti-HEV IgG tendem a apresentar crescimento conforme a idade estimada destes animais (KABRANE-LAZIZI et al., 1999).

Um genótipo que parece estar restrito a aves também já foi descrito (HUANG et al., 2004) e na análise filogenética deste isolado constatou-se que ele foi diferente de outras cepas descritas em mamíferos (HAQSHENAS et al., 2001).

Experimentalmente o HEV aviário não infectou macacos Rhesus (BILLAM et al., 2005). Isolados desta variante aviária identificados por meio de RT-PCR (Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase) foram associados a um surto de hepatite e esplenomegalia em granjas aviárias no Canadá (AGUNOS et al., 2006).

Peralta et al. (2009) demonstraram por RT-PCR um alto percentual (89.7%) de propriedades na Espanha com pelo menos um animal positivo ao vírus da Hepatite E aviária, porém o real impacto deste agente dentro da produção de aves ainda permanece bastante desconhecido.

Em humanos, a hepatite E manifesta-se como hepatite aguda, que apresenta período de incubação de 15 a 65 dias e a excreção fecal de partículas virais ocorre em cerca de uma semana antes da manifestação da sintomatologia clínica, continuando por cerca de uma semana. Os sintomas clínicos e sinais são inespecíficos e incluem icterícia, anorexia, dor abdominal, hepatomegalia, vômitos e febre (WORM et al., 2002).

Em comparação a hepatite A, que também é uma hepatite viral de características epidemiológicas e patogenicidade semelhantes a hepatite E, em humanos, apresenta maior período de incubação, maior elevação de bilirrubina e maior taxa de mortalidade (HOOKS et al., 2009).

A hepatite E em humanos de um modo geral não apresenta características de cronicidade, com tendência a ser uma doença auto-limitante com resolução espontânea em até 6 meses (WORM et al., 2002). As lesões observadas no fígado em casos agudos de hepatite E são necrose intralobular, infiltrado polimórfico, e colangite no espaço porta com infiltrado neutrofilico (PERON et al., 2007).

Entretanto, Haagsma et al. (2008) relataram a ocorrência de dois casos de hepatite crônica após transplante de fígado, ambos atribuídos ao genótipo 3 do HEV, levantando-se portanto um questionamento sobre a cronicidade da doença em pacientes imunossuprimidos.

Um caso de hepatite E crônica com cirrose também foi relatado em uma senhora de 52 anos que havia sido previamente submetida a um transplante de rim (GÉROLAMI; MOAL, 2008).

Kamar et al. (2008) em estudo com 217 pacientes transplantados, observaram que 14 apresentaram-se como positivos ao HEV (6,5%), sendo que, deste número, 3 eram casos de pacientes receptores de fígado, 9 de rins e 2 de rins e pâncreas. Nesta mesma pesquisa, foi constatado ainda que 8 casos evoluíram para hepatite crônica.

Devido este caráter de cronicidade do ciclo da doença em pacientes imunossuprimidos ainda não estar completamente elucidado e por isso

representar uma problemática em potencial, as estratégias de diagnóstico devem ser cada vez mais investigadas (BIHL; NEGRO, 2009).

A dificuldade de diagnóstico da hepatite E, em virtude do curso similar a outras hepatites virais, pode significar que a doença pode estar sendo não diagnosticada em muitas regiões, pois sua diferenciação clínica é praticamente imperceptível e o diagnóstico sorológico e molecular é fundamental para diferenciação (PARANÁ; SCHINONI, 2002).

O HEV transmitido verticalmente de mães para bebês apresenta significantes taxas de morbidade e mortalidade (KHUROO et al., 1995).

Um estudo na Inglaterra e no País de Gales constatou que pacientes com hepatite E sem histórico de viagens para lugares em que a doença é endêmica apresentaram, em grande maioria, o perfil de serem de etnias sul-asiáticas, de idade avançada (>55 anos), e sexo masculino (76%), moradores de regiões costeiras ou estuários e infectados pelo genótipo 3 do vírus, sendo sugerido que suínos podem ser reservatórios naturais para o vírus e na cadeia epidemiológica da doença (IJAZ et al., 2005).

A literatura relata o caso de um homem de 47 anos de idade sem histórico de transfusão sanguínea ou viagem para áreas endêmicas que desenvolveu um caso esporádico agudo de hepatite E. Com etiologia do caso desconhecida, foi sugerida como provável fonte de infecção o gato doméstico do paciente que apresentava titulação positiva ao HEV e tinha o hábito de caçar ratos (KUNO et al., 2003).

Renou et al. (2007) sugerem que a fonte de infecção para um paciente com hepatite E aguda na França tenha sido o suíno criado como animal de companhia com o qual o homem mantinha estreito contato.

No Reino Unido, casos de hepatite E autóctone foram relacionados com o consumo de carne de porco contaminada com o HEV, pois o vírus isolado nos pacientes apresentaram identificação similar aos isolados do genótipo 3, que acomete humanos e suínos (DALTON et al., 2007).

Médicos veterinários e pessoas que trabalham diretamente com suínos podem ser classificados com uma categoria de risco, fazendo com que a doença apresente também um caráter ocupacional (MENG et al., 2002; GALIANA et al., 2008).

Variantes do genótipo 3a já foram detectadas em amostras provenientes de abatedouros suínos, sugerindo-se uma fonte de infecção ocupacional em potencial (LEBLANC et al., 2007).

O HEV pode ser mais endêmico do que o imaginado (WORM et al., 2002), haja visto que existe uma prevalência relativamente alta de anticorpos anti-HEV em indivíduos aparentemente saudáveis nos Estados Unidos e em outros países industrializados (VAN DER POEL et al., 2001; MENG et al., 2002; BOUTROUILLE et al., 2007).

A presença generalizada do HEV em suínos com significativa similaridade genética às sequências obtidas de humanos indicam que está ocorrendo transmissão inter-espécies (LEWIS et al., 2010).

A ocorrência de casos esporádicos da doença em países desenvolvidos e industrializados era relacionada, principalmente, a indivíduos com histórico de viagens para áreas em que o vírus é endêmico (SCHLAUDER et al., 2000), porém a identificação de casos autóctones esporádicos de hepatite E em regiões não-endêmicas como a Europa e os Estados Unidos indicam que o vírus parece estar mais amplamente distribuído do que o esperado e estudos demonstram uma possível importância de animais como reservatórios do agente (CLEMENTE-CASARES et al., 2003).

Com a finalidade de explorar o papel dos suínos na rota mais comum de infecção, um experimento com suínos infectados oralmente com o HEV demonstrou que estes animais são capazes de infectar outros animais controle (CASAS et al., 2009).

Meng (2010) sugere que esta grande variedade de espécies como prováveis reservatórios amplie ainda mais o risco em saúde pública do desenvolvimento desta zoonose, já que as rotas de transmissão ainda não estão completamente compreendidas.

Isolados do genótipo 3 do HEV já foram encontrados em baixas concentrações em águas residuais urbanas e em esgoto em regiões não endêmicas (CLEMENTE-CASARES et al., 2003; ALBINANA-GIMENEZ, 2006).

Um percentual de 11% de positividade ao HEV-RNA do genótipo 3 foi detectado em fígados de suínos vendidos em mercados nos Estados Unidos. Ao serem utilizados como inóculo experimental em suínos, essas amostras reproduziram a infecção pelo vírus e os animais inoculados com composto de

dois dos três fígados apresentaram eliminação fecal do vírus, viremia e soroconversão (FEAGINS et al., 2007).

Anticorpos anti-HEV foram detectados em 58% de suínos no Japão e, dentre os animais positivos, 15% tinham 3 meses e 13% tinham 4 meses de idade. No exame de RT-PCR, os animais com 6 meses de idade não apresentavam o RNA viral no soro, ao contrário do grupo de animais com 3 meses (TAKAHASHI et al., 2003).

Em estudo conduzido em granjas suínas da República Checa, Vasickova et al. (2009) observaram que a bile foi o material biológico mais freqüente para detecção do RNA do HEV (40%), seguido de tecido hepático (16,1%) e soro sanguíneo (3,2%), sendo todos pertencentes ao genótipo 3.

Suínos são relatados como os principais reservatórios do agente, porém existem evidências que outras espécies, como macacos, roedores, galinhas, vacas, ovelhas e cabras podem também atuar como reservatórios naturais do vírus (KABRANE-LAZIZI et al., 1999; FAVOROV et al., 2000).

Takahashi et al. (2004) detectaram o HEV-RNA em javalis (*Sus scrofa leucomystax*) com similaridade de 99,7% a sequências obtidas de cervos em uma mesma região no Japão (TEI et al., 2003), sugerindo que a transmissão inter-espécies pode ocorrer no ambiente selvagem.

Relatos da doença em humanos relacionados ao consumo de carne de javalis e veados indicam outras possíveis fontes de infecção (LI et al., 2005; MATSUDA et al., 2003).

Murídeos e mussaranhos também apresentaram positividade ao HEV no Vale Kathmandu, no Nepal, reforçando a teoria de que roedores também podem funcionar como reservatórios naturais do HEV (HE et al., 2002).

Primatas não-humanos neotropicais das espécies *Cebus apella*, *Aotus trivirgatus*, *Cebus albifrons* e *Saimiri sciureus* não apresentaram IgG anti-HEV, ao contrário da espécie *Macaca fuscata* que, com índice de 36,2% de prevalência no Japão, pode estar relacionada a casos esporádicos da doença (HIRANO et al., 2003).

Em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) experimentalmente infectados com suspensões fecais suínas as alterações patológicas observadas corresponderam a uma leve a moderada palidez de hepatócitos e infiltrado

linfoplasmocitário focal na área portal, um aumento significativo dos níveis de ALT pós-inoculação e soroconversão para anti-HEV IgG (JI et al., 2008).

Suínos infectados experimentalmente apresentaram leve infiltrado linfoplasmocitário e necrose hepatocelular focal (LEE Y. et al., 2009). Segundo os autores nestes animais o curso da infecção parece ser de não apresentar sintomatologia clínica e as lesões hepáticas parecem se manifestar de forma bastante branda em animais jovens. Meng et al. (1998b) citam que o aumento de enzimas hepáticas em suínos experimentalmente infectados parece não ser significativo.

Antígenos do HEV já foram demonstrados no citoplasma de hepatócitos não degenerados de suínos pela técnica de Imuno-histoquímica, além de terem sido detectados também na zona do manto de linfonodos, ao redor das artérias próximas aos folículos linfóides do baço e na lâmina própria do intestino delgado e grosso (HA; CHAE, 2004).

A alta soroprevalência de anti-HEV em criações comerciais de suínos sugerem que o vírus está bastante disseminado em muitas populações suínas (MENG et al., 1997). Adicionalmente, consideram as populações de animais soroprevalentes como possíveis fontes de infecção, e que podem também ser responsáveis pela detecção de anticorpos anti-HEV em indivíduos de regiões em que a doença é classificada como não-endêmica (MENG, 2010).

Os primeiros isolados do vírus na América do Sul foram provenientes de pacientes humanos na Argentina (SCHLAUDER et al., 2000) e somente no ano de 2006 o HEV, classificado dentro do genótipo 3, foi identificado em suínos na América do Sul, na província de Buenos Aires, Argentina, país até então considerado não-endêmico para o vírus (MUNNÉ et al., 2006).

No Brasil, a análise filogenética de sequências do HEV em suínos dos Estados de São Paulo, Mato Grosso e Rio de Janeiro revelaram relação próxima com cepas do Genótipo 3 (PAIVA et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2009).

O primeiro caso de Hepatite E autóctone no país foi diagnosticado em um paciente de 30 anos com histórico de consumo de carne de porco que apresentava sintomatologia de hepatite aguda, porém, negativo para os vírus da hepatite A, B e C, vírus Epstein-Barr, Citomegalovírus, Herpesvirus, HIV,

Toxoplasma gondii, *Treponema pallidum* e positivo ao HEV (genótipo 3) (DOS SANTOS et al., 2010).

Como a presença do HEV no Brasil já foi demonstrada, a possibilidade de infecção por este agente não deve ser negligenciada, pois em casos de hepatite aguda não-A, não-B e não-C pode existir participação do vírus E, causando assim, um impacto na saúde pública que merece ser investigado (DOS SANTOS et al., 2009).

A detecção de anticorpos em pessoas clinicamente saudáveis de regiões consideradas como não-endêmicas sugerem a possibilidade de ocorrência de infecções subclínicas (LIN et al., 2000).

No estudo de populações, os ensaios imunoenzimáticos são utilizados para o diagnóstico do HEV. Withers et al. (2002) verificaram que no soro sanguíneo o teste de ELISA (Imunoensaio ligado à enzima) para pesquisa quantitativa de anticorpos anti-HEV IgM e IgG o nível destes anticorpos está relacionado ao capsídeo do HEV, codificado pela ORF2 do genoma viral. Os autores consideraram um ponto de corte de 20 U/ml no soro sanguíneo de suínos, ao utilizarem uma técnica indireta (IgG de coelhos), porém este valor não é universal e pode mudar conforme variações na técnica.

Os Kits comerciais para detecção de anticorpos anti-HEV são baseados principalmente na proteína do capsídeo viral codificada pela ORF2 e de uma forma geral são eficientes na detecção de anticorpos anti-HEV (BIHL; NEGRO, 2009), já que até o presente momento somente um sorotipo do vírus é conhecido (MENG et al., 1997).

