

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

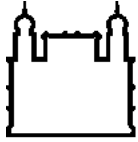
Investigação da circulação de hepadnavírus em animais domésticos e selvagens

Yasmine Rangel Vieira

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

Outubro/2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Yasmine Rangel Vieira

**Investigação da circulação de hepadnavírus em animais
domésticos e selvagens**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de concentração: Imunologia e Patogenia.

Orientação: Prof. Dr.^a Vanessa Salete de Paula
Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Rio de Janeiro

Outubro/2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

V658 Vieira, Yasmine Rangel

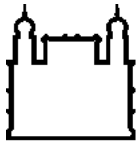
Investigação da circulação de hepadnavírus em animais domésticos e selvagens / Yasmine Rangel Vieira. – Rio de Janeiro, 2016.
xv, 113 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 76-95

1. Infecção. 2. Hospedeiros. 3. Hepadnavírus. 4. Diagnóstico. I. Título.

CDD 636.0896911



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Yasmine Rangel Vieira

**Investigação da circulação de hepadnavírus em animais
domésticos e selvagens**

Orientação: Prof. Dr.^a Vanessa Salete de Paula
Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Aprovada em: 26/10/2016

EXAMINADORES

Prof. Dr. Francisco Campello do Amaral Mello (FIOCRUZ/IOC) - **Revisor**

Prof.^a Dr.^a Elba Regina Sampaio de Lemos (FIOCRUZ/IOC) – **Presidente**

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia (UFF)

Prof.^a Dr.^a Andreza Soriano Figueiredo Nunes (FIOCRUZ/IOC)

Prof.^a Dr.^a Renata de Mendonça Campos (UFRJ)

Rio de Janeiro, 26 de outubro de 2016.

Dedicatória

A minha família.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, pela oportunidade de continuar minha formação acadêmica, fazendo parte do corpo discente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro durante os três primeiros anos de doutorado.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo prêmio referente ao Programa Bolsa Nota 10 e, conseqüentemente, o auxílio durante os últimos meses de pesquisa.

Aos meus orientadores, Dr.^a Vanessa Salette de Paula e Dr. Marcelo Alves Pinto, pela oportunidade de continuar no grupo de pesquisa no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV), e por acreditarem no meu trabalho. Mesmo com inúmeras dificuldades, conseguimos chegar até aqui!

Ao Serviço de Inspeção Estadual (SIE/RJ), representado por Dr. André Sampaio Ferreira e Dra. Sandra Menezes, responsáveis pela autorização do trabalho de campo nos abatedouros oficialmente fiscalizados do Estado do Rio de Janeiro.

Aos essenciais colaboradores desse estudo, Embrapa Pantanal (CPAP/EMBRAPA), representada pelo Dr. Ubiratan Piovezan; Universidade Católica Dom Bosco (UCDB/MS), representada pelo Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera; Universidad de La República (UdelaR/Uruguai), presentada por Dr. Santiago Mirazo e Dr. Juan Arbiza; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), representada pela Profa. Dra. Débora Regina Lopes dos Santos; Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado (PCMC), representada por Dra. Fernanda Cavalcanti de Azevedo, Dra. Fabiana Lopes Rocha e Dr. Frederico Gemesio Lemos; e, à Fiocruz Campus Mata Atlântica, representada pela Dra. Martha Lima Brandão, com quem estabelecemos as parcerias necessárias para conseguirmos a diversificada população de estudo.

A Dr.^a Livia Melo Villar e à amiga Moyra Machado Portilho do Laboratório de Hepatites Virais (LAHEP), pelo compromisso com a investigação, doação dos insumos sorológicos e fundamental auxílio nas análises virais quantitativas.

Ao colega Carlos Eduardo Pereira Velloso do Instituto Nacional de Câncer (INCa), por toda a sua habilidade e experiência com o preparo das lâminas do estudo.

Ao Leandro Layter Xavier do Laboratório de Microscopia Confocal (UERJ) pelo auxílio na captura das imagens de microscopia referentes às análises de imunofluorescência.

À Dr.^a Márcia Arissawa do Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM) de Bio-Manguinhos, pela parceria e disponibilização dos anticorpos monoclonais.

A todos os companheiros do LADTV, funcionários e alunos, com quem compartilhei experiências de bancada e vida durante os últimos quatro anos.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA), Laboratório de Enterovírus (LEV), Laboratório de Hepatites Virais (LAHEP) e, Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses (LHR), por tornarem esses quatro anos de estudo e trabalho mais leves.

Ao Chefe do Laboratório de Enterovírus (LEV), Dr. Edson Elias da Silva, por gentilmente continuar disponibilizando o uso de equipamentos do seu laboratório.

A minha aluna de iniciação científica, Flávia Freitas de Oliveira, por todo o suporte oferecido no final do doutorado, compromisso, dedicação e paciência. Sem dúvidas, uma agradável surpresa!

À Debora Regina Lopes dos Santos, pela amizade e bom-humor, pelas inúmeras conversas de trabalho e vida, além da disponibilidade para as atividades de campo.

Aos meus pais, Sérgio e Márcia, e a minhas irmãs, Tamara e Yárina, pelo apoio e por compartilharem comigo todas as emoções da trajetória até aqui.

“A curiosidade é mais importante do que o conhecimento.”

Albert Einstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

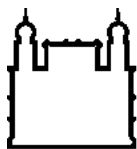
INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DE HEPADNAVÍRUS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SELVAGENS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Yasmine Rangel Vieira

Os hepadnavírus são os únicos vírus animais que replicam seu genoma de DNA via transcrição reversa. Pertencem à família *Hepadnaviridae*, a qual pode ser encontrada circulando em mamíferos (Gênero *Orthohepadnavirus*) e aves (Gênero *Avihepadnavirus*). Humanos, chimpanzés, gibões, gorilas e orangotangos podem ser infectados pelo HBV, a espécie protótipo. Vírus similares são encontrados em uma variedade de outros mamíferos como macacos-barrigudos, marmotas, esquilos e morcegos, além de aves como patos, gansos, garças e cegonhas. Desde 2010, a literatura evidencia a circulação de hepadnavírus em uma maior diversidade de hospedeiros, como suínos, galinhas, anfíbios e peixes. Além disso, achados fósseis demonstram a presença de elementos virais endógenos em cobras, tartarugas, crocodilianos e aves. Essas descobertas podem ajudar a identificar e caracterizar o hepadnavírus circulante em animais, contribuir para elucidar a origem do vírus HBV e sua história evolutiva, e identificar possíveis novos modelos de estudo *in vivo*. Diante disso, inicialmente investigamos a infecção por hepadnavírus em suínos domésticos de rebanhos brasileiros através de testagem sorológica, e buscamos evidências moleculares da presença do DNA viral. Foi possível demonstrar a infecção ativa em 0,8% dos suínos brasileiros, a presença de anti-HBc total em 7,54% dos animais, e a confirmação molecular em 1,06% do grupo de estudo. Em seguida, buscamos avaliar a frequência de DNA dos hepadnavírus em suínos de abatedouros comerciais, caracterizar molecularmente o vírus circulante, determinar a distância genética e realizar a inferência filogenética dos vírus encontrados frente aos demais hepadnavírus conhecidos. Verificamos a presença do DNA viral em 11,11% da população de estudo. A identidade com o HBV foi de 98,9-99,7%, e os hepadnavírus se agruparam próximo às sequências correspondentes aos genótipos A e E. Análises de imunofluorescência em biópsias hepáticas dos animais também confirmaram a presença do HBsAg. Por fim, realizamos a busca por novos hospedeiros de hepadnavírus em animais domésticos, de importância econômica, e selvagens e/ou exóticos, em localidades do Brasil e Uruguai. A circulação de hepadnavírus em animais domésticos foi demonstrada pela primeira vez para os suínos domésticos do Uruguai e os cavalos do Brasil, assim como de forma pioneira para os animais de vida livre, como os porcos selvagens, os cães domésticos, o cachorro do mato, a onça, o lobo-guará e o mão-pelada do Brasil. Nossos resultados indicam evidências sorológicas e moleculares da circulação de um vírus similar ao HBV em animais domésticos e selvagens. Além do aumento da lista de candidatos a hospedeiros de hepadnavírus, evidências da sua circulação em animais selvagens denotam que a fonte de infecção pode não depender da proximidade com o homem.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INVESTIGATION OF HEPADNAVIRUS CIRCULATION IN DOMESTIC ANIMALS AND WILDLIFE.

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Yasmine Rangel Vieira

Hepadnaviruses are the only animal viruses that replicate their DNA genome by reverse transcription. They belong to the *Hepadnaviridae* family, which can be found circulating in mammals (Genus *Orthohepadnavirus*) and birds (Genus *Avihepadnavirus*). Humans, chimpanzees, gibbons, gorillas and orangutans can be infected by HBV, the prototype species. Similar viruses are found in a variety of other mammals such as woolly monkeys, woodchucks, squirrels and bats, and in birds such as ducks, geese, herons and storks. Since 2010, the literature shows the hepadnavirus circulation in a greater variety of hosts such as swine, chickens, amphibians and fishes. Furthermore, fossil findings demonstrate the presence of endogenous viral elements in snakes, turtles, crocodilians and birds. These findings may help to identify and to characterize the current hepadnavirus circulating in animals, to elucidate the origin of HBV and its evolutionary history, and to identify possible new models for in vivo study. Thus, initially we investigated the hepadnavirus infection in domestic pigs from Brazilian herds through serologic testing, and we seek molecular evidence for the presence of viral DNA. It was possible to demonstrate active infection in 0.8% of Brazilian swine, the presence of anti-HBc in 7.54% of the animals, and the molecular confirmation in 1.06% of the study group. Then we sought to evaluate the DNA frequency of hepadnavirus in pigs of commercial abattoirs, to characterize molecularly circulating viruses, to determine the genetic distance and to perform phylogenetic inference of viruses found among to the other known hepadnaviruses. Viral DNA was present in 11.11% of the study population. The identity with HBV ranged from 98.9 to 99.7%, and hepadnaviruses clustered next to sequences corresponding to A and E genotypes. Analysis of immunofluorescence in liver biopsies of the animals also confirmed the presence of HBsAg. Finally, we conducted the search for new hepadnavirus hosts in domestic animals of economic importance, and in wild and exotic animals from locations in Brazil and in Uruguay. For the first time, the hepadnavirus circulation in domestic animals has been demonstrated for domestic pigs from Uruguay and for horses from Brazil, as well as a pioneer for wild animals such as wild pigs, domestic dogs, crab-eating foxes, a jaguar, maned wolves and crab-eating raccoons from Brazil. Our results indicate serologic and molecular evidence of a virus similar to HBV circulating in domestic and wild animals. Besides the increase of the candidates' list to hepadnaviruses hosts, evidence of its circulation among wildlife denote that the source of infection may not depend on the proximity to the human being.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A FAMÍLIA <i>HEPADNAVIRIDAE</i>	1
1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS	2
1.3. PRINCIPAIS PARTICULARIDADES	3
1.4. RECONSTRUÇÃO EVOLUTIVA E PALEOVIROLOGIA	5
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 TEORIAS EVOLUTIVAS	7
2.2 A REVELAÇÃO DO HBV	8
2.3 MORFOLOGIA, ESTRUTURA E GENOMA	10
2.4 REPLICAÇÃO	13
2.5 GENÓTIPOS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	16
2.6 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO	18
2.7 PATOGENIA	22
2.8 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	23
2.8.1 INFECÇÃO AGUDA	24
2.8.2 INFECÇÃO CRÔNICA	24
2.9 DIAGNÓSTICO	26
2.10 PROFILAXIA	29
2.11 TRATAMENTO	30
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVOS	34
4.1. OBJETIVO GERAL	34
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. METODOLOGIAS E RESULTADOS	35
5.1 ARTIGO 1: SEROLOGICAL AND MOLECULAR EVIDENCE OF HEPADNAVIRUS INFECTION IN SWINE	36
5.2 ARTIGO 2: HEPADNAVIRUS DETECTED IN BILE AND LIVER SAMPLES FROM DOMESTIC PIGS OF COMMERCIAL ABATTOIRS	43
5.3 ARTIGO 3: EVALUATION OF HEPADNAVIRUS CIRCULATION IN SOUTH AMERICAN DOMESTIC AND WILD MAMMALS	50
6. DISCUSSÃO	62

<u>7.</u>	<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>73</u>
<u>8.</u>	<u>CONCLUSÕES</u>	<u>74</u>
<u>9.</u>	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>76</u>
<u>10.</u>	<u>ANEXOS</u>	<u>96</u>

Índice de Figuras

Figura 1: Análise filogenética incluindo os vírus encontrados em morcegos.	2
Figura 2: Imagens de microscopia eletrônica (coloração negativa) e os números aproximados de partículas associadas ao HBV em 1 mL de soro de um portador crônico, altamente virêmico.	10
Figura 3: Modelo esquemático das partículas esféricas, filamentosas e Dane, associadas ao HBV. Legenda: SHBs, MHBs e LHBs – proteínas small (S), middle (M) e large (L) que compõem o antígeno de superfície (HBsAg).	11
Figura 4: Representação esquemática da estrutura tridimensional do vírion.	11
Figura 5: Representação esquemática do genoma do HBV, com suas regiões codificantes. Legenda: DR1, DR2 – repetições diretas do genoma, formando as extremidades coesivas que garantem a conformação circular.	12
Figura 6: Representação esquemática do ciclo replicativo do HBV.	14
Figura 7: Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos do HBV.....	17
Figura 8: Prevalência global da infecção pelo HBV.....	19
Figura 9: Prevalência de portadores do vírus da hepatite B na população brasileira, a partir do ano de 2000.	19
Figura 10: Número de casos de hepatite B no Brasil entre os anos de 2004-2012.....	20
Figura 11: Casos de hepatite B por idade e região geográfica do Brasil entre os anos de 2004-2014.....	20
Figura 12: Perfis sorológicos da hepatite aguda (A) e crônica (B).....	28

Índice de Tabelas

Tabela 1: Comparação entre os diferentes membros da família <i>Hepadnaviridae</i>	4
Tabela 2: Conhecimento atual sobre a faixa de hospedeiros susceptíveis aos hepadnavírus.....	5

Lista de Siglas e Abreviaturas

AgAu - Antígeno Austrália

ALT – Alanina transaminase

Anti-HBc - Anticorpo para HBcAg

Anti-HBe – Anticorpo para HBeAg

Anti-HBs - Anticorpo para HBsAg

AST – Aspartato transaminase

cccDNA – *covalently closed circular* DNA (DNA na forma circular covalentemente fechada)

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CEUA – Comitê de Ética no Uso Animal

CITV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

Ct - Ciclo *threshold* (limiar da fase exponencial)

DVHB – Vírus similar ao HBV circulante em patos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO – Absorbância ou densidade óptica

dsDNA – DNA na forma dupla fita

EcoRI – Enzima de restrição tipo 1 isolada de *Escherichia coli*.

eCRHBV – EVE do HBV em crocodilianos

EIA – Imunoensaio enzimático

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)

eSHBV/eSNHBV - EVE do HBV em cobras

eTHBV - EVE do HBV em tartarugas

eZHBV – EVE do HBV em pássaros

EVE – Elemento viral endógeno

GSHV/ASHV - Vírus similar ao HBV circulante em esquilos

GVHB - Vírus similar ao HBV circulante em gansos

HBcAg - Antígeno do core do vírus da hepatite B

HBeAg – Antígeno e secretado do vírus da hepatite B

HBIG – Globulina hiperimune da hepatite B

HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBV – Vírus da hepatite B

HBxAg – Antígeno HBx do vírus da hepatite B

HCV – Vírus da hepatite C

HEV - Vírus da hepatite E

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HVHB - Vírus similar ao HBV circulante em garças

IgG – Imunoglobulina da isoforma G

IgM – Imunoglobulina da isoforma M

INF- α – Interferon-alfa

JAMA - Journal of the American Medical Association

Kb - Kilobase

L – Proteína *large* do HBsAg

M – Proteína *middle* do HBsAg

mL – Mililitro

nm – Nanômetro

NGS – *Next-generation sequencing* (Sequenciamento de nova geração)

NRTI – *Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors* (Nucleosídeos/nucleotídeos inibidores da transcriptase reversa)

NTCP – *sodium-taurocholate cotransporting polypeptide* (proteína cotransportadora de sódio e taurocolato)

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – *Open reading frame* (Fase aberta de leitura)

pb – Pares de bases

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pgRNA – RNA pré-genômico

rcDNA – *relaxed circular DNA* (DNA na forma circular relaxada)

RBHBV/HBHBV/TBHBV - Vírus similar ao HBV circulante em morcegos

RNA – Ácido ribonucleico

RNaseH – Ribonuclease H

S – Proteína *small* do HBsAg

sgRNA – RNA sub-genômico

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

STVHB - Vírus similar ao HBV circulante em cegonhas

TFHBV - Vírus similar ao HBV circulante em anfíbios

μ L - Microlitro

UV – Luz ultravioleta

WHV - Vírus similar ao HBV circulante em marmotas

WMVHB - Vírus similar ao HBV circulante no macaco-barrigudo

1. Introdução

1.1. A família *Hepadnaviridae*

Os hepadnavírus correspondem a um grupo de vírus de DNA dupla fita, circulante em animais, os quais realizam, de forma exclusiva, uma etapa de transcrição reversa no seu processo replicativo, envolvendo, portanto, um intermediário de RNA [1]. De acordo com a classificação de Baltimore, que visa agrupar os vírus de acordo com o seu material genético e estratégia de replicação, os hepadnavírus posicionam-se como membros isolados da classe VII [2].

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (CITV), os hepadnavírus estão reunidos dentro da família *Hepadnaviridae*, a qual pode ser dividida nos gêneros *Orthohepadnavirus*, atribuído a mamíferos, cujo membro protótipo é o vírus da hepatite B (HBV) [3], e *Avihepadnavirus*, atribuído à aves, cujo membro protótipo é o DHBV, o vírus similar que circula em patos [4].

O gênero *Orthohepadnavirus* inclui, portanto, representantes como o HBV que infecta humanos (*Homo sapiens sapiens*) e primatas não humanos como chimpanzé (*Pan troglodytes*), gibão (*Hylobates lar*), gorila (*Gorilla gorilla*) e orangotango (*Pongo pygmaeus pygmaeus*), e os vírus similares, como o WMHBV encontrado no macaco-barrigudo (*Lagothrix lagotricha*), o WHV verificado em roedores como marmotas (*Marmota monax*), e o GSHV e ASHV, encontrado nos esquilos (*Spermophilus beecheyi* e *Spermophilus parryi kennicotti*, respectivamente) [5–14].

O gênero *Avihepadnavirus* inclui, além do DHBV que foi descrito em patos (*Anas domesticus*), o GHBV verificado em gansos (*Anser Rossi* e *Anser caerulescens*), o HHBV que infecta garças (*Adrea cinerea*), e o STHBV encontrado em cegonhas (*Ciconia ciconia*) [7,15–21].

Desde 2010, estudos também incluem os suínos (*Sus scrofa*) [22] e as galinhas (*Gallus gallus*) [23] como hospedeiros de hepadnavírus, embora não esteja claro se o vírus encontrado é o mesmo ou uma variante do HBV, responsável pela hepatite B humana [23]. No caso dos morcegos (*Uroderma bilobatum*, *Rhinolophus alcyone*, *Hipposideros cf. ruber* e *Miniopterus fuliginosus*), entretanto, embora os hepadnavírus encontrados compartilhem não só a organização das fases abertas de leitura (ORFs) com os demais hepadnavírus de mamíferos, como também as estruturas genômicas envolvidas na replicação e na transcrição reversa do RNA pré-genômico tal como o HBV, foi possível demonstrar que os vírus circulantes (TBHBV, HBHBV, RBHBV, LBHBV) são altamente diversificados e suficientemente

distintos do vírus circulante no homem, caracterizando possivelmente três novas espécies dentro do gênero *Orthohepadnavirus* [24] (Figura 1).

Já para os peixes (*Catostomus commersonii*), o nível de divergência entre o vírus circulante (WSHBV) e *Orthohepadnavirus e Avihepadnavirus* já descritos foi alto o suficiente para propor a criação de um novo gênero [25]. De forma análoga, no caso dos anfíbios (*Nanorana parkeri*), o vírus circulante (TFHBV) encontrado apresentou baixa similaridade com as sequências de mamíferos e aves já descritas, embora a nível proteico apresente uma sinalização conservada que funciona como marcador para transporte nuclear, denotada por domínios ricos em arginina na porção C-terminal da proteína do core [1].

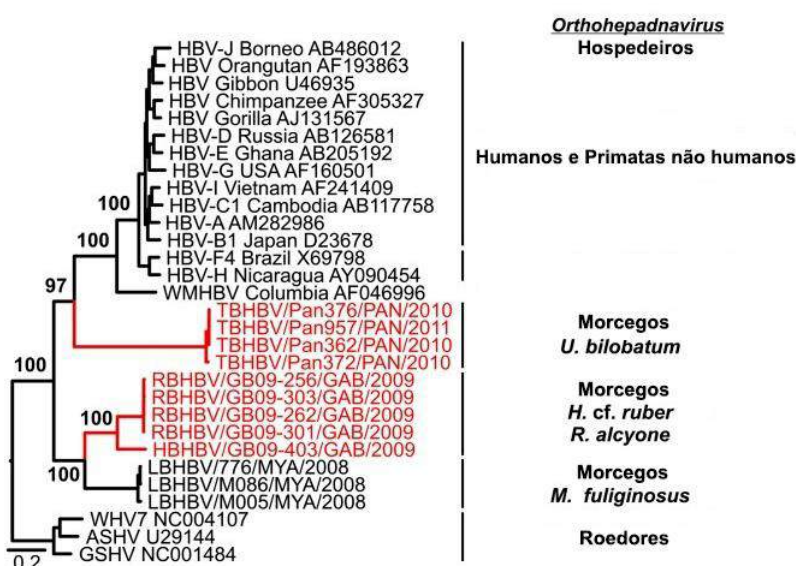


Figura 1: Análise filogenética incluindo os vírus encontrados em morcegos. Adaptado de Drexler *et al.*, 2013 [24].

1.2. Características gerais

Para serem classificados dentro da mesma família, os hepadnavírus devem compartilhar características genômicas e estruturais. Os membros da família *Hepadnaviridae* apresentam genoma extremamente compacto, presente em cópia única, na forma circular e parcialmente dupla fita, de 3 a 3,5 kilobase (Kb) [26,27].

Dotados de uma polimerase associada ao vírion covalentemente ligada ao genoma, com atividade de transcriptase reversa, são capazes de produzir vírions envelopados durante a replicação, bem como partículas subvirais em excesso, compostas somente de um envelope de proteínas e lipídeos [26]. As partículas virais completas, dotadas de genoma, apresentam

conformação esférica, cujo diâmetro pode variar entre 40 e 47 nm [27]. Tais partículas são apenas liberadas após a conversão do genoma a DNA durante o processo replicativo [28].

Ambos os gêneros *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus* apresentam em comum as regiões codificantes para a polimerase viral, a proteína do core, que envolve o genoma, e as proteínas de superfície (incluindo as formas S, M e L) [1]. Não são produzidas poliproteínas, assim como as proteínas sintetizadas não estão sujeitas a processamento proteolítico pós-traducional [28]. Além disso, pelo menos duas fases abertas de leitura (ORFs) se encontram sobrepostas, ao longo de mais de 60% do genoma [26].

Por fim, apresentam uma faixa restrita de hospedeiros susceptíveis, nos quais induzem uma infecção persistente com hepatotropismo predominante [26]. Todos os hepadnavírus de primatas, roedores e aves podem causar hepatite em seus hospedeiros, ou induzir viremia livre de sintomas [29]. Embora não tenha sido possível acompanhar através de estudo longitudinal a progressão da doença, o vírus de morcegos também demonstrou hepatotropismo, com consequente infiltração leucocitária típica de hepatite [24]. Em relação ao vírus encontrado em peixes, entretanto, devido à possibilidade de outras causas concorrentes, não foi possível provar a associação da infecção por hepadnavírus e os casos de tumores hepáticos observados [25].

1.3. Principais particularidades

Embora apresentem semelhantes características que o permitam ser agrupados em uma mesma família, os diferentes hepadnavírus apresentam distinções importantes [30]. Em geral, dentro dos representantes tradicionalmente aceitos pelo CITV, os vírus encontrados em aves são os mais divergentes do HBV, apresentando um genoma menor do que o encontrado em mamíferos e, compartilhando com eles uma similaridade na sequência de nucleotídeos de cerca de 40% [7]. Já dentro do grupo dos mamíferos, as cepas circulantes em marmotas, esquilos e morcegos seriam as mais divergentes do HBV, compartilhando uma identidade de 70%, 55-63% e 47%, por exemplo [31]. *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus* também apresentam posicionamento característico de suas ORFs [24] (Tabela 1).

Além da porcentagem de similaridade entre as sequências, a diferença mais notável entre os gêneros reside no fato de que *Avihepadnavirus* não possuem a ORF X, codificante para a proteína regulatória X, envolvida na carcinogênese [32]. Como os vírus circulantes em aves não apresentam essa ORF, acredita-se que ela não seja essencial para a infecção e replicação em hospedeiros aviários [33].

A despeito disso, *Avihepadnavírus* expressam uma proteína do core maior do que a expressa em *Orthohepadnavírus*, a qual poderia exercer uma atividade similar [34]. Essa proteína seria expressa por um gene similar ao X, cuja função ainda é questionável [35]. Entretanto, independentemente dessa lacuna de conhecimento, mutações pontuais no genoma do DHBV circulante em patos, por exemplo, já seriam suficientes para causar doença hepática [30].

Tabela 1: Comparação entre os diferentes membros da família *Hepadnaviridae*

Características Físicas	Membros da família <i>Hepadnaviridae</i>			
	HBV	WHV	GSHV	DHBV
<i>Virion</i>				
Diâmetro (nm)	42	45	47	40-45
Densidade flutuante em CsCl (g/mL)	1,24	1,225	1,24	1,16
<i>Nucleocapsídeo</i>				
Diâmetro (nm)	27	27	30	27
Densidade flutuante em CsCl (g/mL)	1,34	1,34	1,34	1,34 (com picos)
<i>Partículas do antígeno de superfície</i>				
Esféricas (nm)	22	20-25	15-25	40-60
Densidade flutuante em CsCl (g/mL)	1,19-1,20	1,18	1,18	1,14
Filamentosas (22 nm de diâmetro)	presentes	presentes	Presentes (longos e abundantes)	ausentes
<i>Genoma</i>				
Tamanho (nt)	3182-3188	3308-3320	3311	3021-3027
Identidade com o HBV (%)	100	70	55	40
n° de ORFs	4	4	4	4
<i>n° de aminoácidos codificados</i>				
Pré-S	163	204-205	206	161-163
S	226	222	222	167
Pré-C	29	30	30	43
C	183	187	188	262
P	838	879	881	786-788
X ou similar	145	141	138	114

Legenda: nm – nanômetros; CsCl – cloreto de cézio; nt – nucleotídeos; ORF – fase aberta de leitura. Adaptado de Locarnini *et al*, 2013 [31].

Embora possuam uma organização genômica semelhante aos demais hepadnavírus, as sequências encontradas em peixes também não demonstram a presença de uma região codificante para uma proteína homóloga ao X. Além disso, e de forma atípica, apresentam uma região aparentemente não-codificante de 679 pb, ausente nos demais hepadnavírus. O genoma também não apresenta sítio de clivagem para EcoRI, utilizado como referência para numerar os pares de base [25].

Assim como verificado para os vírus circulantes em peixes, as sequências virais encontradas em anfíbios também compartilham organização genômica semelhante aos hepadnavírus, e não possuem ORF X [1]. Com relação às diferenças estruturais, não é possível encontrar as partículas filamentosas defectivas, produzidas em excesso durante o ciclo replicativo dos hepadnavírus em patos e peixes. Nessas espécies, verificamos apenas as partículas esféricas, completas e incompletas [28].

Para o gênero *Orthohepadnavirus*, a possibilidade de infecção em outras células além dos hepatócitos é um tema controverso. Para o gênero *Avihepadnavirus*, entretanto, evidências comprovam a infecção do ducto biliar, raras células exócrinas, células alfa e beta das ilhotas pancreáticas, o epitélio tubular proximal do rim e, possivelmente, um subconjunto de células esplênicas [16,36–38].

1.4. Reconstrução evolutiva e paleovirologia

A despeito do conhecimento existente até hoje a cerca de hepadnavírus e seus hospedeiros, evidências recentes demonstram a presença de elementos virais endógenos (EVEs) de hepadnavírus integrados ao genoma de cobras (eSHBV/eSNHBV) [39,40], tartarugas (eTHBV), crocodilianos (eCRHBV) [39] e aves (eZHBV) [41]. Esses dados demonstram que os hepadnavírus são mais antigos do que se supunha previamente, com mais de 200 milhões de anos [42], e que a lista de candidatos que servem como hospedeiros ou reservatório pode ser consideravelmente ampla (Tabela 2).

Tabela 2: Conhecimento atual sobre a faixa de hospedeiros susceptíveis aos hepadnavírus.

Hospedeiro	Hepadnavírus exógeno	Hepadnavírus endógeno
Mamíferos	<i>Orthohepadnavirus</i>	n/a
Aves	<i>Avihepadnavirus</i>	EVE de hepadnavírus em aves
Répteis	n/a	EVE de hepadnavírus em répteis
Peixes	WSHBV, BGHBV e ACHBV	n/a
Anfíbios	TFHBV	n/a

Legenda: n/a – não se aplica; EVE – elemento viral endógeno. Adaptado de Dill *et al*, 2016 [1].

Esses estudos suportam evidências de que a organização compacta do genoma permanece ao longo da evolução dos hepadnavírus, assim como revelam um grau inesperado de conservação nas sequências de aminoácidos em certas regiões do genoma, como 27,1% para polimerase e 12,2-18,5% para ORF S, no caso de aves [43]. Além disso, sugerem que os pássaros são, potencialmente, os hospedeiros ancestrais da família *Hepadnaviridae*, e que os vírus de mamíferos emergiram de cruzamento de barreiras entre aves e mamíferos [43], ainda que os primeiros não apresentassem evidências da ORF X.

EVEs de hepadnavírus integrados ao genoma de crocodilianos demonstraram motivos que funcionam como sinais de encapsidação de RNA, análogos aos existentes em *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus*. Além disso, para esses animais, as sequências recuperadas para o gene codificante para a polimerase se agruparam mais próximas às sequências exógenas e endógenas de aves [39]. No caso das tartarugas, os respectivos EVEs de hepadnavírus integrados ao genoma foram recuperados em baixa cobertura para polimerase, o que prejudicou o suporte das análises filogenéticas entre os hospedeiros [39]. Em cobras, os EVEs de hepadnavírus integrados ao genoma se posicionaram distantes evolutivamente dos hepadnavírus exógenos já descritos, permitindo a caracterização de uma nova espécie ou mesmo gênero dentro da família *Hepadnaviridae* [40].

Para todos os EVEs de hepadnavírus não foram encontradas evidências da presença da ORF X, ou do gene similar ao X, o que sugere que tenha emergido na linhagem dos mamíferos [39]. A presença restrita da ORF X em *Orthohepadnavirus* pode estar associada aos eventos carcinogênicos associados às infecções crônicas em mamíferos [35].

Cabe ressaltar que os dados obtidos através da paleovirologia podem ajudar a esclarecer as interações dos vírus e seus hospedeiros no passado, bem como os processos de cruzamento de barreiras entre hospedeiros. Uma vez que as sequências virais exógenas e endógenas obtidas em diferentes espécies de animais nem sempre se posicionam filogeneticamente reproduzindo a distância evolutiva entre hospedeiros de origem, isso pode sugerir que as diferentes cepas possam ter sofrido diferentes episódios saltatórios entre os diferentes hospedeiros.

2. Revisão da Literatura

Em função da sua importância para a saúde pública e pelo fato de o HBV ser considerado o vírus protótipo da família *Hepadnaviridae*, esse vírus será utilizado, a seguir, como modelo para revisão da literatura.

2.1 Teorias Evolutivas

A origem da infecção pelo HBV em humanos e em primatas não humanos permanece um enigma [44]. As discussões voltadas ao tema estão centradas em três hipóteses concorrentes, com semelhantes probabilidades de ocorrência [45].