A ORF2 do genoma codifica o capsídeo viral, que apresenta características imunodominantes, e a comparação dos aminoácidos traduzidos por sequências desta região obtidas de casos humanos de Hepatite E e sequências de suínos podem chegar a similaridade de até 100% (BANKS, 2004), ilustrando esta estreita relação entre isolados dos genótipos 3 e 4, caracterizados como zoonóticos.

Zhou et al. (2004) identificaram uma maior soroprevalência de anticorpos anti-HEV relativas aos aminoácidos 112-607 da proteína codificada pela região ORF2, indicando que a técnica como eficiente para a quantificação da resposta imune humoral em indivíduos infectados pelo vírus.

Uma grande semelhança antigênica entre cepas humanas e suínas sugerem a presença de epítomos cruzados entre as espécies, fato que, pode implicar, em uma utilização relativamente segura de kits humanos para detecção de anticorpos em suínos (CHOI et al., 2003).

Utilizando a técnica de ELISA, Seminati et al. (2008) observaram uma maior proporção de animais IgG anti-HEV positivos em matrizes, seguido de leitões jovens de 3 a 6 semanas de vida, enquanto a IgM foi observada predominantemente em animais com 12 ou mais semanas de vida. Este mesmo estudo sugere, por dados sorológicos, que a circulação do HEV acontece no final do período de maternidade e início do período de engorda em virtude de uma interferência de anticorpos maternos.

Estudo conduzido por Lee W. et al. (2009) com suínos na Coreia utilizando kit comercial de ELISA obteve uma soroprevalência de anti-HEV IgG de 39,5%, com aumento idade-dependente.

O Immunoblot pode ser utilizada como forma de confirmação da reação positiva com o antígeno HEV pela pesquisa de IgM e IgG (YOO et al., 2001). Herremans et al. (2007) indicam a utilização do Immunoblot como teste confirmatório para amostras positivas no teste de ELISA em regiões de baixa endemicidade.

A técnica de Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) é amplamente descrita dentro da literatura como uma das técnicas mais eficientes no diagnóstico da hepatite E, pois identifica os ácidos nucléicos virais. Essa técnica foi utilizada por Jothikumar et al. (2000) como protocolo para isolamento do vírus da hepatite A e do vírus da hepatite E em amostras de água em áreas urbanas de Chennai, na Índia. Como resultado 39,13% das amostras foram positivas ao VHA e 13,04% ao HEV, portanto a técnica pode ser utilizada na avaliação sanitárias e no controle destas enfermidades

Lee Y. et al.(2009) detectaram o ácido nucléico do HEV pela técnica de RT-PCR em fezes de suínos infectados experimentalmente somente a partir do 3º dia pós-infecção e, por conseguinte, este índice de detecção demonstrava-se em declínio.

Uma helicase codificada por um gene da região ORF1, região provavelmente mais conservada do HEV genoma, parece estar envolvida na replicação, recombinação e transcrição do genoma viral podendo ser, portanto,

um alvo em técnicas de diagnóstico baseadas em biologia molecular (LEE W. et al., 2009).

Purdy e Khudyakov (2010) sugerem a utilização de protocolos combinados de sorologia e biologia molecular para o diagnóstico do HEV.

Paiva et al. (2007) fizeram o primeiro isolamento e caracterização molecular do HEV em suínos no Brasil a partir da análise filogenética de segmentos amplificados da ORF2 e observaram maior identidade com o genótipo 3. No Brasil, isolados do HEV suíno foram classificados filogeneticamente como pertencentes ao genótipo 3, ressaltando-se assim a problemática da existência do vírus no país, onde a doença não é considerada como endêmica (DOS SANTOS et al., 2009).

3 DETECÇÃO SOROLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE E (HEV) EM SUÍNOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL BRASILEIRA

RESUMO

O vírus da Hepatite E (HEV) é um agente de transmissão fecal-oral, do gênero *Hepevirus*, causador de hepatite aguda em humanos e que apresenta ampla distribuição em diversas regiões do mundo. Suínos são relatados como a principal fonte de infecção para humanos relacionadas aos genótipos 3 e 4 em regiões consideradas como não-endêmicas. Para demonstrar a infecção pelo HEV em suínos no Estado do Pará, na Amazônia Oriental brasileira, desenvolvemos um estudo sorológico e molecular em que foram analisadas amostras de soro, fezes e fígado de 151 suínos adultos, abatidos na mesorregião metropolitana do Município de Belém durante o período de abril a outubro de 2010. A pesquisa sorológica incluiu testes para detecção de anticorpos anti-HEV IgM e IgG e o diagnóstico molecular abrangeu a detecção do HEV genoma por Nested RT-PCR, sequenciamento nucleotídico e análise filogenética das sequências obtidas. Como resultado, a prevalência de animais sororeativos para IgG foi de 8,6% (13/151) e anticorpos anti-HEV IgM não foram detectados. O diagnóstico molecular identificou o HEV genoma em 4,8% (22/453) das amostras testadas, sendo que a prevalência de animais positivos a pelo menos uma amostra foi de 9,9% (15/151). A análise filogenética concluiu que todas as sequências obtidas durante o estudo pertencem ao genótipo 3 e que as amostras estão relacionadas a isolados humanos de outras regiões não-endêmicas, sugerindo potencial zoonótico dos isolados. Foram identificados os subtipos 3c e 3f ocorrendo simultaneamente entre as amostras, sugerindo a ocorrência de infecções por múltiplas strains e/ou recombinantes do vírus. Estes resultados constam como as primeiras evidências sorológicas e moleculares da circulação do HEV entre suínos na Amazônia Oriental brasileira e também como a primeira detecção e genotipagem do HEV na região.

Palavras-chave: Vírus da hepatite E (HEV); Suínos; zoonose; genótipo 3

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is a fecal-orally transmitted member of the genus *Hepevirus* that causes acute hepatitis in humans and is widely distributed throughout the world. Pigs have been reported to be the main source of genotype 3 and 4 infection in humans in non-endemic areas. To investigate HEV infection in pigs in the state of Pará, eastern Brazilian Amazonia, we performed serological and molecular analyses of serum, fecal and liver samples from 151 adult pigs. The samples were collected from pigs slaughtered between April and October 2010 in slaughterhouses in the greater metropolitan area of Belém. The sera were tested for anti-HEV IgM and IgG, and HEV was detected using nested RT-PCR. The HEV genomes obtained were sequenced, and a phylogenetic analysis was performed. Of the animals tested, 8.6% (13/151) were seropositive for anti-HEV IgG; however, anti-HEV IgM antibodies were not detected in any of the animals. The RT-PCR detected the HEV genome in 4.8% (22/453) of the samples tested, and 9.9% (15/151) of the animals received a positive result for at least one sample. The phylogenetic analysis revealed that all the sequences obtained during the study belonged to genotype 3 and that the samples were related to human isolates from other non-endemic regions, which suggested that the isolates had zoonotic potential. Subtypes 3c and 3f were simultaneously detected in some samples, suggesting co-infection by multiple strains and/or the presence of a recombinant virus. These results constitute the first molecular and serologic evidence of HEV circulation among pigs in the eastern Brazilian Amazon and represent the first detection and genotyping of HEV in the region.

Keywords: Hepatitis E virus (HEV), pigs, zoonosis, genotype 3.

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite E (HEV) é um RNA-vírus entericamente transmissível do gênero *Hepevirus* causador de hepatite aguda em humanos (OKAMOTO, 2007). São descritos quatro genótipos majoritários em mamíferos de acordo com a distribuição geográfica de ocorrência: o genótipo 1 é

considerado endêmico na Ásia e no norte da África; o genótipo 2 foi descrito no México e em epidemias na África central; o genótipo 3 é descrito na América do Norte e do Sul, em regiões da Europa e no Japão e o genótipo 4 é relatado na China, Japão, Taiwan e Vietnã (PURCELL ; EMERSON, 2008).

Os genótipos 1 e 2 são categorizados como epidêmicos, infectam exclusivamente humanos e apresentam menores diferenças gênicas (5 e 2 subtipos, respectivamente) quando comparados aos genótipos 3 e 4 (10 e 7 subtipos, respectivamente), fato que pode estar relacionado aos mecanismos de transmissão do vírus (LU et al., 2006).

Os genótipos 3 e 4 são descritos como zoonóticos, pois são identificados em regiões em que o HEV apresenta grande similaridade genética entre isolados humanos e animais (PURCELL ; EMERSON, 2008).

Meng et al. (1997) identificaram pela primeira vez o HEV em suínos e, após análise filogenética desta amostra, constataram que ela apresentava grande similaridade com isolados humanos do vírus, sugerindo potencial zoonótico da infecção.

Os ciclos epidemiológicos da doença ainda não estão completamente determinados, porém atualmente o HEV é considerado como um vírus zoonótico e suínos domésticos são relatados como as principais fontes de infecção para humanos pelos genótipos 3 e 4 em regiões não-endêmicas (HALBUR et al., 2001; MENG, 2010), apesar do vírus também já ter sido identificado em javalis (TAKAHASHI et al., 2004; KABA et al., 2010), cervos (TAKAHASHI et al., 2004), mangustos (NAKAMURA et al., 2006), ratos (JOHNE et al., 2010), coelhos (ZHAO et al., 2009) e até mesmo em aves (HUANG et al., 2004; PERALTA et al., 2009).

O genoma viral é dividido em 3 *Open reading frames*: ORF1, responsável pela codificação de proteínas não-estruturais envolvidas na replicação viral (PARANÁ ; SCHINONI, 2002), ORF2 responsável pela síntese do capsídeo viral (ZHOU et al., 2004) e ORF3 responsável pela síntese de uma fosfoproteína que parece favorecer a infecção pelo vírus (KANNAN et al., 2009).

O primeiro isolado do HEV no Brasil foi obtido de amostras de fezes de suínos no Estado do Mato Grosso, na região Centro-Oeste do país, e a análise filogenética desta amostra indicou similaridade com o genótipo 3 (PAIVA et al.,

2007). Amostras do genótipo 3 do HEV também foram obtidas de suínos e efluentes de matadouros suínos no Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (DOS SANTOS et al., 2009, 2011).

Recentemente pela primeira vez foi identificado no Brasil um caso humano de hepatite E autóctone em um paciente com hepatite aguda não-A-C. Nesse caso o genótipo 3b do HEV foi identificado sugerindo uma provável origem zoonótica da infecção. (DOS SANTOS et al., 2010).

Estudos acerca da circulação do HEV em suíno no Brasil ainda são escassos e diante dos aspectos zoonóticos desta infecção, sua epidemiologia precisa ser melhor caracterizada. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar a presença da infecção pelo HEV em suínos procedentes de matadouros do Estado do Pará, Amazônia Oriental brasileira, assim como caracterizar os genótipos circulantes nessa região.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e amostras

Durante os meses de abril a outubro do ano de 2010 foram coletadas amostras de soro, fezes e fígado de 151 suínos (\pm 6 meses de vida) durante o abate. Amostras de 95 animais foram coletadas em um matadouro oficial localizado no Município de Santa Izabel do Pará. Este estabelecimento possui critérios sanitários de inspeção estabelecidos pela Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará baseados principalmente na inspeção visual das vísceras e das carcaças para determinação da aprovação para comercialização dos produtos obtidos após o abate dos suínos.

As amostras dos outros 56 animais foram coletadas em 3 pontos de abate clandestino situados no Município de Belém. Estes estabelecimentos são caracterizados por não apresentarem registro legal junto às agências sanitárias oficiais reguladoras deste tipo de atividade e por abaterem animais provenientes de pequenas propriedades (escala familiar) para comercialização direta destes produtos em feiras-livres e mercados da região metropolitana de Belém.

Todos os 4 pontos de coleta encontram-se situados na Mesorregião Metropolitana de Belém, no Estado do Pará. Os animais foram provenientes

dos Municípios de Belém, Marituba, Santa Izabel do Pará, Castanhal, Bujarú e do arquipélago do Marajó.

De cada animal foram coletadas amostras de soro, fezes e fígado durante o abate e todo material biológico permaneceu congelado na temperatura de -70°C até posterior análise.

Este estudo foi desenvolvido de acordo com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto Evandro Chagas – Belém/Pará/Brasil (parecer de aprovação n° 0019/2010/CEPAN/IEC/SVS/MS) e as atividades envolvidas obedeceram aos pré-requisitos de ética e bem-estar animal deste comitê.

Detecção sorológica

O *screening* do estudo sorológico foi baseado na pesquisa de anticorpos anti-HEV das classes IgM e IgG em todas as amostras de soro dos 151 suínos utilizando-se o kit comercial *RecomWell* HEV IgM e IgG (Mikrogen), baseado no princípio de ELISA indireto. Os procedimentos laboratoriais e interpretação dos testes seguiram as instruções do fabricante e a fotometria para medição das absorvâncias foi feita em leitora automática de microplacas (450 nm/650 nm) imediatamente após o bloqueio da reação. A quantificação dos anticorpos foi baseada em cálculo também determinado pelo fabricante.

As amostras de soro classificadas como positivas ou inconclusivas no teste de ELISA foram testadas adicionalmente pelo kit comercial de Immunoblot *RecomLine* HEV (Mikrogen) para confirmação da reatividade sorológica.

Além dos controles positivos e negativos dos *kits* foram adicionados controles positivos internos e as amostras positivas e/ou inconclusivas foram testadas em duplicata. Os testes também foram validados segundo orientações específicas do fabricante.