A primeira hipótese sugere que o HBV seja endêmico no Novo Mundo e tenha se dispersado para o resto do globo há cerca de 400 anos, logo após a colonização dos europeus [45,46]. Essa hipótese está sustentada no fato de os genótipos F e H, específicos da América do Sul, serem discrepantes do restante dos genótipos descritos. Além disso, sugere que o HBV foi transmitido à população humana de forma interespecífica a partir dos macacos do Novo Mundo há aproximadamente 2000 anos [45].

A segunda hipótese sugere que o HBV estava presente no ancestral comum dos primatas do Velho Mundo e macacos do Novo Mundo, e sofreu co-especiação com eles entre 10 e 35 milhões de anos. Além disso, como as cepas de HBV de primatas e humanos não formam clados distintos, essa hipótese sugere que o homem tenha sido infectado como resultado de múltiplos eventos de transmissão interespecífica a partir de primatas [14,47].

A terceira e última hipótese propõe que o HBV poderia estar presente no homem moderno (*Homo sapiens*) desde quando ele emigrou da África, há aproximadamente 60-70 mil anos [48-50].

Embora tentem elucidar a origem controversa do vírus, todas as hipóteses apresentam falhas em suas propostas. O homem moderno originado na África há 200 mil anos partiu do referido continente há 60-70 mil anos, dispersou-se pela Eurásia e Oceania há 40-45 mil anos e, finalmente, chegou às Américas há 15 mil anos. Com isso, a terceira hipótese seria viável, por exemplo, se as distribuições genótípicas do HBV no mundo fossem compatíveis com os processos migratórios do homem moderno. Fundamentalmente, as sequências de HBV amostradas em várias populações nativas isoladas pertencem a subgenótipos separados [51-55]. Em alguns casos, inclusive, como ocorre no arquipélago Indonésio, a distribuição genotípica/subgenotípica do HBV está associada com a origem étnica das populações [55]. Esses padrões geográficos indicam que a diversidade de o HBV pode estar associada às ondas

iniciais de migração humana, embora a filogenia do vírus não seja perfeitamente compatível com a história evolutiva das populações humanas ou de primatas [45].

No Brasil, a origem dos principais genótipos circulantes pode ser atribuída aos ameríndios (HBV/F) [56], aos colonizadores europeus (HBV/A2 e HBV/D) [57], e aos escravos africanos retirados à força do sudeste da África (HBV/A1) no meio do século XIX [58].

2.2 A revelação do HBV

Surtos de icterícia de caráter epidêmico são relatados no continente Asiático há mais de 5000 anos [59]. Desde então, percebe-se que o histórico das grandes guerras é acompanhado pelas pandemias ictéricas, como ocorreu na guerra de Sucessão Austríaca (1743), de Napoleão no Egito (1798), Franco-Prussiana (1870), Secessão Americana (1861-1865) e Segunda Guerra Mundial [59].

No Brasil, são raros os relatos de hepatite antes do início século XIX [59]. Contudo, registros de nativos de Porto Velho em Rondônia já denotavam a existência do quadro de cirrose hepática em membros da tribo local há mais de 500 anos [59]. Entretanto, o termo hepatite apenas foi adotado a partir do século XVIII, quando foi introduzido por Bianchi em seu artigo científico publicado em 1725.

Para a futura descoberta do agente etiológico, os episódios de vacinação coletiva contra varíola e contra a febre amarela foram de fundamental importância. Cerca de 15% dos trabalhadores do porto de Bremen, na Alemanha foram imunizados contra a varíola através de vacinas preparadas a partir de linfa humana. Após 2-8 meses de injeção, desenvolveram quadros de icterícia, fadiga, anorexia e queixas digestivas. Após a exclusão de outras hipóteses, Lüdman deduziu que a vacina deveria ser a responsável por esse quadro, veiculando um potencial agente infeccioso desconhecido até o momento. Dessa forma, registros científicos datados a partir de 1895 trazem à tona a possibilidade de transmissão parenteral de uma forma de hepatite [59–61].

Em 1937, casos de icterícia também foram descritos por Findlay e MacCallum em voluntários imunizados contra a febre amarela, após 2-7 meses de inoculação com cepas atenuadas do referido vírus [62]. Na época, para fins de estabilização do produto final, a vacina era preparada com adição de soro humano. Com isso, no final dos anos 30, a transmissão de hepatite por inoculação parenteral a partir de soro humano foi estabelecida. A partir de então, novos estudos passaram a sugerir que essa prática na fabricação de vacinas

seria um veículo de transmissão da doença icterícia [61].

No Brasil, um surto de icterícia após vacinação contra a febre amarela foi responsável por diversos óbitos no estado do Espírito Santo no começo dos anos 40. Investigações indicaram que dois lotes de vacinas preparadas com o soro normal humano foram responsáveis pelos casos de infecção [63]. Já entre os anos de 1940 e 1950, acredita-se que o emprego em massa da mesma vacina, ainda derivada de plasma humano, associada ao uso de seringa e agulhas não descartáveis para a sua aplicação, bem como o emprego de lancetas não descartáveis para a punção digital no diagnóstico de malária tenham sido responsáveis pela disseminação do HBV na região Amazônica [64].

Apesar dos inúmeros registros de surtos icterícios, foi apenas em 1963 que o geneticista americano Baruch Blumberg descobriu acidentalmente o HBV. Analisando o soro de um aborígine australiano, Blumberg notou a presença de um antígeno que reagia com o soro de pacientes hemofílicos politransfundidos. De acordo com os critérios de nomenclatura vigentes na época, esse antígeno foi denominado antígeno Austrália (AgAu). Mas, foi apenas em 1965 que essa revelação alcançou os acadêmicos, com a publicação do trabalho intitulado *A new antigen in leukemia sera* no *Journal of the American Medical Association* (JAMA).

Em 1967, Blumberg e colaboradores levantaram a hipótese de que a alta frequência do AgAu no soro de pacientes com hepatite aguda poderia estar relacionada a um suposto vírus introduzido entre humanos por transfusões de sangue [65]. No ano seguinte, enquanto Prince isolava o antígeno no sangue de um paciente durante o período de incubação de uma hepatite pós-transfusional [66], Bayer verificava através de microscopia eletrônica a presença de numerosas partículas nas formas esféricas e tubulares no soro de um indivíduo portador crônico do AgAu, as quais reagiam com o soro de pacientes convalescentes de hepatite [67]. Estudos subsequentes revelaram que essas partículas seriam invólucros virais vazios, não infectivos, fruto da síntese excessiva do antígeno de superfície viral pelos hepatócitos infectados [67].

Em 1970, uma terceira partícula, de forma esférica, foi demonstrada no soro de indivíduos positivos para o AgAu através de microscopia eletrônica [68]. Ao contrário das demais partículas descritas anteriormente, o pacote viral completo do HBV, dotado de ácido nucleico, era finalmente conhecido, e classificado como partícula de Dane em 1971 [68].

Estudos posteriores confirmaram que essa partícula correspondia ao virion completo do HBV [67]. O invólucro externo da partícula de Dane, correspondente ao AgAu, passou a ser posteriormente designado como antígeno de superfície do HBV (HBsAg). Mas esse antígeno não era o único presente na partícula viral. Com os anos, a presença de outros antígenos, como o antígeno do core do HBV (HBcAg) e o antígeno 'e' do HBV (HBeAg) foi

sendo revelada [69]. Além dos antígenos, e seus respectivos anticorpos, o material genético do HBV também se tornou conhecido, correspondendo ao primeiro a ser sequenciado dentre os demais vírus patogênicos humanos [67].

2.3 Morfologia, estrutura e genoma

A análise por microscopia eletrônica revela três tipos de partículas distintas presentes no soro de um paciente infectado pelo HBV (Figura 2). Duas dessas partículas são estruturas menores, subvirais, que podem ser encontradas nas formas esférica, com um diâmetro de 20 nm, e filamentosa, com comprimento variável e largura de 22 nm. Essas partículas são compostas pelo antígeno de superfície do HBV (HBsAg) e por lipídeos derivados do hospedeiro. Por não apresentarem ácido nucléico, não são infecciosas [70].

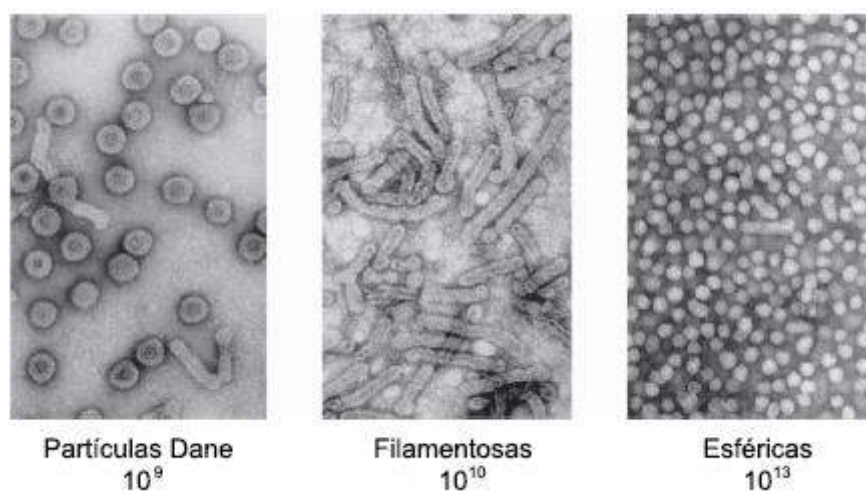


Figura 2: Imagens de microscopia eletrônica (coloração negativa) e os números aproximados de partículas associadas ao HBV em 1 mL de soro de um portador crônico, altamente virêmico. Adaptado de Gerlich *et al*, 2013 [71].

A terceira e última corresponde à partícula infecciosa propriamente dita, denominada como partícula Dane, a qual representa o vírion completo envelopado. Trata-se de uma partícula esférica de 42 nm de diâmetro, envolvida por uma bicamada lipídica, à qual se encontram ancoradas as proteínas transmembrana que compõem o HBsAg - proteínas *small (S)*, *middle (M)* e *large (L)*- associadas à morfogênese e infectividade [72,73] (Figura 3).

A partícula infecciosa, entretanto, é menos abundante no soro que o HBsAg [28]. Uma célula infectada produz por dia cerca de 1-10 vírions [74], enquanto o HBsAg é produzido até

3 mil vezes em excesso por um hepatócito infectado, sendo liberado na forma das partículas subvirais vazias [71].

Internamente ao vírion encontra-se o nucleocapsídeo icosaédrico de aproximadamente 30 nm, composto do antígeno do core do HBV (HBcAg), uma polimerase viral, e o genoma de DNA de aproximadamente 3,2 Kb [72,73] (Figura 4). Em função do tamanho do genoma, o HBV é considerado um dos menores vírus infecciosos humano [75,76]. Apesar de o seu material genético corresponder ao DNA, o vírus apresenta características particulares durante o seu processo replicativo, semelhante aos retrovírus [77,78].

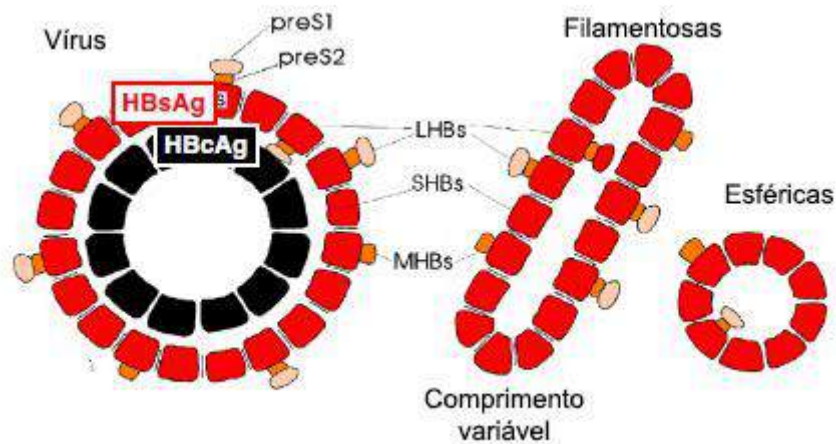


Figura 3: Modelo esquemático das partículas esféricas, filamentosas e Dane, associadas ao HBV. Legenda: SHBs, MHBs e LHBs – proteínas *small* (S), *middle* (M) e *large* (L) que compõem o antígeno de superfície (HBsAg). Adaptado de Gerlich *et al*, 2013 [71].

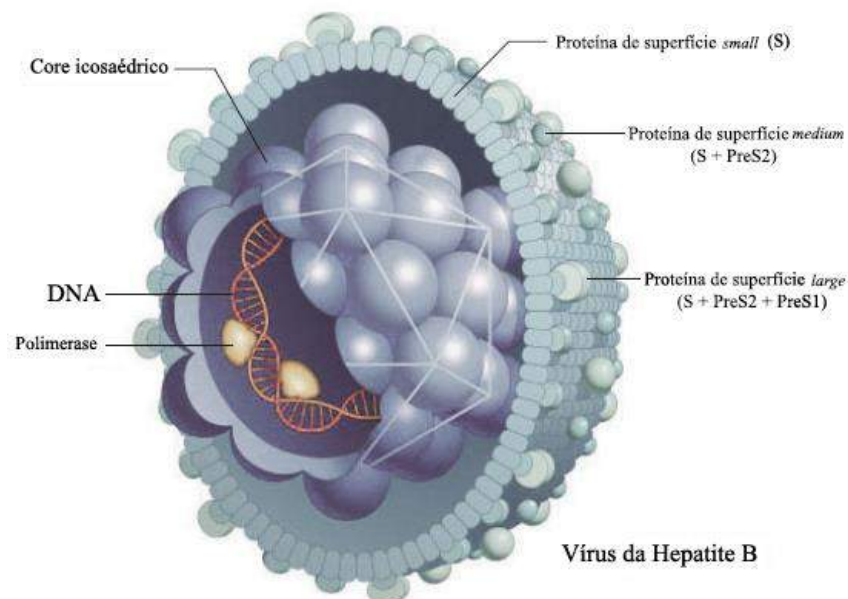


Figura 4: Representação esquemática da estrutura tridimensional do vírion. Adaptado de <http://www.37med.com/xywy/qtks/crk/201306/13878.html>. Acesso em 18-08-2016.

O genoma transportado pelo vírion encontra-se na forma circular relaxada (rcDNA), parcialmente dupla fita (dsDNA). A fita mais externa é a fita codificante, de polaridade negativa, representando o genoma total do HBV, à qual se encontra covalentemente ancorada um transcriptase reversa viral na região 5' [72,73,79]. A fita complementar interna, de polaridade positiva e, portanto, não codificante, apresenta comprimento variável, equivalente a 50-100% da fita externa. Repetições diretas do genoma formam extremidades coesivas, as quais garantem a configuração circular, por complementariedade entre as regiões 5' de ambas as fitas [79]. (Figura 5).

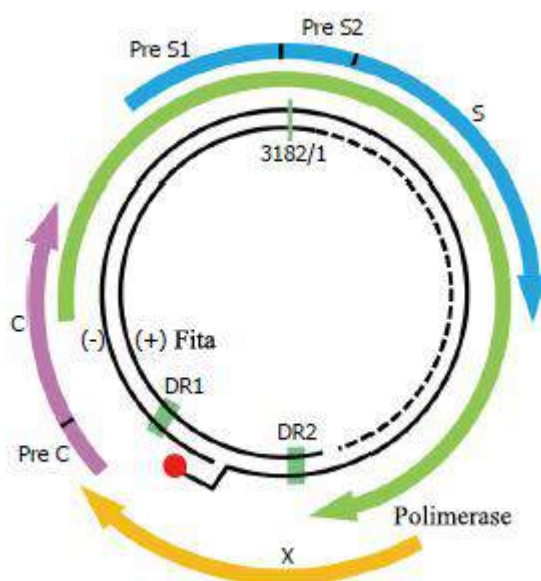


Figura 5: Representação esquemática do genoma do HBV, com suas regiões codificantes. Legenda: DR1, DR2 – repetições diretas do genoma, formando as extremidades coesivas que garantem a conformação circular. Adaptado de Ohno *et al*, 2015 [80].

O material genético do HBV apresenta uma organização altamente compacta, abrigando quatro fases abertas de leitura (ORFs) sobrepostas [79]. Essas regiões são identificadas por S (superfície), C (core), P (polimerase) e X (proteína X), e são codificantes para proteínas virais, estruturais específicas e não estruturais [81,82], descritas a seguir.

A ORF S é responsável pela codificação das proteínas que compõem o antígeno de superfície viral e circundam o nucleocapsídeo. Ela pode ser dividida nas regiões pré-S1, pré-S2 e região S. A região S codifica a proteína S do HBsAg, as regiões pré-S2 e S codificam a proteína M do HBsAg e, a região completa pré-S/S codifica a proteína L do HBsAg [79,81,83,84].

As proteínas *S*, *M* e *L* estão presentes em diferentes proporções nos três tipos de partículas virais associadas à infecção pelo HBV. A proteína *S* representa o componente predominante do envelope viral. A proteína *M* parece estar distribuída de forma semelhante em todos os tipos de partículas. A proteína *L* é somente encontrada no vírion e partícula filamentosa de HBV [85].

A ORF C é responsável pela codificação do antígeno do nucleocapsídeo (HBcAg) e do antígeno 'e' secretado (HBeAg). Ela pode ser dividida nas regiões pré-core e core [79,83,84]. A região do core codifica o HBcAg, enquanto o pré-core codifica o HBeAg, associado à infecção persistente [86] e envolvido com funções imunoregulatórias [87–90]. Embora seu papel não esteja claro, acredita-se que o HBeAg possa inibir ou atrasar a imunidade antiviral [28].

A ORF P é responsável pela codificação de uma proteína multifuncional, que pode ser dividida em proteína terminal e polimerase viral. O domínio da proteína terminal está envolvido na encapsidação e atua como primer para o início da síntese da fita negativa. A polimerase viral agrega funções não só de DNA polimerase, mas também de transcriptase reversa, que catalisa a síntese do genoma e, de ribonuclease H (RNaseH), a qual degrada o RNA pré-genômico e facilita a replicação [83,91]. Essa região codificante é a única que se encontra sobreposta a todas as demais ORFs [91].

A ORF X é responsável pela codificação da proteína HBx, essencial à replicação viral e à eficiente transcrição do cccDNA [28]. Trata-se de uma proteína com múltiplas funções, incluindo transdução de sinal, atividade transcricional, reparo de DNA, e inibição da degradação proteica [79,83,84]. A essa proteína está atribuído o potencial oncogênico do HBV [83].

Finalmente, proteínas virais do HBV codificadas por transcritos virais *spliced* têm sido identificadas, e também atribuídas a ORF X [91]. Tais proteínas parecem estar envolvidas com diferentes efeitos apoptóticos [92] e à gravidade da doença hepática [93,94].

2.4 Replicação

O ciclo de replicação do HBV se inicia com a ligação do vírion à membrana do hepatócito através de um receptor pré-S1 específico [73,95]. Estudos recentes sugerem que a proteína cotransportadora de sódio e taurocolato (NTCP) expressa na membrana basolateral dos hepatócitos funciona como um receptor genuíno do HBV [96]. Entretanto, tal receptor isoladamente não garante a susceptibilidade das espécies hospedeiras ao vírus [97]. Apesar de

o mecanismo de entrada na célula não estar elucidado, algumas vias têm sido propostas, como a entrada através de endocitose e de fusão direta do envelope viral com a membrana plasmática [98].

Após a entrada do vírus na célula, o nucleocapsídeo é liberado no citosol e transportado até o núcleo do hepatócito [99,100]. Os mecanismos de desencapsidação viral e transporte intracelular do seu genoma até o núcleo também não estão esclarecidos. Provavelmente, tais mecanismos envolvem modificação da proteína do nucleocapsídeo [101].

No núcleo, o genoma viral que se encontra na forma circular relaxada (rcDNA) é reparado e convertido a uma molécula circular covalentemente fechada (cccDNA) pela maquinaria enzimática celular [102,103] e viral [97]. Entretanto, a natureza das enzimas que executam o reparo de DNA permanece elusiva [28] (Figura 6). Tanto o processo de migração dos nucleocapsídeos até a membrana nuclear quanto a conversão do rcDNA a cccDNA são etapas que também dependem de fatores específicos do hospedeiro, assim como a entrada do vírus na célula [28].

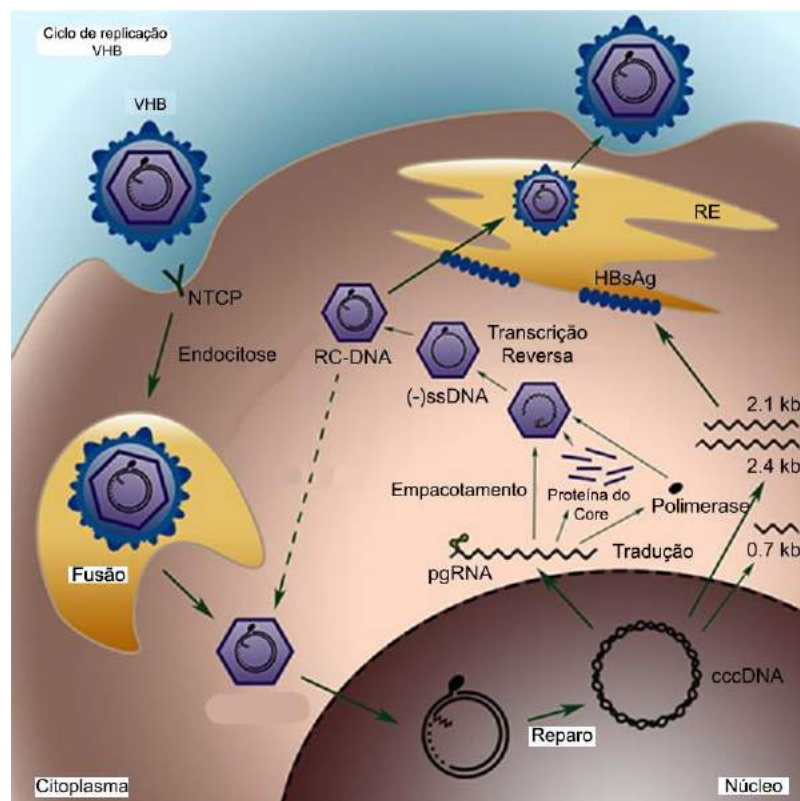


Figura 6: Representação esquemática do ciclo replicativo do HBV. Adaptado de Yang *et al*, 2014 [104].

Em um primeiro momento do processo de reparo, a região de fita simples do rcDNA é completada com nucleotídeos pela polimerase endógena e, em outra etapa, a polimerase viral

e os iniciadores de RNA usados para a síntese dessa fita serão removidos pelas enzimas celulares [100]. Após esse processo, o DNA será, então, circularizado e estabilizado através de proteínas histonas e não histonas [105,106].

Esse mecanismo de reparo do DNA viabilizado pela polimerase endógena foi utilizado como princípio da técnica molecular empregada para a investigação de amostras de soro de diferentes hospedeiros quanto à presença de vírus similares ao HBV, na presença de nucleotídeos marcados radioativamente com P-32 [5,6,107].

O cccDNA é crucial para a persistência da infecção [98]. Evidências sugerem que cada célula infectada contenha 1-50 moléculas de cccDNA funcionando como mini cromossomo epissomal de longa meia-vida, representando um intermediário replicativo do ciclo do HBV, o qual é relativamente resistente ao tratamento com antivirais e *clearance* imune [98,99].

Uma vez sintetizado, o cccDNA serve como molde para a transcrição de todos os RNAs virais, associados ao genoma ou codificantes para todas as proteínas virais necessárias ao ciclo replicativo do HBV [83,103]. Dessa forma, ele pode ser transcrito em RNA pré-genômico (pgRNA), de aproximadamente 3,5 Kb de comprimento, e diferentes RNAs sub-genômicos (sgRNA), cujos comprimentos variam de 0,8-2,4 Kb [83,98,103] (Figura 6).

No citosol, uma única molécula de pgRNA é incorporada juntamente com a transcriptase reversa a um capsídeo em montagem. No interior desse nucleocapsídeo, a transcrição reversa do pgRNA em DNA genômico ocorre. Inicialmente, o pgRNA é retrotranscrito na fita negativa de DNA, a qual dará origem por complementariedade à fita positiva e, finalmente, ao rcDNA [98,103]. Esse nucleocapsídeo poderá ser reimportado ao núcleo, para a amplificação das moléculas de cccDNA ou, ser envelopado pelas proteínas de superfície, e liberado via retículo endoplasmático na forma de uma nova geração de vírions infecciosos maduros [72,98]. Alternativamente, o genoma viral pode ser integrado ao genoma hospedeiro, por meio de enzimas celulares, embora essa estratégia não seja essencial ao ciclo do HBV [108].

Além de servir como modelo para a transcrição reversa, após ser exportado do núcleo, o pgRNA é também traduzido a HBcAg e polimerase viral. Já os sgRNAs são traduzidos a HBeAg, HBxAg e proteínas do envelope [79,98]. Curiosamente, além de revestirem a partícula Dane, essas proteínas do envelope também podem brotar em excesso na forma de partículas subvirais envelopadas vazias. Por não apresentarem nucleocapsídeo, essas partículas não são infecciosas, podendo ser encontradas nas formas esférica e filamentosa [85,109]. Trata-se de um fenômeno natural específico de HBV, associado à habilidade da proteína S do envelope de formar espontaneamente tais partículas no retículo endoplasmático rugoso [110].

2.5 Genótipos e distribuição geográfica

Sabe-se que os vírus que se replicam mais rapidamente apresentam maior probabilidade de desenvolverem mutações e por elas serem selecionados [111]. O HBV é um vírus cujo ciclo replicativo produz altos títulos de partículas virais no sangue, de cerca de 10^8 a 10^{10} vírions/mL [112]. Além disso, possui a transcriptase reversa, que é uma enzima suscetível a erros, devido à falta de capacidade de revisão exonucleolítica no sentido 3' → 5' [113,114]. Essa característica provoca uma alta taxa de erro nos ciclos replicativos, através de mutações pontuais, deleções e inserções, e determina uma rápida evolução em seu genoma ao longo do tempo [115].

Em função das restrições impostas pelas ORFs sobrepostas e pela presença de estruturas secundárias de RNA codificadas pelas regiões não sobrepostas, a taxa de mutação das diferentes regiões do genoma do HBV varia [116,117]. Estima-se que a taxa de substituição nucleotídica varie de 10^{-3} a 10^{-6} substituições/sítio/ano, cerca de dez vezes maior que outros vírus de DNA [118–123]. Embora algumas mutações proporcionem uma vantagem replicativa, em função da compactação do genoma, outras podem gerar vírions não viáveis [124], como aquelas que interferem em promotores, repetições diretas e em outros elementos envolvidos na replicação [125].

Quando viáveis, as substituições nucleotídicas no genoma viral podem gerar variabilidade, com a existência de vários genótipos, subgenótipos, mutantes e quasiespécies [126]. Tais genótipos podem se recombinar, e isso também influencia a variabilidade e a evolução do HBV [127]. Além da diversidade, essas modificações podem provocar diversos efeitos, como evasão da imunidade natural ou induzida por vacina, resistência às drogas, alterações na patogenicidade, alterações no tropismo por tecidos e espécie e, persistência viral [128].

Os genótipos representam populações virais estáveis geneticamente, com distintas histórias evolucionárias. Em função disso, apresentam uma distribuição etno-geográfica característica [129]. Acredita-se que tenham surgido em populações humanas específicas, e migrado com seus hospedeiros para diferentes áreas no mundo, levando à presente distribuição geográfica [130]. Foi em função dessa característica que a maioria das teorias evolutivas do HBV estão construídas [131].

Atualmente, existem nove genótipos reconhecidos para HBV, classificados de A – I [132–134], os quais são discriminados por uma divergência de pelo menos 7,5% nas suas sequências nucleotídicas completas; ou, uma divergência de 3-5% no gene para o antígeno de superfície [132,135–137]. Embora sua classificação como genótipo ainda seja controversa,

um novo candidato a genótipo foi proposto, correspondentes à variante J, isolada de um único indivíduo [138–140]. Devido à diversidade genética, os genótipos A-D, F, H e I podem ainda ser classificados em, pelo menos, 35 subgenótipos, os quais diferem entre 4-8% do seu genoma completo, com bom suporte de *bootstrap* [132,133].

Os genótipos A e D encontram-se distribuídos globalmente, e são os mais prevalentes no Brasil [141]. O genótipo A é encontrado principalmente na Europa, América do Norte, África e Índia, enquanto que o genótipo D no Oriente Médio, países mediterrâneos e sul da Ásia [129]. Os genótipos B e C são os mais frequentemente encontrados no leste e sudeste da Ásia, China e Japão [142]. O genótipo E está limitado à África, particularmente região ocidental subsaariana [133,143]. Os genótipos F e H são quase que exclusivamente verificados nas Américas Central e do Sul, entre a população nativa dessa região [135,144,145]. O genótipo G foi caracterizado em amostras dos EUA, México e França, além de aparecer em coinfeções, principalmente com o genótipo A [146–148] (Figura 7). O genótipo I foi descrito no noroeste da China, Vietnã e Laos [134,140,149], enquanto que a variante candidata a genótipo J foi descrita no Japão, em um paciente com carcinoma hepatocelular [138].

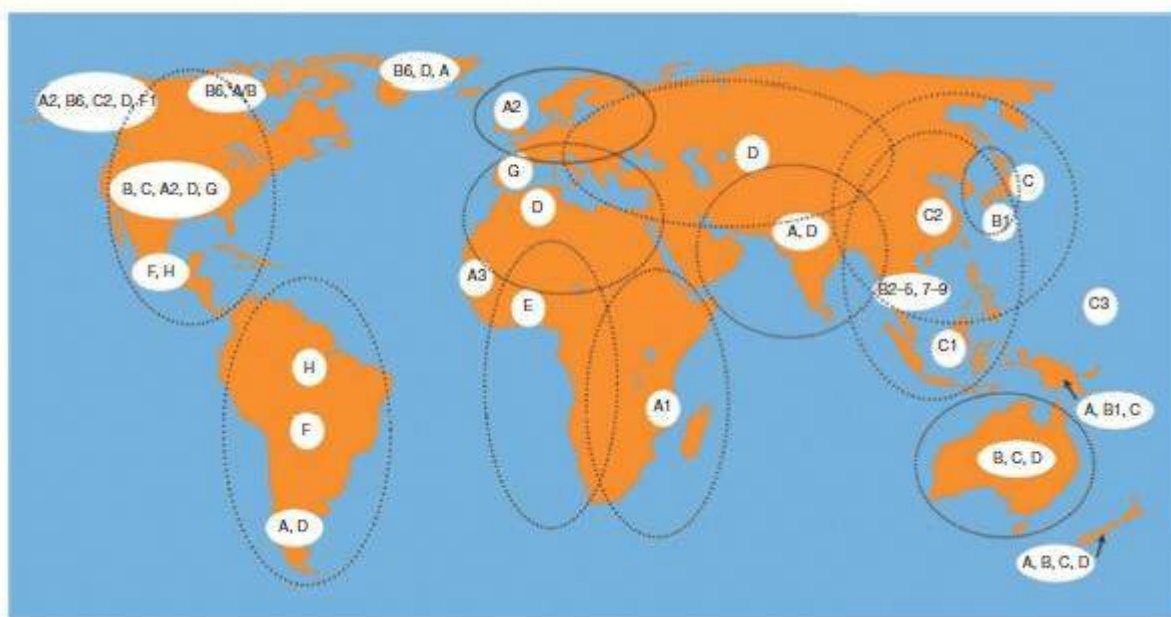


Figura 7: Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos do HBV. Fonte: Littlejohn *et al* [131].

Cabe ressaltar que a infecção por um determinado genótipo não exclui a possibilidade de coinfeção dentro de um mesmo hospedeiro por outro genótipo, ou ainda coinfeção por tipos recombinantes do HBV [150–152]. Sendo assim, o HBV pode circular como uma

complexa mistura de variantes geneticamente distintas, mas estreitamente relacionadas, que estão em equilíbrio em um determinado momento da infecção sob uma dada circunstância [114].