Extração de RNA

A extração do RNA viral das amostras de soro foi feita com o reagente Trizol LS (Invitrogen). O protocolo de extração do RNA viral das amostras de fezes foi adaptado para utilização no RNeasy mini kit (QIAGEN). Segundo protocolo sugerido por Leblanc et al. (2007) as amostras de fezes foram previamente preparadas em solução a 10% (diluídas em PBS pH 7,4) e

incubadas em *overnight* à 4°C, sendo em seguida centrifugadas para retirada do sobrenadante que foi utilizado para extração. O RNA viral foi extraído das amostras de fígado também a partir da utilização do RNeasy mini kit (QIAGEN).

Nested RT-PCR

A etapa de transcrição reversa para síntese do cDNA foi feita com a utilização de primers randômicos (Erker et al., 1999) e da enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (Invitrogen).

As amostras de Soro, fezes e fígado dos 151 animais foram testadas pela técnica de *Nested* RT-PCR para detecção de 3 regiões parciais do genoma do HEV.

Para amplificação de fragmentos do HEV genoma foram utilizados dois conjuntos de *primers* oligonucleotídicos descritos por Wang et al. (1999) correspondentes a fragmentos da ORF1 e ORF2 do protótipo Burma do HEV.

Os *primers* da ORF1 situados nas posições nucleotídicas 56-79 e 473-451 correspondem a região codificadora da Metiltransferase. Os *primers* externos (ConsORF1-s1, 5' CTGGCATYACTACTGICYATTGAGC e ConsORF1-a1, 5' CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC) e os *primers* internos (ConsORF1-s2, 5' CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG e ConsORF1-a2, 5' GGCAGWRTACCARGCTGAACATC) amplificam produtos de 418 e 287 pares de base de comprimento na primeira e segunda PCR, respectivamente.

Os *primers* da ORF2 correspondem às posições 6298-6321 e 6494-6470 do protótipo de Burma. Os *primers* externos (ConsORF2-s1, 5' GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG e ConsORF2-a1, 5' CTTGTTCRTGYTGGTTRTCATAATC) amplificam produtos com tamanhos de 197 pb na primeira PCR e os *primers* internos (ConsORF2-s2, 5' GTYGTCTCRGCCAATGGCGAGC e ConsORF2-a2, 5' GTTCRTGYTGGTTRTCATAATCCTG) amplificam produtos de 145 pb na segunda PCR.

Adicionalmente, as amostras foram testadas utilizando-se um terceiro conjunto de *primers* que também amplificam um segmento da ORF2. Estes iniciadores (externos - 3156NF, 5' AATTATGCYCAGTAYCGRGTTG e 3157NR, 5' CCCTTRTCYTGCTGMGCATTCTC; e internos - 3158NF, 5' GTWATGCTYTGCATWCATGGCT e 3159NR, 5'

AGCCGACGAAATCAATTCTGTC) utilizados no presente estudo foram descritos para detecção do HEV por Huang et al. (2002) e Leblanc et al. (2007) e amplificam produtos de 731 e 348pb na primeira e segunda PCR, respectivamente.

Os procedimentos laboratoriais de extração de RNA e PCRs foram desenvolvidos em ambientes distintos. Cuidados adicionais como a constante troca de luvas, higienização dos utensílios e cabines de segurança biológica com álcool 70%, hipoclorito e luz UV foram aplicados a fim de minimizar a ocorrência de contaminação.

Em todas as reações de PCR foram adicionados controles positivos para certificação da efetividade das reações e controles negativos (H₂O DEPC) para verificação de contaminantes que poderiam vir a influenciar na amplificação do genoma viral.

As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 50µL por amostra testada: 35,3 µL de H₂O DEPC; 5 µL de 10x PCR *buffer*; 1 µL de DNTPs (10mM) (Invitrogen); 1,5µL de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen); 1µL do *primer forward*; 1µL do *primer reverse*; 0,2µL da Platinum Taq polimerase (Invitrogen) e 5µL do cDNA da amostra.

Esta formulação fixa foi estabelecida para todas as reações de PCR, diferindo apenas na adição dos pares de *primers* de acordo com a etapa de PCR e das regiões amplificadas. Na segunda PCR, ao invés do cDNA foram adicionados 5 µL dos produtos da primeira PCR.

O programa de amplificação das PCRs seguiu as seguintes etapas: desnaturação inicial por 94°C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (50°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos), subsequente extensão final de 72°C por 5 minutos e hold a 10°C. A temperatura de anelamento diferiu somente nos primers de 348 pb (42 °C).

Os produtos da segunda PCR foram marcados com o corante SYBR (Invitrogen) e separados por eletroforese em gel de agarose a 1%. De acordo com os *primers* utilizados, amostras que apresentaram bandas nítidas e intensas com tamanhos aproximados de 145, 287 e 348 pares de base foram consideradas como positivas.

Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética

Os produtos de 2ª PCR selecionados foram sequenciados com a utilização do BigDye® *Terminator* v3.1 *Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as orientações do fabricante.

As sequências *forward* e *reverse* de cada amostra foram precipitadas, ressuspensas em 10 µL de formamida e sequenciadas no sequenciador modelo ABI PRISM 3130XL *DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Com auxílio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - National Center for Biotechnology Information - NCBI) foi verificado o grau de similaridade das sequências obtidas durante o estudo com outras sequências do HEV disponíveis no banco de dados do NCBI para determinação da positividade das amostras.

Quinze sequências nucleotídicas de 287 pb (ORF1) e 7 sequências de 348 pb (ORF2) do HEV obtidas nos suínos no Estado do Pará foram selecionadas para serem alinhadas, analisadas filogeneticamente e genotipadas de acordo com outras sequências do HEV isoladas em humanos e animais de diversas regiões do mundo disponíveis no banco de dados do GenBank (NCBI).

As sequências nucleotídicas foram alinhadas, analisadas no programa MEGA4: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) *software version* 4.0. (TAMURA et al., 2007) e agrupadas pelo método de Neighbor-Joining. Análise de *Bootstrap* (1000 replicatas) foi desenvolvida para determinação da confiabilidade das relações filogenéticas. Valores de *Bootstrap* maiores que 70% foram considerados como significativos para a formação dos grupos da árvore genética.

Os cálculos de divergência nucleotídica entre as sequências foram feitos a partir do modelo de substituição de nucleotídeos pelo método Kimura-2 parâmetros.

RESULTADOS

Deteccão sorológica

A prevalência de anti-HEV IgG indicada no teste de ELISA (Cut-off = 0,3) foi de 4,6% (7/151) (média de absorbância = 0,643; DP = ± 0,214).

Adicionalmente, 3,9% (6/151) (média de absorbância = 0,308; DP = $\pm 0,024$) foram classificados como inconclusivos.

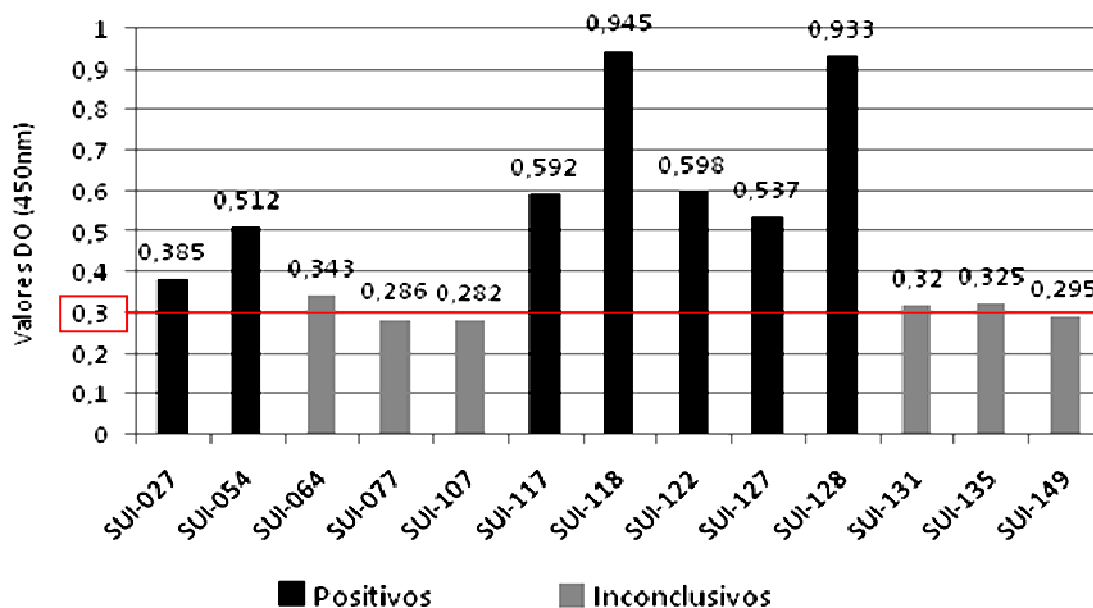


Figura 1 - Valores individuais de densidade óptica na pesquisa de anti-HEV IgG em amostras de soro classificadas como positivas e inconclusivas no teste de ELISA. Valor de Cut-off destacado em vermelho ($\geq 0,300$).

A média de anticorpos anti-HEV IgG entre as 7 amostras positivas foi de 42,1 U/mL (DP=14,6) e de 20,5 U/mL (DP=1,6) entre as 6 amostras inconclusivas (Figura 2).

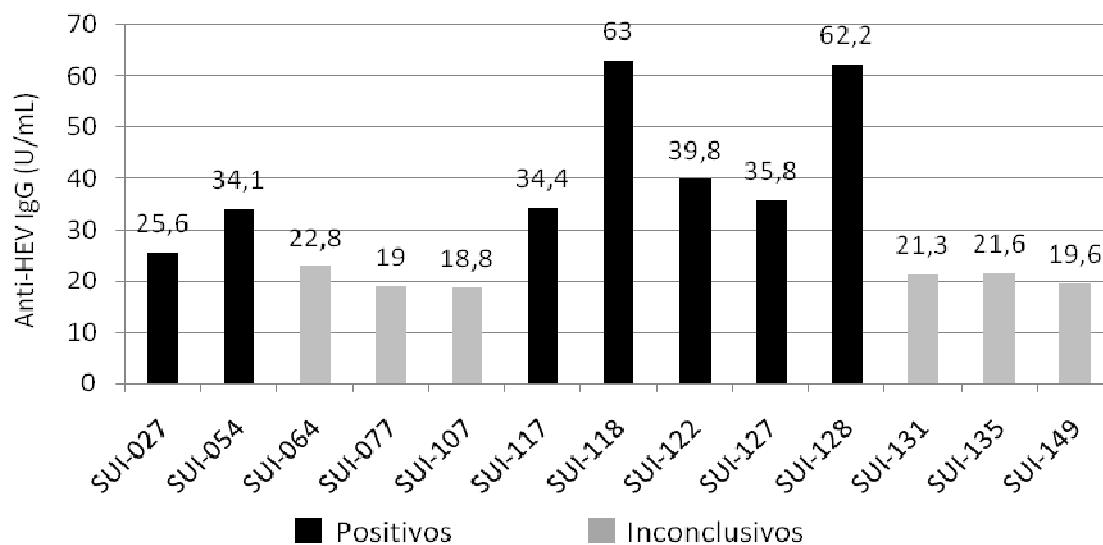


Figura 2 - Valores individuais de anticorpos anti-HEV IgG (U/mL) em amostras de soro classificadas como positivas e inconclusivas no teste de ELISA.

Todos os 13 casos (7 positivos e 6 inconclusivos) tiveram a reatividade para anti-HEV IgG posteriormente confirmada por Immunoblot, portanto o resultado combinado das análises sorológicas indicou uma prevalência global de 8,6% (13/151) para marcadores sorológicos anti-HEV. Anticorpos anti-HEV IgM não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas.

Dos 13 suínos sorologicamente positivos, 10 animais foram provenientes do município de Bujarú, 2 do município de Castanhal e 1 do arquipélago do Marajó.

Nested RT-PCR

Os testes com cada conjunto de primers analisaram 453 amostras correspondentes ao material de soro, fezes e fígado dos 151 suínos. Os primers de 145pb da ORF2 amplificaram produtos positivos em 5 amostras (1,1%) (1 soro; 2 fezes; 2 fígado), 9 amostras (1,9%) (2 soro; 5 fezes; 2 fígado) foram positivas para os primers de 287pb da ORF1 e os primers de 348pb da ORF2 amplificaram produtos positivos em 7 amostras (1,5%) (2 soro; 3 fezes; 2 fígado).

O percentual de amostras positivas a pelo menos um conjunto de primers, com confirmação da análise filogenética, foi de 4,8% (22/453), sendo 12 de amostras de fezes, 6 de fígado e 4 de soro. O animal #027 foi o único caso sorologicamente positivo em que o RNA viral foi identificado nos testes de RT-PCR.