Esses eventos de coinfeção por diferentes genótipos do HBV dentro do mesmo hospedeiro podem favorecer a troca e recombinação de material genético entre as cepas infectantes. E existem algumas oportunidades no ciclo replicativo do HBV para isso acontecer, incluindo o empacotamento do pgRNA, a transcrição de RNA de duas subpopulações de minicromossomos, a transcrição reversa e a geração dos genomas dupla-fita [105,153].

Estudos demonstram que os diferentes genótipos e a maioria dos subgenótipos apresentam propriedades epidemiológicas e virológicas particulares. Além da distinta distribuição geográfica, evidências sugerem que os genótipos sejam resultado da biologia do HBV [154], determinando o curso natural da doença [155], influenciando nas manifestações clínicas, gravidade da doença hepática, bem como afetando a resposta à terapia antiviral [156].

Na Europa, por exemplo, a cronificação das infecções está mais frequentemente associada ao genótipo A do que ao genótipo D. Enquanto que, na Ásia, os quadros graves estão mais correlacionados ao genótipo B do que ao genótipo C [147]. De uma forma geral, pacientes infectados com o genótipo E apresentam uma frequência maior de positividade para HBeAg e, portanto, maiores cargas virais do que os pacientes infectados com o genótipo D [157].

2.6 Epidemiologia e Transmissão

O HBV é um dos agentes infecciosos mais comuns no mundo [158], o que faz com que a infecção provocada por ele constitua um relevante problema de saúde pública a nível mundial [98].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 240 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo HBV [159]. Dessas, aproximadamente 780 mil pessoas vão a óbito por ano devido à infecção, sendo 130 mil devido à forma aguda, e 650 mil devido à infecção crônica, manifestada através de cirrose e câncer hepático [160].

A prevalência da hepatite B é mais elevada na África Subsaariana e na Ásia Oriental, onde 5-10% da população adulta está cronicamente infectada. Altas taxas de infecção crônica também são encontradas na Amazônia e na região Sul da Europa Central e Oriental. No

Oriente Médio e no Subcontinente Indiano, estima-se que 2-5% da população estejam cronicamente infectadas. Já na Europa Ocidental e na América do Norte, menos do que 1% da população está cronicamente infectada [159] (Figura 8).

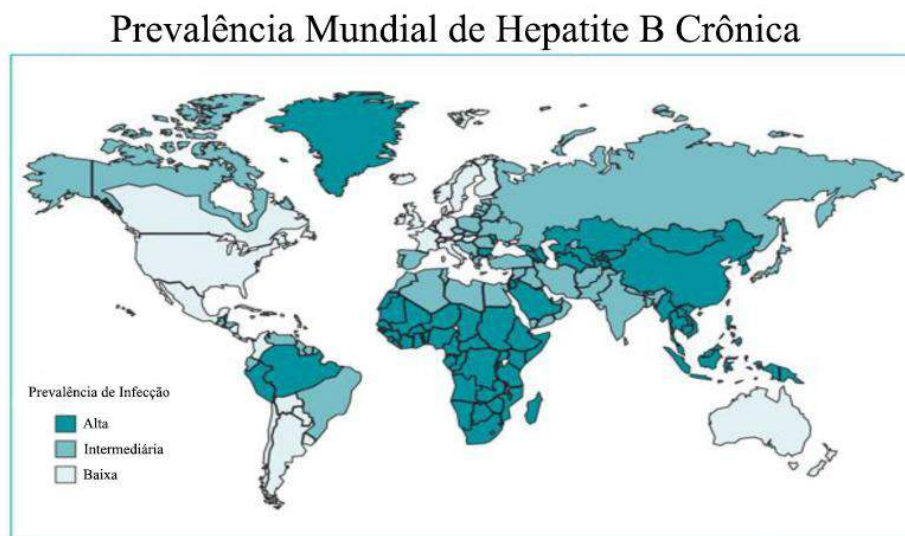


Figura 8: Prevalência global da infecção pelo HBV. Adaptado de Ogholikhan & Schwarz, 2016 [161].

A despeito da região Amazônica Ocidental e de áreas restritas de alguns estados nas regiões Sul e Sudeste, classificados como de alta endemicidade para a infecção pelo HBV, a maioria do território brasileiro foi classificada em regiões de baixa e intermediária endemicidade, segundo estudos nacionais [162,163] (Figura 9).

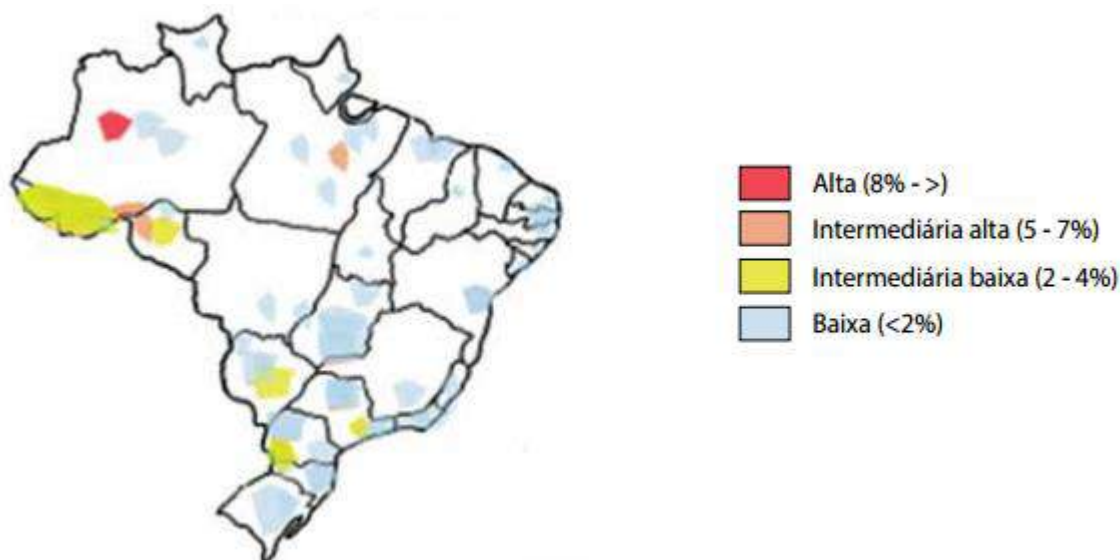


Figura 9: Prevalência de portadores do vírus da hepatite B na população brasileira, a partir do ano de 2000. Adaptado de Souto, 2015 [163].

Dados do Ministério da Saúde, publicados em 2015, referentes ao último Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais no Brasil registram, aproximadamente, 130 mil novos casos confirmados de hepatite B no período de 2000 a 2012 [164] (Figura 10).

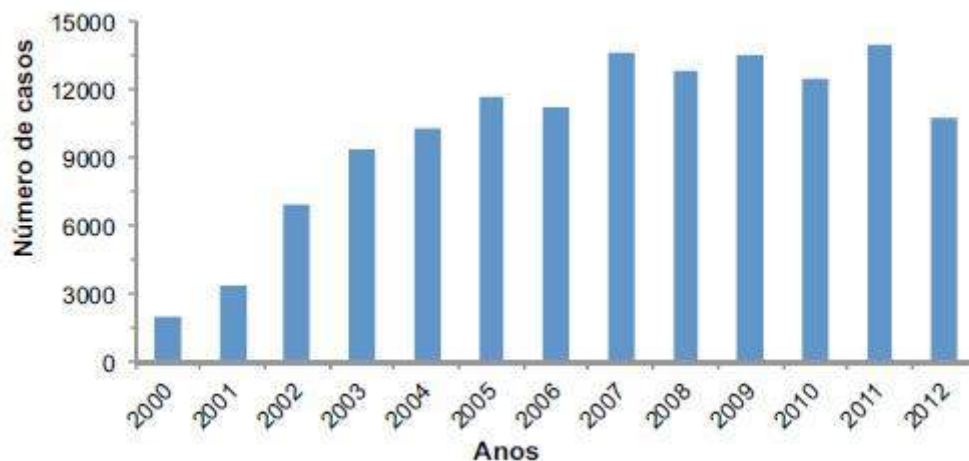


Figura 10: Número de casos de hepatite B no Brasil entre os anos de 2004-2012. Fonte: Casos de Hepatites Virais, Sinan/SVS/MS [164].

De acordo com o Boletim, não houve alteração significativa do número total de casos notificados por ano no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), nem da distribuição da infecção por faixa etária, entre os anos de 2004 e 2012. Embora não caracterizadas como áreas altamente endêmicas, as regiões Sul e Sudeste apresentam um maior número de casos diagnosticados do que as demais regiões brasileiras, provavelmente devido ao melhor sistema de vigilância [164] (Figura 11).

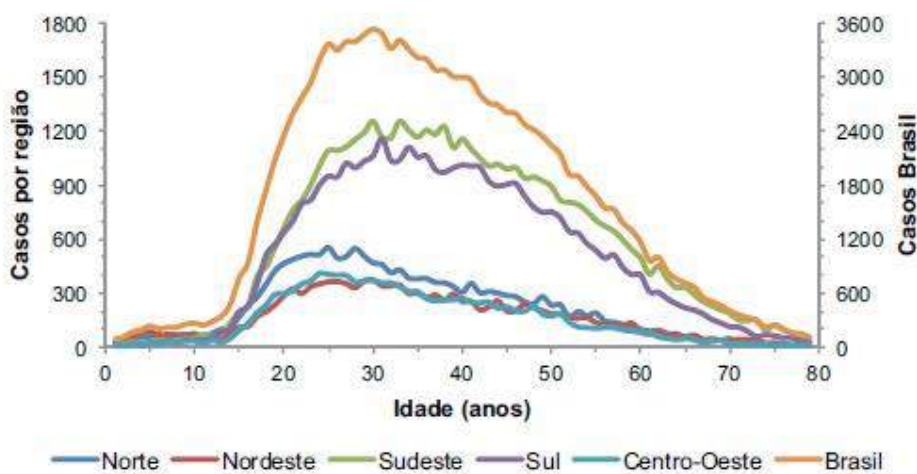


Figura 11: Casos de hepatite B por idade e região geográfica do Brasil entre os anos de 2004-2014. Fonte: Casos de Hepatites Virais, Sinan/SVS/MS [164].

O HBV pode ser transmitido através de exposição percutânea ou de mucosa ao sangue, sêmen ou fluidos corporais de uma pessoa infectada, como saliva e secreção vaginal, por exemplo. Além das transfusões de sangue e produtos sanguíneos contaminados, o vírus também pode ser adquirido através da reutilização de agulhas e seringas no ambiente de saúde, ou durante procedimentos médicos, cirúrgicos e/ ou odontológicos, com instrumentais perfurocortantes não devidamente esterilizados. Usuários de drogas injetáveis, os quais compartilham agulhas e seringas, indivíduos que fazem tatuagens com material não individual/exclusivo, e pessoas que compartilham aparelhos/lâminas de barbear, instrumental de manicure, e/ou objetos semelhantes contaminados com sangue de um indivíduo infectado também estão sujeitos à infecção [159,165].

Além das transmissões sexual e parenteral, o vírus também pode ser transmitido de forma vertical, de mães infectadas para os filhos durante o nascimento, pela exposição do recém-nascido ao sangue ou líquido amniótico, e mais raramente por via transplacentária. Além disso, o vírus também pode ser transmitido de forma horizontal, a partir de um membro da família para a criança durante a primeira infância [159,165].

O HBV também representa um risco para os trabalhadores da saúde, os quais estão sujeitos a traumatismos e lesões acidentais com agulhas/bisturis enquanto cuidam de pacientes infectados pelo HBV, ou aqueles que manipulam amostras biológicas de indivíduos portadores do vírus [159,165].

Em áreas de alta endemicidade, como ocorre nos países asiáticos por exemplo, a maioria das infecções são adquiridas através de transmissão perinatal ou, de transmissão vertical, no início da infância. Na África e em países ocidentais, a transmissão horizontal entre crianças constitui a forma predominante de transmissão, a partir de uma criança infectada para uma não infectada durante os primeiros 5 anos de vida [82,126,159,166]. Em áreas de baixa prevalência, o uso de drogas injetáveis e o comportamento sexual de risco correspondem à principal via de infecção [142,167–169].

De acordo com a literatura, neonatos têm 90% de chance de se tornarem portadores crônicos do HBV após a infecção, com risco de desenvolverem complicações fatais como injúrias hepáticas, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular [170–173]. Essa porcentagem diminui para até 50% até o terceiro ano de idade, e chega até 5% em adultos [174], grupo no qual a maioria das infecções são espontaneamente resolvidas, e uma resposta imune protetora é mantida ao longo da vida [173].

No Brasil, a infecção pelo HBV é considerada um agravo de notificação compulsória, e os medicamentos são fornecidos gratuitamente aos pacientes pelo governo, de acordo com a portaria 2.561/2009 do Ministério da Saúde, a qual estabelece o Protocolo Clínico e as

Diretrizes Terapêuticas. Em outros países, entretanto, nos quais essa medida não ocorre, o custo dos antivirais torna o tratamento não amplamente disponível para os portadores do vírus [175–177]. Além disso, os efeitos colaterais relevantes e a necessidade de administração prolongada de agentes antivirais afetam a adesão ao tratamento [178–182]. Apesar da disponibilidade de uma vacina eficaz, responsável pela proteção a longo prazo contra a infecção em mais de 90% das pessoas saudáveis, e com uma alta eficiência no bloqueio da transmissão vertical, cerca de um milhão de pessoas morrem anualmente devido à infecção pelo HBV [183,184].

2.7 Patogenia

O ciclo replicativo do HBV não é diretamente citotóxico para os hepatócitos. Entretanto, a resposta imune dirigida aos antígenos virais expostos na superfície dos hepatócitos é que determina a injúria tecidual [185]. O equilíbrio dinâmico entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro é determinante para a patogênese da doença hepática [173].

A forma pela qual a infecção irá se manifestar depende da idade do indivíduo, seu estado imunológico e rota de transmissão da infecção. Adultos imunocompetentes normalmente apresentam uma doença autolimitada, na qual a eliminação viral é observada em cerca de 95% dos casos, e adquirindo imunidade ao longo da vida. Já as infecções adquiridas precocemente, vertical ou horizontalmente, até 5 anos de idade, tendem a evoluir com um prognóstico desfavorável, tendendo à cronificação [173].

A eliminação do HBV está associada a uma forte resposta coordenada por células T CD4+ e T CD8+ à infecção viral, combinada com um componente humoral imune eficaz [186]. O perfil de infecção crônica está relacionado a uma diminuição dessa resposta por células T específica, insuficiente para a eliminação viral do fígado [185]. Alguns fatores comportamentais e genéticos, características demográficas, consumo de substâncias tóxicas como álcool e fumo, e coinfeção pelos vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da hepatite C (HCV) podem contribuir para o agravamento do quadro hepático na cronicidade, elevando os riscos de cirrose e neoplasias [165].

A inflamação crônica mediada pelo sistema imune, a contínua morte celular e a subsequente proliferação celular podem aumentar a frequência de alteração genética e o risco de desenvolvimento de câncer. A presença de células e citocinas inflamatórias ativam as vias geradoras de oxidantes celulares, que induzem danos oxidativos no DNA [187–189]. O

aumento do *stress* oxidativo pode induzir mutações genéticas e alterações cromossomais. Sendo assim, um efeito pró-carcinogênico pode ser desencadeado através de uma doença inflamatória necrótica sem a erradicação final de HBV do fígado [173].

Novos estudos têm demonstrado que além do efeito não citopático tradicionalmente aceito, o HBV pode estar envolvido diretamente com a morte celular dos hepatócitos [190]. As proteínas virais HBx e HBsP estariam envolvidas na indução de apoptose nas células infectadas, que passariam a expor resíduos de fosfatidilserina em suas membranas, além de adquirirem uma conformação mais arredondada [92]

Além disso, evidências experimentais sugerem que HBx, uma proteína multifuncional com potencial oncogênico, possa interagir com um grande número de fatores celulares e modular suas funções normais, levando à desregulação das atividades celulares [191].

2.8 Manifestações Clínicas

A infecção pelo HBV é capaz de provocar uma ampla faixa de manifestações clínicas, variando desde um estado de portador assintomático com uma histologia hepática normal à grave, às doenças hepáticas crônicas, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular [192].

A infecção aguda pode se manifestar como hepatite anictérica (subclínica) em 66% dos pacientes, hepatite icterícia em 33% dos pacientes ou, raramente, como hepatite fulminante, em aproximadamente 1% dos casos [83].

A infecção crônica pode ser assintomática (estado de portador de HBsAg), ou pode ser manifestada por sinais e sintomas de cirrose ou carcinoma hepatocelular, ou ambos. O resultado desse perfil de infecção depende não só do vírus, através dos níveis de HBV-DNA, genótipo e padrões de mutação, mas também de fatores relacionados ao hospedeiro, como idade, sexo, *background* genético e estado imunológico [83].

Manifestações extra-hepáticas também são relatadas em cerca de 1-10% dos casos de infecção por HBV, como doença do soro, poliarterite nodosa, crioglobulinemia mista, glomerulonefrite membranosa e anemia aplásica. Embora a patogênese das desordens não esteja clara, acredita-se que a causa seja a injúria mediada pela deposição de complexos imunes relacionados aos altos níveis de antígenos HBV [112].

2.8.1 Infecção Aguda

No perfil agudo de infecção, o período de incubação do HBV varia de duas semanas a quatro meses, seguido de um período prodrômico ou pré-ictérico e, em seguida, uma fase ictérica [83]. Inicialmente, os pacientes se queixam de fadiga, náusea, anorexia e desconforto no hipocôndrio direito, além de apresentarem manifestações clínicas semelhantes à gripe, como coriza, fotofobia, dor de cabeça e mialgia [112]. Durante o período prodrômico, os níveis de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) se elevam [112], bem como os níveis de HBsAg e HBV-DNA [83].

Após dez dias do início dos sintomas, a icterícia se torna aparente através da colúria, aliada à febre de baixo grau, e hepatomegalia levemente dolorosa [112]. Na fase ictérica, os níveis de bilirrubina também se elevam [112], mas os níveis virais diminuem [83].

Na convalescença, a icterícia é resolvida, mas os sinais e/ou sintomas podem durar ainda algumas semanas. Nessa fase, o HBsAg é eliminado do organismo, e os níveis de HBV-DNA não são detectados no soro [83]. Com a recuperação, os níveis de ALT se normalizam dentro de 1-4 meses. Embora o nível de ALT também reflita a injúria hepatocelular, ele não tem valor prognóstico [112].

Os casos de hepatite fulminante são evidenciados pelo aparecimento súbito de febre, dor abdominal, vômito e icterícia, seguido de desorientação, confusão e coma. Os níveis de HBsAg e HBV-DNA caem rapidamente à medida que a falência hepática se desenvolve, fazendo com que, inclusive, alguns pacientes sejam HBsAg negativos no início do coma hepático. Devido à gravidade nas alterações das funções hepatocelulares e consequente citotoxicidade, trata-se de um quadro clínico que requer transplante [83].

2.8.2 Infecção Crônica

O perfil crônico de infecção apresenta um curso dinâmico e variável [83]. São conhecidos quatro estágios naturais de infecção baseados nos níveis de HBV-DNA, ALT e HBeAg: estágio de imunotolerância, estágio de *clearance* imune ou estágio imunorreativo, estágio de portador HBsAg inativo, e estágio de reativação ou estágio HBeAg negativo [193]. Entretanto, nem todos os pacientes crônicos irão atravessar todos esses estágios [173].

O estágio de imunotolerância é evidenciado em pacientes que adquiriram a infecção perinatal ou na infância. É caracterizado por elevada replicação viral, sem evidências de agressão hepatocelular [165], assim como pela presença de HBeAg, altos níveis séricos do

HBV-DNA, níveis séricos normais das aminotransferases e com mínima ou nenhuma inflamação detectada por biópsia hepática [194]. São considerados pacientes com baixo risco de progressão à cirrose ou hepatocarcinoma, para os quais não há indicação de tratamento [173].

A fase imunorreativa é verificada após 20-30 anos do início da fase de imunotolerância, e em pacientes que adquiriram o HBV na fase adulta. Nessa fase, embora a replicação e viremia do HBV continuem no fígado, os níveis séricos se tornam mais baixos do que aqueles verificados na fase anterior. É caracterizada pela presença de HBeAg, altos níveis séricos do HBV-DNA e aminotransferases, além de inflamação ativa e necrose no fígado [173]. Em função disso, há indicação clínica para tratamento [165]. Do total de pacientes que se encontram nessa fase, 12-20% evoluem para um quadro de doença hepática grave dentro de 5 anos [195].

O estágio de portador HBsAg inativo corresponde ao estágio no qual são encontrados a maioria dos pacientes com infecção crônica. Nessa fase ocorre a soroconversão HBeAg/anti-HBe, os níveis do HBV-DNA se tornam baixos ou indetectáveis, os níveis de ALT se normalizam, e as biópsias revelam leve inflamação e fibrose mínima à cirrose inativa [83,173]. Apesar do bom prognóstico, não é possível eliminar o vírus em função da integração do seu genoma ao núcleo dos hepatócitos. Como a progressão desse grupo é normalmente benigna, não há indicação clínica de tratamento [165].

A fase de reativação ocorre em 20-30% dos portadores HBsAg inativos. Nesse estágio ocorre escape viral, seja por depressão da atividade imunológica ou devido a mutações virais que permitam driblar a vigilância imunológica do hospedeiro [165]. No primeiro caso a soroconversão é revertida e, no segundo caso, devido à mutação na região do pré-core ou core, as células infectadas param de secretar o antígeno 'e', considerado um antígeno alvo em hepatócitos infectados [86,88]. Apesar disso, a carga viral permanece elevada, assim como as transaminases, havendo uma exacerbação da injúria hepática e um pior prognóstico [173]. Comparado aos pacientes da fase imunorreativa, os pacientes da fase de reativação tendem a ser mais velhos, apresentam menores níveis do HBV-DNA no soro, e um dano hepático mais avançado [112]. Em função disso, é necessário avaliar a carga viral de forma sistemática e acompanhar o paciente.

De uma forma geral, pacientes com evidências de hepatite B crônica - com transaminases elevadas associadas à inflamação e/ou fibrose na biópsia hepática - não apresentam sintomas, ou têm sintomas inespecíficos como fadiga, ou desconforto no hipocôndrio direito. Os pacientes com doença mais grave ou cirrose apresentam sinais de

icterícia, esplenomegalia, ascite, edema periférico, encefalopatia e hemorragias gastrointestinais [165].

Embora não classificada como um dos estágios da infecção crônica, também é possível verificarmos um quadro de infecção classificada como oculta [196,197]. Acredita-se que a infecção oculta persistente seja uma consequência natural, a longo prazo, de um quadro de infecção aguda resolvida ou, fruto de uma exposição a uma pequena quantidade de hepadnavírus. Em ambos os casos, o vírus se replica a baixos títulos no hospedeiro [173].

A infecção oculta é caracterizada pela não detecção do HBsAg na presença do HBV-DNA [198–200]. Trata-se de uma espécie de infecção residual, detectada pelos ensaios de amplificação de ácido nucleico, que aumentam a sensibilidade à detecção dos genomas de hepadnavírus. Os indivíduos portadores desse tipo de infecção funcionam como reservatórios a partir dos quais o vírus pode retomar o processo de replicação ativa após episódio de imunossupressão ou imunodeficiência [201,202].

2.9 Diagnóstico

O período de incubação do HBV é de 75 dias em média, mas pode variar de 30 a 180 dias. O vírus pode ser detectado dentro de 30-60 após a infecção, podendo persistir durante a cronicidade [203]. O diagnóstico da infecção é baseado em observações clínicas, análises bioquímicas, histológicas, sorológicas [83] e moleculares [204]. Antígenos virais, os respectivos anticorpos produzidos pelo hospedeiro, e o material genético podem ser detectados no soro de pacientes infectados pelo HBV, funcionando como marcadores da infecção. A adequada interpretação dos resultados é essencial para o correto diagnóstico das várias formas clínicas e/ou fases da infecção na qual se encontra o paciente [112], bem como para determinar se a sua eventual imunidade é fruto de infecção prévia ou vacinação, ou mesmo se ele está susceptível à infecção (Quadro 1).

Os primeiros marcadores sorológicos de infecção aguda são o HBV-DNA, o HBsAg e o HBeAg, os quais aparecem antes do início das manifestações clínicas. O HBsAg corresponde a um marcador de infecção ativa, enquanto o HBeAg está correlacionado a altos níveis de replicação viral e infectividade. Após o início da doença clínica, também é possível verificar IgM anti-HBc, o qual declina à medida que IgG anti-HBc se eleva; permanecendo, o último, em níveis elevados ao longo da vida. Dessa forma, anti-HBc total funciona como marcador, a longo prazo, de exposição ao HBV. Durante a recuperação clínica do paciente ou convalescença, o HBV-DNA, o HBsAg e o HBeAg são eliminados, e a soroconversão é

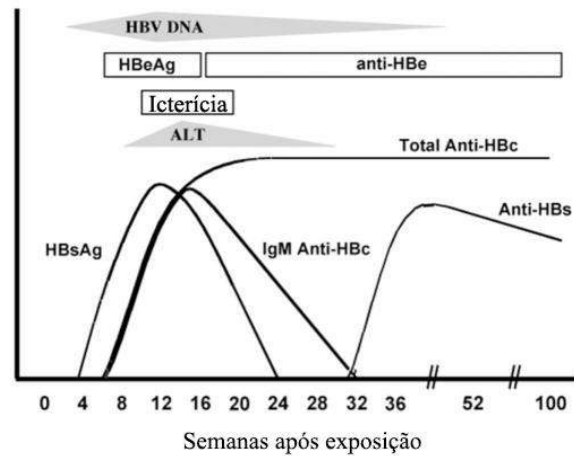
verificada com a detecção de anticorpos anti-HBs e anti-HBe. Anticorpos anti-HBs estão associados à imunidade contra HBV [83] (Figura 12).

Interpretação dos Resultados Sorológicos		
Testes	Resultados	Interpretação
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Negativo Negativo	Suscetível
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Positivo Positivo	Imune devido à infecção natural
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Negativo Positivo	Imune devido à vacinação
HBsAg anti-HBc IgM anti-HBc anti-HBs	Positivo Positivo Positivo Negativo	Infecção aguda
HBsAg anti-HBc IgM anti-HBc anti-HBs	Positivo Positivo Negativo Negativo	Infecção crônica
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativo Positivo Negativo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Infecção resolvida (mais comum) 2. Anti-HBc falso-positivo, portanto suscetível 3. Infecção crônica “baixa carga viral” 4. Infecção aguda em resolução

Quadro 1: Interpretação dos testes sorológicos para Hepatite B. Adaptado de <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/PDFs/SerologicChartv8.pdf>. Acesso em 18-08-2016.

Semelhante ao perfil agudo de infecção, o padrão inicial da infecção crônica apresenta os mesmos marcadores, como o HBV-DNA, o HBsAg e o HBeAg, frequentemente detectados em altos títulos. Além disso, a detecção de anti-HBc total representa o contato com o HBV. Entretanto, de forma diferenciada, não se verifica a resolução da infecção nesse perfil. Mesmo após seis meses de infecção os níveis de HBsAg caem, mas não são completamente eliminados, persistindo no organismo e funcionando como marcador de cronicidade; enquanto o processo replicativo viral se mantém [165]. Dessa forma, não é possível detectar a produção de anticorpos anti-HBs e anti-HBe [83]. Além disso, a manutenção de uma alta carga viral na cronicidade funciona como um indicador de progressão hepática mais grave [112] (Figura 12).

A Hepatite B Aguda



B Hepatite B Crônica

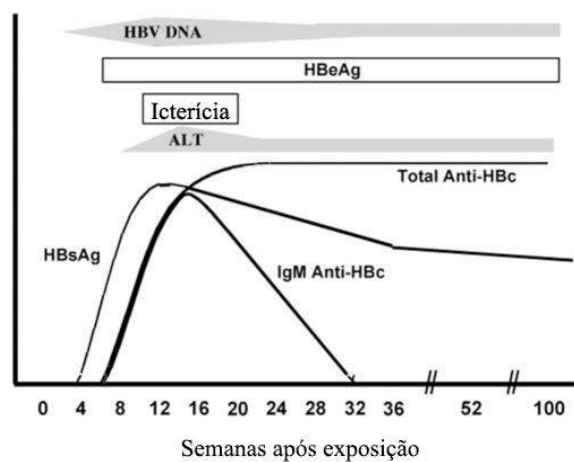


Figura 12: Perfis sorológicos da hepatite aguda (A) e crônica (B). Adaptado de Liang, 2009 [83].

O HBV-DNA é detectável no começo da infecção, aproximadamente 1 mês após a exposição ao vírus, aumentando até o terceiro mês, quando chega ao seu valor máximo, de aproximadamente 10^8 cópias/mL. A partir de então a carga viral diminui progressivamente na infecção crônica ou desaparece com a resolução da infecção [205]. Em função disso, a maior sensibilidade dos ensaios moleculares é especialmente útil para pacientes crônicos em que não há detecção sérica de HBeAg, e para os indivíduos com infecção oculta [206].

Os métodos moleculares qualitativos e quantitativos também são úteis para diagnosticar a replicação na cronicidade, avaliar o prognóstico da doença, o risco de progressão à cirrose e ao hepatocarcinoma, definir o começo do tratamento antiviral, assim como monitorar o tratamento e identificar a emergência de cepas resistentes [207,208]. Aqueles com baixos limites de detecção, altos níveis de acurácia e precisão intra e inter-ensaio são recomendados para a detecção precoce da reativação viral [209].

2.10 Profilaxia

As medidas profiláticas à infecção pelo HBV envolvem a prevenção de comportamentos de risco, como a prevenção à exposição ao sangue e outros fluidos corporais, o rastreamento de gestantes infectadas, e estratégias de imunização ativa, por meio de vacinas, e passiva, através de globulina hiperimune específica (HBIG) [210].

Em 1981, a primeira vacina contra hepatite B foi autorizada. Embora fosse uma vacina eficaz e imunogênica, por ser preparada a partir de plasma humano, a estratégia de imunização contra o HBV não isentava os pacientes de prováveis riscos de infecção por outros agentes infecciosos presentes nesse plasma [211].

Devido a isso, uma nova vacina foi desenvolvida, dessa vez baseada na tecnologia do DNA recombinante. Através de engenharia genética, leveduras ou células de mamíferos são utilizadas como vetores de expressão do gene codificante para HBsAg para a produção dessas vacinas [212]. Além de mais segura, essa estratégia demonstra conferir efetiva imunogenicidade contra o HBV, já que cerca de 90% dos indivíduos adultos imunocompetentes e 95% das crianças/adolescentes vacinados desenvolvem uma resposta humoral adequada [213], além de minimizar a incidência de câncer hepático [214].

No Brasil, o esquema preconizado de vacinação contra HBV envolve três doses da vacina recombinante, em intervalos de um mês e seis meses após a dose inicial. A capacidade de proteção conferida pela vacinação está diretamente relacionada à resposta humoral do indivíduo, medida pelo título de anticorpos anti-HBs após o esquema vacinal. Estima-se que cerca de, no mínimo, 10 mUI/mL de anticorpos anti-HBs são necessários para essa proteção [215,216]. Embora a duração da proteção conferida pela vacina seja controversa, a proteção conferida por 3 ou 4 doses da vacina monovalente persiste por, pelo menos, 20 anos [217].

Em casos de urgência de imunização após exposição ao vírus, seja através de exposição perinatal de recém-nascidos cujas mães são HBsAg reagentes, exposição percutânea ou de mucosa em acidentes ou, exposição sexual a um portador do HBV, a imunoprofilaxia passiva através da administração de HBIG é recomendada [218]. Ela também é indicada para a redução do risco de infecção por HBV recorrente após transplante hepático [219]. A combinação de ambas as estratégias de vacinação e HBIG chega a alcançar 95% de eficiência de proteção na transmissão perinatal [220].