O resultado combinado das reações de RT-PCR e da análise filogenética indicou que 15 animais (9,9%) foram positivos a pelo menos uma amostra reagindo à amplificação por pelo menos um conjunto de *primers* (Tabela 1)

Tabela 1 - Resultados das reações de detecção molecular do HEV em suínos no Estado do Pará confirmados por sequenciamento nucleotídico e análise Filogenética

RG. ANIMAL	AMOSTRA	RESULTADOS DE <i>NESTED</i> RT-PCR, SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA		
		ORF2 (145pb)	ORF1 (287pb)	ORF2 (348pb)
#025	Soro	-	+	-
	Fezes	-	-	-
	Fígado	-	-	-
#027	Soro	+	+	-
	Fezes	+	+	+
	Fígado	+	+	+
#028	Soro	-	-	-
	Fezes	-	-	-
	Fígado	-	+	-
#029	Soro	-	-	-
	Fezes	+	+	+
	Fígado	-	+	-
#030	Soro	-	-	-
	Fezes	-	+	-
	Fígado	-	-	-
#031	Soro	-	-	-
	Fezes	-	+	-
	Fígado	-	-	-
#032	Soro	-	-	-
	Fezes	-	+	-
	Fígado	-	-	-
#034	Soro	-	-	-
	Fezes	-	+	+
	Fígado	-	-	-
#035	Soro	-	+	+
	Fezes	-	+	+
	Fígado	-	+	-
#036	Soro	-	-	-
	Fezes	-	-	-
	Fígado	-	+	-
#037	Soro	-	-	-
	Fezes	-	+	+
	Fígado	-	-	-
#080	Soro	-	-	-
	Fezes	-	+	-
	Fígado	-	-	-
#125	Soro	+	-	+
	Fezes	+	+	+
	Fígado	+	+	+
#147	Soro	-	-	-
	Fezes	-	+	-
	Fígado	-	-	-
#150	Soro	-	-	-
	Fezes	+	-	-
	Fígado	-	-	-
TOTAL/TESTADO (%)		8/453 (1,76%)	20/453 (4,41%)	10/453 (2,2%)

Análise Filogenética

O agrupamento filogenético de 15 sequências da região 5' terminal da ORF1 obtidas em suínos no Estado do Pará indicou que todas pertencem ao genótipo 3 do HEV. Destas sequências, 14 apresentaram proximidade ao clado

de sequências do subtipo 3c e uma sequência agrupou de modo divergente, sendo classificada no subtipo 3f (Figura 3).

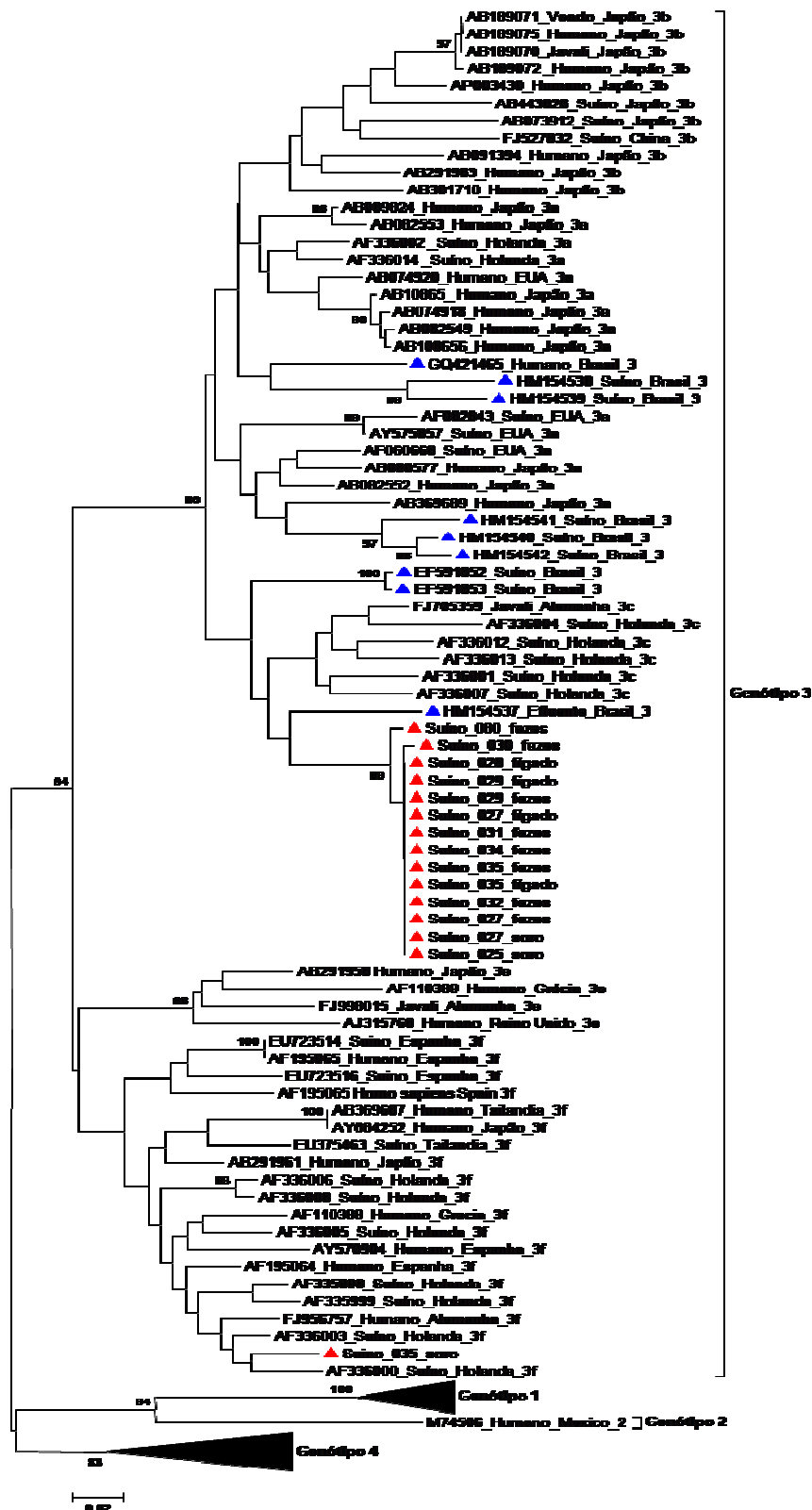


Figura 3 – Árvore filogenética baseada na análise de 266 nt da região 5'-terminal ORF1 do HEV pelo método de Neighbor-joining. As sequências do GenBank estão identificadas pelo número de acesso, seguido pela fonte de isolamento do vírus, origem geográfica e genótipo/subtipo. Análise de Bootstrap foi feita em 1000 replicatas para verificação da

confiabilidade dos dados. Valores maiores de 70% estão demonstrados nos ramos das árvores. As sequências obtidas durante o estudo estão destacadas com um triângulo vermelho e identificadas pelo número do animal seguido pela amostra. As demais sequências já caracterizadas no Brasil com um triângulo azul. Os ramos dos genótipos 1 e 2 encontram-se colapsados. Bar = 0,02 substituições/sítio.

O cálculo de divergência das 15 sequências da ORF1 identificadas no Estado do Pará indicou que elas apresentam identidade nucleotídica que varia de 78-100%.

A análise filogenética da região 5' terminal da ORF2 de 7 sequências obtidas de suínos no Estado do Pará indicou que elas também pertencem ao genótipo 3 do HEV, também com similaridade ao subtipo 3f e identidade entre si variando de 93-100% (Figura 4).

De acordo com a análise das regiões ORF1 e ORF2, foram obtidas sequências dos subtipos 3c e 3f coexistindo em algumas amostras (Tabela 2).

Tabela 2 - Subtipos divergentes do HEV coexistindo entre amostras biológicas obtidas de suínos no Estado do Pará de acordo com a análise filogenética de fragmentos das regiões ORF1 e ORF2. ND, Não determinado

Número do suíno	Amostra	Subtipos do HEV de acordo com a análise filogenética das regiões genômicas	
		ORF1	ORF2
#027	Fezes	3c	3f
#029	Fígado	3c	3f
	Fezes	3c	3f
#034	Fezes	3c	3f
#035	Soro	3f	3f
	Fezes	3c	3f
	Fígado	3c	ND

Dos 15 animais positivos a pelo menos uma amostra biológica, com confirmação por sequenciamento nucleotídico e análise filogenética, 12 procederam do município de Bujarú, 2 de Castanhal e 1 do arquipélago do Marajó.

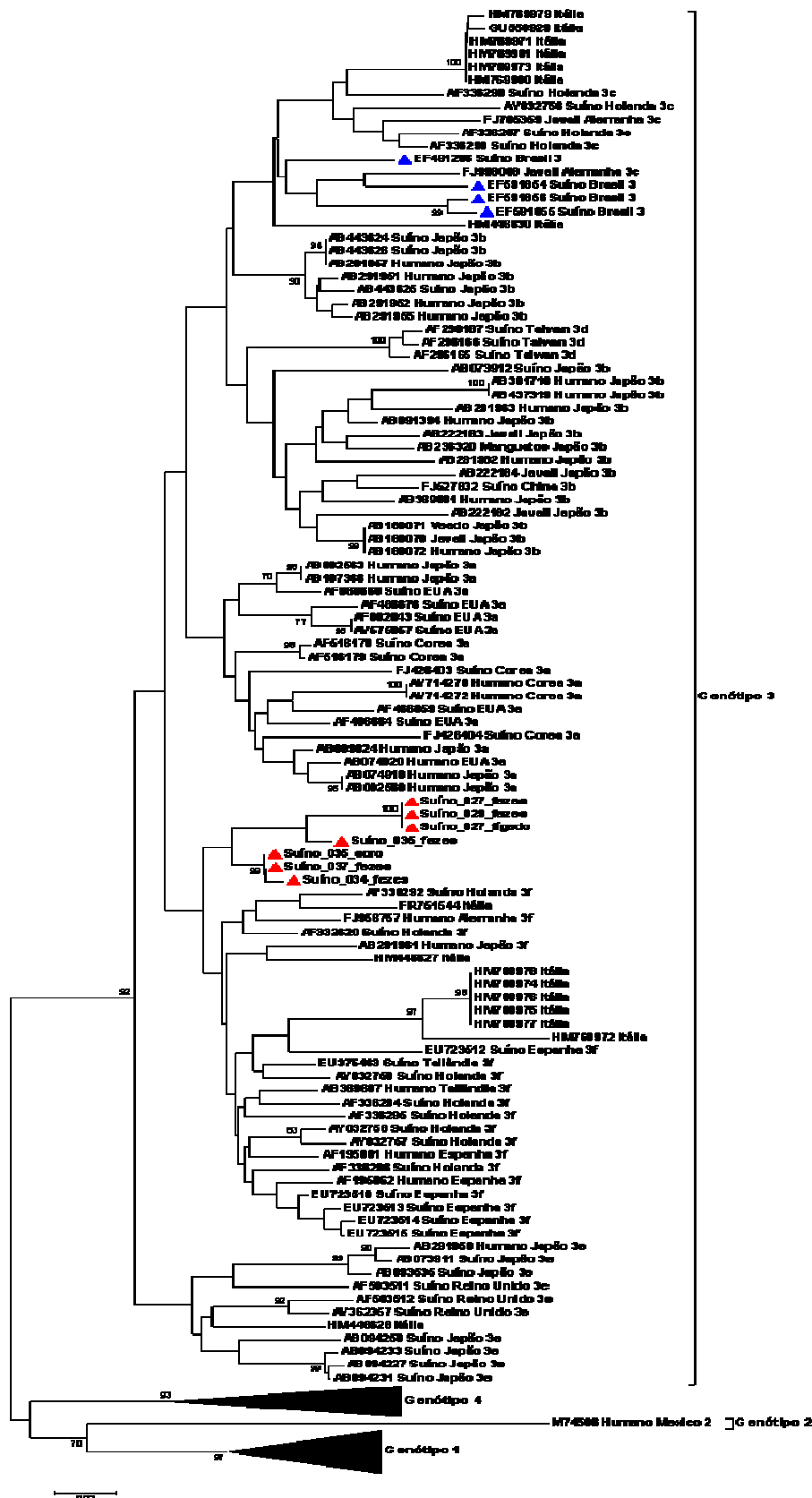


Figura 4 – Árvore filogenética baseada na análise de 346 nt da região 5'-terminal ORF2 do HEV pelo método de Neighbor-joining. As sequências do GenBank estão identificadas pelo número de acesso, seguido pela fonte de isolamento do vírus, origem geográfica e genótipo/subtipo. Análise de Bootstrap foi feita em 1000 replicatas para verificação da confiabilidade dos dados. Valores maiores de 70% estão demonstrados nos ramos das

árvores. As sequências obtidas durante o estudo estão destacadas com um triângulo vermelho e identificadas pelo número do animal seguido pela amostra e as demais sequências já caracterizadas no Brasil com um triângulo azul. Os ramos dos genótipos 1 e 2 encontram-se colapsados. Bar = 0,02 substituições/sítio.

DISCUSSÃO

Suínos são relatados como a principal fonte de infecção pelo HEV para humanos em regiões não-endêmicas e acredita-se, inclusive, que o HEV nestes animais seja enzoótico em todo o mundo (CHANDRA et al., 2008; OKAMOTO, 2007; KUMAR et al., 2010; PAVIO et al., 2010).

Somente um sorotipo do HEV é reconhecido (MENG et al., 1997) e as divergências de soroprevalência entre populações podem estar relacionadas à especificidade dos métodos de diagnóstico (HERREMANS et al., 2007), níveis de exposição ao vírus e às variantes em circulação em determinada região (BENDALL et al., 2010).

O fato de não ter sido detectado anticorpos anti-HEV IgM no presente estudo pode estar relacionado à sensibilidade e especificidade do teste comercial Imunoenzimático utilizado para o diagnóstico sorológico (HERREMANS et al., 2007), à breve atividade desta imunoglobulina durante o ciclo de infecção (MENG et al., 1998) e/ou à baixa habilidade de manutenção destes anticorpos em animais infectados (TAKAHASHI et al., 2005).

Adicionalmente, anticorpos anti-HEV IgM parecem ser idade-dependente e apresentar maior proporção entre animais jovens, de até 3 meses de vida, em virtude do primeiro contato com o vírus se dar, preferencialmente, logo após a etapa de desmame (FERNÁNDEZ-BARREDO et al., 2007; LEBLANC et al., 2007; SEMINATI et al., 2008; LI W. et al., 2009; DI BARTOLO et al., 2011). Durante o presente estudo foram analisadas amostras de animais em idade de abate (cerca de 6 meses), portanto este fator também pode ter relação com a não detecção de anticorpos IgM.