2.11 Tratamento

O objetivo principal do tratamento da hepatite B crônica é alcançar a supressão sustentada da replicação do HBV a níveis indetectáveis, prevenindo ou reduzindo as complicações de cirrose, descompensação hepática, carcinoma hepatocelular e morte [221]. Para isso, a adesão dos pacientes faz-se necessária, minimizando uma insuficiente supressão virológica, o avanço da resistência e a progressão da doença [222]. Em função disso, a eficácia a longo prazo, a segurança do paciente, a resistência à droga e o custo devem ser considerados na escolha da terapia [223].

O tratamento atual para a hepatite B crônica é limitado a duas classes de terapêuticos disponíveis, os imunomoduladores e os nucleosídeos/nucleotídeos inibidores da transcriptase reversa (NRTI) [183]. Os parâmetros de resposta ao tratamento a serem considerados são a soroconversão de HBeAg a anti-HBe, o desaparecimento do HBV-DNA do soro, a normalização dos níveis das transaminases e a melhora da histologia hepática [211].

Dentre os imunomoduladores, encontramos o interferon-alfa (INF- α) e o interferon-alfa peguilado, os quais potencializam a defesa imune do hospedeiro contra a infecção viral [183]. Trata-se de uma proteína de sinalização com diferentes mecanismos de ação, como ação antiviral direta e efeitos antiproliferativos [224]. As vantagens dessa escolha são a curta duração do tratamento e a ausência de resistência antiviral [179]. Entretanto, a taxa de resposta ao tratamento dentre os pacientes crônicos é de cerca de 20-30%; e, o desenvolvimento de efeitos colaterais graves limita sua tolerabilidade [218].

Com relação à classe de NRTIs, existem cinco drogas aprovadas e disponíveis para o tratamento de pacientes crônicos, que são Lamivudina, Adefovir, Entecavir, Telbivudina e Tenofovir [168]. Os análogos de nucleosídeos e nucleotídeos atuam bloqueando a transcrição reversa do RNA pré-genômico a HBV-DNA [183] e são bem tolerados [211]. Entretanto, o maior inconveniente associado à sua escolha é a emergência de resistência à droga. Várias mutações no gene da polimerase do HBV associadas à resistência são descritas, além daquelas que conferem resistência cruzada a outros NRTIs [225]. Segundo o Ministério da Saúde, não há registros publicados até o momento de resistência ao Tenofovir.

Diante da emergência de resistência aos NRTIs, o tratamento de pacientes crônicos pode ser otimizado através da genotipagem das mutações associadas à resistência, guiando a escolha do NRTI adequado, além da combinação, por exemplo, com INF- α peguilado, resultando em melhor tolerabilidade ao imunomodulador e maior eficácia ao tratamento do que o verificado em uma monoterapia [183].

Apesar dos avanços terapêuticos, o *clearance* do HBV-DNA ou cccDNA no soro ou tecido hepático, e a soroconversão HBsAg/anti-HBs ainda parecem desafiadores [224]. Diante disso, estudos sobre os mecanismos de infecção viral, associados à replicação e patogênese são necessários para a identificação de novos alvos terapêuticos no ciclo do HBV ou no sistema imune do hospedeiro [183].

3. Justificativa

A literatura afirma que o HBV apresentaria uma estreita faixa de hospedeiros em que seria possível manter o seu ciclo de replicação viral. A maioria das espécies hospedeiras originalmente descritas capazes de albergá-lo está inclusa no grupo dos primatas não humanos, os quais não são comumente utilizados em pesquisas médicas devido à dificuldade de disponibilidade, manejo em cativeiro, e alto custo de manutenção [30].

A despeito dessa teoria original, achados da literatura evidenciam a circulação de um vírus semelhante ao HBV em suínos [22] e em galinhas [23], demonstram a presença de elementos virais endógenos (EVEs) de hepadnavírus em cobras [39,40], tartarugas e crocodilianos [39], e propõem a criação de um novo gênero atribuído aos vírus circulantes em peixes [25] e anfíbios [1]. Esses dados demonstram não só que os hepadnavírus são mais antigos do que se suponha (> 200 milhões de anos) [42], como também que a lista de candidatos que atuariam como hospedeiro ou reservatório de hepadnavírus é consideravelmente ampla.

Embora o HBV seja considerado tradicionalmente espécie-específico, suspeita-se que sua habilidade já demonstrada de cruzar barreiras de espécies poderia prejudicar, de forma ainda não esclarecida, as tentativas de erradicação da infecção humana através das estratégias de imunização em regiões endêmicas [226]. Além disso, outros fatores como circunstâncias ambientais, aumento do número de viagens e circulação de pessoas, comércio de animais, entre outros têm sido discutidos como influências importantes no comportamento das doenças virais, como sua emergência, distribuição e evolução [227].

Estudos realizados no nosso laboratório, iniciados durante o mestrado, forneceram pistas sorológicas e moleculares sobre a circulação de hepadnavírus em rebanhos de suínos domésticos brasileiros. Esses achados renderam indícios de que era necessário investir esforços direcionados a essa população de estudo a fim de revelar molecularmente o provável hepadnavírus presente, investigar sua frequência em animais provenientes de matadouros, bem como comprovar a presença antigênica *in situ*. Além disso, encorajou a investigação para uma nova amostragem, incluindo os suínos selvagens, bem como novas espécies, criadas confinadas ou de vida livre, as quais não foram descritas como prováveis hospedeiras do vírus em questão.

Tendo em vista a importante capacidade adaptativa do HBV de infectar novas espécies, aliada ao seu potencial também demonstrado de se submeter a recombinações genéticas, o presente estudo é de extrema relevância por apresentar de forma pioneira

evidências de circulação de hepadnavírus em populações de mamíferos domésticos e selvagens oriundos do Brasil e Uruguai.

A descoberta de um vírus relacionado à hepatite B em novos mamíferos amplia as possibilidades de estudo *in vivo* caso seja confirmada a infecção natural nessas populações. Isso porque os estudos sobre os mecanismos de replicação viral, patogenia, e novas drogas antivirais estão restritos, atualmente, a um único modelo experimental, o qual utiliza chimpanzés. Dessa forma, portanto, novos estudos poderiam ser adequados à espécies mais acessíveis.

Além disso, o eventual sequenciamento nucleotídico do genoma dos vírus encontrados nesses animais poderia contribuir para análises filogenéticas mais robustas, incluindo *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus* já descritos, a fim de avaliarmos o ancestral comum entre as diferentes cepas pertencentes à família *Hepadnaviridae*. Esses achados seriam de grande relevância, já que a fonte da infecção viral para muitos desses animais permanece uma incógnita, tanto quanto a definição de quem são os doadores e os receptores de *Hepadnavirus* dentre os homens e outras espécies animais [228].

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

- Avaliar a circulação de hepadnavírus em animais domésticos e selvagens;

4.2. Objetivos Específicos

Artigo 1

- Investigar a infecção por hepadnavírus em suínos domésticos de rebanhos brasileiros através de testagem sorológica;
- Evidenciar molecularmente a presença de DNA do hepadnavírus, estabelecendo seu relacionamento genético com os hepadnavírus conhecidos.

Artigo 2

- Avaliar a frequência de DNA de hepadnavírus em suínos de abatedouros comerciais;
- Caracterizar molecularmente os hepadnavírus circulantes em suínos de abatedouros do Brasil;
- Determinar a distância genética e realizar a inferência filogenética dos DNAs de hepadnavírus encontrados frente aos diferentes hepadnavírus conhecidos.

Artigo 3

- Investigar a circulação de hepadnavírus em diferentes animais domésticos, de importância econômica, e selvagens e/ou exóticos, em localidades do Brasil e Uruguai, através de métodos sorológicos e moleculares;
- Avaliar a circulação de hepadnavírus em animais domésticos e selvagens;
- Detectar, quantificar e caracterizar molecularmente os DNAs de hepadnavírus encontrados;
- Estabelecer as relações filogenéticas entre os DNAs dos hepadnavírus determinados no estudo e os previamente conhecidos.

5. Metodologias e Resultados

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados sob a forma de manuscritos publicados ou submetidos à publicação em revistas científicas indexadas, e serão listados a seguir na ordem em que as publicações serão discutidas.

5.1 Artigo 1 [229]: Vieira YR, FM Silva M, Santos DR, Vieira AA, Ciacci-Zanella JR, Barquero G, Do Lago B V, Gomes SA, Pinto MA, De Paula VS. Serological and molecular evidence of hepadnavirus infection in swine. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22(221):11–6.

5.2 Artigo 2 [230]: Vieira YR, dos Santos DRL, Portilho MM, Velloso CEP, Arissawa M, Villar LM, Pinto MA, de Paula VS. Hepadnavirus detected in bile and liver samples from domestic pigs of commercial abattoirs. *BMC Microbiol.* 2014;14(1):1–6.

5.3 Artigo 3: Vieira YR, Portilho MM, Oliveira FF, dos Santos DRL, Villar LM, Mirazo S, Arbiza J, Dimache LAG, Almeida FQ, Brandão ML, Cordeiro JLP, Rocha FL, Azevedo FC, Lemos FG, Campos JBV, Macedo GC, Herrera HM, Peres IAHFS, Zimmermann NP, Piovezan U, Pellegrin AO, de Paula VS, Pinto MA. Evaluation of Hepadnavirus circulation in South American domestic and wild mammals. *Viruses.* 2016. *Submetido*

5.1 Artigo 1:

Vieira YR, FM Silva M, Santos DR, Vieira AA, Ciacci-Zanella JR, Barquero G, Do Lago B V, Gomes SA, Pinto MA, De Paula VS. Serological and molecular evidence of hepadnavirus infection in swine. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22(221):11–6

Serological and molecular evidence of hepadnavirus infection in swine

Yasmine R Vieira¹, Marcelle FM Silva², Débora RL Santos³, Antônio A Vieira⁴,
Janice R Ciacci-Zanella⁵, Gonzalo Barquero⁶, Bárbara V do Lago⁷, Selma A Gomes⁷,
Marcelo A Pinto¹, Vanessa S de Paula¹

¹ Laboratory of Development Technological in Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, RJ, Brazil

² Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, RJ, Brazil

³ Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Federal Rural University of Rio De Janeiro, UFRRJ, RJ, Brazil

⁴ Department of Animal Production, Institute of Animal Science, Federal Rural University of Rio De Janeiro, UFRRJ, RJ, Brazil

⁵ Brazilian National Research Center, EMBRAPA Swine and Poultry, SC, Brazil

⁶ Tropical Sustainability Institute, TSI, SP, Brazil

⁷ Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, RJ, Brazil

Vieira YR, Silva MFM, Santos DRL, Vieira AA, Ciacci-Zanella JR, Barquero G, do Lago BV, Gomes SA, Pinto MA, de Paula VS. Serological and molecular evidence of hepadnavirus infection in swine. *Ann Agric Environ Med.* 2015; 22(1): 11–16. doi: 10.5604/12321966.1141361

Abstract

Introduction and objective. Recently, investigations in a swine herd identified evidence of the existence of a novel member of the Hepadnavirus family endemic in swine. The aim of this study was to investigate the serological and molecular markers of Hepadnavirus circulation in Brazilian domestic swine and wild boar herds, and to evaluate the identity with HBV and other Hepadnaviruses reported previously.

Materials and methods. For the study, 376 swine were screened for hepatitis B virus serological markers. Analyses were performed in serum samples using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (DiaSorin®) for anti-HBc, HBsAg and anti-HBs. Reactive and undetermined swine serum samples were selected to perform DNA viral extraction (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen®), partial genome amplification and genome sequencing.

Results. From 376 swine samples analysed, 28 (7.45%) were reactive to anti-HBc, 3 (0.80%) to HBsAg and 6 (1.6%) to anti-HBs. Besides, more 17 (4.52%) swine samples analyzed were classified in the grey zone of the EIA test to anti-HBc and 2 (0.53%) to HBsAg. From 49 samples molecularly analyzed after serological trial, 4 samples showed a positive result for the qualitative PCR for Hepadnavirus. Phylogenetic reconstruction using partial genome sequencing (360 bp) of 3 samples showed similarity with HBV with 90.8–96.3% of identity.

Conclusions. Serological and molecular data showed evidence of the circulation of a virus similar to hepatitis B virus in swine.

Key words

diagnostic, hepadnavirus, swine

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection constitutes a major public health problem globally. It is estimated that more than two billion people have been infected, and of these over 400 million people are chronically infected by this widespread pathogen [1]. Despite the availability of an effective vaccine, about one million people die each year due to HBV infection [2].

In most adults, HBV infections resolve spontaneously and a lifelong protective immunity response is maintained. However, most neonates and infants become chronically infected, with a high risk of developing life-threatening complications, such as chronic liver injuries, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [3].

The main routes of HBV transmission are sexual, perinatal and percutaneous [4]. In endemic areas, like Asia countries, sub-Saharan Africa and amongst indigenous peoples in Central and South America, mother-to-child and horizontal transmissions constitute the predominant means of transmission [5]. In areas of low prevalence, the practice of drug injection and risky sexual behaviour represent the most frequent routes of infection [4].

Although HBV has not been described as a biological agent of zoonotic risk for farm workers [6], a possible occupational exposure as a form of infection should be considered since recently HBV and hepatitis E virus (HEV) have been included as work-related pathogens for slaughterhouse workers [7].

An HBV particle is 42 nm in diameter, enveloped, and presents a partially double-stranded circular DNA genome of about 3.2 Kb, with an intermediate RNA during replication. It belongs to the Hepadnaviridae family which is divided in 2 genera, Orthohepadnavirus and Avihepadnavirus, from mammals and birds, respectively [1, 8].

The Orthohepadnavirus genus includes HBV that naturally infects humans and some non-human primates, including chimpanzees, gibbons, gorillas, orangutans; WMHBV which infects woolly monkeys; and similar viruses which infect rodents, such as WHV (woodchuck) and GSHV/ASHV (squirrels). Avihepadnavirus genus includes viruses that have been reported infecting ducks (DHBV), geese (GHBV), herons (HHBV), and storks (STHBV) [9].

Like most Hepadnavirus, HBV displays a narrow host range where it is possible to maintain the viral life cycle. The majority of these potential host species are not commonly used in medical research due to difficulty of availability, management in captivity and high cost maintenance [10]. Although host-specific, it is suspected that HBV ability of crossing specific barriers could hinder attempts to eradicate

Address for correspondence: Yasmine R Vieira, Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira - 2º andar - sala B220, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil, nº 4365, Manguinhos - RJ, Rio de Janeiro, Cep: 21045-900, RJ, Brasil
E-mail: yasmirangel@ig.com.br

Received: 18 June 2013; Accepted: 05 September 2013

the human infection by immunization [11]. Furthermore, environmental circumstances, increase in travel, trade of animals and others factors, have been discussed as important influences in viral diseases behaviour, such as its emergence, distribution and evolution [12].

OBJECTIVES

Recently, researchers found evidence of the circulation of a new member of the Hepadnaviridae family endemic in swine [13] and in chickens [14] from China. However, it was not possible to determine whether the infection is actually caused by the same virus that causes infection in humans, or by a virus similar to HBV. The presented study aims to investigate evidence of Hepadnavirus circulation in Brazilian swine and to estimate the similarity with HBV and other Hepadnaviruses reported previously.

MATERIALS AND METHOD

Ethic Committee and Study Group. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, registered under license LW-49/11. 376 swine *Sus scrofa* from nursery to slaughter age (4–25 weeks) of both genders were investigated for serological markers of HBV. The study population was divided into groups A and B, corresponding to 288 domestic pigs from commercial herds and 88 wild boars, respectively.

Sample Collection. 5 mL of venous blood were collected from the marginal ear/cephalic vein with a 10 mL syringe and 18G needle, and transferred into vacuum tubes containing gel separator and clot activator (BD Vacutainer® SST II Advance). The tubes were kept refrigerated (4°C) until processing. After 10–15 minutes of clot retraction, samples were centrifuged at 3,500 rpm for 5 minutes at room temperature (20–22°C). Sera were separated and stored in aliquots at -20°C and -80°C until further analysis.

Evaluation of HBV serological markers. Serum samples were screened using commercial ELISA kits (DiaSorin®) for HBV serological markers (HBsAg, anti-HBc and anti-HBs). Interpretation of results was determined by the absorbance value (OD) at 450 nm of specimens to cut-off value, according to the manufacturer's recommendations. Samples in grey zone of the test (± 10 –20% of cut-off value) were classified as undetermined samples.

Molecular Tests. Three sets of primers were used: 2 sets for human HBV diagnosis (semi-nested PCR) and 1 set designed for this study. For the latter set, the optimum annealing temperature and limit of detection were established prior to testing the swine samples.

Orthohepadnavirus sequence alignment. In order to ensure amplification of Hepadnavirus-DNA in samples from animals not previously described in the literature, interspecific primers were designed for the most conserved genome region, equivalent to the S region of HBsAg from HBV. For this purpose, 110 public complete nucleotide sequences of Orthohepadnavirus available in GenBank were aligned using

the BioEdit 7.1.3 – ClustalW Alignment Multiple programme. This alignment included sequences of viruses similar to HBV that infect chimpanzees, orangutans, gibbons, woolly monkeys, woodchucks, squirrels and human HBV genotypes circulating in Brazil (HBV-A, D and F). Evaluation of the pair of mammalian primers (MF and MR) was performed with software OligoAnalyzer 3.1 for a region of 429 bp (Tab. 1).

Table 1. Primers used for partial genome amplification^(A), viral load quantification^(B) and partial genome sequencing^(C)

Primers ^(A, R, O)	Sequence (5' → 3')	Location*	Length	GC%	Tm (°C)	Amplicon
Mammals F (MF) ^(A, O)	GAY TSG TGG TGG ACT TCT CTC	nt 251-271	21	54.8	55.9	MF-MR 429 bp
Mammals R (MR) ^(A, O)	TAA AYT GAG CCA DGA GAA ACG G	nt 679-658	22	44.7	54.8	
PS1 F ^(A, O)	CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA	nt 2820- 2839	20	40.0	49.6	PS1-S2 1.200 bp
S2 R ^(A, O)	GGG TTT AAA TGT ATA CCC AAA GA	nt 839-817	23	34.8	50.6	
SR R ^(A, O)	CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC	nt 704-685	20	50.0	54.7	PS1-SR 1.100 bp
S10 F ^(O)	GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TC	nt 256-278	23	43.5	53.8	
S3 R ^(O)	CCT TGA GCA GGA GTC GTG CAG GT	nt 543-521	23	60.9	63.3	
PS2 R ^(O)	GGT CCC CAG TCC TCG AGA AG	nt 143-124	20	65.0	59.2	
S14 F ^(B)	GGA CCC CTG CTC GTG TTA CA	nt 182-201	20	60.0	59.4	S14-S17 90 bp
S17 R ^(B)	GAG AGA AGT CCA CCM CGA GTC TAG A	nt 271-247	25	54.0	59.8	
Probe ^(B)	TGT TGA CAA RAA TCC TCA CAA TAC CRC AGA	nt 216-245	30	40.0	59.9	

*Nucleotides (nt) are numbered according to the HBV reference sequence available in GenBank (NC_003977.1)

PCR optimization. After establishing the pair of primers that anneal in Hepadnavirus from different animal species, its optimum annealing temperature was determined. Amplification assays were performed with a gradient of temperature ranging from 50°C – 60°C for HBV positive control samples. Furthermore, to confirm if the primers could amplify different HBV human genotypes, plasmids containing inserts of clones related to HBV genotypes A, D, E, F and G were subjected to amplification under the following conditions established in this study: 25 µL reaction volume consisting of 1 µL DNA, 0.2 mM dNTP, Buffer PCR 1X, 3 mM MgCl₂, 10 pmol primer MF-MR, 0.5 U Taq polymerase (Invitrogen®) and H₂O RNase free. The cycling conditions were initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 54°C for 40 s and extension at 72°C for 2 min, and lastly, extension at 72°C for 7 min.

Finally, to verify the detection limit, 2 positive controls were used, the first with 1.89×10^{10} copies/mL and the other with 9.7×10^4 copies/mL. Tenfold serial dilutions (1–10) from both controls were amplified and the result compared to that obtained using semi-nested PCR primers for human HBV diagnosis, according to the conditions established by the Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ [15, 16].

Detection of Hepadnavirus-DNA in swine. After serological trial and PCR optimization, reactive and undetermined swine samples for HBV markers were submitted to DNA Purification Kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen®), according to manufacturer's recommendations. The extracted DNA was eluted in 50 mL of AE Buffer and stored at -80°C until amplification assays.

The samples were amplified by 2 protocols. Initially, for human HBV diagnosis with primers PS1-S2 and PS1-SR (Tab. 1) to amplification of 1,100 bp of region from HBV surface (pré-S/S region of HBsAg). The conditions of PCR1 and PCR2 were the same as described in the literature. Then, for interspecific diagnosis, with primers MF-MR to amplification of 429 bp of the region corresponding to the S region of HBsAg according to conditions established in the presented study. Amplicons were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide ($0.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$) and observed under UV Light.

Sequencing reactions. PCR products with expected size were purified using reagents and protocols of QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen®) and sequenced using reagents and protocols of Kit Big Dye® Terminator 3.1 at sequencing platform of Oswaldo Cruz Institute and Ludwig Biotechnology Company. Samples were sequenced using primers previously used in PCR reactions and more three options of internal primers, like PS2R, S3 e S10 (Tab. 1).

Phylogenetic analysis. Phylogenetic trees were constructed with positive samples (360 bp) and sequences from GenBank by the neighbour-joining method (1,000 Bootstrap replications) and the Kimura 2-parameter model using software MEGA 5 Beta #6.1. With the same software, a nucleotide identity matrix was constructed using consensus nucleotide sequences for each Orthohepadnavirus used for the design of interspecific primers.

RESULTS

Serology. From 376 swine samples analyzed, 3 (0.8%) were reactive for HBsAg, indicating active infection, 28 (7.45%) were reactive for anti-HBc, indicating previous exposure to the virus, and 6 (1.60%) showed reactivity for anti-HBs,

indicating resolution of the infection or immunity. In addition, it was observed 17 more (4.52%) swine samples analyzed were characterized as undetermined to anti-HBc and 2 (0.53%) to HBsAg (Tab. 2).

Figure 1 shows the reactivity of the samples for the markers analyzed, observing ratios between absorbance values (OD)/cut-off. For the direct assay of HBsAg screening (Fig. 1a), ratio OD/cut-off from HBsAg reactive samples ranged from 1.11–3.95. For the competitive assay of anti-HBc screening (Fig. 1b), the ratio from anti-HBc reactive samples ranged from 0.14–0.90. Finally, for the direct assay of anti-HBs screening (Fig. 1c), the ratio from anti-HBs reactive samples ranged from 1.71–15.96. According to the manufacturer, analytical sensitivity is $< 0.03\ \text{PEI U}/\text{mL}$ (HBsAg), $< 0.5\ \text{PEI U}/\text{mL}$ (anti-HBc) and $< 10\ \text{UI}/\text{L}$ (anti-HBs).

Molecular diagnosis. All swine samples classified as reactive or undetermined in serological assay were tested to molecular diagnosis to investigate the presence of Hepadnavirus-DNA. From a total of 49 samples selected after serological trial, only 2 samples (SW216, JV45) were positive in semi-nested PCR commonly used to human HBV diagnosis, with primers PS1-S2 and PS1-SR (1,100 pb). In interspecific PCR, using primers MF-MR (429 pb), 4 samples were positive by PCR (SW216, JV45, SW170, SW203) (Tab. 3).

Phylogenetic analysis. Among the 4 samples positive in qualitative PCR, the presence of a virus similar to HBV was confirmed in 3 of them (SW216, SW170, SW203) by partial genome sequencing. The PCR products from these samples were sequenced 4 times using a different set of primers. Once the nucleotide mutations were reproducible in each sample, there were no similarities between the samples sequenced, and no sample was identical to positive control, the possibility of contamination was therefore discounted. The sequences of samples positives were deposited in GenBank (Access Nos. JX439919 [SW216], JX439920 [SW170] and JX439921 [SW203]). Since sample JV45 showed a weak band PCR product and low viral load, it was not possible to confirm the HBV detection by sequencing.

Analyzing the nucleotide identity matrix, the similarity between swine nucleotide sequences ranged from 90.8–96.3% compared to human HBV consensus sequence, from 84.1–90.8% with non-human primates consensus sequence, and

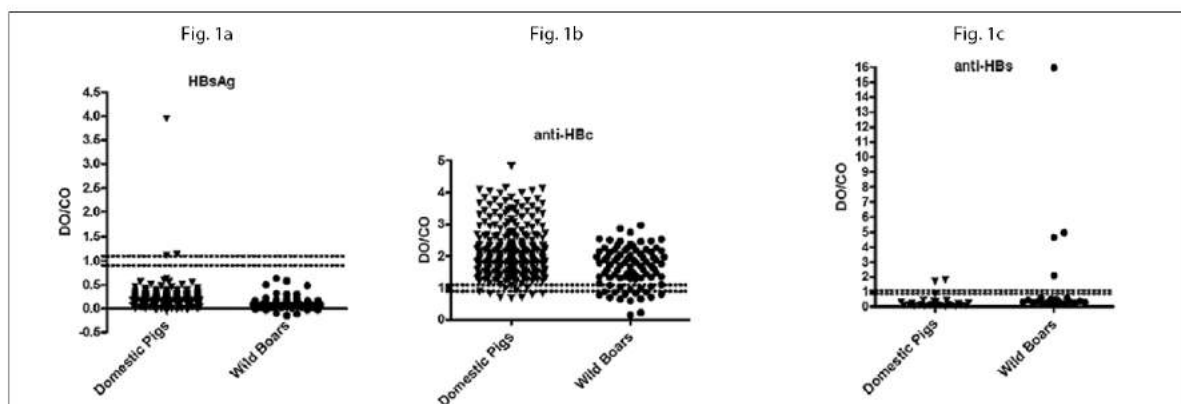


Figure 1 (a, b, c). Degree of reactivity of swine samples to HBV markers analyzed. Between dot lines, the grey zone, corresponding to the interval between ± 10 –20% of cut-off value, for which samples are classified as indeterminate. As the assay for anti-HBc is competitive (Fig. 1b), the reagent samples are below the grey zone. For direct assays for HBsAg (Fig. 1a) and anti-HBs (Fig. 1c), reagent samples are above grey zone

Table 2. Prevalence of HBV serological markers in swine from Brazil

Group	Herd	N	HBsAg, n (%)		Anti-HBc, n (%)		Anti-HBs, n (%)	
			+	IND	+	IND	+	IND
A – Domestic Pigs	Rio de Janeiro	38	0	---	0	---	0	---
	Santa Catarina	250	3 (1.2)	2 (0.8)	11 (4.4)	13 (5.2)	2 (0.8)	---
B – Wild Boars	São Paulo	88	0	---	17 (19.3)	4 (4.5)	4 (4.5)	---
Total		376	3 (0.80)	2 (0.53)	28 (7.45)	17 (4.52)	6 (1.60)	---

IND – Samples in gray zone of EIA (± 10-20% of cut-off value)

from 70.7–72.4% with rodents consensus sequence (Tab. 4). The phylogenetic tree (360 bp) shows that swine sequences are closely related to human sequences, followed by non-human primates and rodents (Fig. 2). When analyzed with human HBV strains, 2 swine sequences were close to human samples belonging to genotype A (SW216, SW203) and 1 to genotype G (SW170).

DISCUSSION

Initial steps of HBV infection related to attachment of viral particles to hepatocytes have a critical role in the specificity of host species [17]. Although previous studies indicate that HBV infection is host-specific [9], the literature reports its circulation in humans and some apes [18]. Recently, infection by a virus similar to HBV was described in pigs from China by ELISA, immunohistochemical staining, and transmission electron microscopy (TEM) [13], but was not molecularly confirmed. In this scenario, the aim of the presented study was to investigate the Hepadnavirus infection in swine from Brazilian herds, and to evaluate the identity with HBV and other Hepadnaviruses reported previously.

Table 3. Results of serological and molecular tests from swine positive to hepatitis B

ID Animal	Result			Molecular Qualitative PCR
	Serological		Anti-HBs	
	Anti-HBc	HBsAg	Anti-HBs	
SW 216	+	+	-	1.100 bp and 429 bp
JV 45	+	-	+	1.100 bp and 429 bp
SW 170	UND	-	-	429 bp
SW 203	UND	-	-	429 bp

UND – Undetermined – Samples in gray zone of EIA (20% of cut-off value)

According to Centers for Disease Control and Prevention (CDC), different serological markers or combinations of markers are used to identify HBV acute or chronic infection in human samples. HBsAg marker is the earliest sign of HBV infection, useful for identifying active infection. Anti-HBc marker is useful for epidemiological studies, and indicates present contact or previous exposure to the virus. In the case of the window period and occult HBV infection, since HBsAg levels are undetectable and the viral load is low, molecular diagnosis has been described as a useful tool for the detection of infection, in addition serological trial [19]. For

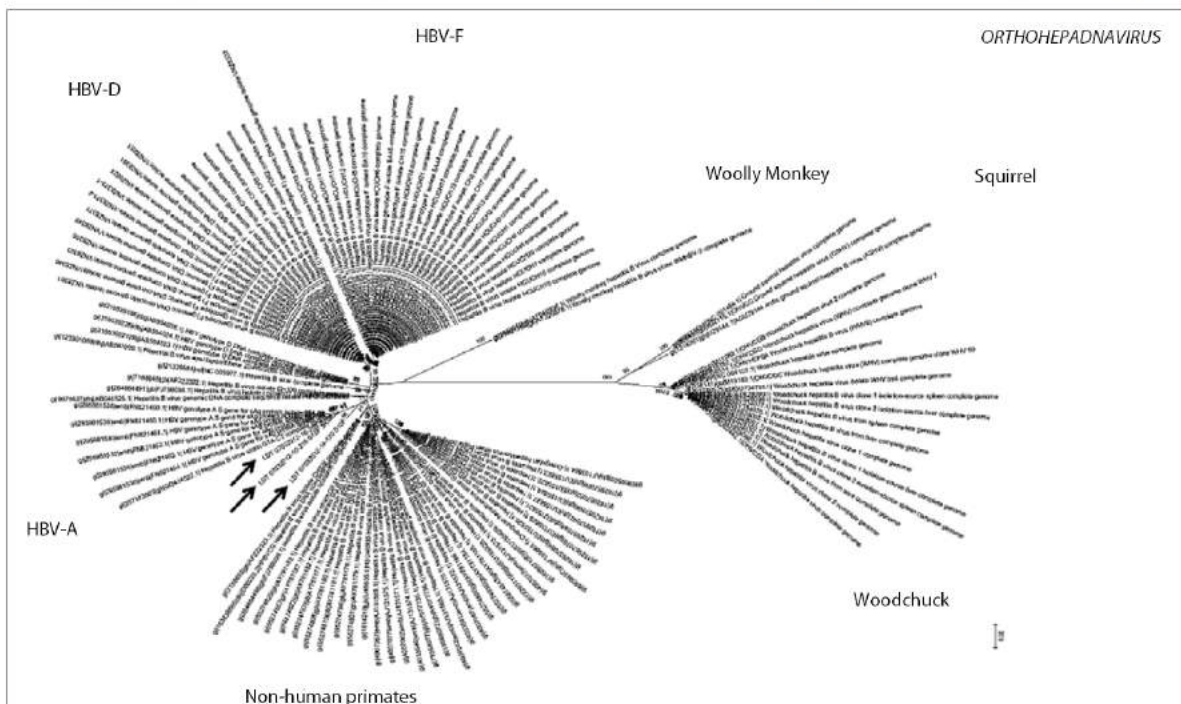


Figure 2. Phylogenetic analysis of *Orthohepadnaviruses* based on partial genome sequences. Number at nodes indicate the percentage of bootstrap replications (1000 sets) supporting the clusters. Identified groups of mammals related to *Orthohepadnaviruses*: human (HBV), non-human primates (HBV), rodents (WHV and GSHWASHV) and woolly monkey (WMHBV). Sequences from swine are pointed out with arrows

this reason, serological and molecular tests were performed in swine samples.

Serological screening by anti-HBc revealed that 7.45% among swine were exposed to the virus. If the samples classified as undetermined by EIA were considered, the prevalence could increase by more than 4.52%. Using the HBsAg test, only 0.8% of samples were positive and 0.53% were undetermined. According to the literature, reactive anti-HBc associated with non-reactive HBsAg could indicate that there is an ongoing lifelong HBV infection hidden from the immune system, with consequent low levels of HBV quantification in the circulation, reflecting a non-reactive HBsAg result [19]. Concerning anti-HBs evaluation, 1.60% of swine were seroreactive; however, depending on the period of infection, the neutralizing antibody titer is not detectable, as occurs in the case of the window period [19].

Initial serological data demonstrate that Brazilian pigs were previously exposed to a virus similar to HBV, as observed in herds from China where 63.9% of swine analyzed showed anti-HBc reactivity [13]. Given the similar rates of infection between humans and animals in the same region, researchers discuss whether pigs may also contribute as reservoirs for the maintenance of virus circulation, as occurs with non-human primates from endemic areas [9, 20].

The samples analyzed in the presented study originate from the southern and southeastern regions of Brazil, where the prevalence of human acute HBV infection ranges 0.3–0.5%. Although characterized as low endemicity areas, these regions concentrate 68.2% of notifications in this period [21].

In order to confirm the possibility of infection, viral genomic detection was performed in all reagent or undetermined samples to ELISA tests. From the total of 49 samples tested by PCR, 2 samples exhibited expected products of 1,100 bp using primers to human HBV diagnosis. Comparing genomic detection with serology (Tab. 3), 1 sample was characterized as positive for anti-HBc and HBsAg (SW216), indicating hepatitis B infection; and another sample (JW45) was reagent to anti-HBc and anti-HBs, showing immunity for hepatitis B, a past infection.

Using interspecific primers, 2 additional samples (SW170, SW203) exhibited expected products of 429 bp. Both samples were characterized as undetermined in EIA test for anti-HBc marker. The presence of anti-HBc indicates previous or ongoing HBV infection in an undefined time frame.

In 3 of the samples (SW216, SW170, SW203) it was possible

to confirm the presence of Hepadnavirus-DNA by sequencing of 360 bp. Although the sample JW45 had been amplified by both strategies, in this case sequencing was not possible due to the low concentration of DNA detected. The PCR results and serological marks found in this swine suggest that this animal was at the end of infection.

Phylogenetic reconstruction indicated that Hepadnavirus sequences obtained from pigs in this study are closely related to human HBV sequences. Nucleotide identity matrix confirmed a higher similarity of Hepadnavirus from pigs with human HBV (90.8–96.3%), than Hepadnavirus from non-human primates (84.1–90.8%) and rodents (70.7–72.4%). However, it is noteworthy that the sequencing product corresponds to a region of high conservation on the Orthohepadnavirus genus, and its length was equivalent to about 11.2% of the HBV genome.

Curiously, when a phylogenetic tree was constructed to compare the Brazilian swine sequences to human HBV strains previously genotyped, the samples were related to 2 different genotypes groups. Two of them were close to the samples from genotype A, the most prevalent genotype in Brazil [22]. Another was similar to samples that belong to genotype G, which is common in countries like USA, Mexico and France, and described in cases of coinfections with other genotypes, mainly genotype A [23]. However, the size of the fragment amplified in this study is not useful for genotyping HBV. The complete sequencing of pre-S/S region, rather than only the S region, could provide more accurate information and allow hypotheses about the evolutionary origin. The amplification of the complete genome or the gene encoding the surface antigen is required for classification of HBV in genotypes [24].

The presented study shows for the first time molecular evidence of a virus similar to HBV circulating in swine from commercial herds, detected by qualitative PCR and confirmed by partial sequencing of the virus genome. Similarity to human HBV was confirmed by phylogenetic analysis and by cross-reactivity in non-host specific commercial serological assays.

Further studies are needed to reveal if Hepadnavirus detection in swine may represent a potential risk for human health. Although the transmission route is unclear, domestication could favour a mutual share of Hepadnavirus between humans and animals. This hypothesis is supported by HBV ability to cross specific barriers [11] and to alter its pathogenicity and transmission through errors in the replicative cycle and interspecific recombination [13]. These

Table 4. Nucleotide Identity Matrix

Sequence	216 (S10F)	170 (S10F)	203 (S10F)	HBV-A	HBV-D	HBV-F	Chimpanze	Orangutan	Gibbon	Woolly Monkey	Woodchuck	Squirrel
216 (S10F)												
170 (S10F)	0.949											
203 (S10F)	0.988	0.955										
Consensus HBV-A	0.958	0.93	0.963									
Consensus HBV-D	0.919	0.93	0.924	0.913								
Consensus HBV-F	0.908	0.916	0.913	0.905	0.933							
Consensus Chimpanze	0.891	0.896	0.896	0.908	0.91	0.905						
Consensus Orangutan	0.899	0.894	0.908	0.899	0.908	0.883	0.888					
Consensus Gibbon	0.863	0.869	0.869	0.888	0.871	0.866	0.908	0.88				
Consensus Woolly Monkey	0.841	0.841	0.846	0.835	0.849	0.835	0.824	0.827	0.813			
Consensus Woodchuck	0.71	0.724	0.715	0.715	0.727	0.721	0.699	0.696	0.688	0.701		
Consensus Squirrel	0.707	0.715	0.71	0.713	0.713	0.721	0.707	0.707	0.696	0.671	0.858	

events have been described among HBV strains from human and non-human primates, and between hepadnavirus strains from birds of different subfamilies [9]. Therefore, the closer contact of humans and swine compared to other animals of naturally occurring HBV could favour these episodes.

The ability to cross the barrier of different species is widely known for the Influenza virus, Hantavirus, Bluetongue and West Nile fever [6, 12]. Focusing on Influenza A virus, researchers discuss the competence of this virus circulating in mammalian hosts to rapidly evolve due to mutations during replication and reassortment with animal viruses. Concerning the role of swine in the zoonotic circulation, they could act as reservoirs for mammals adaptation of the avian viruses, either by reassortment with human or swine viruses, or through adaptive changes [22]. However, the emergence of strains among the human population requires that the novel strain should be able to replicate and efficiently to transmit between humans to deserve attention and monitoring.

Hepatitis E virus (HEV), another classic hepatotropic virus, has proved to be common in Brazilian swine herds [26, 27]. National studies indicate a probable zoonotic transmission of swine strains in urban areas from the southeastern region from Brazil, in sporadic human cases of acute hepatitis [28].

Pig farming is of economic importance to the Brazilian food industry. However, the swine health checks by official inspectors are limited to reviews of visible lesions present in animal herds, and post-mortem gross macroscopic examinations in slaughterhouses. Perhaps preventive sanitary efforts should be applied in mammal hosts such as domestic swine.

The confirmation that swine are also natural hosts of Hepadnavirus may contribute to disclosure of the mechanisms of replication, pathogenesis, and new antiviral drugs in a new experimental animal model for the study of HBV, which is currently restricted to chimpanzees. Due to anatomical and physiological similarities with humans, the species *Sus scrofa* presents a significant role as an experimental animal for biomedical investigation.

CONCLUSIONS

Serological and molecular data indicate evidence for the circulation of a virus similar to HBV in Brazilian swine. However, these data do not elucidate whether we are facing a new swine virus or a human virus circulating in swine. Further studies are needed to determinate the likely infectivity of this agent, as well as evaluating possible epidemiological risks. Due to this, the presented study brings new perspectives for zoonotic risk evaluation, infectivity studies in non-human primates and HBV studies in the swine host, since in addition to its abundant supply, these animals are already widely used in medical research.

Acknowledgements

The authors express their thanks to Marcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza for donating the positive controls.

REFERENCES

- Grimm D, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol Int*. 2011; 5(2): 644–653.
- Xie YH, Hong R, Liu W, Liu J, Zhai JW. Development of novel therapeutics for chronic hepatitis B. *Virology*. 2010; 25(4): 294–300.
- Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(25): 3099–3105.
- Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. 2008; 359(14): 1486–1500.
- Andre F. Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa. *Vaccine* 2000; 18(Suppl 1): 20–22.
- Dutkiewicz J, Cisak E, Sroka J, Wojcik-Fatla A, Zajac V. Biological agents as occupational hazards – selected issues. *Ann Agric Environ Med*. 2011; 18(2): 286–293.
- Haagsma JA, Tariq L, Heederik DJ, Havelaar AH. Infectious disease risks associated with occupational exposure: a systematic review of the literature. *Occup Environ Med*. 2012; 69(2): 140–146.
- Patient R, Hourieux C, Roingeard P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol*. 2009; 11(11): 1561–1570.
- Yang J, Xi Q, Deng R, Wang J, Hou J, Wang X. Identification of inter-species recombination among hepadnaviruses infecting cross-species hosts. *J Med Virol*. 2007; 79(11): 1741–1750.
- Dandri M, Volz TK, Lutgehetmann M, Petersen J. Animal models for the study of HBV replication and its variants. *J Clin Virol*. 2005; 34(Suppl 1): 54–62.
- Makuwa M, Souquiere S, Clifford SL, Mouinga-Ondeme A, Bawe-Johnson M, Wickings EJ, et al. Identification of hepatitis B virus genome in faecal sample from wild living chimpanzee (*Pan troglodytes troglodytes*) in Gabon. *J Clin Virol*. 2005; 34(Suppl 1): 83–88.
- Jimenez-Clavero MA. Animal viral diseases and global change: bluetongue and West Nile fever as paradigms. *Front Genet*. 2012; 3: 105.
- Li W, She R, Liu L, You H, Yin J. Prevalence of a virus similar to human hepatitis B virus in swine. *Virology*. 2010; 7: 60.
- Tian J, Xia K, She R, Li W, Ding Y, Wang J, et al. Detection of Hepatitis B Virus in Serum and Liver of Chickens. *Virology*. 2012; 9(1): 2.
- Motta-Castro AR, Martins RM, Yoshida CF, Teles SA, Paniago AM, Lima KM, et al. Hepatitis B virus infection in isolated Afro-Brazilian communities. *J Med Virol*. 2005; 77(2): 188–193.
- Niel C, Moraes MT, Gaspar AM, Yoshida CF, Gomes SA. Genetic diversity of hepatitis B virus strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol*. 1994; 44(2): 180–186.
- Chouteau P, Le Seyec J, Cannie I, Nassal M, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J Virol*. 2001; 75(23): 11565–11572.
- Grethe S, Heckel JO, Rietschel W, Hufert FT. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol*. 2000; 74(11): 5377–5381.
- Allain JP, Cox L. Challenges in hepatitis B detection among blood donors. *Curr Opin Hematol*. 2011; 18(6): 461–466.
- Starkman SE, MacDonald DM, Lewis JC, Holmes EC, Simmonds P. Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology*. 2003; 314(1): 381–393.
- Health Ministry, Brazil. www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros (access: 2012.07.16)
- Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA. Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2010; 47(1): 13–17.
- Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Vieira DS, Pinho JR, Carrilho FJ, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. *Virology*. 2010; 7: 315.
- Norder H, Courouche AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*. 1994; 198(2): 489–503.
- Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(8): 591–600.
- dos Santos DR, Vitral CL, de Paula VS, Marchevsky RS, Lopes JF, Gaspar AM, et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J*. 2009; 182(3): 474–480.
- Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AM. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(2): 117–122.
- Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol*. 2010; 47(3): 276–279.

5.2 Artigo 2:

Vieira YR, dos Santos DRL, Portilho MM, Velloso CEP, Arissawa M, Villar LM, Pinto MA, de Paula VS. Hepadnavirus detected in bile and liver samples from domestic pigs of commercial abattoirs. *BMC Microbiol.* 2014;14(1):1–6.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Hepadnavirus detected in bile and liver samples from domestic pigs of commercial abattoirs

Yasmine Rangel Vieira^{1*}, Debora Regina Lopes dos Santos², Moyra Machado Portilho³, Carlos Eduardo Pereira Velloso¹, Marcia Arissawa⁴, Livia Melo Villar³, Marcelo Alves Pinto¹ and Vanessa Saete de Paula¹

Abstract

Background: Preliminary studies showed the prevalence of a virus similar to human hepatitis B virus (HBV-like) in swine from farms in China and the molecular evidence of Hepadnavirus infection in domestic pigs herds in Brazil. In this study, we genetically characterize the swine Hepadnavirus strains in swine from slaughterhouses located in certified abattoirs from Rio de Janeiro State, Brazil and evaluate its hepatotropic potential.

Results: Bile and liver samples from swine were positive for partial genome amplification (ORF S and ORF C), direct sequencing and viral load quantification. Sequencing of the gene encoding the surface antigen allowed classification of Hepadnavirus into genotypes, similar to HBV genotype classification. Indirect immunofluorescence confirmed the presence of HBsAg antigen in liver tissue sections.

Conclusions: So far our data suggest that commercial swine house an HBV-like virus and this relevant finding should be considered in studies on the origin and viral evolution.

Keywords: Hepadnavirus, Brazil, Commercial swine, Bile, Liver, Genotyping, Immunofluorescence

Background

Hepatitis B virus (HBV) is a dual polarity and partially double-stranded enveloped DNA virus of *Hepadnaviridae* family [1]. The agent can be transmitted by sexual, perinatal and percutaneous means [2], and is considered a major cause of acute and chronic liver disease, that may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [3]. Beyond the prototype member that infects humans and non-human primates (chimpanzees, gibbons, gorillas, orangutans and woolly monkeys), *Hepadnaviridae* family also houses HBV-related viruses circulating in mammalian hosts, like woodchuck (WHV) and squirrels (GSHV/ASHV), and avian hosts, like ducks (DHBV), geese (GHBV), herons (HHBV), and storks (STHBV) [4].

A virus similar to HBV has been diagnosed by serology (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc) in swine herds [5] and chickens flocks [6] from China, and in domestic pig herds in Brazil [7]. Moreover, positive molecular diagnosis was demonstrated for the first time in swine from Brazil [7]

and in chickens flocks from China [6]. Similarity with human HBV (90.8-96.3%) was confirmed for swine strains by phylogenetic analysis and by cross reactivity in non-host specific commercial serological assays. However, the partial nucleotide sequencing (360 bp) was equivalent to about 11.2% of full-length HBV genome. And even for chickens, despite the high percentage of similarity with HBV (92.2-97.9%), the short length of amplified product in both cases limits a conclusion.

Therefore, we performed the current study to improve the molecular characterization of Hepadnavirus circulating in swine from abattoirs in Brazil, revealing if there is evidence that pigs destined for human consumption might act as a potential new reservoir or host for a virus HBV-similar.

Methods

This study was approved by the Institutional Committee for Ethics in the Use of Research Animals (CEUA-Fiocruz: PO 0132/01). On December 2008, a total of 36 bile and liver samples were collected from domestic pigs *Sus scrofa* (aged > 5 months), breed Large white, from three slaughterhouses located in Petrópolis (SPET), Itaocara (SITC) and Itaperuna (SITP) (North and Hill region of Rio de

* Correspondence: yasminerangel@ig.com.br

¹Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira – 2º andar - sala B220, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil, nº 4365, Manguinhos - RJ, Cep: 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Full list of author information is available at the end of the article

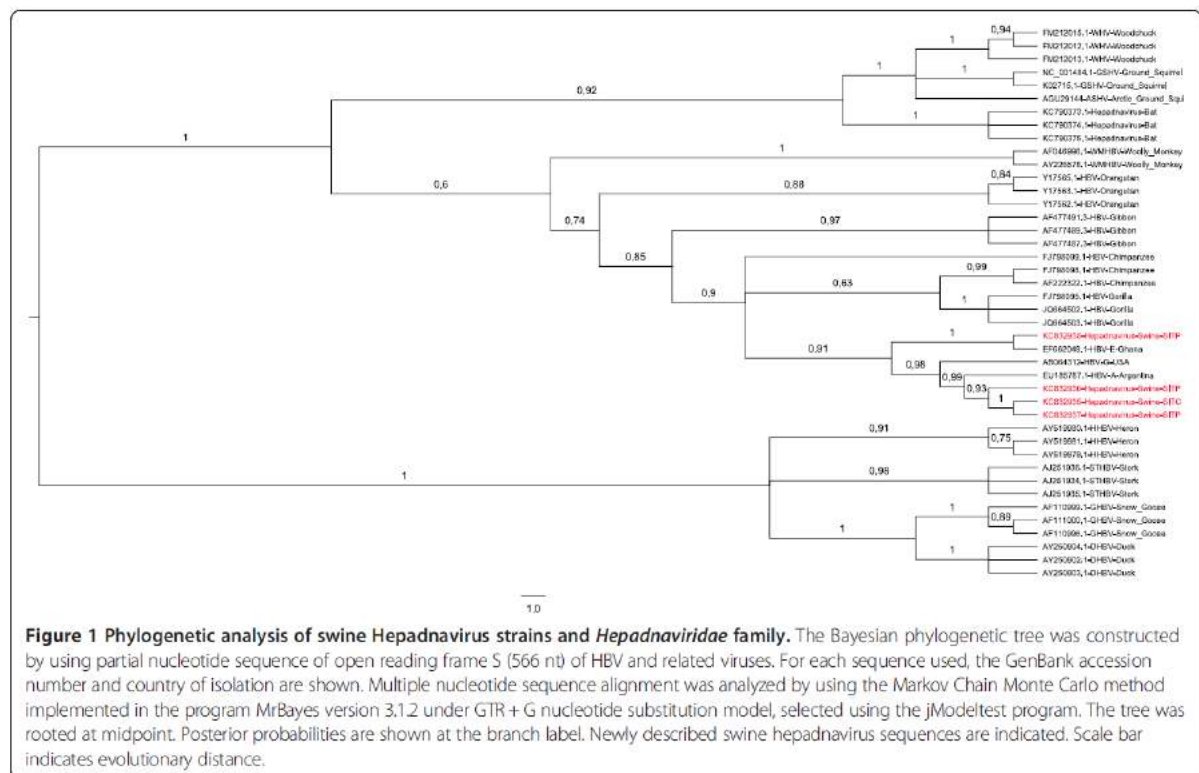
Janeiro State, Brazil). Commercial establishments are submitted to controlled inspection by an official agency of Rio de Janeiro State. All animals from the three abattoirs were classified healthy and approved for slaughter and further commercialization according to inspect evaluation criteria. Swine from each abattoir were acquired from distinct pig farms suppliers. The samples were collected during the evisceration process under sanitary requisites determined by regulations of Animal Sanitary Protection Agency in Rio de Janeiro State (ASPA).

Five milliliters of bile were collected by vacuum-puncture through the gallbladder wall with sterile syringe; and 500 mg of liver samples were collected with Medblade® bisturi blades. All samples were stored in Nalgene® cryogenic vials and immediately frozen in dry ice. At the laboratory, bile samples were stored at -80°C and liver samples in liquid nitrogen until analysis. Viral DNA was extracted from bile and liver samples using DNA Purification Kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen®) according to Moricz et al, 2010 [8] and was concentrated to a final volume of 25 µL. Extracted DNA was analyzed by semi-nested PCR (PS1-S2 and PS1-SR) specific for open reading frame (ORF S) of HBV - as previously established for the first round of amplification [9], and for the second round [10] - and by PCR specific for core gene of HBV - as previously

established [11]. Direct sequencing of amplicons was performed to identify the sequence amplified.

After molecular diagnosis, in order to quantify the viral load DNA samples were evaluated in duplicate by Real Time PCR using TaqMan® method. The Real Time PCR assay was performed for pre-S2/S region as previously established [12], using the following primers pair and fluorescent probe: forward primer (5'-GAATCCTCACA ATACCGCAGAGT-3'), reverse primer (5'-GCCAAGA CACACGGGTGAT-3'), and probe (5'-FAM-AAGTCC ACCACGAGTCTAG-NFQ/MGB-3') (Life Technologies®, Applied Biosystems). HBV plasmid serially diluted from 5×10^7 to 5×10^1 copies/ µL was used as HBV standard PCR template. The amplification was analyzed using the software Applied Biosystems 7500.

Indirect immunofluorescence assay was also performed in samples of liver tissue cryosectioned at 4 µm. Liver biopsies were stained with anti-HBs mouse monoclonal primary antibody specific for human HBsAg (19-CC6/CG2 Lot 100830S019, Biomanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) at the dilution 1:50 overnight at 4°C, followed by Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-mouse secondary antibodies (Molecular Probes®) at the dilution 1:400 for 1 h at 37°C. Liver sections were counterstained with Evans Blue (1: 20,000) and DAPI (Molecular Probes®). Images of



the green fluorescent HBsAg-positive liver cells were observed and photographed using a Confocal Scanning Laser Microscope equipped with camera (Nikon® Instruments, Model C2, Inc., New York, USA).

Results

Hepadnavirus-DNA was detected in bile and liver samples from about 11.11% pigs (4/36). All samples from Petrópolis (0/9) were tested negative. Hepadnavirus-DNA was detected in both samples types from 1 animal in Itaocara (1/10) and from 3 animals in Itaperuna (3/17). These samples showed a positive result for the semi-nested PCR specific for HBV ORF S (1,100 bp) [GenBank: KC832935, GenBank:KC832936, GenBank:KC832937, GenBank:KC832938], and 3 of them also for the PCR specific for core gene (431 bp) [GenBank:KF859967, GenBank:KF859968, GenBank:KF859969]. The sequences found in bile and liver of the same animal matched. Phylogenetic reconstruction using partial nucleotide sequences

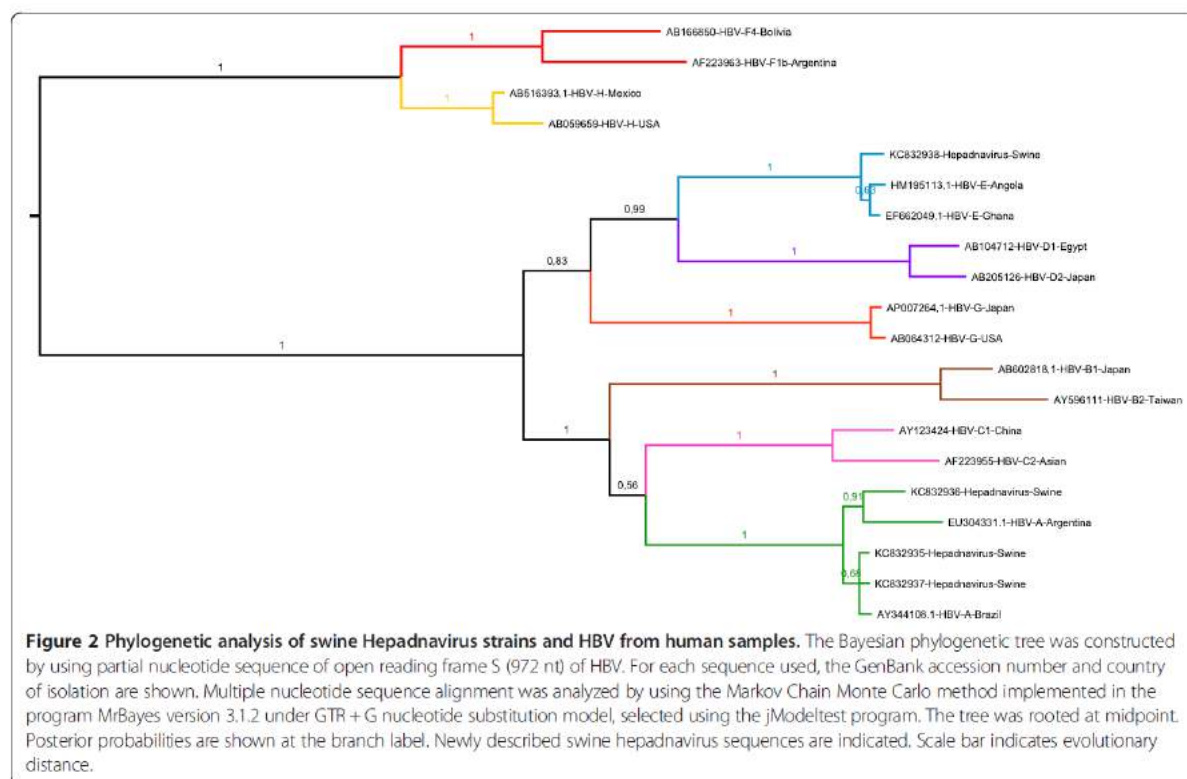
of ORF S (566 nt) showed a close relationship of Hepadnavirus strains from pigs and Hepadnavirus nucleotide sequences from non-human primates (from 84.8 to 96.1%), bats (from 68.9 to 75.6%), rodents (from 70.5 to 71.8%) and birds (from 45.8 to 48.6%) (Figure 1, Table 1).

Genetic distances calculated with nucleotide sequences of ORF S (972 nt) showed filogenetic distance between the virus detected in Brazilian domestic pigs and human samples from significant alignment listed by NCBI Blast [GenBank:JF784228, GenBank:JF784230, GenBank:JF784231, GenBank:JF784234, GenBank:EF662027-49, GenBank:DQ060826, GenBank:DQ060829] ranging from 98.9-99.7%. These data also revealed that distinct strains might be responsible for the infection in domestic pigs (Figure 2). Comparing to human HBV strains previously genotyped, swine samples were assigned to two different genotypes groups. Three of them were close to samples from genotype A, the most prevalent genotype in Brazil [13]. And, another was similar to samples that belong

Table 1 Nucleotide identity between Hepadnavirus strains from pigs and other species

Species	Accession Number GenBank	Swine Hepadnavirus			
		KC832935	KC832936	KC832937	KC832938
Chimpanzee (HBV)	FJ798099.1	0.950	0.950	0.951	0.961
	AF222322.1	0.937	0.937	0.939	0.948
Gibbon (HBV)	AF477494.2	0.939	0.939	0.940	0.953
	AF274499.2	0.918	0.918	0.920	0.933
Orangutan (HBV)	Y17562.1	0.916	0.918	0.918	0.929
	Y17559.1	0.911	0.913	0.913	0.926
Gorilla (HBV)	AJ131567.1	0.946	0.946	0.948	0.951
	JQ664502.1	0.942	0.942	0.944	0.948
Woolly Monkey (WMHBV)	AF046996.1	0.850	0.848	0.851	0.848
	AY226578.1	0.850	0.848	0.851	0.848
Bat (Hepadnavirus)	KC790378.1	0.689	0.689	0.691	0.695
	KC790376.1	0.755	0.753	0.756	0.755
Woodchuck (WHV)	FM212013.1	0.707	0.705	0.709	0.707
	FM212009.1	0.716	0.714	0.718	0.714
Squirrel (ASHV/GSHV)	AGU29144	0.709	0.709	0.710	0.712
	K02715.1	0.709	0.709	0.710	0.716
Heron (HHBV)	AY552597.1	0.474	0.477	0.476	0.481
	AY552595.1	0.483	0.484	0.484	0.486
Stork (STHBV)	AJ251937.1	0.464	0.466	0.466	0.471
	AJ251935.1	0.464	0.466	0.466	0.468
Snow Goose (GHBV)	AF110999.1	0.458	0.461	0.460	0.461
	AF110997.1	0.461	0.465	0.463	0.465
Duck (DHBV)	AY494851.1	0.467	0.470	0.468	0.461
	M21953.1	0.473	0.476	0.475	0.476

Legend: The nucleotide identity matrix was constructed by using partial nucleotide sequence of open reading frame S (566 nt) of HBV and related viruses. For each sequence used, the GenBank accession number and specie infected are shown. Newly described swine hepadnaviruses sequences are indicated.



to genotype E, which is common in western Africa [14]. Genotype A was found circulating in Itaocara and Itaperuna, while genotype E was found exclusively in Itaperuna.

Concerning viral load quantification, a linear relationship was obtained between the cycle threshold (Ct) values and the \log_{10} concentration of the HBV DNA. The regression analysis yielded a correlation coefficient of 0.99. All four bile samples could be quantified. The viral loads ranged from 0.8×10^3 to 1×10^5 copies/mL.

Further, we investigated viral hepatotropism by indirect immunofluorescence analysis using monoclonal anti-HBs antibody in liver biopsies from *Hepadnavirus*-DNA positive animals, and compared the results to the control animals. HBsAg was observed in cell membrane and cytoplasm of sinusoidal lining cells in liver parenchyma and in hepatocytes (Figure 3). No staining was observed for controls. Molecular data and antigenic detection in situ confirm that swine were infected by a Hepadnavirus with hepatotropic behavior, similar to human HBV.

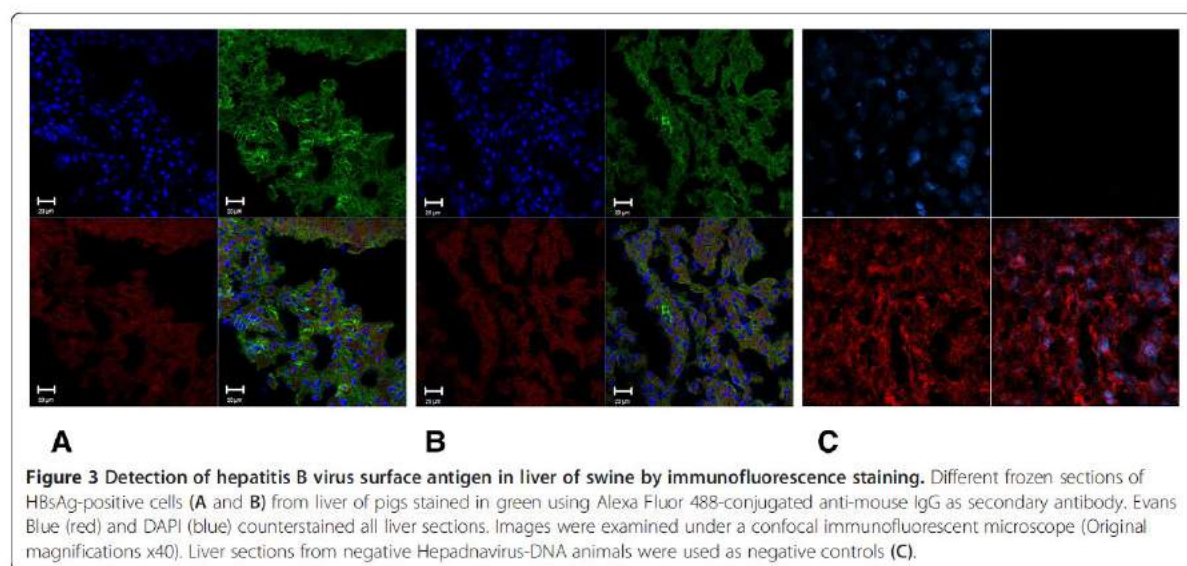
Discussion

Our challenge in this study was to refine the molecular characterization of Hepadnavirus circulating in swine from Brazil, disclosing how close porcine strains are to HBV and to HBV-like viruses sequences described for different hosts, including human. Data presented here showed different

strategies for viral detection, including the molecular characterization of complete ORF C and ORF S in bile and liver samples, the genotype classification based on the genotypic classification of HBV, the viral load quantification and antigenic detection in hepatic parenchyma.

This is the first record of molecular characterization of swine Hepadnavirus from bile and liver samples. There are no previous data available in the literature concerning genotypic classification based on complete sequencing of pre-S/S region and viral load evaluation in swine from slaughterhouses.

According to results described previously for Brazilian domestic swine [7], the similarity between pigs and human Hepadnavirus strains was supposed through superficial and preliminary estimates, and cross reactivity in non-host specific commercial serological assays. In this study, molecular results from a larger and more representative fragment of the genome allowed us to calculate an approximate identity not only with HBV from human host, as well as other viruses that comprise the *Hepadnaviridae* family: 98.9-99.7% to human HBV, 93.7-96.1% to Chimpanzee HBV, 91.8-95.3% to Gibbon HBV, 94.2-95.1% to Gorilla HBV, 91.1-92.9% to Orangutan HBV, 84.8-85.1% to Woolly Monkey WMHBV, 68.9%-75.6% to Bat Hepadnavirus, 70.5-71.8% to Woodchuck WHV, 70.9-71.6% to Arctic/Ground Squirrels ASHV/ GSHV, 47.4-48.6% to Heron



HHBV, 46.4-47.1% to Stork STHBV, 45.8-46.5% to Snow Goose GHBV, 46.1-47.6% to Duck DHBV.

Genetic distances data are relevant and need to be better evaluated once despite the diversity of hosts, no reservoirs are described for HBV so far [15]. At the same time, as commercial swine are slaughtered at a young age (up to 22 weeks old), the identification of any clinical signs of disease may be hindered notably considering that health inspections are based only in visible lesions present and post-mortem gross macroscopic examinations in animal from abattoirs. No molecular tests are executed. Due to these factors, a follow-up study for longer periods should be considered.