A primeira evidência sorológica da circulação do HEV na América do Sul foi sugerida a partir da detecção de anticorpos anti-HEV IgG em humanos na Venezuela (PUJOL et al., 1994). No continente, as soroprevalências relatadas de anti-HEV IgG em suínos são de 7% no Chile (Ibarra et al., 2007) e 22,7% na Argentina (MUNNÉ et al., 2006).

No Brasil, Guimarães et al. (2005) descreveram uma alta prevalência de 81,2% de suínos sororeativos para IgG em propriedades no Estado do Mato Grosso, no Centro-Oeste do Brasil, já no Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do País, esta soroprevalência foi de 24,3% (VITRAL et al., 2005).

Em comparação com estes índices prévios no país, a soroprevalência para anti-HEV IgG no Estado do Pará demonstrou ser menor, contudo cabe ressaltar que a suinocultura no Estado apresenta, de modo geral, características bastante artesanais, pois grande parte da produção é feita em pequenas propriedades de escala familiar, onde os sistemas de criação não são intensificados e o manejo higiênico-sanitário das instalações é questionável, influenciando, portanto, nos níveis de exposição ao vírus.

Suínos podem entrar em contato com o HEV de modo contínuo durante diversas etapas da vida produtiva e diferenças de prevalência estão diretamente associadas ao manejo sanitário do plantel e das instalações (SATOU; NISHIURA, 2007; CASAS et al., 2011). Criatórios suínos de escala familiar no interior da China, por exemplo, apresentaram soroprevalência superior quando comparados a criatórios de larga escala (90% vs 76.6%), sendo este resultado justificado pelas baixas condições sanitárias destes estabelecimentos de pequenas proporções (LI W. et al., 2009).

Neste sentido, o fato de termos detectado animais soropositivos para anti-HEV IgG em idade de abate, com cerca de 6 meses de vida, pode estar associado a um maior tempo de exposição dos suínos ao vírus dentro das propriedades na região (LEBLANC et al., 2007; LI W. et al., 2009).

Uma explicação para esta exposição contínua ao HEV dentro das propriedades parece estar associada ao fato de que o vírus pode ser eliminado pelas fezes de suínos infectados durante longos períodos, inclusive por animais adultos, sendo possível, então, que essas fontes de infecção permaneçam em um ambiente através da transmissão horizontal contínua (KASORNDORKBUA et al., 2004; SEMINATI et al., 2008; DI BARTOLO et al., 2011).

Os 12 animais soropositivos (7,9%) em que o HEV-RNA não foi detectado parecem representar infecções pregressas, pois o tempo estimado de soroconversão para IgG varia de cerca de duas semanas (Meng *et al.*, 1998) a 25 dias (SATOU; NISHIURA, 2007).

O suíno #27 (0,6%), em que foi detectado anti-HEV IgG em baixa titulação (25,6 U/mL) e também o HEV-RNA nas amostras de soro, fezes e fígado, faz supor que este caso se trate de reinfecção, em virtude da possibilidade de existência de mecanismos de manutenção do vírus entre populações co-infectadas (LI Z. et al., 2009). A obtenção de sequências nucleotídicas dos subtipos 3c e 3f na amostra de fezes e fígado desse animal reforça esta teoria de co-infecção.

A reinfecção pelo HEV pode ocorrer pela introdução em um plantel de novos animais infectados por variantes diferentes do HEV, o que faz com que a imunidade adquirida dos suínos possa apresentar uma proteção incompleta contra estas novas strains, resultando em co-infecções (DI BARTOLO et al., 2008).

Os 14 suínos positivos para o HEV-RNA (9,2%) em pelo menos uma amostra e que não apresentavam anticorpos anti-HEV, foram associados à infecção pelo vírus durante as etapas de crescimento e terminação, o que resulta nesta detecção do genoma do HEV em animais soronegativos em idade de abate (DOS SANTOS et al., 2009; LEBLANC et al., 2010; DI BARTOLO et al., 2011).

Cabe ressaltar que variações nas fontes de infecção influenciam na detecção idade-específica do HEV e a detecção do RNA viral em animais em idade de abate pode ser associada à infecções ocorridas após os 180 dias de vida (SATOU; NISHIURA, 2007).

A caracterização molecular das sequências obtidas de suínos no Estado do Pará indicou que elas pertencem ao genótipo 3 do HEV. Este resultado está de acordo com o observado em suínos e humanos em países com casos esporádicos de hepatite E pelo genótipo 3 como os Estados Unidos (MENG et al., 1997; FEAGINS et al., 2007), Canadá (PEI; YOO, 2002), Japão (OKAMOTO et al., 2007), China (WANG et al., 1999; ZHENG et al., 2006), Inglaterra (DALTON et al., 2007), Holanda (BORGEM et al., 2008), Itália (DI BARTOLO et al., 2008; DI MARTINO et al., 2010; MARTELI et al., 2010), Hungria (REUTER et al., 2009), Dinamarca (BREUM et al., 2010), França (LEGRAND-ABRAVANEL et al., 2009), Austria (WORM et al., 2000) e Argentina (SCHLAUDER et al., 2000; MUNNÉ et al., 2006).

Os resultados do presente estudo também corroboram com os dados da ocorrência do genótipo 3 do vírus previamente relatados no Brasil (PAIVA et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2009, 2010, 2011).

A análise filogenética das 15 sequências obtidas da ORF1 indicou que 14 pertencem ao subtipo 3c e apresentaram estreita similaridade com sequência obtida em efluente de matadouro suíno no Estado do Rio de Janeiro (DOS SANTOS et al., 2011), entretanto uma sequência pertence ao subtipo 3f e agrupou junto a um isolado suíno da Holanda (VAN DER POEL et al., 2001), distante dos outros isolados do Estado do Pará do subtipo 3c.

Esta sequência do subtipo 3f obtida no soro do suíno #35 apresentou divergência nucleotídica de 22% das outras sequências da ORF1 obtidas nas amostras de fezes e fígado deste mesmo animal. Esta evidência de divergência nucleotídica nos faz sugerir a ocorrência de co-infecção em um único animal por mais de um subtipo do vírus, provavelmente em virtude da existência de múltiplas variantes do HEV em circulação na Amazônia Oriental brasileira.

Kaba et al. (2009) identificaram os subtipos 3c e 3f do HEV em suínos no sudeste da França ocorrendo em propriedades distintas e sugeriram que sequências de uma mesma origem geográfica tendem a agrupar nos mesmos clados, o que não foi observado no suíno #35, já que estes dois subtipos foram identificados no mesmo animal;

Os subtipos 3c e 3f foram identificados em suínos abatidos na Itália, entretanto, as sequências obtidas de múltiplas amostras de um mesmo animal apresentaram 100% de identidade e não agruparam em subtipos diferentes (DI BARTOLO et al., 2011), como no suíno #35. Apesar de não terem sido detectados casos de co-infecção com múltiplos subtipos do vírus, os autores supracitados não descartaram essa possibilidade.

Um estudo sobre incidência do HEV em amostras de fezes em três granjas suínas no Japão indicou que múltiplas variantes podem coexistir em uma mesma propriedade (NAKAI et al., 2006). De Deus et al (2008) demonstraram pelo menos 3 strains do HEV em circulação dentro de uma única granja suína na Espanha. De modo similar, foi verificada a existência de pelo menos 4 subtipos do genótipo 4, com identidade nucleotídica variando entre 83,3-89,7%, em circulação entre suínos de 2-4 meses de vida em Shangai e a (YAN et al., 2008).

Li Z. et al. (2009) relataram, inclusive, a possibilidade de ocorrência de co-infecção inter-genótipos em uma mesma amostra biológica. Os autores identificaram em uma única amostra de fezes de um suíno sequências dos genótipos 3 e 4, de acordo com a análise da ORF1 e ORF2, respectivamente. Em humanos, a infecção mista pelos genótipos 3 e 4 também já foi demonstrada em um paciente com hepatite E aguda no Japão (TAKAHASHI et al., 2002).

A pressão seletiva intra-hospedeiro pode imprimir variações no genoma viral que podem influenciar na persistência de algumas variantes do HEV determinando a existência de quasi-espécies do vírus (GRANDADAM et al., 2004), fato que também pode justificar as divergências intra-genotípicas observadas entre as sequências nucleotídicas do presente estudo.

A hipótese de existência de recombinantes do HEV entre as amostras de suínos do Estado do Pará também deve ser levada em consideração, já que existe relato da ocorrência de recombinantes em strains do genótipo 1 do HEV (VAN CUYCK et al., 2005).

Fan (2009) evidenciou divergências filogenéticas em uma amostra do HEV a partir da análise de diferentes regiões genoma e determinaram a existência de um recombinante entre os genótipos 3 e 4 do vírus. Wang et al. (2010) também relataram a existência de recombinantes inter e intra-genótipos entre strains humanos e suínos do HEV.

A filogenia das 7 sequências da ORF2 não apresentou divergência de subtipos entre as amostras e indicou que todas pertencem ao subtipo 3f do HEV, relacionadas à sequências obtidas na Holanda (VAN DER POEL et al., 2001).

Lu et al. (2006) sugerem que a classificação de subtipos de uma amostra tende a permanecer constante mesmo quando se analisa diferentes regiões do genoma do HEV, portanto as sequências da ORF1 e ORF2 com subtipos divergentes obtidas dos suínos #27, #29, #34 e #35 reforçam a hipótese de ocorrência de co-infecções por múltiplos subtipos e/ou recombinantes do vírus. Neste sentido, sugerimos posterior clonagem e análise filogenética das amostras obtidas no presente estudo para determinação da causa da divergência de classificação de subtipos destas sequências.

Ressaltamos que os resultados de recombinações em animais co-infectados ou super-infectados podem significar a emergência de variantes mais virulentas do vírus (LI Z. et al., 2009), portanto a detecção do HEV em suínos no Estado do Pará reforça a necessidade de estudos adicionais também para avaliação da patogenicidade destes isolados e de fatores risco de infecção para humanos, principalmente aquelas de caráter ocupacional, já que a existência de um risco em potencial à saúde coletiva não pode ser descartado.

Este risco de infecção ocupacional foi confirmado por Pérez-Garcia et al. (2007), que relataram a ocorrência de um caso de hepatite E em um funcionário de matadouro que apresentava sequência nucleotídica do genótipo 3 com 87,3-97,3% de homologia a sequências de suínos da mesma região geográfica. Recentemente foram detectadas sequências do Genótipo 3 com estreita relação entre humanos e suínos na Bolívia (DELL'AMICO et al., 2011).

Esta problemática pode ser agravada na região Amazônica, pois Freitas et al. (2006) indicaram que os procedimentos de abate nos matadouros clandestinos situados na região metropolitana de Belém apresentam importantes inconformidades higiênico-sanitárias, pois não há escoamento adequado dos resíduos e as pessoas envolvidas não utilizam nenhuma espécie de equipamento de proteção individual, estando, portanto, constantemente em contato com material de risco biológico. Sob este aspecto, sugere-se, que determinadas populações podem estar expostas ao HEV no Estado do Pará e na região Amazônica sem a devida notificação.

Diferentes fontes de infecção são sugeridas para humanos que estão em contato com suínos e/ou consomem carne suína, pois apesar de a infecção pelo HEV apresentar curso silencioso nestes animais, o vírus vem sido demonstrado em amostras de soro, fezes, urina, fígado, bile, linfonodos mesentéricos, intestinos, músculos de suínos e em efluentes de matadouros (WILLIAMS et al., 2001; CLEMENTE-CAZARES et al., 2003; DE DEUS et al., 2007; BOUWKNEGT et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2009; LEBLANC et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2011).

Ponderamos que a manifestação clínica da infecção parece ter uma relação dose-dependente (TSAREV et al., 1994) e que uma relativa resistência térmica de alguns isolados do HEV também pode influenciar nesta questão

epidemiológica (EMERSON et al., 2005), já que alimentos crus ou mal-cozidos representam uma fonte de infecção em especial (TAKAHASHI et al., 2002; MATSUDA et al., 2003; TEI et al., 2003; LI et al., 2005; COLSON et al., 2010).

A partir da demonstração da infecção em animais em idade de abate, nossos resultados sugerem que os suínos na Amazônia Oriental brasileira parecem estar expostos ao HEV durante diversas etapas da vida produtiva, o que implica em uma particularidade da dinâmica epidemiológica nas granjas suínas da região que merece abordagem complementar.

Esta foi primeira identificação e genotipagem do HEV na Amazônia Oriental brasileira e o HEV circulante em suínos no Estado do Pará está relacionado a amostras humanas e animais de outras regiões não-endêmicas do mundo, sugerindo potencial zoonótico destes isolados. Adicionalmente, o presente estudo detectou a ocorrência simultânea dos subtipos 3c e 3f do vírus entre as amostras analisadas, o que sugere a ocorrência de infecções mistas dos suínos por múltiplas *strains* e/ou recombinantes do vírus. Estudos complementares devem ser desenvolvidos para esclarecimento das questões epidemiológicas do HEV em circulação no Estado do Pará e seus reais impactos na saúde pública da região Amazônica e do resto do Brasil.

REFERÊNCIAS

BENDALL, R.; ELLIS, V.; IJAZ, S.; ALI, R.; DALTON, H. A Comparison of Two Commercially Available Anti-HEV IgG Kits and a Re-Evaluation of Anti-HEV IgG Seroprevalence Data in Developed Countries. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 799–805, 2010.