It is noteworthy that investigation of the population of animals from three different commercial herds was performed after a single collection, and 11.11% of swine showed positive molecular diagnosis, in which hepatotropism was also confirmed. These positive animals were distributed in two slaughterhouses which do not share the same pig farm supplier.

The possibility of an eventual vertical transmission can not be ruled out for positive animals from the same slaughterhouse since they came from the same herd. However, as there are distinct breeding sows in a single pig farm, animals destined to the same abattoir may be born from different sows. To consider the risk of vertical transmission, pigs should also share the same genotype in addition to sharing the same geographical origin.

In this study, three positive animals came from Itaperuna. One animal was assigned to genotype E, and two animals shared genotype A. Due to the circulation of both genotypes in swine from the same abattoir, at least two different breeding sows were involved in its respective pig farm

supplier. Even though, the risk of vertical transmission for two animals of genotype A cannot be confirmed.

Since the role of bats as reservoirs of zoonotic viruses is now being investigated, including for bat hepadnaviruses [15], further studies are also necessary to extrapolate this reasoning to the pigs analogously. Whether there is a zoonotic ability of swine Hepadnavirus strains and if this virus is able to induce cross-infection in other species are remaining issues. Considering the main routes of HBV transmission, and since personal protective equipment is not often used in slaughterhouses, novel studies are necessary to assess a potential occupational risk of infection by Hepadnaviruses during the management of pigs and their derivatives.

Conclusions

The present study demonstrated the circulation of an emerging virus in swine, similar to Hepadnavirus that causes human infection. Further studies are necessary to disclose the actual role of swine in the viral cycle.

Abbreviations

HBV: Human hepatitis B virus; ORF S: Open reading frame S; ORF C: Open reading frame C; WHV: HBV-related virus of woodchuck; GSHV: HBV-related virus of ground squirrels; ASHV: HBV-related virus of arctic squirrels; DHBV: HBV-related virus of ducks; GHBV: HBV-related virus of geese; HHBV: HBV-related virus of herons; STHBV: HBV-related virus of storks; HBsAg: Surface antigen of HBV; anti-HBs: HBV surface antibody; anti-HBc: Antibody to HBV core antigen; bp: Base pair; CEUA: Committee for Ethics in the Use of Research Animals; ASPA: Animal Sanitary Protection Agency in Rio de Janeiro State; nt: Nucleotide.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

This study was designed by YRV, DRLS, MAP and VSP. YRV performed qualitative molecular assays, sequence analysis, interpreted the data, collaborated to quantitative molecular assays, to immunofluorescence assay and wrote the manuscript. DRLS contributed to the sample collection and helped to write the manuscript. MMP performed quantitative molecular assays. CEPV contributed to the immunofluorescence assay. MA contributed with immunological reagents. LMV contributed with molecular reagents, materials and analysis tools. MAP contributed to the sample collection, coordinated the study and revised the manuscript. VSP coordinated the study and revised the manuscript. All authors read, corrected and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ/ E-26/110.607/2014). The authors appreciated the help from Gilberto Vaughan (Centers for Disease Control and Prevention/ CDC) and Leandro Lajter Xavier (Universidade do Estado do Rio de Janeiro/ UERJ).

Author details

¹Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira – 2º andar - sala B220, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil, nº 4365, Manguinhos - RJ, Cep: 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Departamento de Microbiologia Veterinária e Imunologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRJ, Seropédica, RJ, Brasil. ³Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Received: 21 June 2014 Accepted: 26 November 2014

Published online: 11 December 2014

References

1. Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA: **Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene.** *Pathol Biol (Paris)* 2010, **58**:267–272.
2. Dienstag JL: **Hepatitis B virus infection.** *N Engl J Med* 2008, **359**:1486–1500.
3. Prange R: **Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress.** *Med Microbiol Immunol* 2012, **201**:449–461.
4. Yang J, Xi Q, Deng R, Wang J, Hou J, Wang X: **Identification of interspecies recombination among hepadnaviruses infecting cross-species hosts.** *J Med Virol* 2007, **79**:1741–1750.
5. Li W, She R, Liu L, You H, Yin J: **Prevalence of a virus similar to human hepatitis B virus in swine.** *Viral J* 2010, **7**:60.
6. Tian J, Xia K, She R, Li W, Ding Y, Wang J, Chen M, Yin J: **Detection of hepatitis B virus in serum and liver of chickens.** *Viral J* 2012, **9**:2.
7. Vieira YR, Vieira AA, Ciacci-Zanella JR, Barqueró G, do Lago BV, Gomes SA, Silva MFM, Santos DRL, Pinto MA, de Paula VS: **Serological and molecular evidence of Hepadnavirus infection in swine.** *Ann Agric Environ Med*, in press.
8. Moricz A, Melo M, Castro AM, Campos T, Silva RA, Pacheco AM Jr: **Prevalence of Helicobacter spp in chronic cholecystitis and correlation with changes on the histological pattern of the gallbladder.** *Acta Cir Bras* 2010, **25**:218–224.
9. Niel C, Moraes MT, Gaspar AM, Yoshida CF, Gomes SA: **Genetic diversity of hepatitis B virus strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil.** *J Med Virol* 1994, **44**:180–186.
10. Motta-Castro AR, Martins RM, Yoshida CF, Teles SA, Paniago AM, Lima KM, Gomes SA: **Hepatitis B virus infection in isolated Afro-Brazilian communities.** *J Med Virol* 2005, **77**:188–193.
11. Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB 3rd, Rico-Hesse R: **Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:5757–5761.
12. Portilho MM: **Desenvolvimento de testes de detecção e quantificação do vírus da hepatite B em amostras de soro e fluido oral.** *MSc thesis.* Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Virologia. Rio de Janeiro, Brazil; 2013.
13. Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA: **Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil.** *Arq Gastroenterol* 2010, **47**:13–17.

14. Kramvis A, Kew MC: **Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes.** *Hepatal Res* 2007, **37**:S9–S19.
15. Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, Van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Müller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJ, Stöcker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Opong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C: **Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:16151–16156.

doi:10.1186/s12866-014-0315-2

Cite this article as: Vieira et al.: Hepadnavirus detected in bile and liver samples from domestic pigs of commercial abattoirs. *BMC Microbiology* 2014 **14**:315.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5.3 Artigo 3:

Vieira YR, Portilho MM, Oliveira FF, dos Santos DRL, Villar LM, Mirazo S, Arbiza J, Dimache LAG, Almeida FQ, Brandão ML, Cordeiro JLP, Rocha FL, Azevedo FC, Lemos FG, Campos JBV, Macedo GC, Herrera HM, Peres IAHS, Zimmernann NP, Piovezan U, Pellegrin AO, de Paula VS, Pinto MA. Evaluation of Hepadnavirus circulation in South American domestic and wild mammals. *Viruses*. 2016. *Submetido*

1 Article

2 Evaluation of Hepadnavirus circulation in South 3 American domestic and wild mammals

4 Yasmine R. Vieira ^{1*}, Moyra M. Portilho ², Flávia F. Oliveira ¹, Débora Regina L dos Santos ³, Livia
5 M. Villar ², Santiago Mirazo ⁴, Juan Arbiza ⁴, Luana A.G. Dimache ⁵, Fernando Q. Almeida ⁵, Martha
6 L. Brandão ⁶, José Luís P. Cordeiro ⁶, Fabiana L. Rocha ^{7,8}, Fernanda C. Azevedo ⁸, Frederico G.
7 Lemos ^{8,9}, João Bosco V. Campos ¹⁰, Gabriel C. Macedo ¹⁰, Heitor M. Herrera ¹⁰, Igor Alexandre S.
8 Péres ¹¹, Namor P. Zimmermann ¹², Ubiratan Piovezan ¹¹, Aiesca O. Pellegrin ¹¹, Vanessa S. de Paula
9 ¹ & Marcelo A. Pinto ¹

10 ¹ Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, IOC, FIOCRUZ, RJ, Brasil

11 ² Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, IOC, FIOCRUZ, RJ, Brasil

12 ³ Laboratório de Virose Veterinárias, Departamento de Microbiologia Veterinária e Imunologia, Universidade
13 Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, RJ, Brasil

14 ⁴ Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Udelar, Montevideo, Uruguay

15 ⁵ Departamento de Medicina e Cirurgia, Instituto de Veterinária, UFRRJ, RJ, Brasil

16 ⁶ Fiocruz Mata Atlântica, FIOCRUZ, RJ, Brasil

17 ⁷ Centro de Ciências Aplicadas e Educação, Campus IV Litoral Norte, Universidade Federal da Paraíba, UFPB,
18 PB, Brasil

19 ⁸ Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado, PCMC, MG, Brasil

20 ⁹ Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Goiás, UFG, GO, Brasil

21 ¹⁰ Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, MS, Brasil

22 ¹¹ Embrapa Pantanal, CP 109, Corumbá, MS, Brasil

23 ¹² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, MS,
24 Brasil

25
26 *Corresponding author: Yasmine Rangel Vieira, Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia,
27 Pavilhão Hélio e Peggy Pereira – 2º andar - sala B220, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Av. Brasil, nº 4365,
28 Manguinhos - RJ. Cep: 21045-900. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Fax (+ 55 21) 2562 1825. Tel: (+ 55 21) 2562 1900; e-mail
29 address: yasmminerangel@ig.com.br

30 **Abstract:** The aim of the study was to evaluate Hepadnavirus circulation in domestic and wild
31 mammals from different sites in South America using serological and molecular tools. A total of 422
32 domestic and wild animals were screened for hepatitis B virus (HBV) serological markers and tested
33 by performing quantitative and qualitative polymerase chain reaction (PCR) to detect open reading
34 frames (ORFs) S and C. We report evidence of HBsAg (surface antigen of HBV) and total anti-HBc
35 (HBV core antigen) markers, and the detection of low-copy Hepadnavirus DNA among domestic and
36 wild animals. According to our results, the list of candidate Hepadnavirus hosts is increasing, and our
37 data may help to clarify the controversial origins of HBV.

38 **Keywords:** Hepadnavirus; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Real-Time PCR; Brazil; Uruguay.

39

40 1. Introduction

41 The family *Hepadnaviridae* comprises hepatotropic enveloped viruses containing partially double-
42 stranded circular DNA which replicates by reverse transcription [1]. These viruses are classified into
43 the *Orthohepadnavirus* (mammals) genus and the *Avihepadnavirus* (birds) genus. Humans and non-
44 human primates such as chimpanzees (*Pan troglodytes*), gibbons (*Hylobates sp.*), gorillas (*Gorilla gorilla*),

45 orangutans (*Pongo pygmaeus*) and woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) are infected by Hepatitis B
 46 virus (HBV), the prototype species [2–7]. HBV-like viruses are also found in a variety of other
 47 mammals, including woodchucks (WHV) [8], squirrels (GSHV/ASHV) [9,10], bats
 48 (RBHBV/HBHBV/TBHBV) [12], and birds such as ducks (DHBV), geese (GHBV), herons (HHBV), and
 49 storks (STHBV) [2,13–19].

50 Human infection by HBV is endemic worldwide [20]. The World Health Organization (WHO)
 51 estimates that 240 million people are chronically infected with HBV [21], and 780,000 people die
 52 annually from complications such as cirrhosis and liver cancer [22]. Contact with blood or other body
 53 fluids from an infected person leads to the transmission of this pathogen [21]. Although immunization
 54 strategies have been adopted to prevent its spread [20], researchers question whether the existence of
 55 a virus shared by different host species impairs eradication attempts [23].

56 Recent findings have confirmed the circulation of a virus similar to HBV in swine [24,25] and
 57 chickens [26] and have also demonstrated the presence of endogenous viral elements (EVEs) from
 58 Hepadnaviruses in snakes [27,28], turtles and crocodylians [27]; furthermore, the creation of a novel
 59 genus assigned to an HBV-like virus circulating among fish has been proposed [29]. Based on these
 60 data, Hepadnaviruses are more ancient than previously thought (>200 million years) [30], and the list
 61 of candidates that serve as Hepadnavirus hosts or reservoirs is quite long.

62 However, the sources of viral infection for many of these animals are unknown, as is the
 63 definition of Hepadnavirus donors and recipients among humans and other animal species [31]. To
 64 close this knowledge gap, the aim of this study was to evaluate Hepadnavirus circulation in a variety
 65 of domestic and wild animals from different regions of South America.

66 2. Materials and Methods

67 2.1. Ethics committee, study group and sample collection

68 This study was approved by the Animal Use Ethics Committees (CEUA) of the institutions
 69 involved, under the licenses CBA_02356_013, CEUA/UFRRJ n° 375/2013, CEUA/UFMS n° 500/2013,
 70 CEUA/UCDB n° 1/2013 and CEUA/UFMG 086/2014. The capture of wild animals was licensed by the
 71 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio) under the licenses
 72 SISBIO/ICMBio 35296-2, SISBIO/ICMBio 49647-1 and SISBIO/ICMBio 14576-4), in accordance with
 73 Brazilian regulations. Appropriate biosecurity techniques and individual protective equipment were
 74 implemented during all procedures involving the collection and handling of biological samples.

75 The study sample included 422 animals from different sites in South America that were divided
 76 into groups A and B. Group A corresponded to 200 domestic animals, either found on semi-extensive
 77 farms or confined; there were 75 domestic pigs (*Sus scrofa*) from the municipalities of Canelones,
 78 Lavalleya and Colonia/Uruguay and 125 equines (*Equus ferus caballus*) from the municipality of
 79 Seropédica/Brazil. Group B corresponded to 222 free-roaming exotic, domestic and/or wild mammals
 80 and included 140 domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) used for cattle work and hunting, with
 81 frequent access to farming and wild areas, from the municipality of Corumbá/Brazil (Pantanal Biome),
 82 11 wild boars (*Sus scrofa*) from the municipality of Maldonado/Uruguay, 61 wild pigs (*Sus scrofa*) from
 83 the municipalities of Barão de Melgaço and Corumbá/Brazil (Pantanal Biome), one jaguar (*Panthera*
 84 *onca*) from the municipality of Barão de Melgaço/Brazil (Pantanal Biome), and six crab-eating foxes
 85 (*Cerdocyon thous*), two maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and one crab-eating raccoon (*Procyon*
 86 *cancrivorus*) from the municipality of Cumari/Brazil (Cerrado Biome).

87 Domestic animals were physically restrained. Wild species were actively captured using a
 88 tranquilizer gun or with Tomahawk box traps that were baited with sardines and boiled chicken,
 89 followed by chemical immobilization with an intramuscular injection of a combination of zolazepam
 90 and tiletamine (ZoletilH®) at dosages of 3–10 mg/kg depending on the target species. A total of 5 to 20
 91 mL of venous blood was collected from the cephalic vein using Vacutainer® 18-21 G needles and
 92 directly transferred into vacuum tubes containing a gel separator and clot activator (BD Vacutainer®

93 SST II Advance). The tubes were refrigerated (4°C) until they were processed. After 10-15 minutes of
 94 clot retraction, the samples were centrifuged at 3,500 rpm for 5 minutes at room temperature (20-
 95 22°C). The sera were separated and stored in aliquots at -20°C and -80°C until further analysis was
 96 performed.

97 2.2. Evaluation of serological markers

98 The serum samples were screened using specific commercial enzyme-linked immunosorbent
 99 assay (ELISA) kits (DiaSorin®) for HBV serological markers (HBsAg, surface antigen of HBV, and
 100 total anti-HBc, HBV core antigen). The immunoassay approaches were antigen capture for the HBsAg
 101 test and antibody competition for the total anti-HBc test. The results were interpreted by comparing
 102 specimen absorbance values (optical density, OD) at 450 nm to the cut-off (CO) value according to the
 103 manufacturer's recommendations.

104 2.3 Incidence analysis

105 Statistical analysis of Hepadnavirus infection incidence among different animal species was
 106 performed in accordance with the non-parametric Kruskal-Wallis test (95% confidence intervals). A p-
 107 value <0.05 was considered statistically significant.

108 2.4. Molecular tests

109 Viral DNA was extracted from the serum samples using a DNA Purification Kit (QIAamp DNA
 110 Mini Kit, Qiagen®) according to the manufacturer's recommendations. Extracted DNA was
 111 concentrated to a final volume of 25 µL and analyzed by performing quantitative and qualitative
 112 polymerase chain reaction (PCR). To prevent cross-contamination, HBV-positive controls were not
 113 handled with animal samples.

114 2.4.1. Detection of Hepadnavirus DNA

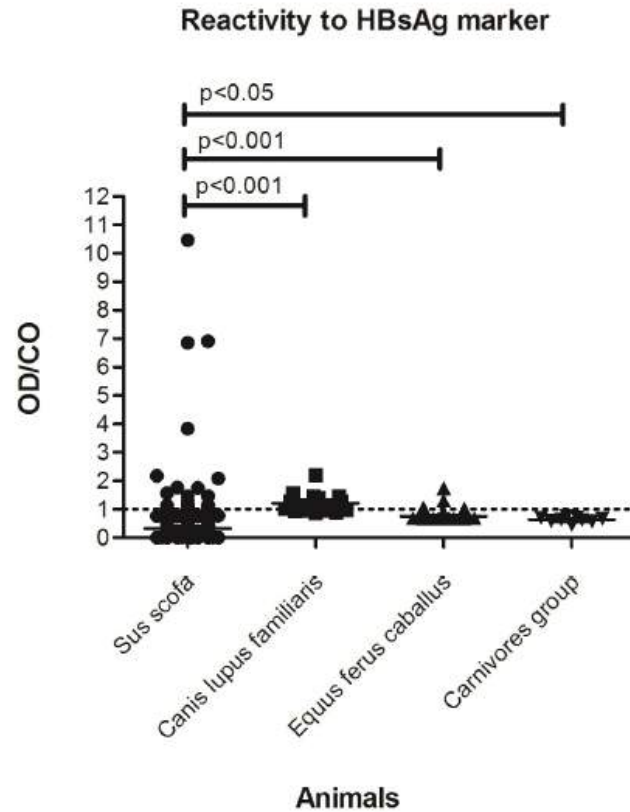
115 To detect Hepadnavirus DNA, samples were evaluated in duplicate by performing real-time PCR
 116 using the TaqMan® method. The assay was performed for the pre-S2/S region as previously
 117 established [32], using the following primer pair and fluorescent probe described in the literature:
 118 forward primer (5'-GAATCCTCACAATACCGCAGAGT-3'), reverse primer (5'-
 119 GCCAAGACACACGGGTGAT-3'), and probe (5'-FAM-AAGTCCACCAGAGTCTAG-NFQ/MGB-3')
 120 (Life Technologies®, Applied Biosystems) [33]. Amplification was analyzed using the software
 121 Applied Biosystems 7500. The detection limit of the assay corresponded to 5×10^4 copies/µL. For this
 122 method, all samples that crossed the threshold line below 42 cycles and exhibited a characteristic
 123 sigmoid curve were considered positive.

124 Next, amplification strategies for different regions of the genome were carried out. Initially, semi-
 125 nested PCR (PS1-S2 and PS1-SR) specific for an open reading frame (ORF S) of HBV (~1,100 bp) was
 126 performed as previously described for the first round of amplification [34] and for the second round
 127 [35], followed by PCR specific for a core gene of HBV (430 bp) [3]. Amplicons were analyzed by
 128 performing electrophoresis in a 1.5% agarose gel, staining with ethidium bromide (0.2 µg/mL) and
 129 observing under UV light.

130 3. Results

131 Based on our serological analyses, 32 (7.58%) out of 422 samples from the different mammalian
 132 orders and biomes investigated were reactive for HBsAg, indicating the existence of an active
 133 infection. Of these, six (18.75%) samples belonged to livestock animals (Group A), and 26 (81.25%)
 134 belonged to free-roaming exotic, domestic or wild animals (Group B) (Table 1). The active infection
 135 rate in free-roaming animals was approximately 4 times higher than that in confined or semi-extensive
 136 domestic animals. In addition, statistical analysis of Hepadnavirus infection incidence among different

137 animal species based on HBsAg levels revealed greater susceptibility of *Sus scrofa* to infection by
 138 Hepadnavirus than the other species analyzed ($p < 0.001$ and $p < 0.05$) (Figure 1).
 139



140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149

Figure 1. Level of reactivity of serum samples to the HBsAg marker in domestic and wild animals from South America. Legend: Dotted line corresponds to the cut-off line of the analysis. Above the dotted line, reactive samples for the HBsAg marker. Below the dotted line, non-reactive samples for the same marker. Statistical analysis between groups was conducted in accordance with the Kruskal-Wallis test (95% confidence intervals). The *Sus scrofa* group corresponds to domestic pigs, wild boars and wild pigs. The carnivores group corresponds to jaguar (*Panthera onca*), crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*), maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*). OD/CO = absorbance value/cut-off ratio.

150 Thirty-nine (9.24%) serum samples were reactive for total anti-HBc, indicating previous exposure
 151 of these animals to the virus and viral circulation in both domestic and wild environments. Of these,
 152 19 (48.72%) samples belonged to group A, and 20 (51.28%) belonged to group B (Table 1). Both study
 153 groups (A and B) showed similar prevalence rates of exposure.

154 Among 39 (100%) serum samples classified as reactive for total anti-HBc, 15 (38.46%) were also
 155 reactive for HBsAg. However, because anti-HBc IgM reactivity was not evaluated, it was not possible
 156 to assess which animals were newly infected (Table 1).

157 Hepadnavirus DNA was detected by real-time PCR in 5.21% (22/422) of the samples (Table 1). Of
 158 these, 4 (18.18%) belonged to Group A, including 1.34% (1/75) of swine serum samples and 2.40%
 159 (3/125) of horse serum samples, and 18 (81.82%) belonged to Group B, corresponding to 7.14% (10/140)
 160 of domestic dog serum samples, 11.48% (7/61) of wild pig serum samples, and 16.67% (1/6) of crab-
 161 eating fox serum samples. When domestic and wild environments were compared, the Hepadnavirus

162 DNA detection rate in *Sus scrofa* was 7 times higher in wild animals than in livestock. Similarly,
163 comparison of different species from the *Canidae* family belonging to both environments revealed a
164 molecular detection rate in the wild species (*Cerdocyon thous*) approximately 2 times higher than that
165 in domestic individuals (*Canis lupus familiaris*).

166 The qualitative PCR results for ORF S and ORF C were negative for all serum samples from
167 confined or semi-extensive domestic animals and free-roaming exotic, domestic or wild animals in
168 both study groups (Table 1).

Group	Common name (<i>Species</i>)	Municipality/ Country	n (%)	Anti-HBc total n (%)	HBsAg n (%)	Hepadnavirus-DNA n (%)
A - Domestic						
<i>(created in semi-extensive farms or confined)</i>	Domestic pig (<i>Sus scrofa</i>)	Canelones, Lavalleja and Colonia/Uruguay	75 (37.50)	15 (20.00)	2 (2.67)	1 (1.34)
	Horse (<i>Equus ferus caballus</i>)	Seropédica/Brazil	125 (62.50)	4 (3.20)	4 (3.20)	3 (2.40)
<i>Total</i>			200 (100)	19 (9.50)	6 (3.00)	4 (2.00)
B - Free-Roaming						
<i>(exotic, domestic and/or wild mammals)</i>	Domestic dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Corumbá/Brazil,	140 (100)	12 (8.57)	10 (7.14)	10 (7.14)
	Wild boar (<i>Sus scrofa</i>)	Maldonado/Uruguay	11 (13.41)	0	0	0
	Wild pig (<i>Sus scrofa</i>)	Barão de Melgaço and Corumbá/Brazil	61 (74.39)	6 (9.84)	15 (24.59)	7 (11.48)
	Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	Barão de Melgaço/ Brazil	1 (1.22)	0	1 (100)	0
	Crab-eating fox (<i>Cerdocyon thonis</i>)	Cumari/Brazil	6 (7.32)	0	0	1 (16.67)
	Maned wolf (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	Cumari/Brazil	2 (2.44)	1 (50.00)	0	0
	Crab-eating raccoon (<i>Procyon cancrivorus</i>)	Cumari/Brazil	1 (1.22)	1 (100)	0	0
<i>Total</i>			222 (100)	20 (9.01)	26 (11.71)	18 (8.11)
Total			422 (100)	39 (9.24)	32 (7.58)	22 (5.21%)

169

170

Table 1: Prevalence of serological and molecular markers of Hepadnavirus in domestic and wild animals from different locations in South America.

171 4. Discussion

172 The origin of HBV is controversial [30]. Many hypotheses have been raised to suggest how the
173 virus emerged, based on its viral evolution rate and Hepadnavirus nucleotide sequences from hosts
174 already described in the literature. In this context, this investigation aimed to evaluate Hepadnavirus
175 circulation in domestic and wild environments, including animals from different taxa and biomes.

176 The percentages of reactive serum samples for the total anti-HBc marker reveal previous contact
177 of livestock (Group A) and free-roaming animal populations (Group B) with the virus. Regarding
178 livestock, these data are the first record of Hepadnavirus circulation in swine herds from Uruguay and
179 in equines from Brazil. Data in the literature have been shown serological and/or molecular evidences
180 of HBV-like virus circulation in swine herds from China [24] and Brazil [25] and in chicken flocks in
181 China [26]. Additionally, other hepatitis viruses are present in domestic animal populations, such as
182 Hepatitis E virus (HEV) in swine herds [36] and hepatitis C-like virus in Brazilian equines [37].

183 The presence of the total anti-HBc marker in the wild pig population constitutes evidence of the
184 natural circulation of Hepadnavirus in free-roaming animals, regardless of the absence or presence of
185 close contact with humans. These results corroborate those obtained for other wild animals as well as
186 animals used for cattle work and hunting, such as the domestic dogs in this study. Unlike domestic
187 animals, dogs from Pantanal have free access to environments in which wild animals circulate. They
188 are employed to hunt wild pigs, through which they are exposed to blood and are fed the viscera and
189 meat of freshly deceased animals. Thus, given their feeding ecology and behaviors, these carnivores
190 are at risk for infection through hunting and predation.

191 Our data are consistent with records of mammals and avian species harboring HBV and HBV-
192 like viruses [12,38]. Non-human primates, rodents and birds are free-roaming animals that do not
193 experience close contact with humans. Novel evidence of ancient, endogenous Hepadnavirus
194 genomes in snakes, turtles, crocodylians and fishes [27–29] reaffirms both zoonotic and natural
195 circulation. Thus, mammals, birds and reptiles should be considered in studies examining population
196 dynamics and Hepadnavirus evolution.

197 In this study, the HBsAg incidence in livestock was 2.67% for swine and 3.20% for equines.
198 Compared to available data in the literature, low infection rates in livestock were also noted for swine
199 herds from the southern and southeastern regions of Brazil (0.8%) [25], which are areas of low
200 endemicity for HBV. In highly endemic regions, such as China, the overall prevalence of HBsAg in
201 swine herds is higher (24.8%) [24]. Higher percentages of infection in wild animals highlight the
202 existence of a natural source of infection that must be further investigated.

203 The analysis of Hepadnavirus infection incidence among different animal species tested for
204 HBsAg indicated greater susceptibility of *Sus scrofa* pigs than the other species analyzed ($p < 0.001$ and
205 $p < 0.05$). Fig. 1 shows the OD/CO ratios obtained for serum samples from different groups. The HBsAg
206 data obtained here for swine from Uruguay and wild pigs from Pantanal/Brazil were grouped with
207 data previously obtained for domestic pigs and wild boars from Rio de Janeiro, São Paulo and Santa
208 Catarina/Brazil [25].

209 The reactivity results for both markers (total anti-HBc and HBsAg) revealed active infection in
210 some animals at the time of collection. However, reactive HBsAg animals were not followed up; thus,
211 it was not possible to confirm acute or chronic infection. Furthermore, as the available sample
212 volumes were limited, it was not possible to assess cases of immunity due to seroconversion to anti-
213 HBs or resolved infection.

214 Reactivity to HBsAg and non-reactivity to total anti-HBc may be indicative of ongoing infection.
215 In this case, with recent infection, antibody titers against the HBV core antigen (anti-HBc) are not
216 sufficiently high to yield a positive test [39]. Conversely, non-reactivity to HBsAg and reactivity to
217 total anti-HBc reactive may indicate a more advanced infection because HBsAg decreases and even
218 disappears as an acute infection resolves, as well as in cases of immunity due to natural infection and
219 low-level chronic infection [39,40].

220 According to the real-time PCR results, 5.21% (22/422) of serum samples were positive for
 221 Hepadnavirus DNA. Molecular data comparing domestic and wildlife species of the *Canidae* family as
 222 well as *Sus scrofa* pigs from both environments provide further evidence supporting the origin of
 223 Hepadnavirus within a wild environment. Sigmoid curves from positive samples crossed the
 224 threshold line between 37-41 amplification cycles, suggesting a low viral load. Likely due to this, all
 225 serum samples from domestic and wild animals in the study groups tested negative for qualitative
 226 PCR. The sensitivity and specificity of molecular diagnosis in this study were consistent with data
 227 reported in the literature for domestic animals [33].

228 Although qualitative PCR for ORF S and ORF C did not confirm active infection, numerous
 229 empty spherical and filamentous particles released during the HBV replicative cycle may be
 230 responsible for the serological diagnosis of reactive HBsAg. Furthermore, HBsAg levels decrease more
 231 slowly than HBV-DNA levels because HBsAg has a longer half-life in serum [39].

232 Hepadnaviruses are zoonotic agents that circulate in different host species, both domestic and
 233 wild. The presence of these infectious agents in new free-roaming species indicates the complexity of
 234 the transmission cycle due to the involvement of multiple host species and may even contribute with
 235 molecular studies of *Hepadnaviridae* family, as well as with hypothesis about elusive origin of HBV
 236 and evolutionary timescale.

237 The serological and molecular results of this study suggest an expansion of the list of new hosts
 238 or reservoirs for HBV-like viruses. Epidemiological studies focused on zoonotic agents found in free-
 239 roaming animals must be performed.

240 **Abbreviations:** anti-HBc: antibody to HBV core antigen; bp: base pairs; CEUA: Animal Use Ethic
 241 Committee; DHBV: HBV-related virus of ducks; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; EVE:
 242 Endogenous viral element; GHBV: HBV-related virus of geese; GSHV/ASHV: HBV-related virus of
 243 ground squirrels/arctic squirrels; HBsAg: surface antigen of HBV; HBV: Hepatitis B virus; HEV:
 244 Hepatitis E virus; HHBV: HBV-related virus of herons; ICMBio: Instituto Chico Mendes de
 245 Conservação da Biodiversidade; OD: absorbance value; ORF S: open reading frame S;
 246 RBHBV/HBHBV/TBHBV: HBV-related virus of bats; SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em
 247 Biodiversidade; STHBV: HBV-related virus of storks; WHO: World Health Organization; WHV: HBV-
 248 related virus of woodchuck.

249 **Acknowledgments:** This study was supported by the Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Coordenação de
 250 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de
 251 Janeiro (FAPERJ/E-26/110.607/2014), Capim Branco Energy Company and Conselho Nacional de
 252 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Edital Universal 484727/201-3). The authors wish to thank
 253 Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado members (Mozart C. Freitas-Junior, Ricardo C. Arrais, Caio F.
 254 M. Lima, Ísis Z. Candeias, Stacie M. Castelda, Alan N. Costa) and field Biologist Carlos E. Bagual Fragofo for
 255 providing invaluable assistance during the fieldwork. We are grateful to the landowners and cowboys from
 256 Cumari for their hospitality. We also thank the partnership of the Fundação Parque Zoológico de São Paulo and
 257 the Fiocruz Mata Atlântica Zoonoses Surveillance team.

258 **Conflict of interest:** The authors declare that they have no competing interests.

259 References

- 260 1. Tiollais, P.; Pourcel, C.; Dejean, a The hepatitis B virus. *Nature* 1985, 317, 489-95.
- 261 2. Mandart, E.; Kay, A.; Galibert, F. Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison
 262 with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J. Virol.* 1984, 49, 782-792.
- 263 3. Lanford, R. E.; Chavez, D.; Brasky, K. M.; Burns, R. B.; Rico-Hesse, R. Isolation of a hepadnavirus from the
 264 woolly monkey, a New World primate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, 95, 5757-61.
- 265 4. Warren, K. S.; Heeney, J. L.; Swan, R. a; Heriyanto; Verschoor, E. J. A new group of hepadnaviruses naturally
 266 infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J. Virol.* 1999, 73, 7860-7865.
- 267 5. Grethe, S.; Heckel, J. O.; Rietschel, W.; Hufert, F. T. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in

- 268 nonhuman primates. *J. Virol.* 2000, 74, 5377–5381.
- 269 6. Hu, X.; Margolis, H. S.; Purcell, R. H.; Ebert, J.; Robertson, B. H. Identification of hepatitis B virus indigenous to
- 270 chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, 1661–1664.
- 271 7. MacDonald, D. M.; Holmes, E. C.; Lewis, J. C.; Simmonds, P. Detection of hepatitis B virus infection in wild-
- 272 born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes.
- 273 *J. Virol.* 2000, 74, 4253–7.
- 274 8. Summers, J.; Smolec, J. M.; Snyder, R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and
- 275 hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978, 75, 4533–7.
- 276 9. Marion, P. L.; Oshiro, L. S.; Regnery, D. C.; Scullard, G. H.; Robinson, W. S. A virus in Beechey ground squirrels
- 277 that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980, 77, 2941–5.
- 278 10. Trueba, D.; Phelan, M.; Nelson, J.; Beck, F.; Pecha, B. S.; Brown, R. J.; Varnus, H. E.; Ganem, D. Transmission
- 279 of ground squirrel hepatitis virus to homologous and heterologous hosts. *Hepatology* 1985, 5, 435–439.
- 280 11. Lanford, R. E.; Chavez, D.; Rico-Hesse, R.; Mootnick, a Hepadnavirus infection in captive gibbons. *J. Virol.*
- 281 2000, 74, 2955–2959.
- 282 12. Drexler, J. F.; Geipel, A.; Konig, A.; Corman, V. M.; van Riel, D.; Leijten, L. M.; Bremer, C. M.; Rasche, A.;
- 283 Cottontail, V. M.; Maganga, G. D.; Schlegel, M.; Müller, M. A.; Adam, A.; Klose, S. M.; Carneiro, A. J.; Stocker, A.;
- 284 Franke, C. R.; Gloza-Rausch, F.; Geyer, J.; Annan, A.; Adu-Sarkodie, Y.; Opong, S.; Binger, T.; Vallo, P.;
- 285 Tschapka, M.; Ulrich, R. G.; Gerlich, W. H.; Leroy, E.; Kuiken, T.; Glebe, D.; Drosten, C. Bats carry pathogenic
- 286 hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc. Natl.*
- 287 *Acad. Sci. U. S. A.* 2013, 110, 16151–16156.
- 288 13. Mason, W. S.; Aldrich, C.; Summers, J.; Taylor, J. M. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in
- 289 liver cells: Free minus-strand DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1982, 79, 3997–4001.
- 290 14. Jilbert, A. R. R.; Freiman, J. S. S.; Gowans, E. J. J.; Holmes, M.; Cossart, Y. E. E.; Burrell, C. J. J. Duck hepatitis B
- 291 virus DNA in liver, spleen, and pancreas: Analysis by in situ and southern blot hybridization. *Virology* 1987, 158,
- 292 330–338.
- 293 15. Sprengel, R.; Kaleta, E. F.; Will, H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J.*
- 294 *Virol.* 1988, 62, 3832–9.
- 295 16. Chang, S. F.; Netter, H. J.; Bruns, M.; Schneider, R.; Frölich, K.; Will, H. A new avian hepadnavirus infecting
- 296 snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA.
- 297 *Virology* 1999, 262, 39–54.
- 298 17. Pult, I.; Netter, H. J.; Bruns, M.; Prassolov, a; Sirma, H.; Hohenberg, H.; Chang, S. F.; Frölich, K.; Krone, O.;
- 299 Kaleta, E. F.; Will, H. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* 2001, 289, 114–28.
- 300 18. Triyatni, M.; Ey, P.; Tran, T.; Le Mire, M.; Qiao, M.; Burrell, C.; Jilbert, a Sequence comparison of an
- 301 Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses. *J. Gen. Virol.* 2001, 76 (Pt 1), 211–215.
- 302 19. Guo, H.; Mason, W. S.; Aldrich, C. E.; Saputelli, J. R.; Miller, D. S.; Jilbert, A. R.; Newbold, J. E. Identification
- 303 and Characterization of Avihepadnaviruses Isolated from Exotic Anseriformes Maintained in Captivity. *J. Virol.*
- 304 2005, 79, 2729–2742.
- 305 20. Komatsu, H. Hepatitis B virus: Where do we stand and what is the next step for eradication? *World J.*
- 306 *Gastroenterol.* 2014, 8998–9016.
- 307 21. World Health Organization <http://www.who.int/topics/hepatitis/en/> (accessed Jun 4, 2016).
- 308 22. Lozano, R.; Naghavi, M.; Foreman, K.; Lim, S.; Shibuya, K.; Aboyans, V.; Abraham, J.; Adair, T.; Aggarwal, R.;
- 309 Ahn, S. Y.; Alvarado, M.; Anderson, H. R.; Anderson, L. M.; Andrews, K. G.; Atkinson, C.; Baddour, L. M.;
- 310 Barker-Collo, S.; Bartels, D. H.; Bell, M. L.; Benjamin, E. J.; Bennett, D.; Bhalla, K.; Bikbov, B.; Bin Abdulhak, A.;
- 311 Birbeck, G.; Blyth, F.; Bolliger, I.; Boufous, S.; Bucello, C.; Burch, M.; Burney, P.; Carapetis, J.; Chen, H.; Chou, D.;
- 312 Chugh, S. S.; Coffeng, L. E.; Colan, S. D.; Colquhoun, S.; Colson, K. E.; Condon, J.; Connor, M. D.; Cooper, L. T.;
- 313 Corriere, M.; Cortinovis, M.; de Vaccaro, K. C.; Couser, W.; Cowie, B. C.; Criqui, M. H.; Cross, M.; Dabhadkar, K.
- 314 C.; Dahodwala, N.; De Leo, D.; Degenhardt, L.; Delossantos, A.; Denenberg, J.; Des Jarlais, D. C.; Dharmaratne, S.
- 315 D.; Dorsey, E. R.; Driscoll, T.; Duber, H.; Ebel, B.; Erwin, P. J.; Espindola, P.; Ezzati, M.; Feigin, V.; Flaxman, A. D.;
- 316 Forouzanfar, M. H.; Fowkes, F. G. R.; Franklin, R.; Fransen, M.; Freeman, M. K.; Gabriel, S. E.; Gakidou, E.;
- 317 Gaspari, F.; Gillum, R. F.; Gonzalez-Medina, D.; Halasa, Y. A.; Haring, D.; Harrison, J. E.; Havmoeller, R.; Hay, R.
- 318 J.; Hoen, B.; Hotez, P. J.; Hoy, D.; Jacobsen, K. H.; James, S. L.; Jasrasaria, R.; Jayaraman, S.; Johns, N.; Karthikeyan,
- 319 G.; Kassebaum, N.; Keren, A.; Khoo, J.-P.; Knowlton, L. M.; Kobusingye, O.; Koranteng, A.; Krishnamurthi, R.;
- 320 Lipnick, M.; Lipshultz, S. E.; Ohno, S. L.; Mabweijano, J.; MacIntyre, M. F.; Mallinger, L.; March, L.; Marks, G. B.;

- 321 Marks, R.; Matsumori, A.; Matzopoulos, R.; Mayosi, B. M.; McAnulty, J. H.; McDermott, M. M.; McGrath, J.;
 322 Mensah, G. A.; Merriman, T. R.; Michaud, C.; Miller, M.; Miller, T. R.; Mock, C.; Mocumbi, A. O.; Mokdad, A. A.;
 323 Moran, A.; Mulholland, K.; Nair, M. N.; Naldi, L.; Narayan, K. M. V.; Nasser, K.; Norman, P.; O'Donnell, M.;
 324 Omer, S. B.; Ortblad, K.; Osborne, R.; Ozgediz, D.; Pahari, B.; Pandian, J. D.; Rivero, A. P.; Padilla, R. P.; Perez-
 325 Ruiz, F.; Perico, N.; Phillips, D.; Pierce, K.; Pope, C. A.; Porrini, E.; Pourmalek, F.; Raju, M.; Ranganathan, D.;
 326 Rehm, J. T.; Rein, D. B.; Remuzzi, G.; Rivara, F. P.; Roberts, T.; De León, F. R.; Rosenfeld, L. C.; Rushton, L.; Sacco,
 327 R. L.; Salomon, J. A.; Sampson, U.; Sanman, E.; Schwebel, D. C.; Segui-Gomez, M.; Shepard, D. S.; Singh, D.;
 328 Singleton, J.; Sliwa, K.; Smith, E.; Steer, A.; Taylor, J. A.; Thomas, B.; Tleyjeh, I. M.; Towbin, J. A.; Truelsen, T.;
 329 Undurraga, E. A.; Venketasubramanian, N.; Vijayakumar, L.; Vos, T.; Wagner, G. R.; Wang, M.; Wang, W.; Watt,
 330 K.; Weinstock, M. A.; Weintraub, R.; Wilkinson, J. D.; Woolf, A. D.; Wulf, S.; Yeh, P.-H.; Yip, P.; Zabetian, A.;
 331 Zheng, Z.-J.; Lopez, A. D.; Murray, C. J. L.; AlMazroa, M. A.; Memish, Z. A. Global and regional mortality from
 332 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease
 333 Study 2010. *Lancet (London, England)* 2012, 380, 2095–128.
- 334 23. Makuwa, M.; Souquière, S.; Clifford, S. L.; Mouinga-Ondeme, A.; Bawe-Johnson, M.; Wickings, E. J.; Latour, S.;
 335 Simon, F.; Roques, P. Identification of hepatitis B virus genome in faecal sample from wild living chimpanzee
 336 (*Pan troglodytes troglodytes*) in Gabon. *J. Clin. Virol.* 2005, 34.
- 337 24. Li, W.; She, R.; Liu, L.; You, H.; Yin, J. Prevalence of a virus similar to human hepatitis B virus in swine. *Virol.*
 338 *J.* 2010, 7, 60.
- 339 25. Vieira, Y. R.; Fm Silva, M.; Santos, D. R.; Vieira, A. A.; Ciacci-Zanella, J. R.; Barquero, G.; Do Lago, B. V.;
 340 Gomes, S. A.; Pinto, M. A.; De Paula, V. S. Serological and molecular evidence of hepadnavirus infection in swine.
 341 *Ann. Agric. Environ. Med. Ann Agric Env. Med* 2015, 22, 11–16.
- 342 26. Tian, J.; Xia, K.; She, R.; Li, W.; Ding, Y.; Wang, J.; Chen, M.; Yin, J. Detection of Hepatitis B virus in serum and
 343 liver of chickens. *Virol J* 2012, 9, 2.
- 344 27. Suh, A.; Weber, C. C.; Kehlmaier, C.; Braun, E. L.; Green, R. E.; Fritz, U.; Ray, D. A.; Ellegren, H. Early
 345 Mesozoic Coexistence of Amniotes and Hepadnaviridae. *PLoS Genet.* 2014, 10.
- 346 28. Gilbert, C.; Meik, J. M.; Dashevsky, D.; Card, D. C.; Castoe, T. A.; Schaack, S. Endogenous hepadnaviruses,
 347 bonnaviruses and circoviruses in snakes. *Proc. Biol. Sci.* 2014, 281, 20141122.
- 348 29. Hahn, C. M.; Iwanowicz, L. R.; Cornman, R. S.; Conway, C. M.; Winton, J. R.; Blazer, V. S. Characterization of
 349 a Novel Hepadnavirus in the White Sucker (*Catostomus commersonii*) from the Great Lakes Region of the United
 350 States. *J. Virol.* 2015, 89, 11801–11811.
- 351 30. Paraskevis, D.; Angelis, K.; Magiorkinis, G.; Kostaki, E.; Ho, S. Y. W.; Hatzakis, A. Dating the origin of
 352 hepatitis B virus reveals higher substitution rate and adaptation on the branch leading to F/H genotypes. *Mol.*
 353 *Phylogenet. Evol.* 2015, 93, 44–54.
- 354 31. Bonvicino, C. R.; Moreira, M. A.; Soares, M. A. Hepatitis B virus lineages in mammalian hosts: Potential for
 355 bidirectional cross-species transmission. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 7665–7674.
- 356 32. Portilho, M. M. Desenvolvimento de testes de detecção e quantificação do vírus da hepatite B em amostras de
 357 soro e fluido oral., Instituto Oswaldo Cruz, 2013.
- 358 33. Vieira, Y. R.; dos Santos, D. R. L.; Portilho, M. M.; Velloso, C. E. P.; Arissawa, M.; Villar, L. M.; Pinto, M. A.; de
 359 Paula, V. S. Hepadnavirus detected in bile and liver samples from domestic pigs of commercial abattoirs. *BMC*
 360 *Microbiol.* 2014, 14, 1–6.
- 361 34. Niel, C.; Moraes, M. T.; Gaspar, A. M.; Yoshida, C. F.; Gomes, S. A. Genetic diversity of hepatitis B virus
 362 strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 1994, 44, 180–186.
- 363 35. Motta-Castro, A. R. C.; Martins, R. M. B.; Yoshida, C. F. T.; Teles, S. a; Paniago, A. M.; Lima, K. M. B.; Gomes,
 364 S. a Hepatitis B virus infection in isolated Afro-Brazilian communities. *J. Med. Virol.* 2005, 77, 188–93.
- 365 36. 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.;
 366 Júnior, N. C. D. M.; Guimarães, F. D. R.; Júnior, J. G. C.; Ximenes, L. L. L.; Souto, F. J. D. J. D.; Pinto, M. A.; J?nior,
 367 N. C. de M.; Guimar??es, F. de R.; J?nior, J. G. C.; Ximenes, L. L. L.; Souto, F. J. D. J. D.; Pinto, M. A. Serological
 368 and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet. J.* 2009, 182, 474–80.
- 369 37. Figueiredo, A. S.; Lampe, E.; do Espírito-Santo, M. P.; do Amaral Mello, F. C.; de Almeida, F. Q.; de Lemos, E.
 370 R. S.; Godoi, T. L. O. S.; Dimache, L. A. G.; dos Santos, D. R. L.; Villar, L. M. Identification of two phylogenetic
 371 lineages of equine hepacivirus and high prevalence in Brazil. *Vet. J.* 2015, 206, 414–416.
- 372 38. Yang, J.; Xi, Q.; Deng, R.; Wang, J.; Hou, J.; Wang, X. Identification of interspecies recombination among
 373 hepadnaviruses infecting cross-species hosts. *J. Med. Virol.* 2007, 79, 1741–1750.

- 374 39. Gerlich, W. H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology*. 2013, 10, 239.
375 40. Centers for Disease Control and Prevention <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/index.htm> (accessed Jun 4,
376 2016).
377

6. Discussão

A origem do HBV é controversa [42]. Muitas hipóteses foram propostas para sugerir como o vírus emergiu, baseadas na taxa de evolução viral e nas sequências nucleotídicas de hepadnavírus de hospedeiros já descritos na literatura. Embora estudos prévios indiquem que a infecção pelo HBV seja restrita a uma limitada gama de hospedeiros [154], a literatura relata a sua circulação no homem e em algumas espécies de macacos [204], como chimpanzés (*Pan troglodytes*), gibões (*Hylobates sp.*), gorilas (*Gorilla gorilla*) e orangotangos (*Pongo pygmaeus*) [24,154]. Contribuindo para essa distribuição, sabe-se que os passos iniciais da infecção pelo HBV relacionados à adesão das partículas virais aos hepatócitos têm um papel crítico na especificidade das espécies de hospedeiros [231].

Em paralelo a esse conhecimento, novos estudos têm demonstrado que a lista de possíveis hospedeiros ao HBV ou vírus similares pode ser maior do que supostamente se imaginava. Em 2010, Li e colaboradores descreveram a infecção por um vírus similar ao HBV em porcos na China. Tal infecção foi demonstrada através de ELISA para os marcadores HBsAg, anti-HBs, HBe, anti-HBe e anti-HBc, além de imunohistoquímica para HBsAg e HBcAg em cortes de fígado, bem como detecção de partículas virais através de microscopia eletrônica de transmissão no soro dos animais. Entretanto, Li *et al* não realizaram ensaios moleculares [22]. Nesse cenário, um dos nossos objetivos preliminares, iniciados durante o mestrado no laboratório, foi investigar a infecção por hepadnavírus em suínos domésticos de rebanhos brasileiros por meio de testagem sorológica, e evidenciar molecularmente a presença do DNA do hepadnavírus, a fim de estabelecer seu relacionamento genético com os hepadnavírus previamente descritos na literatura (Artigo 1).

Diferentes marcadores sorológicos ou combinações de marcadores são usados para identificar as infecções aguda e crônica pelo HBV em amostras humanas (CDC, 2005) [203]. O marcador HBsAg é o sinal mais precoce da infecção pelo HBV, útil para identificar a infecção ativa. O marcador anti-HBc é útil para estudos epidemiológicos, e indica o contato atual ou exposição prévia ao vírus. No caso de janela imunológica e infecção oculta, já que os níveis de HBsAg são indetectáveis e a carga viral é baixa, o diagnóstico molecular tem sido descrito como uma ferramenta útil para a detecção, em combinação com a triagem sorológica [204]. Por essa razão, tanto os ensaios sorológicos quanto os moleculares foram executados no nosso primeiro estudo, envolvendo 376 amostras de soro de suínos brasileiros.

Em função do elevado número de animais, optamos por realizar uma triagem sorológica inicial. A triagem sorológica para anti-HBc revelou que 7,45% (28/376) dos suínos foram expostos ao vírus. Se as amostras classificadas como indeterminadas pelo teste de

ELISA fossem consideradas potencialmente positivas, a serem confirmadas posteriormente por outra ferramenta metodológica, a prevalência poderia aumentar mais 4,52% (17/376). Usando o teste HBsAg, apenas 0,8% (3/376) das amostras foram positivas e 0,53% (2/376) foram indeterminadas. De acordo com a literatura, o anti-HBc reagente, associado ao HBsAg não reagente pode representar que há uma infecção em curso escondida do sistema imune, com conseqüente baixo nível de quantificação do HBV na circulação, refletindo um resultado HBsAg não reagente [204]. Com relação à avaliação de anti-HBs, 1,60% (6/376) dos suínos foram soro-reativos. No entanto, dependendo do período da infecção, o título de anticorpos neutralizantes não é detectável, como ocorre no caso de janela imunológica [204].

Os dados sorológicos iniciais demonstram que os suínos brasileiros foram expostos previamente a um vírus similar ao HBV, como observado por Li e colaboradores em rebanhos da China, onde 63,9% dos animais analisados demonstraram reatividade ao anti-HBc [22]. No referido trabalho, dadas as taxas similares de infecção entre humanos e os animais na mesma região, pesquisadores já levantavam a questão se os porcos poderiam contribuir como reservatórios para a manutenção da circulação do vírus na natureza, tal como ocorre com primatas não-humanos em áreas endêmicas [154,232].

As amostras analisadas no nosso primeiro estudo vieram das regiões Sul e Sudeste do Brasil, onde a prevalência da infecção aguda varia entre 0,3 a 0,5% na população humana. Embora caracterizadas como áreas de baixa endemicidade, essas regiões concentram 68,2% das notificações nesse período [233]. Semelhante ao estudo de Li *et al.*, as taxas de infecção encontradas nos animais do nosso estudo foram semelhantes às taxas verificadas nas regiões de procedência (menores que 2%).

Com o objetivo de confirmar a possibilidade de infecção, a detecção do genoma viral foi executada em todas as amostras reagentes ou indeterminadas para o teste de ELISA. Dado que o estudo de Li e colaboradores foi pioneiro na demonstração da infecção em suínos, mas não originou sequências nucleotídicas do vírus circulante, nosso grupo optou pela otimização inicial de uma reação de PCR interespecífica para o gênero *Orthohepadnavírus*, a fim de aumentar a chance de recuperação da cepa que eventualmente estivesse presente na população estudada.

Em função do limite de detecção encontrado para esse par de oligonucleotídeos interespecíficos, cerca de 10^6 cópias/mL (dados não publicados), e a fim de aumentar a sensibilidade da nossa detecção molecular, além da estratégia inicial de PCR de gênero, também executamos a reação de amplificação *semi-nested* utilizada para o diagnóstico de infecção pelo HBV humano, cujo limite de detecção corresponde a 10^3 cópias/mL.

Com isso, das 49 amostras testadas para o PCR, em duas amostras foram encontrados produtos esperados de PCR de 1100 pb usando oligonucleotídeos para o diagnóstico do HBV humano, descritos por [234,235]. Comparando a detecção genômica com a sorologia (Tabela IV – Artigo 1), uma amostra foi caracterizada como positiva para anti-HBc e HBsAg (SW 216), indicando infecção ativa; e outra amostra (JW45) foi classificada como reagente para anti-HBc e anti-HBs, indicando imunidade para hepatite B devido à infecção passada.

Usando o par de oligonucleotídeos interespecíficos desenhados nesse estudo, duas amostras adicionais (SW170 e SW203) exibiram produtos de PCR esperados de 429 pb. Ambas as amostras foram caracterizadas como indeterminadas no teste de ELISA para o marcador anti-HBc. A presença de anti-HBc indica infecção prévia ou em curso pelo HBV em um período de tempo não definido.

Em três amostras (SW216, SW170, SW203) foi possível confirmar a presença do DNA do hepadnavírus através do sequenciamento nucleotídico parcial de 360 nt do genoma. Embora a amostra JW45 tenha sido amplificada por ambas as estratégias de PCR, acredita-se que nesse caso o sequenciamento não foi possível devido à baixa concentração de DNA detectado. Os resultados de PCR e os marcadores sorológicos encontrados para esse animal sugerem que o mesmo estava no final da infecção, e possivelmente apresentava uma baixa carga viral.

A reconstrução filogenética indicou que as sequências de hepadnavírus obtidas a partir dos porcos nesse estudo estavam estreitamente relacionadas às sequências do HBV de amostras humanas. A matriz de identidade de nucleotídeos confirmou uma maior similaridade de hepadnavírus oriundos dos porcos com as sequências do HBV humano (de 90,8% a 96,3%), do que com os hepadnavírus de primatas não humanos (84,1% a 90,8%) e roedores (70,7% a 72,4%). Entretanto, cabe ressaltar que a alta porcentagem de identidade encontrada pode ser atribuída ao fato de que o produto de sequenciamento obtido nesse estudo é oriundo de uma região de alta conservação no gênero *Orthohepadnavirus*, correspondente à região S, estabelecida como alvo para a PCR interespecífica, cujo comprimento correspondia a aproximadamente 11,2% do genoma do HBV.

Curiosamente, quando uma árvore filogenética foi construída comparando as sequências obtidas dos vírus dos suínos brasileiros com as cepas do HBV humano previamente genotipadas, as amostras dos animais puderam ser atribuídas a dois grupos de genótipos distintos. Duas delas posicionaram-se próximas ao genótipo A, o mais prevalente no Brasil [236]. E a outra foi similar a amostras que pertenciam ao genótipo G, comum em países como EUA, México e França e descrito em casos de coinfeções com outros genótipos, principalmente com o genótipo A [237].

Entretanto, cabe ressaltar que o tamanho do fragmento amplificado nesse estudo não é suficiente para a genotipagem do HBV. O completo sequenciamento da região pré-S/S do HBV mais do que somente a região S poderia fornecer uma informação mais acurada e permitir hipóteses sobre sua origem evolutiva. A amplificação do genoma completo ou do gene que codifica o antígeno de superfície é requerida para a classificação do HBV em genótipos [48].

Com o objetivo de descartar uma eventual hipótese de contaminação, controles positivos para o HBV não foram incluídos nas baterias de extração de DNA e PCR que envolviam as amostras dos animais. Além de serem manipulados separadamente, o sequenciamento parcial do genoma demonstrou que as sequências obtidas dos animais não eram idênticas a esses controles.

Nosso primeiro trabalho mostrou, portanto, pela primeira vez, a evidência molecular de um vírus similar ao HBV circulando em suínos oriundos de rebanhos comerciais, detectado por PCR qualitativo e confirmado por sequenciamento parcial do genoma viral. A similaridade com as sequências do HBV humano foi confirmada por análises filogenéticas, e reatividade cruzada em ensaios sorológicos comerciais não hospedeiro-específicos, assim classificados em função das informações disponibilizadas pelo fabricante a respeito dos princípios dos diferentes ensaios.

Em seguida, com o intuito de refinar a caracterização molecular do potencial novo hepadnavírus circulante em suínos no Brasil e, a fim de comprovar a presença antigênica *in situ*, nosso grupo optou por explorar a detecção viral em amostras pareadas de bile e fígado oriundas de 36 suínos de diferentes matadouros do estado do Rio de Janeiro (Artigo 2), após a anuência do Serviço de Inspeção Estadual (SIE)/ RJ.

De forma diferenciada à metodologia empregada no primeiro estudo, nós buscamos a caracterização molecular de duas ORFs distintas do genoma viral, correspondentes às ORFs S e C completas, a quantificação da carga viral através de PCR em Tempo Real e a detecção antigênica no parênquima hepático através de imunofluorescência indireta.

Dos 36 animais avaliados para os PCRs qualitativos, 4 (11,1%) exibiram produtos esperados de PCR de 1100 pb, referentes à ORF S, em suas amostras pareadas de bile e fígado. Desse total, 3 (75%) permaneceram positivos para o PCR de 431 pb, referente à ORF C, em suas respectivas amostras pareadas. Para todos os animais testados positivamente, foi possível confirmar a presença do DNA do hepadnavírus através do sequenciamento nucleotídico parcial do genoma de 972 nt (ORF S) e 392 nt (ORF C). Com isso, foi possível verificar não só que as sequências nucleotídicas encontradas em ambos os espécimes clínicos

de cada animal coincidiram, descartando uma eventual hipótese de contaminação, mas também que distintas cepas podem ser responsáveis pela infecção em porcos domésticos.

Nesse estudo, os resultados moleculares de um fragmento maior e mais representativo do genoma (972 nt), comparativamente ao nosso primeiro trabalho (360 nt), nos permitiu calcular uma identidade mais aproximada não somente com o HBV do hospedeiro humano, mas também com outros vírus que compreendem a família *Hepadnaviridae*: 98,9-99,7% com o HBV humano, 93,7-96,1% com o HBV de Chimpanzés, 91,8-95,3% com o HBV de Gibões, 94,2-95,1% com o HBV de Gorilas, 91,1-92,9% com o HBV de Orangotangos, 84,8-85,1% com o vírus similar WMHBV do macaco-barrigudo, 68,9%-75,6% com o vírus similar RBHBV/HBHBV/TBHBV de morcegos, 70,5-71,8% com o vírus similar WHV de marmotas, 70,9-71,6% com o vírus similar ASHV/ GSHV de esquilos, 47,4-48,6% com o vírus similar HHBV de garças, 46,4-47,1% com o vírus STHBV de cegonhas, 45,8-46,5% com o vírus similar GHBV de gansos, 46,1-47,6% com o vírus similar DHBV de patos (Figura 1, Tabela 1 – Artigo 2).

Os dados das distâncias genéticas são relevantes e precisam ser melhor investigados uma vez que, apesar da diversidade de hospedeiros, nenhum reservatório foi descrito para o HBV até agora. Além disso, a suinocultura é de importância econômica para a indústria alimentícia no Brasil. Como os suínos comerciais são abatidos em idade jovem (até 22 semanas de vida), a identificação de qualquer sinal clínico de doença pode ser mascarada, já que a fiscalização de saúde dos animais pelos inspetores oficiais é limitada à revisão de lesões visíveis presentes nos rebanhos e em exames macroscópicos *pós-mortem* nos matadouros. Testes moleculares não são executados. Devido a esses fatores, talvez um estudo de acompanhamento dos animais por períodos maiores deve ser considerado.

Em seguida, a avaliação da carga viral nas amostras de bile por PCR em Tempo Real resultou em valores estimados entre $0,8 \times 10^3$ e 1×10^5 cópias/ mL. Os resultados de baixa carga viral eram esperados para a população de suínos desde a nossa experiência inicial em nosso primeiro estudo (Artigo 1), no qual não só encontramos uma parcela de animais anti-HBc reagentes/ HBsAg não reagentes, como também em função da baixa porcentagem de animais positivos por PCR qualitativo naquele estudo, cuja infecção foi posteriormente confirmada através do sequenciamento nucleotídico parcial do genoma. A baixa carga viral encontrada em suínos pode sugerir que a espécie *Sus scrofa* funcione como reservatório de hepadnavírus, capaz de ser infectada mas não desenvolver doença hepática.

Por se tratar de um estudo retrospectivo, não foi possível acompanhar a infecção nos animais, ou avaliar novas espécimes clínicas, uma vez que os mesmos já haviam sido abatidos. E, assim como no primeiro estudo, medidas semelhantes foram assumidas, visando

descartar chances de contaminação: controles positivos para o HBV também não foram incluídos nas análises moleculares que envolviam as amostras dos animais. Além de serem manipulados separadamente, o sequenciamento parcial do genoma mais uma vez demonstrou que as sequências obtidas dos animais não eram idênticas a esses controles.

Por fim, ensaios de detecção antigênica *in situ* confirmaram que os suínos estavam infectados por hepadnavírus com comportamento hepatotrópico. As biópsias hepáticas dos animais positivos para o DNA do hepadnavírus revelaram através de imunofluorescência indireta a presença de HBsAg na membrana celular e citoplasma dos hepatócitos (Figura 3 – Artigo 2).

Tentativas de detecção antigênica também foram realizadas através de *Dot blot* nas respectivas amostras de bile testadas positivamente para PCR. Entretanto, mesmo após o processo de diálise do material com membranas específicas, não foi possível eliminar o excesso de sais biliares e pigmentos, os quais podem ter interferido nas análises, cujo resultado foi inconclusivo.

Cabe ressaltar que a investigação da população de animais de três rebanhos comerciais distintos foi executada a partir de uma única coleta, e que 11,11% dos suínos mostraram diagnóstico molecular positivo, no qual o hepatotropismo também foi confirmado. Esses animais positivos estavam distribuídos em dois matadouros distintos, que não compartilhavam a mesma fazenda fornecedora de porcos.

Como os animais positivos dentro do mesmo matadouro vieram de um mesmo rebanho, a possibilidade de uma eventual transmissão vertical não pode ser descartada. Entretanto, como há diferentes reprodutoras em uma mesma fazenda, os animais destinados a um mesmo matadouro podem ter nascido de diferentes matrizes. Como o nosso grupo não teve acesso às fazendas fornecedoras, não foi possível investigar a infecção nas reprodutoras. Para considerar o risco de transmissão vertical nessas fazendas, os porcos com diagnóstico positivo também deveriam compartilhar o mesmo genótipo.

Nesse estudo, três animais positivos vieram de Itaperuna. Um animal foi atribuído ao genótipo E, e dois animais ao genótipo A (Figura 2 – Artigo 2). Devido à circulação de ambos os genótipos em suínos do mesmo matadouro, podemos considerar que pelo menos duas matrizes diferentes estavam envolvidas na sua respectiva fazenda fornecedora. Mesmo assim, a transmissão vertical para os dois animais do genótipo A não pode ser confirmada.

Sabendo-se que não há reservatórios descritos para o HBV até o momento, e uma vez que o papel dos morcegos como reservatórios de vírus zoonóticos, incluindo hepadnavírus [24] está sendo investigado, estudos são necessários para avaliar se os suínos também poderiam assumir essa função. Diante dessa possibilidade, também é necessário investigar a

habilidade zoonótica das cepas suínas de hepadnavírus e a capacidade deste vírus induzir infecção cruzada em outras espécies. Sendo assim, considerando as principais rotas de transmissão do HBV, e o fato de que os equipamentos de proteção individual não são frequentemente usados em matadouros, novos estudos são necessários para avaliar um potencial risco ocupacional de infecção por hepadnavírus durante o manejo de porcos e seus derivados.