BORGEN, K.; HERREMANS, T.; DUIZER, E.; VENNEMA, H.; RUTJES, S.; BOSMAN, A.; HUSMAN, A.M.R.; KOOPMANS, M. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; A case series 2004 – 2006 **BMC Infectious Diseases**, v. 8, n. 61, 2008.

BOUWKNEGT, M.; RUTJES, S.A.; REUSKEN, S.B.E.M.; STOCKHOFER-ZURWIEDEN, N.; FRANKENA, K.; DE JONG, M.C.M.; HUSMAN, A.M.R.; VAN DER POEL, W.H.M. (2009). The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. **BMC Veterinary research**, v. 5, n. 7, 2009.

BREUM, S.Ø.; HJULSAGER, C.K.; DE DEUS, N.; SEGALÉ, J.; LARSEN, L.E. Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p. 144–149, 2010.

CASAS, M.; CORTÉS, R.; PINA, S.; PERALTA, B.; ALLEPUZ, A.; CORTEY, M.; CASAL, J.; MARTÍN, M. Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. **Veterinary Microbiology**, v.148, p. 27–34, 2011.

CHANDRA, V.; TANEJA, S.; KALIA, M.; JAMEEL, S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 4, p. 451–464, 2008.

CLEMENTE-CASARES, P.; PINA, S.; BUTI, M.; JARDI, R.; MARTÍN, M.; BOFILL-MAS, S.; GIRONES, R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. **Emerging Infectious Diseases**, v 9, p. 448-454, 2003.

COLSON, P.; BORENTAIN, P.; QUEYRIAUX, B.; KABA, M.; MOAL, V.; GALLIAN, P.; HEYRIES, L.; RAOULT, D.; GEROLAMI, R. Pig Liver Sausage as a Source of Hepatitis E Virus Transmission to Humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 6, p. 825–834, 2010.

DALTON, H.R.; THURAIRAJAH, P.H.; FELLOWS, H.J.; HUSSAINI, H.S.; MITCHELL, J.; BENDALL, R.; BANKS, M.; IJAZ, S.; TEO, C.G.; LEVINE D.F. Autochthonous hepatitis E in southwest England. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 14, p. 304–309, 2007.

DE DEUS, N., SEMINATI, C., PINA, S., MATEU, E., MARTIN, M., SEGALÉS, J. 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, p. 105-114, 2007.

DE DEUS, N.; CASAS, M.; PERALTA, B.; NOFRARÍAS, M.; PINA, S.; MARTÍN, M.; SEGALÉS, J. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 19-28, 2008.

DELL'AMICO, M.C.; CAVALLO, A.; GONZALES, J.L.; BONELLI, S.I.; VALDA, Y.; PIERI, A.; SEGUNDO, H.; IBAÑEZ, R.; MANTELLA, A.; BARTALESI, F. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Bolivia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1488-1490, 2011.

DI BARTOLO, I.; MARTELLI, F.; INGLESE, N.; POURSHABAN, M.; CAPRIOLI, A.; OSTANELLO, F.; RUGGERI, F.M. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 47–55, 2008.

DI BARTOLO, I.; PONTERIO, E.; CASTELLINI, L.; OSTANELLO, F.; RUGGERI, F.M. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 330–338, 2011.

DI MARTINO, B.; DI PROFIO, F.; MARTELLA, V.; DI FELICE, E.; DI FRANCESCO, C.E.; CECI, C.; MARSILI, F. Detection of hepatitis E virus in slaughtered pigs in Italy. **Archives of Virology**, v. 155, p. 103–106, 2010.

DOS SANTOS, D.R.L.; VITRAL, C.L.; DE PAULA, V.S.; MARCHEVSKY, R.S.; LOPES, J.F.; GASPAR, A.M.C.; SADDI, T.M.; DE MESQUITA JÚNIOR, N.C.; GUIMARÃES, F.R.; CARAMORI JÚNIOR, J.G.; LEWIS-XIMENES, L.L.; SOUTO, F.J.D.; PINTO, M.A. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 474–480, 2009.

DOS SANTOS, D.R.L.; LEWIS-XIMENES, L.L.; DA SILVA, M.F.M.; DE SOUSA, P.S.F.; GASPAR, A.M.C.; PINTO, M.A. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, p. 276–279, 2010.

DOS SANTOS, D.R.L.; DE PAULA, V.S.; OLIVEIRA, J.M.; MARCHEVSKY, R.S.; PINTO, M.A. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 236–241, 2011.

EMERSON, S.U.; ARANKALLE, V.A.; PURCELL, R.H. Thermal stability of Hepatitis E Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 930–3, 2005.

ERKER, J.C.; DESAI, S.M.; MUSHAHWAR, I.K. Rapid detection of hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. **Journal of Virological Methods**, v. 81, p. 109–113, 1999.

FAN, J. Open reading frame structure analysis as a novel genotyping tool for hepatitis E virus and the subsequent discovery of an inter-genotype recombinant. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1353–1358, 2009.

FEAGINS, A. R.; OPRIESSNIG, T.; GUENETTE, D.K.; HALBUR, P.G.; MENG, X.J. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 912–917, 2007.

FERNÁNDEZ-BARREDO, S.; GALIANA, C.; GARCÍA, A.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.T.; VEJA, S.; RODRÍGUEZ-IGLESIAS, M.A.; PÉREZ-GRACIA M.T. Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 236–240, 2007.

FREITAS, J.A.; GALINDO, G.A.R.; SARRAF, K.A.; OLIVEIRA, J.P. Situação atual e aspectos higiênicos e sanitários do abate clandestino, na região metropolitana de Belém, Pará. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 143, p. 45–49, 2006.

GRANDADAM, M.; TEBBAL, S.; CARON, M.; SIRIWARDANA, M.; LAROUZE, B.; KOECK, J.L.; BUISSON, Y.; ENOUF, V.; NICAND, E. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3189–3194, 2004.

GUIMARÃES, F.R.; SADDI, T.M.; VITRAL, C.L.; PINTO, M.A.; GASPAR, A.M.C.; SOUTO, F.J.D. Hepatitis e virus antibodies in swine herds of Mato

Grosso state, Central Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 223-226, 2005.

HALBUR, P.G.; KASORNDORKBUA, C.; GILBERT, C.; GUENETTE, D.; POTTERS, M.B.; PURCELL, R.H.; EMERSON, S.U.; TOTH, T.E.; MENG, X.J. 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.

HERREMANS, M.; BAKKER, J.; DUIZER, E.; VENNEMA, H.; KOOPMAN, M.P.G. Use of Serological Assays for Diagnosis of Hepatitis E Virus Genotype 1 and 3 Infections in a Setting of Low Endemicity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 562–568, 2007.

HUANG, F.F.; HAQSHENAS, G.; GUENETTE, D.K.; HALBUR, P.G.; SCHOMMER, S.K.; PIERSON, F.W.; TOTH, T.E.; MENG, X.J. Detection by Reverse Transcription-PCR and Genetic Characterization of Field Isolates of Swine Hepatitis E Virus from Pigs in Different Geographic Regions of the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1326–1332, 2002.

HUANG, F.F.; SUN, Z.F.; EMERSON, S.U.; PURCELL, R.H.; SHIVAPRASAD, H.L.; PIERSON, F.W.; TOTH, T.E.; MENG, X.J. 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, p. 1609–1618, 2004.

IBARRA, V.H.; RIEDEMANN G.S.; REINHARDT V.G.; CALVO A.M. Presencia de anti-HEV en un estudio de cohorte de porcinos ¿reservorio animal de hepatitis E en Chile? **Revista Médica de Chile**, v. 135, n. 8, p. 997-1001, 2007.

JOHNE, R.; HECKEL, G.; PLENGE-BÖNIG, A.; KINDLER, E.; MARESCH, C.; REETZ, J.; SCHIELKE, A.; ULRICH, R.G. Novel Hepatitis E Virus Genotype in Norway Rats, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, 2010.

KABA, M.; DAVOUST, B.; MARIE, J.L.; BARTHET, M.; HENRY, M.; TAMALET, C.; RAOULT, D.; COLSON, P. Frequent Transmission of Hepatitis E Virus Among Piglets in Farms in Southern France. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1750–1759, 2009.

KABA, M.; DAVOUST, B.; MARIÉ, J.L.; COLSON, P. Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 259–261, 2010.

KANNAN, H.; FAN, S.; PATEL, D.; BOSSIS, I.; ZHANG, Y.J. The Hepatitis E Virus Open Reading Frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. **Journal of Virology**, v. 83, n. 13, p. 6375–6382, 2009.

KASORNDORKBUA, C.; GUENETTE, D.K.; HUANG, F.F.; THOMAS, P.J.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Routes of Transmission of Swine Hepatitis E Virus in Pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5047–5052, 2004.

KUMAR, V.; DAS, J.; JAMEEL, S. The biology and pathogenesis of hepatitis viruses. **Current Science**, v. 98, n. 3, 2010.

LEBLANC, D.; WARD, P.; GAGNÉ, M.J.; POITRAS, E.; MÜLLER, P.; TROTTIER, Y.L.; SIMARD, C.; HOUDE, A. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 160–166, 2007.

LEBLANC, D.; POITRAS, E.; GAGNÉ, M.J.; WARD, P.; HOUDE, A. (2010). Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 206–209, 2010.

LEGRAND-ABRAVANEL, F.; MANSUY, J.M.; DUBOIS, M.; KAMAR, N.; PERON, J.M.; ROSTAING, L.; IZOPET, J. Hepatitis E Virus Genotype 3 Diversity, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, 2009.

LI, W.; SHE, R.; WEI, H.; ZHAO, J.; WANG, Y.; SUN, Q.; ZHANG, Y.; WANG, D.; LI, R. Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 75-83, 2009.

LI, T.C.; CHIJIWA, K.; SERA, N.; ISHIBASHI, T.; ETOH, Y.; SHINOHARA, Y.; KURATA, Y.; ISHIDA, M.; SAKAMOTO, S.; TAKEDA, N.; MIYAMURA, T. Hepatitis E Virus transmission from wild boar meat. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, Dez. 2005.

LI, Z.; YU, S.; DONG, S.; ZHU, Y.; SI, F.; SHEN, S.; JIANG, Z.; YU, R.; ZOU, S. Reduced prevalence of genotype 3 HEV in Shanghai pig farms and hypothetical homeostasis of porcine HEV reservoir. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 184-189, 2009.

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, p. 5–36, 2006.

MARTELLI, F.; TOMA, S.; DI BARTOLO, I.; CAPRIOLI, A.; RUGGERI, F.M.; LELLI, D.; BONCI, M.; OSTANELLO, F. Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 492–496, 2010.

MATSUDA, H.; OKADA, K.; TAKAHASHI, K.; MISHIRO, S. Severe Hepatitis E Virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, 2003.

MENG, X.J.; PURCELL, R.H.; HALBUR, P.G.; LEHMAN, J.R.; WEBB D.M.; TSAREVA T.S.; HAYNES, J.S.; THACKER B.J.; EMERSON, S.U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 94, p. 9860–9865, set. 1997.

MENG, X.J.; HALBUR, P.G.; HAYNES, J.S.; TSAREVA, T.S.; BRUNA, J.D.; ROYER, R.L.; PURCELL, R.H.; EMERSON, S.U. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1405–1415, 1998.

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

MUNNÉ, M.S.; VLADIMIRSKY, S.; OTEGUI, L.; CASTRO, R.; BRAJTERMAN, L.; SOTO, S.; GUARNERA, E.; MOLINA, V.; MONFELLANO, M.; SCHLAUDER, G.G.; GONZÁLEZ, J.E. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. **Journal of Medical Virology**, v. 78, p. 1579–1583, 2006.

NAKAI, I.; KATO, k.; MIYAZAKI, a.; YOSHII, M.; LI, T.C.; TAKEDA, N.; TSUNEMITSU, H.; IKEDA, H. Different Fecal Shedding Patterns of Two Common Strains of Hepatitis E Virus at Three Japanese Swine Farms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 6, p. 1171–1177, 2006.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, K.; TAIRA, K.; TAIRA, M.; OHNO, A.; SAKUGAWA, H.; ARAI, M.; MISHIRO, S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. **Hepatology Research**, v. 34, p. 137–140, 2006.

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

PAIVA, H.H.; TZANEVA, V.; HADDAD, R.; YOKOSAWA, J. Molecular characterization of swine hepatitis e virus from Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 693–698, 2007.

PARANÁ, R.; SCHINONI, M.I. Hepatite E. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 247–253, mai-jun, 2002.

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

PEI, Y.; YOO, D. Genetic Characterization and Sequence Heterogeneity of a Canadian Isolate of Swine Hepatitis E Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4021–4029, 2002.

PERALTA, B.; BIARNÉS, M.; ORDÓÑEZ, G.; PORTA, R.; MARTÍN, M.; MATEU, E.; PINA, S.; MENG, X.J. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 31–36, 2009.

PÉREZ-GRACIA, M.T.; MATEOS, M.L.; GALIANA, C.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S.; GARCÍA, A.; GÓMEZ, M.T.; MOREIRA, V. Autochthonous Hepatitis E Infection in a Slaughterhouse Worker. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 893–896, 2007.

PUJOL, F.H.; FAVOROV, M.O.; MARCANO, T.; ESTÉ, J.A.; MAGRIS, M.; LIPRANDI, F.; KHUDYAKOV, Y.E.; KHUDYAKOVA, N.S.; FIELDS, H.A. Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. **Journal of Medical Virology**, v. 42, n. 3, p. 234-236, 1994.

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

REUTER, G.; FODOR, D.; FORGACH, P.; KATAI, A.; SZUCS, G. Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, p. 277-281, 2009.

SATOU, K.; NISHIURA, H. Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. **BMC Veterinary Research**, v. 3, n. 9, 2007.

SCHLAUDER, G.G.; FRIDER, B.; SOOKOIAN, S.; CASTAÑO, G.C.; MUSHAHWAR, I.K. Identification of 2 novel isolates of Hepatitis E Virus in Argentina. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 294-7, 2000.

SEMINATI, C.; MATEU, E.; PERALTA, B.; DE DEUS, N.; MARTIN, M. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. **Veterinary Journal**, v. 175, p. 130-132, 2008.

TAKAHASHI, K.; KITAJIMAB, N.; ABE, N.; MISHIRO, S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. **Virology**, v. 330, p. 501-505, 2004.

TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; YOSHIKAWA, A.; SATO, S.; ISODA, N.; IDO, K.; SUGANO, K.; OKAMOTO, K. Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 1931-1940, 2002.

TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; TANAKA, T.; TSATSALTO-OD, B.; INOUE, J.; OKAMOTO, H. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1807-1813, 2005.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEI, S.; KITAJIMA, N.; TAKAHASHI, K.; MISHIRO, S. Zoonotic transmission of Hepatitis E Virus from deer to human beings. **Lancet**, v. 362, p. 371-373, 2003.

TSAREV, S.A.; EMERSON, S.U.; REYES, G.R.; TSAREVA, T.S.; LEGTERS, L.J.; MALIK, I.A.; IQBAL, M.; PURCELL, R.H. Characterization of a prototype

strain of Hepatitis E Virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 89, p. 559-563, 1992.

VAN CUYCK, H.; FAN, J.; ROBERTSON, D.L.; ROQUES, P. Evidence of Recombination between Divergent Hepatitis E Viruses. **Journal of Virology**, v. 79, n. 14, p. 9306–9314, 2005.

VAN DER POEL, W.H.M.; VERSCHOOR, F.; VAN DER HEIDE, R.; HERRERA, M.I.; VIVO, A.; KOOREMAN, M.; HUSMAN, A.M.R. Hepatitis E Virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, nov.-dez. 2001.

VITRAL, C.L.; PINTO, M.A.; LEWIS-XIMENEZ, L.L.; KHUDYAKOV, Y.E.; SANTOS, D.R.; GASPARGAS, A.M.C. Serological evidence of Hepatitis E Virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 2, p. 117-122, Abril 2005.

WANG, H.; ZHANG, W.; NI, B.; SHEN, H.; SONG, Y.; WANG, X.; SHAO, X.; HUA, X.; CUI, L. Recombination analysis reveals a double recombination event in hepatitis E virus. **Virology Journal**, v. 7, n. 129, 2010.

WANG, Y.; LING, R.; ERKER, J.C.; ZHANG, H.; LI, H.; DESAI, S.; MUSHAHWAR, I.K.; HARRISON, T.J. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 169–177, 1999.

WILLIAMS, T.P.E.; KASORNDORKBUA, C.; HALBUR, P. G.; HAQSHENAS, G.; GUENETTE, D. K.; TOTH, T. E.; MENG, X. J. 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.

WORM, H.C.; SCHLAUDER, G.G.; WURZER, H.; MUSHAHWAR, I.K. identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2885–2890, 2000.

YAN, Y.; ZHANG, W.; SHEN, Q.; CUI, L.; HUA, X. Prevalence of four different subgenotypes of genotype 4 hepatitis E virus among swine in the Shanghai area of China. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n.12, 2008.

ZHAO, C.; MA, Z.; HARRISON, T.J.; FENG, R.; ZHANG, C.; QIAO, Z.; FAN, J.; MA, H.; LI, M.; SONG, S.; WANG, Y. A Novel Genotype of Hepatitis E Virus Prevalent Among Farmed Rabbits in China. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1371–1379, 2009.

ZHENG, Y.; GE, S.; ZHANG, J.; GUO, Q.; HONG, M.; WANG, F.; XIA, N.; JIANG, N. Swine as a Principal Reservoir of Hepatitis E Virus That Infects Humans in Eastern China. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 1643–1649, 2006.

ZHOU Y.H.; PURCELL, R.H.; EMERSON S.U. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. **Vaccine**, v. 22, p. 2578–2585, 2004.

4 CONCLUSÕES

- A circulação do Vírus da Hepatite E em suínos no Estado do Pará foi demonstrada sorologicamente pela detecção de anti-HEV IgG em 8,6% (13/151) das amostras analisadas.
- O HEV genoma foi detectado em 15 suínos (9,93%) por *Nested* RT-PCR em pelo menos uma amostra biológica de cada animal.
- A caracterização molecular das sequências nucleotídicas obtidas indicou que pertencem ao genótipo 3 do vírus.
- Foram detectadas sequências dos subtipos 3c e 3f do HEV ocorrendo simultaneamente entre as amostras testadas, sugerindo a possibilidade de infecções por múltiplos *strains* e/ou recombinantes do vírus.
- O HEV circula no Estado do Pará e as amostras suínas estão relacionadas a amostras humanas de outras regiões não endêmicas, sugerindo potencial zoonótico desses isolados.
- O HEV circulante no Pará filogeneticamente difere dos outros isolados identificados previamente nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Mato Grosso.

REFERÊNCIAS

AGUNOS, A.C.; YOO, D.; YOUSSEF, S.A.; RAN, D.; BINNINGTON, B.; HUNTER, D.B. Avian hepatitis E virus in an outbreak of hepatitis-splenomegaly syndrome and fatty liver haemorrhage syndrome in two flaxseed-fed layer flocks in Ontario. **Avian Pathology**, v. 35, n.5, p. 404-412, out. 2006.

ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; BOFILL-MAS, S.; HUNDESA, A.; RIBAS, F.; GIRONES, A. Distribution of human Polyomaviruses, Adenoviruses, and Hepatitis E Virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 23, 2006.

BALAYAN, M.S., ANDJAPARIDZE, A.G., SAVINSKAYA, S.S., KETILADZE, E.S., BRAGINISKI, D.M., SAVINOV, A.P., POLESCHUK, V.F. Evidence of a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal oral route. **Intervirolgy**, v. 20, p. 23–31, 1983.

BANKS, M.; BENDALL, R.; GRIERSON, S.; HEATH, G.; MITCHELL, J.; DALTON, H. Human and Porcine Hepatitis E Virus Strains, United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, 2004.

BERKE, T.; MATSON, D.O. Reclassification of the *Caliciviridae* into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. **Archives of Virology**, v. 145, p.1421–1436, 2000.

BIHL, F.; NEGRO, F. Chronic hepatitis E in the immunosuppressed: A new source of trouble? **Journal of Hepatology**, v. 50, p. 435–437, 2009.

BILLAM, P.; HUANG, F.F.; SUN, Z.F.; PIERSON, F.W.; DUNCAN, R.B.; ELVINGER, F.; GUENETTE, D. K.; TOTH, T.E.; MENG, X.J. Systematic pathogenesis and replication of Avian Hepatitis E Virus in specific-pathogen-free adult chickens. **Journal of virology**, v. 79, n. 6, p. 3429–3437, Mar. 2005.

BOUTROUILLE, A.; BAKKALI-KASSIMI, L.; CRUCIÈRE C.; PAVIO, N. Prevalence of Anti-Hepatitis E Virus antibodies in French blood donors. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 6, p. 2009–2010, 2007.

BOUWKNEGT, M.; FRANKENA, K.; RUTJES, S.A.; WELLENBERG, G.J.; HUSMAN, A.M.R.; VAN DER POEL, W.H.M.; JONG, M.C.M. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, 2008.

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

CASAS, M.; PINA, S.; DE DEUS, N.; PERALTA, B.; MARTÍN, M.; SEGALÉS, J. Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels. **Veterinary Microbiology**, v.138, p. 78–84, 2009.

CHOI, I.S.; KWON, H.J.; SHIN, N.R.; YOO, H.S. Identification of Swine Hepatitis E Virus (HEV) and prevalence of Anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3602–3608, 2003.

CLEMENTE-CASARES, P.; PINA, S.; BUTI, M.; JARDI, R.; MARTÍN, M.; BOFILL-MAS, S.; GIRONES, R. Hepatitis E Virus Epidemiology in Industrialized Countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, 2003.

DALTON, H.R.; THURAIRAJAH, P.H.; FELLOWS, H.J.; HUSSAINI, H.S.; MITCHELL, J.; BENDALL, R.; BANKS, M.; IJAZ, S.; TEO, C.G.; LEVINE D.F. Autochthonous hepatitis E in southwest England. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 14, p. 304–309, 2007.

DOS SANTOS, D.R.L.; VITRAL, C.L.; DE PAULA, V.S.; MARCHEVSKY, R.S.; LOPES, J.F.; GASPAR, A.M.C.; SADDI, T.M.; DE MESQUITA JÚNIOR, N.C.; GUIMARÃES, F.R.; CARAMORI JÚNIOR, J.G.; LEWIS-XIMENES, L.L.; SOUTO, F.J.D.; PINTO, M.A. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 474–480, 2009.

DOS SANTOS, D.R.L.; LEWIS-XIMENES, L.L.; DA SILVA, M.F.M.; DE SOUSA, P.S.F.; GASPAR, A.M.C.; PINTO, M.A. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, p. 276–279, 2010.

FAUQUET, C.M.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. **Virology Journal**, v. 2, n. 64, 2005.

FAVOROV, M.O.; KOSOY, M.Y.; TSAREV, S.A.; CHILDS, J.E.; MARGOLIS H.S. Prevalence of antibody to Hepatitis E Virus among rodents in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 449–55, 2000.

FEAGINS, A. R.; OPRIESSNIG, T.; GUENETTE, D.K.; HALBUR, P.G.; MENG, X.J. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA **Journal of General Virology**, v. 88, p. 912–917, 2007.

GALIANA, C.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S.; GARCÍA, A.; GÓMEZ, M.T.; PÉREZ-GRACIA, M.T. Occupational exposure to Hepatitis E Virus (HEV) in swine workers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 78, n. 6, p. 1012-1015, 2008.

GÉROLAMI, R.; MOAL, V. Chronic Hepatitis E with Cirrhosis in a Kidney-Transplant Recipient. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 8, 2008.

GUU, T.S.Y.; LIU, Z.; YE, Q.; MATA, D.A.; LI, K.; YIN, C.; ZHANG, J.; TAO, Y.J. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 106, n. 31, p. 12992–12997, 2009.

GRAFF, J.; TORIAN, U.; NGUYEN, H.; EMERSON, S.U. A Bicistronic Subgenomic mRNA Encodes both the ORF2 and ORF3 Proteins of Hepatitis E Virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 12, p. 5919–5926, 2006.

HA, S.K.; CHAE, C. Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 11, p. 263–267, 2004.

HAAGSMA, E.B.; VAN DEN BERG, A.P.; PORTE, R.J.; BENNE, C.A.; VENNEMA, H.; REIMERINK, J.H.J.; KOOPMANS, M.P.G. Chronic Hepatitis E Virus Infection in Liver Transplant Recipients. **Liver Transplantation**, v. 14, p. 547-553, 2008.

HALBUR, P.G.; KASORNDORKBUA, C.; GILBERT, C.; GUENETTE, D.; POTTERS, M.B.; PURCELL, R.H.; EMERSON, S.U.; TOTH, T.E.; MENG, X.J. 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.

HAQSHENAS, G.; SHIVAPRASAD, H.L.; WOOLCOCK, P.R.; READ, D.H.; MENG, X.J. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis–splenomegaly syndrome in the United States. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2449–2462, 2001.

HE, J.; INNIS, B.L.; SHRESTHA, M.P.; CLAYSON, E.T.; SCOTT, R.M.; LINTHICUM, K.J.; MUSSER, G.G.; GIGLIOTTI, S.C.; BINN, L.N.; KUSCHNER, R.A.; VAUGHN, D.W. Evidence that rodents are a reservoir of Hepatitis E Virus for humans in Nepal. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, 2002, p. 4493–4498, 2002.

HE, S.; MIAO, J.; ZHENG, Z.; WU, T.; XIE, M.; TANG, M.; ZHANG, J.; NG, M.H.; XIA, N. Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 245–249, 2008.

HERREMANS, M.; BAKKER, J.; DUIZER, E.; VENNEMA, H.; KOOPMAN, M.P.G. Use of Serological Assays for Diagnosis of Hepatitis E Virus Genotype 1 and 3 Infections in a Setting of Low Endemicity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 562–568, 2007.

HIRANO, M.; DING, G.; TRAN, H.T.T.; LI, T.C.; TAKEDA, N.; SATA T.; NAKAMURA, S.; ABE, K. Prevalence of antibody against Hepatitis E virus in

various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 8-11, 2003.

HOOKS, S.B.; BILLINGS, C.J.; HERRERA, J.L. Hepatitis E Virus infection. **Practical Gastroenterology**, janeiro 2009.

HUANG, F.F.; SUN, Z.F.; EMERSON, S.U.; PURCELL, R.H.; SHIVAPRASAD, H.L.; PIERSON, F.W.; TOTH, T.E.; MENG, X.J. 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, p. 1609–1618, 2004.

IJAZ, S.; ARNOLD, E.; BANKS, M.; BENDALL, R.P.; CRAMP, M.E.; CUNNINGHAM, R.; DALTON, H.R.; HARRISON, T.J.; HILL, S.F.; MACFARLANE, L.; MEIGH, R.E.; SHAFI, S.S.; SHEPPARD, M.J.; SMITHSON, J.; WILSON, M.P.; TEO, C.G. Non-travel-associated Hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p.1166–72, 2005.

INOUE, J.; TAKAHASHI, M.; ITO, K.; SHIMOSEGAWA, T.; OKAMOTO, H. Analysis of human and swine hepatitis E virus (HEV) isolates of genotype 3 in Japan that are only 81–83% similar to reported HEV isolates of the same genotype over the entire genome **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2363–2369, 2006.

JI, Y.; ZHU, Y.; LIANG, J.; WEI, X.; YANG, X.; WANG, L.; LI, L.; CHANG, Y.; TANG, R.; ZHUANG, H. Swine hepatitis E virus in rural southern China: genetic characterization and experimental infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Journal of Gastroenterology**, v. 43, p. 565–570, 2008.

JOHNE, R.; HECKEL, G.; PLENGE-BÖNIG, A.; KINDLER, E.; MARESCH, C.; REETZ, J.; SCHIELKE, A.; ULRICH, R.G. Novel Hepatitis E Virus Genotype in Norway Rats, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, 2010.

JOTHIKUMAR, N.; PAULMURUGAN, R.; PADMANABHAN, P.; SUNDARI, R.B.; KAMATCHIAMMAL, S.; RAO, K.S. Duplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis A and hepatitis E virus isolated from drinking water samples. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 2, p. 587-590, 2000.

KABA, M.; DAVOUST, B.; MARIÉ, J.L.; COLSON, P. Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 259–261, 2010.

KABRANE-LAZIZI, Y.; FINE, J.B.; ELM, J.; GLASS, G.E.; HIGA, H.; DIWAN, A.; GIBBS JR., C.J.; MENG, X.J.; EMERSON, S.U.; PURCELL, R.H. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E Virus in the United States. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 331–335, 1999.

KAMAR, N.; SELVES, J.; MANSUY, J.M.; OUEZZANI, L.; PÉRON, J.M.; GUITARD, J.; COINTAULT, O.; ESPOSITO, L.; ABRAVANEL, F.; DANJOUX, M.; DURAND, D.; VINEL, J.P.; IZOPET, J.; ROSTAING, L. Hepatitis E Virus and chronic Hepatitis in organ-transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n.8, p. 811-817, 2008.

KANNAN, H.; FAN, S.; PATEL, D.; BOSSIS, I.; ZHANG, Y.J The Hepatitis E Virus Open Reading Frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. **Journal of Virology**, v. 83, n. 13, p. 6375–6382, 2009.

KHUROO, M.S. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. **American Journal of Medicine**, v. 68, p. 818–823, 1980.

KHUROO, M.S.; KAMILI, S.; JAMEEL, S. Vertical transmission of hepatitis E virus. **Lancet**, v. 345, n. 8956, p. 1025-1026, 1995.

KHUROO, M.S. Discovery of hepatitis E: The epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. **Virus Research**, v. 161, n. 1, p. 3-14, 2011.

KUMAR, A.; BENIWAL, M.; KAR, P.; SHARMA, J.B.; MURTHY, N.S. Hepatitis E in pregnancy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 85, p. 240–244, 2004.

KUNO, A.; IDO, K.; ISODA, N.; SATOH, Y.; ONO, K.; SATOH, S.; INAMORI, H.; SUGANO, S.; KANAI, N.; NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H. Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. **Hepatology Research**, v. 26, p. 237-242, 2003.

LEBLANC, D.; WARD, P.; GAGNÉ, M.J.; POITRAS, E.; MÜLLER, P.; TROTTIER, Y.L.; SIMARD, C.; HOUDE, A. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 160–166, 2007.

LEE, W.J; KANG, M.L.; CHA, S.B.; PARK, B.K.; CHOI, I.S.; YOO, H.S. Analysis of the helicase gene of Korean swine hepatitis E virus isolates and trends in viral infection. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1361–1364, 2009.

LEE, Y.H.; HA, Y.; AHN, K.K.; CHAE, C. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 417–421, 2009.

LEWIS, H.C.; WICHMANN, O.; DUIZER, E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 2, p.145-166, 2010.

LI, T.C.; CHIJIWA, K.; SERA, N.; ISHIBASHI, T.; ETOH, Y.; SHINOHARA, Y.; KURATA, Y.; ISHIDA, M.; SAKAMOTO, S.; TAKEDA, N.; MIYAMURA, T. Hepatitis E Virus transmission from wild boar meat. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, Dez. 2005.

LIN, C.C.; WU, J.C.; CHANG, T.T.; CHANG, W.Y.; YU, M.L.; TAM, A.W.; WANG, S.C.; HUANG, Y.H.; CHANG, F.Y.; LEE, S.D. Diagnostic Value of Immunoglobulin G (IgG) and IgM Anti-Hepatitis E Virus (HEV) Tests Based on HEV RNA in an Area Where Hepatitis E Is Not Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 3915–3918, 2000.

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, p. 5–36, 2006.

MATSUDA, H.; OKADA, K.; TAKAHASHI, K.; MISHIRO, S. Severe Hepatitis E Virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, 2003.

MAYO, M.A. Changes to virus taxonomy 2004. **Archives of Virology**, v. 150, p. 189–198, 2005.

MENG, X.J.; PURCELL, R.H.; HALBUR, P.G.; LEHMAN, J.R.; WEBB D.M.; TSAREVA T.S.; HAYNES, J.S.; THACKER B.J.; EMERSON, S.U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 94, p. 9860–9865, set. 1997.

MENG, X.J.; HALBUR, P.G.; SHAPIRO, M.S.; GOVINDARAJAN, S.; BRUNA, J.D.; MUSHAHWAR, I.K.; PURCELL R.H.; EMERSON, S.U. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by Swine Hepatitis E Virus. **Journal of virology**, v. 72, n. 12, 1998a.

MENG, X.J.; HALBUR, P.G.; HAYNES, J.S.; TSAREVA, T.S.; BRUNA, J.D.; ROYER, R.L.; PURCELL, R.H.; EMERSON, S.U. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1405–1415, 1998b.

MENG, X.J.; WISEMAN, B.; ELVINGER, F.; GUENETTE, D.K.; TOTH, T.E.; ENGLE, R.E.; EMERSON, S.U.; PURCELL, R.H. Prevalence of antibodies to hepatitis E Virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 117–122, Jan. 2002.

MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Swine Hepatitis E Virus. In:___ **Diseases of Swine**, 9^a ed. Blackwell Publishing, 2006, cap. 32.

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

MUNNÉ, M.S.; VLADIMIRSKY, S.; OTEGUI, L.; CASTRO, R.; BRAJTERMAN, L.; SOTO, S.; GUARNERA, E.; MOLINA, V.; MONFELLANO, M.; SCHLAUDER, G.G.; GONZÁLEZ, J.E. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. **Journal of Medical Virology**, v. 78, p. 1579-1583, 2006.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, K.; TAIRA, K.; TAIRA, M.; OHNO, A.; SAKUGAWA, H.; ARAI, M.; MISHIRO, S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. **Hepatology Research**, v. 34, p. 137–140, 2006.

NISHIZAWA, T.; TAKAHASHI, M.; MIZUO, H.; MIYAJIMA H.; GOTANDA Y.; OKAMOTO, H. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1245–1251, 2003.

PAIVA, H.H.; TZANEVA, V.; HADDAD, R.; YOKOSAWA, J. Molecular characterization of swine hepatitis e virus from Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 693-698, 2007.

PANDA, S.K.; THAKRAL, D.; REHMAN, S. Hepatitis E Virus. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 151–180, 2007.

PARANÁ, R.; SCHINONI, M.I. Hepatite E. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 247-253, mai-jun, 2002.

PERALTA, B.; BIARNÉS, M.; ORDÓÑEZ, G.; PORTA, R.; MARTÍN, M.; MATEU, E.; PINA, S.; MENG, X.J. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 31–36, 2009.

PERON, J.M.; DANJOUX, M.; KAMAR, N.; MISSOURY, R.; POIRSON, H.; VINEL, J.P.; MANSUY, J.M.; BUREAU, C.; IZOPET, J.; BROUSSET, P.; SELVES, J. Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. **Virchows Archives**, v. 450, p. 405–410, 2007.

PURDY, M.A.; KHUDYAKOV, Y.E. Evolutionary History and Population Dynamics of Hepatitis E Virus. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.

RENOU, C.; CADRANEL, J.F.; BOURLIÈRE, M.; HALFON, P.; OUZAN, D.; RIFFLET, H.; CARENCO, P.; HARAF, A.; BERTRAND, J.J.; BOUTROUILLE, A.; MULLER, P.; IGUAL, J.P.; DECOPPET, A.; ELOIT, M., PAVI, N. Possible Zoonotic Transmission of Hepatitis E from Pet Pig to Its Owner. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, 2007.

SCHLAUDER, G.G.; FRIDER, B.; SOOKOIAN, S.; CASTAÑO, G.C.; MUSHAHWAR, I.K. Identification of 2 novel isolates of Hepatitis E Virus in Argentina. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 294–7, 2000.

SEMINATI, C.; MATEU, E.; PERALTA, B.; DE DEUS, N.; MARTIN, M. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. **Veterinary Journal**, v. 175, p. 130–132, 2008.

SMITH, H.M.; REPORTER, R.; ROOD, M.P.; LINSKOTT, A.J.; MASCOLA, L.M.; HOGREFE, W.; PURCELL, R.H. Prevalence study of antibody to ratborne pathogens and other agents among patients using a free clinic in Downtown Los Angeles. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1673–6, 2002.

TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; MIYAJIMA, H.; GOTANDA, Y.; IITA, T.; TSUDA, F.; OKAMOTO, H. 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, p. 851–862, 2003.

TAKAHASHI, K.; KITAJIMAB, N.; ABE, N.; MISHIRO, S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. **Virology**, v. 330, p. 501– 505, 2004.

TAKAHASHI, K.; OKAMOTO, H.; ABE, N.; KAWAKAMI, M.; MATSUDA, H.; MOCHIDA, S.; SAKUGAWA, H.; SUGINOSHITA, Y.; WATANABE, S.; YAMAMOTO, K.; MIYAKAWA, Y.; MISHIRO, S. Virulent strain of Hepatitis E Virus genotype 3, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, Maio 2009.

TEI, S.; KITAJIMA, N.; TAKAHASHI, K.; MISHIRO, S. Zoonotic transmission of Hepatitis E Virus from deer to human beings. **Lancet**, v. 362, p. 371–373, 2003.

TSAREV, S.A.; EMERSON, S.U.; REYES, G.R.; TSAREVA, T.S.; LEGTERSI, L.J.; MALIK, I.A.; IQBAL, M.; PURCELL, R.H. Characterization of a prototype strain of Hepatitis E Virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 89, p. 559-563, 1992.

TURNER, J.; GODKIN, A.; NEVILLE, P.; KINGHAM, J.; CH'NG, C.L. Clinical Characteristics of Hepatitis E in a “Non-Endemic” Population. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1899–1902, 2010.

TYAGI, S.; M. SURJIT; A. K. ROY; S. JAMEEL; S. K. LAL. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-microglobulin/bikunin precursor (AMBp) and expedites their export from the hepatocyte. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279 p. 29308–29319, 2004.

VAN DER POEL, W.H.M.; VERSCHOOR, F.; VAN DER HEIDE, R.; HERRERA, M.I.; VIVO, A.; KOOREMAN, M.; HUSMAN, A.M.R. Hepatitis E Virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, nov.-dez. 2001.

VASICKOVA, P.; PSIKAL, I.; WIDEN, F.; SMITALOVA, R.; BENDOVA, J.; PAVLIK, I.; KRALIL, P. Detection and genetic characterisation of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. **Research in Veterinary Science**. v. 87, n. 1, p. 143-8, ago. 2009.

VELÁZQUEZ, O.; STETLER, H.C.; AVILA, C.; ORNELAS, G.; ALVAREZ, C.; HADLER, S.C.; BRADLEY, D.W.; SEPÚLVEDA, J. Epidemic transmission of enterically transmitted Non-A, Non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. **Journal of American Medical Association**, v. 263, n. 24, 1990.

WILLIAMS, T.P.E.; KASORNDORKBUA, C.; HALBUR, P. G.; HAQSHENAS, G.; GUENETTE, D. K.; TOTH, T. E.; MENG, X. J. 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.; CORREA, M.T.; MORROW, M.; STEBBINS, M.E.; SERIWATANA, J.; WEBSTER W.D.; BOAK, M.B.; VAUGHN, D.W. 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.

WORM, H.C.; VAN DER POEL, W.H.M.; BRANDSTÄTTER, G. Hepatitis E: an overview. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 657–666, 2002.

YOO, D.; WILLSON, P.; PEI Y.; HAYES M.A.; DECKERT, A.; DEWEY, C.E.; FRIENDSHIP, R.M.; YOON, Y.; GOTTSCHALK, M.; YASON, C.; GIULIVI, A. Prevalence of Hepatitis E Virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine Hepatitis E Virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1213–1219, 2001.

ZEDER, M.A. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 105, n. 33, 2008.

ZHAO, C.; MA, Z.; HARRISON, T.J.; FENG, R.; ZHANG, C.; QIAO, Z.; FAN, J.; MA, H.; LI, M.; SONG, S.; WANG, Y. A Novel Genotype of Hepatitis E Virus Prevalent Among Farmed Rabbits in China. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1371–1379, 2009.

ZHOU Y.H.; PURCELL, R.H.; EMERSON S.U. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. **Vaccine**, v. 22, p. 2578–2585, 2004.