Em função dessa lacuna de conhecimento, após a aprovação em Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), registrado sob parecer 275.608/2013, em uma nova visita aos mesmos matadouros, nosso grupo realizou uma investigação epidemiológica para os marcadores sorológicos e moleculares do HBV na população envolvida no processo de evisceração dos animais e na manipulação de embutidos. Dentre o grupo de trabalhadores presente nos matadouros nos dias da coleta, envolvidos diretamente na manipulação dos animais, 91,7 % (11/12) aceitaram participar da investigação após a assinatura do TCLE e participação em questionário epidemiológico. Desse total, 9,09% (1/11) demonstrou estar vacinado contra o vírus HBV, conforme questionário respondido pelo participante e confirmado posteriormente pelo resultado sorológico. Nenhum indivíduo (0/11) apresentou indícios de contato passado com o vírus HBV ou infecção ativa (dados não publicados). Dado que o quadro de trabalhadores dos matadouros pode ter sido modificado ao longo dos anos, nossa investigação pode não ter incluído os indivíduos presentes quando a primeira coleta foi realizada, a qual originou amostras positivas dos animais. Cabe destacar que os indivíduos susceptíveis foram encaminhados à vacinação.

Com os dados encontrados para ambos os estudos (Artigos 1 e 2), não foi possível revelar se a detecção de hepadnavírus em suínos pode representar um risco potencial para a saúde humana. Embora a rota de transmissão não esteja clara, a domesticação poderia favorecer o compartilhamento mútuo de hepadnavírus entre homens e animais. Essa hipótese é suportada pela habilidade de o HBV cruzar barreiras de espécies [226] e alterar sua patogenicidade e transmissão através de erros no ciclo replicativo e recombinação interespecífica [22]. Esses eventos têm sido descritos entre cepas do HBV de humanos e primatas não-humanos, e entre cepas de hepadnavírus de pássaros de diferentes subfamílias [154]. Portanto, o contato estreito do homem com os suínos comparado a outros animais de ocorrência natural do HBV poderia favorecer esses episódios.

Essa habilidade de cruzar barreiras de diferentes espécies é amplamente conhecida para os vírus Influenza, Hantavirus, vírus da Língua Azul e febre do Oeste do Nilo [227,238]. Focando no vírus Influenza, pesquisadores discutem a competência desse vírus circulante em hospedeiros mamíferos de evoluir devido às mutações durante o processo replicativo e ao

rearranjo com vírus animais. Com relação ao papel dos suínos na circulação zoonótica, acredita-se que eles poderiam atuar como reservatórios para adaptação de vírus aviários, tanto pelo rearranjo com vírus humanos e suínos ou através de mudanças adaptativas [236]. No entanto, a emergência de cepas dentro da população humana requer que as novas cepas sejam capazes de se replicar e serem transmitidas eficientemente entre humanos para merecer atenção e monitoramento.

O HEV, outro clássico vírus hepatotrópico, tem provado ser comum em rebanhos suínos brasileiros [239,240]. Estudos nacionais indicam uma provável transmissão zoonótica de cepas suínas em áreas urbanas da região sudeste do Brasil em casos esporádicos humanos de hepatite aguda [241].

A confirmação de que os suínos também são hospedeiros naturais de hepadnavírus pode contribuir para revelar os mecanismos de replicação, patogênese e novas drogas antivirais em modelos animais experimentais para o estudo do HBV, que é atualmente restrito a chimpanzés. Devido à similaridades anatômicas e fisiológicas com os humanos, a espécie *Sus scrofa* apresenta um papel significante como animal experimental para investigação biomédica.

Com o nosso segundo trabalho, foi possível a caracterização molecular de hepadnavírus suíno em amostras de fígado e bile. Até o momento, não havia dados disponíveis na literatura relacionados à caracterização molecular de hepadnavírus circulantes em suínos no que tange à determinação da sequência nucleotídicas do gene do core do vírus, à classificação genotípica baseada no sequenciamento completo da região Pré-S/S, à avaliação da carga viral em suínos de matadouros, e ao hepatotropismo viral nessa população hospedeira.

Em função dos dados encontrados até agora em ambos os estudos sobre a evidência da circulação de hepadnavírus em populações de suínos domésticos no Brasil, nosso grupo decidiu, por fim, expandir a investigação para uma nova amostragem animal, mais diversificada. Para isso, optamos por investigar a circulação de hepadnavírus em novas espécies de animais domésticos de importância econômica, bem como animais selvagens e/ou exóticos, de vida livre, incluindo os suínos selvagens, os quais ainda não foram descritos na literatura como hospedeiros do vírus em questão, oriundos de diferentes localidades do Brasil e do Uruguai.

Com isso, nossos objetivos seriam avaliar a circulação de hepadnavírus em animais domésticos e selvagens, detectar, quantificar e caracterizar molecularmente os DNAs de hepadnavírus encontrados e, por fim, estabelecer as relações filogenéticas entre os DNAs dos hepadnavírus determinados no estudo e os previamente conhecidos.

Para esse estudo (Artigo 3), a nossa população era composta de 422 amostras de soro de animais de diferentes regiões do Brasil e do Uruguai, as quais foram testadas usando as mesmas ferramentas sorológicas e moleculares empregadas nos estudos anteriores. Entretanto, dessa vez, mesmo com o elevado número de animais, os ensaios sorológicos foram realizados paralelamente aos ensaios moleculares, e não mais como uma ferramenta de triagem.

Nesse estudo, a porcentagem de amostras de soro reagentes para o marcador anti-HBc total (9,24%) revela que tanto as populações de animais domésticos (Grupo A), criados em fazendas ou confinados, quanto a de animais selvagens (Grupo B), de vida livre, tiveram contato prévio com o vírus, com taxas de 9,50% (19/200) e 9,01% (20/222), respectivamente. Percebemos, também, que ambos os grupos de estudo apresentaram taxas similares de exposição à infecção, correspondentes a 48,72% (19/39) e 51,28% (20/39), respectivamente.

Considerando o Grupo A, composto de animais de pecuária, nosso terceiro trabalho corresponde ao primeiro registro de circulação de hepadnavírus em rebanhos de suínos domésticos do Uruguai e em cavalos do Brasil. Não existem registros anteriores disponíveis na literatura. Nossos achados mais recentes corroboram não só os nossos estudos anteriores, mas também o que a literatura já vem demonstrando, por meio das evidências sorológicas e/ou moleculares da circulação de um vírus similar ao HBV em rebanhos suínos na China [22], no Brasil [229,230], e em galinhas na China [242]. Além disso, outros vírus causadores de hepatites já foram demonstrados em populações de animais domésticos, como o HEV em rebanhos suínos [240] e o vírus similar ao HCV em cavalos no Brasil [243].

Com relação ao Grupo B, nossos achados também revelam de forma pioneira a circulação de hepadnavírus em novas espécies de animais de vida livre no Brasil, como os porcos selvagens, os cães domésticos, o cachorro do mato, a onça, o lobo-guará e o mão-pelada. Para essas espécies, também não há registros disponíveis na literatura.

A presença do marcador anti-HBc total na população de porcos selvagens indica que há evidência da circulação natural de hepadnavírus em animais de vida livre, independente da ausência de contato estreito com o homem. Esse marcador sorológico também foi encontrado em outros animais selvagens investigados nesse estudo, como a onça, o cachorro do mato, o mão-pelada e o lobo-guará, assim como os cães domésticos utilizados no manejo do gado e na caça. Embora sejam animais domésticos, os cães do Pantanal têm acesso livre aos ambientes onde os animais selvagens circulam. Eles são empregados na caça dos porcos selvagens, quando são expostos ao sangue e alimentados com vísceras e carne dos animais recém-abatidos. Devido à sua ecologia alimentar e comportamento, os carnívoros também estariam sob risco de infecção através da caça e predação.

Esses dados são consistentes com os registros de espécies de mamíferos e aves que albergam o HBV e vírus similares [24,154]. Hospedeiros já descritos como primatas não-humanos, roedores e pássaros são animais de vida livre, que não estão em contato estreito com o homem. Além desses, também foram reportadas evidências do genoma de hepadnavírus endógeno em cobras, tartarugas, crocodilianos, peixes e anfíbios [1,25,39,40], reafirmando a sua circulação zoonótica e natural. Reunidos, esses dados também sugerem que mamíferos, pássaros, répteis, anfíbios e peixes devem ser considerados em estudos de dinâmica populacional e evolução de hepadnavírus.

No nosso estudo, a incidência de HBsAg no rebanho foi de 2,67% para suínos e 3,20% para equinos. Comparando com os dados disponíveis na literatura, baixas taxas de infecção em animais de pecuária também foram encontradas nos rebanhos suínos das regiões Sul e Sudeste do Brasil (0,8%) [229], áreas de baixa endemicidade para o HBV. Em regiões altamente endêmicas como ocorre na China, a prevalência de HBsAg em rebanhos suínos foi mais alta (24.8%) [22].

Com relação aos animais de vida selvagem, 7,14% dos cães domésticos, 24,59% dos porcos selvagens e a única onça avaliada do Brasil foram positivos para o marcador HBsAg. A maior porcentagem de infecção para esse grupo comparado ao grupo de animais domésticos (11,71% *versus* 3%) permite conjecturar a existência de animais selvagens que atuem como reservatório do vírus, constituindo, assim, uma fonte natural de infecção que deveria ser investigada futuramente.

Resultados reagentes para ambos os marcadores anti-HBc total e HBsAg demonstram que haviam animais infectados quando a coleta foi executada, como ocorreu para 2,67% (2/75) dos suínos domésticos do Uruguai, e em 5,71% (8/140) dos cães domésticos e em 6,56% (4/61) dos porcos-selvagens do Brasil. Uma vez que os animais HBsAg reagentes não foram acompanhados, não foi possível confirmar infecção aguda ou crônica. Além disso, como o volume disponível das amostras era limitado, também não foi possível avaliar os casos de imunidade devido à soroconversão para anti-HBs.

Animais HBsAg reagentes e anti-HBc total não reagentes podem indicar a possibilidade de infecção recente. Nesse caso, como a infecção é precoce, anticorpos contra o antígeno do core do HBV (anti-HBc) não apresentam título suficiente para serem detectados como reagentes [71]. Esse resultado foi verificado para 3,20% (4/125) dos cavalos, 1,43% (2/140) dos cães domésticos, e em 18,03 % (11/61) dos porcos selvagens do Brasil.

Animais HBsAg não reagentes e anti-HBc total reagentes podem indicar um período de infecção mais avançado, quando o HBsAg está diminuindo, como ocorre na infecção aguda em resolução, e podem até mesmo desaparecer como ocorre nas infecções resolvidas,

em casos de imunidade devido à infecção natural e nas infecções crônicas de baixa carga viral [71,203]. Esse resultado foi verificado para 3,20% (4/125) dos cavalos, 2,86% (4/140) dos cães domésticos e 3,28% (2/61) dos porcos selvagens do Brasil.

Considerando os resultados do PCR em Tempo Real, 5,21% (22/422) das amostras de soro foram consideradas positivas para o DNA do hepadnavírus, sendo 18,18% (4/22) pertencentes ao grupo A e 81,81% (18/22) ao grupo B. Dentro do grupo A, 1,34% (1/75) dos porcos domésticos do Uruguai e 2,40% (3/125) dos cavalos do Brasil foram positivos. Dentro do grupo B, 7,14% (10/140) dos cães domésticos, 11,48% (7/61) dos suínos selvagens e 16,67% (1/6) dos cachorros do mato foram positivos.

Dados moleculares comparando as espécies domésticas e de vida livre, tanto da família *Canidae* quanto dos porcos *Sus scrofa* de diferentes ambientes, permitem especular que hepadnavírus podem ter se originado em ambiente selvagem. Curvas sigmóides das amostras positivas cruzaram a linha de *threshold* entre 37 - 41 ciclos de amplificação, sugerindo uma baixa carga viral. Provavelmente devido a isso, todas as amostras de soro de animais domésticos e selvagens nos grupos de estudo foram testadas negativas para o PCR qualitativo. A sensibilidade do diagnóstico molecular nesse estudo foi consistente com aquela obtida em nossos estudos anteriores para animais domésticos, de cerca de 10^3 cópias/mL no PCR qualitativo e 5×10^1 cópias/ uL no PCR em Tempo Real [230].

Embora o PCR qualitativo direcionado à amplificação dos genes pré-S/S e do core não tenha confirmado a infecção ativa, numerosas partículas esféricas e filamentosas liberadas durante o ciclo replicativo do HBV podem ser responsáveis pelo diagnóstico sorológico reagente para HBsAg. Além disso, os níveis de HBsAg diminuem mais lentamente que o HBV-DNA, porque essas partículas têm uma meia-vida mais longa no soro [71].

Sabe-se que hepadnavírus são agentes zoonóticos circulantes em diferentes espécies hospedeiras, domésticas e selvagens. A demonstração da presença desses agentes infecciosos em novas espécies de vida livre mostra o quão complexo pode ser o seu ciclo de transmissão, devido ao envolvimento de múltiplas espécies de hospedeiros, e pode até mesmo contribuir para estudos moleculares dentro da família *Hepadnaviridae*, e para hipóteses sobre a origem ainda imprecisa do HBV e sua escala de tempo evolutiva.

Resultados sorológicos e moleculares dos nossos estudos sugerem que a lista de novos hospedeiros ou reservatórios para o vírus similar ao HBV pode aumentar. Os nossos achados mais recentes para animais selvagens sugerem que, futuramente, estudos epidemiológicos focados em agentes zoonóticos encontrados em animais de vida livre devem ser realizados.

7. Perspectivas

Diante dos resultados obtidos em nossos trabalhos, algumas questões inevitáveis são suscitadas, como a relevância em termos de saúde pública dessas evidências de circulação zoonótica de hepadnavírus em novos hospedeiros domésticos e selvagens.

Para responder essas lacunas de conhecimento, esforços dirigidos para o sequenciamento nucleotídico completo do genoma das cepas devem ser intensificados, principalmente através de ferramentas de sequenciamento de nova geração (NGS). Diante dessa informação, poderemos esclarecer, futuramente, se esse vírus corresponde de fato ao HBV, qual sua origem mais provável, e se ele é fruto de recombinação entre cepas de diferentes hospedeiros.

Além disso, tentativas de infecção experimental com o HBV em suínos devem ser executadas, a fim de esclarecer se os mesmos desenvolvem a infecção, e se podem contribuir para futuros estudos relacionados à hepatite B, uma vez que representariam um modelo animal de mais fácil acesso, manejo e de menor custo em comparação com os chimpanzés.

8. Conclusões

- O presente trabalho demonstrou evidências sorológicas e moleculares de circulação de um vírus similar ao HBV em animais domésticos e selvagens;
- A infecção ativa por hepadnavírus, determinada pela pesquisa de HBsAg em amostras de soro, foi demonstrada, inicialmente, em 0,8% dos suínos do Brasil e, em seguida, em 2,67% dos suínos domésticos do Uruguai, em 3,20% dos cavalos, em 7,14% dos cães domésticos, em 24,59% dos suínos selvagens e, na única amostra de onça do Brasil;
- A pesquisa de anticorpos anti-HBc total em amostras de soro indicou uma infecção prévia por hepadnavírus em 7,54% dos suínos brasileiros estudados inicialmente e, em seguida, em 20% dos suínos domésticos do Uruguai, em 3,20% dos cavalos, em 8,57% dos cães domésticos, em 9,84% dos suínos selvagens, em 50% dos lobos-guará e na única amostra do mão-pelada do Brasil;
- A presença do DNA do hepadnavírus foi detectada em 1,06% das amostras de soro dos suínos brasileiros, em 11,11% das amostras pareadas de bile e fígado dos suínos de matadouros, em 1,34% dos suínos do Uruguai, em 2,40% dos cavalos, em 7,14% dos cães domésticos, em 11,48% dos suínos selvagens e, em 16,67% dos cachorros-do-mato do Brasil. As porcentagens encontradas em amostras de soro de suínos são compatíveis com as taxas verificadas na literatura. Para os demais animais, não é possível a comparação, em função da ausência de dados na literatura;
- O sequenciamento nucleotídico parcial do genoma confirmou a infecção por um vírus similar ao HBV nos suínos brasileiros. A comparação de sequências de hepadnavírus suíno determinadas nesse estudo com as sequências de *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus* disponíveis no *GenBank* demonstra uma similaridade inicial com o HBV humano de 90,8–96,3% (Artigo 1), seguida de 98,9–99,7% de identidade (Artigo 2);
- O DNA do hepadnavírus detectado nas amostras pareadas de bile e fígado dos suínos brasileiros de matadouros apresentou maior similaridade com os genótipos A e E, de acordo com a classificação de HBV;
- A presença de hepadnavírus nos hepatócitos dos suínos foi confirmada por diferentes técnicas, tanto através da detecção molecular do DNA viral, quanto por meio de análises de imunofluorescência para HBsAg em biópsias de fígado, denotando também o seu hepatotropismo;
- A circulação de hepadnavírus em animais domésticos foi demonstrada pela primeira vez para os suínos domésticos do Uruguai e os cavalos do Brasil, assim como de forma pioneira para os animais de vida livre, como os porcos selvagens, os cães domésticos, o

cachorro do mato, a onça, o lobo-guará e o mão-pelada do Brasil;

- Além do aumento da lista de candidatos a hospedeiros de hepadnavírus, evidências da sua circulação em animais selvagens denotam que a fonte de infecção pode não depender da proximidade com o homem.

9. Referências Bibliográficas

1. Jennifer A. Dill, a, Alvin C. Camus, a, John H. Leary, a, Francesca Di Giallonardo, b 5 Edward C., Holmes, b, Terry Fei Fan Ng a. Distinct Viral Lineages from Fish and Amphibians Reveal the 2 Complex Evolutionary History of Hepadnaviruses. *JVI* . 2016;
2. Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* 1971;35(3):235–41.
3. International Committee on Taxonomy of Viruses [Internet]. [cited 2016 May 27]. Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
4. Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [Internet]. 2005 [cited 2016 May 28]. Available from: <http://www.amazon.com/Virus-Taxonomy-International-Committee-Viruses/dp/0122499514>
5. Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences*; 1978 Sep;75(9):4533–7.
6. Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences*; 1980 May;77(5):2941–5.
7. Mandart E, Kay A, Galibert F. Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J Virol.* 1984;49(3):782–92.
8. Trueba D, Phelan M, Nelson J, Beck F, Pecha BS, Brown RJ, Varmus HE, Ganem D. Transmission of ground squirrel hepatitis virus to homologous and heterologous hosts. *Hepatology.* 1985;5(3):435–9.
9. Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(10):5757–61.
10. Grethe S, Heckel JO, Rietschel W, Hufert FT. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol.* 2000;74(11):5377–81.
11. Warren KS, Heeney JL, Swan R a, Heriyanto, Verschoor EJ. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol.* 1999;73(9):7860–5.
12. Hu X, Margolis HS, Purcell RH, Ebert J, Robertson BH. Identification of hepatitis B

- virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1661–4.
13. Lanford RE, Chavez D, Rico-Hesse R, Mootnick a. Hepadnavirus infection in captive gibbons. *J Virol*. 2000;74(6):2955–9.
 14. MacDonald DM, Holmes EC, Lewis JC, Simmonds P. Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *J Virol*. 2000;74(9):4253–7.
 15. Mason WS, Aldrich C, Summers J, Taylor JM. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(13):3997–4001.
 16. Jilbert ARR, Freiman JSS, Gowans EJJ, Holmes M, Cossart YEE, Burrell CJJ. Duck hepatitis B virus DNA in liver, spleen, and pancreas: Analysis by in situ and southern blot hybridization. *Virology*. Academic Press; 1987 Jun;158(2):330–8.
 17. Sprengel R, Kaleta EF, Will H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol*. 1988;62(10):3832–9.
 18. Chang SF, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, Frölich K, Will H. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology*. 1999;262(1):39–54.
 19. Pult I, Netter HJ, Bruns M, Prassolov a, Sirma H, Hohenberg H, Chang SF, Frölich K, Krone O, Kaleta EF, Will H. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology*. 2001;289(1):114–28.
 20. Triyatni M, Ey P, Tran T, Le Mire M, Qiao M, Burrell C, Jilbert a. Sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses. *J Gen Virol*. 2001;76 (Pt 1)(Pt 2):211–5.
 21. Guo H, Mason WS, Aldrich CE, Saputelli JR, Miller DS, Jilbert AR, Newbold JE. Identification and characterization of avihepadnaviruses isolated from exotic anseriformes maintained in captivity. *J Virol*. 2005 Mar 1;79(5):2729–42.
 22. Li W, She R, Liu L, You H, Yin J. Prevalence of a virus similar to human hepatitis B virus in swine. *Virol J*. 2010;7:60.
 23. Tian J, Xia K, She R, Li W, Ding Y, Wang J, Chen M, Yin J. Detection of Hepatitis B virus in serum and liver of chickens. *Virol J*. 2012;9:2.
 24. Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Muller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJ, Stocker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically

- related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(40):16151–6.
25. Hahn CM, Iwanowicz LR, Cornman RS, Conway CM, Winton JR, Blazer VS. Characterization of a Novel Hepadnavirus in the White Sucker (*Catostomus commersonii*) from the Great Lakes Region of the United States. *J Virol*. 2015;89(23):11801–11.
 26. Ganem D. Hepadnaviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DN HP, editor. *Virology*. Lippincott-Raven Publishers; 1996.
 27. Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R., Skalka AM. Principles of virology, molecular biology, pathogenesis, and control. *The Lancet Infectious Diseases*. 2000. p. 471–2.
 28. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. 2015;479–480:672–86.
 29. Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World Journal of Gastroenterology*. 2007. p. 22–38.
 30. Dandri M, Volz TK, Lütgehetmann M, Petersen J. Animal models for the study of HBV replication and its variants. *Journal of Clinical Virology*. 2005.
 31. Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Seminars in Cancer Biology*. 2013. p. 561–75.
 32. Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*. 2007. p. 157–70.
 33. Meier P, Scougall C., Will H, Burrell C., Jilbert A. A duck hepatitis B virus strain with a knockout mutation in the putative X ORF shows similar infectivity and in vivo growth characteristics to wild-type virus. *Virology*. 2003;317(2):291–8.
 34. Feitelson MA, Miller RH. X gene-related sequences in the core gene of duck and heron hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Acad Sciences; 1988 Aug;85(16):6162–6.
 35. Chang SF, Netter HJ, Hildt E, Schuster R, Schaefer S, Hsu YC, Rang a, Will H. Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame. *J Virol*. 2001;75(1):161–70.
 36. Guo H, Mason WS, Aldrich CE, Saputelli JR, Miller DS, Jilbert AR, Newbold JE. Identification and Characterization of Avihepadnaviruses Isolated from Exotic Anseriformes Maintained in Captivity. *J Virol*. 2005 Mar 1;79(5):2729–42.
 37. Halpern MS, Egan J, Mason WS, England JM. Viral antigen in endocrine cells of the pancreatic islets and adrenal cortex of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus.

- Virus Res. Elsevier; 1984 Jan;1(3):213–23.
38. Halpern MS, England JM, Deery DT, Petcu DJ, Mason WS, Molnar-Kimber KL. Viral nucleic acid synthesis and antigen accumulation in pancreas and kidney of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences*; 1983 Aug;80(15):4865–9.
 39. Suh A, Weber CC, Kehlmaier C, Braun EL, Green RE, Fritz U, Ray DA, Ellegren H. Early Mesozoic Coexistence of Amniotes and Hepadnaviridae. *PLoS Genet*. 2014;10(12).
 40. Gilbert C, Meik JM, Dashevsky D, Card DC, Castoe TA, Schaack S. Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes. *Proc Biol Sci*. 2014;281(1791):20141122.
 41. Gilbert C, Feschotte C. Genomic fossils calibrate the long-term evolution of hepadnaviruses. *PLoS Biol*. 2010;8(9).
 42. Paraskevis D, Angelis K, Magiorkinis G, Kostaki E, Ho SYW, Hatzakis A. Dating the origin of hepatitis B virus reveals higher substitution rate and adaptation on the branch leading to F/H genotypes. *Mol Phylogenet Evol*. 2015;93:44–54.
 43. Suh A, Brosius J, Schmitz J, Kriegs JO. The genome of a Mesozoic paleovirus reveals the evolution of hepatitis B viruses. *Nat Commun*. 2013;4:1791.
 44. Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SYW, Belshaw R, Allain JP, Hatzakis A. Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology*. 2013;57(3):908–16.
 45. Simmonds P. Reconstructing the origins of human hepatitis viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356(1411):1013–26.
 46. Bollyky P, Rambaut A, Grassley N, Carman W, Holmes E. Hepatitis B virus has a recent new world evolutionary origin. *J Hepatol. Elsevier*; 1998 Jan;28:96.
 47. Hu X lei, Javadian A, Gagneux P, Robertson BH. Paired chimpanzee hepatitis B virus (ChHBV) and mtDNA sequences suggest different ChHBV genetic variants are found in geographically distinct chimpanzee subspecies. *Virus Res*. 2001;79(1–2):103–8.
 48. Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*. 1994;198(2):489–503.
 49. Soares P, Alshamali F, Pereira JB, Fernandes V, Silva NM, Afonso C, Costa MD, Musilova E, Macaulay V, Richards MB, Cerny V, Pereira L. The Expansion of mtDNA Haplogroup L3 within and out of Africa. *Mol Biol Evol*. 2012 Mar 1;29(3):915–27.
 50. Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the

- hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*. 1995;38(1-2):24-34.
51. Sugauchi F, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Kato H, Suzuki S, Kimura Y, Ueda R, Butterworth LA, Cooksley WGE. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: Complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2001;82(4):883-92.
 52. Jazayeri MS, Basuni AA, Cooksley G, Locarnini S, Carman WF. Hepatitis B virus genotypes, core gene variability and ethnicity in the Pacific region. *J Hepatol*. 2004;41(1):139-46.
 53. Sakamoto T, Tanaka Y, Simonetti J, Osiowy C, Borresen ML, Koch A, Kurbanov F, Sugiyama M, Minuk GY, McMahon BJ, Joh T, Mizokami M. Classification of hepatitis B virus genotype B into 2 major types based on characterization of a novel subgenotype in Arctic indigenous populations. *J Infect Dis*. 2007;196(10):1487-92.
 54. Devesa M, Pujol FH. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res*. 2007;127(2):177-84.
 55. Thedja MD, Muljono DH, Nurainy N, Sukowati CHC, Verhoef J, Marzuki S. Ethnogeographical structure of hepatitis B virus genotype distribution in Indonesia and discovery of a new subgenotype, B9. *Arch Virol*. 2011;156(5):855-68.
 56. Crispim MAE, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MMA, Kiesslich D. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014;14:94.
 57. Brichler S, Lagathu G, Chekaraou MA, Le Gal F, Edouard A, Dény P, Césaire R, Gordien E. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J Gen Virol*. 2013;94(PART10):2318-29.
 58. Lago B V., Mello FC, Kramvis A, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B virus subgenotype A1: Evolutionary relationships between Brazilian, African and Asian isolates. *PLoS One*. 2014;9(8).
 59. Reuben A. Landmarks in hepatology: the thin red line. *Hepatol*. 2002;36:770-773.
 60. Alter HJ. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera [*J Am Med Assoc* 1965;191:541-546]. *J Hepatol*. 2003 Aug;39(2):149-52.
 61. Hollinger FB. The five viruses: a perspective. AASLD Postgrad Course" Viral Hepat A to F An Updat. 1994;2-20.
 62. Findlay GM, Maccallum FO. Hepatitis and Jaundice Associated with Immunization against Certain Virus Diseases: (Section of Comparative Medicine). *Proc R Soc Med*.

- 1938 May;31(7):799–806.
63. Franco O. História da febre-amarela no Brasil. História da febre-amarela no Bras. 1976;
 64. Fonseca JCF da. Histórico das hepatites virais. Rev Soc Bras Med Trop. SBMT; 2010 Jun;43(3):322–30.
 65. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. Ann Intern Med. 1967 May;66(5):924–31.
 66. Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1968 Jul;60(3):814–21.
 67. Blumberg BS. Hepatitis B: the hunt for a killer virus. Princeton University Press; 2002.
 68. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet (London, England). 1970 Apr 4;1(7649):695–8.
 69. Magnus LO, Espmark A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol. 1972;80(2):335–7.
 70. Gavilanes F, Gonzalez-Ros JM, Peterson DL. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. J Biol Chem. 1982;257(13):7770–7.
 71. Gerlich WH. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. Virol J. 2013;10(1):239.
 72. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. World J Gastroenterol. 2007;13(1):65–73.
 73. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. Cell. 1980;21(3):801–9.
 74. Summers J, Smith PM, Horwich a L. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. J Virol. 1990;64(6):2819–24.
 75. Lau JY, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. Lancet (London, England). 1993 Nov 27;342(8883):1335–40.
 76. Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. J Virol. 1974;14(2):384–91.
 77. Ganem D SR. Hepadnaviridae and their replication. In: Knipe DN H, PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA RB et al., editors. Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA; 2001.
 78. Hollinger FB LT. Hepatitis B viruso Title. In: Knipe DN, Howley PM, Griffin DE L,

- RA, Martin MA RB et al., editors. *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA; 2001.
79. Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia M. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris)*. 2010;58(4):267–72.
 80. Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Novel therapeutic approaches for hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *World J Gastroenterol*. 2015;21(23):7084–8.
 81. Yano Y, Azuma T, Hayashi Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J Hepatol*. 2015 Mar 27;7(3):583–92.
 82. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(1):51–68.
 83. Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*. 2009;49(5 Suppl):S13-21.
 84. Gish RG, Gadano AC. Chronic hepatitis B: Current epidemiology in the Americas and implications for management. *Journal of Viral Hepatitis*. 2006. p. 787–98.
 85. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*. 1984;52(2):396–402.
 86. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2003;38(5):1075–86.
 87. Chen MT, Billaud J-N, Sällberg M, Guidotti LG, Chisari F V, Jones J, Hughes J, Milich DR. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(41):14913–8.
 88. Chen M, Sällberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari F V, Billaud J-N, Milich DR. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol*. 2005;79(5):3016–27.
 89. Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 6):1439–49.
 90. Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ V, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, Rodgers S, Kurtovic J, Chang J, Lewin S, Desmond P, Locarnini S. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology*. 2007;45(1):102–10.
 91. Soussan P, Garreau F, Zylberberg H, Ferray C, Brechot C, Kremsdorf D. In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest*.

- 2000;105(1):55–60.
92. Milich DR, Schödel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J Virol.* 1997;71(3):2192–201.
 93. Pol JG, Lekbaby B, Redelsperger F, Klamer S, Mandouri Y, Ahodantin J, Bieche I, Lefevre M, Souque P, Charneau P, Gadessaud N, Kremsdorf D, Soussan P. Alternative splicing-regulated protein of hepatitis B virus hacks the TNF- α -stimulated signaling pathways and limits the extent of liver inflammation. *FASEB J.* 2015;29:1879–89.
 94. Chen W-N, Chen J-Y, Jiao B-Y, Lin W-S, Wu Y-L, Liu L-L, Lin X. Interaction of the hepatitis B spliced protein with cathepsin B promotes hepatoma cell migration and invasion. *J Virol.* 2012;86(24):13533–41.
 95. Klingmüller U, Schaller H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol.* 1993;67(12):7414–22.
 96. Yan H, Peng B, He WH, Zhong GC, Qi YH, Ren BJ, Gao ZC, Jing ZY, Song M, Xu GW, Sui JH, Li WH. Molecular Determinants of Hepatitis B and D Virus Entry Restriction in Mouse Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J Virol.* 2013;87(14):7977–91.
 97. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, Stindt J, Königer C, Nassal M, Kubitz R, Sülthmann H, Urban S. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology.* 2014;146(4).
 98. Grimm D, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatology International.* 2011. p. 644–53.
 99. Hongthanakorn C, Lok ASF. New Pharmacologic Therapies in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology Clinics of North America.* 2010. p. 659–80.
 100. Nassal M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Res.* 2008;134(1–2):235–49.
 101. Kang HY, Lee S, Park SG, Yu J, Kim Y, Jung G. Phosphorylation of hepatitis B virus Cp at Ser87 facilitates core assembly. *Biochem J.* 2006;398:311–7.
 102. Sohn JA, Litwin S, Seeger C. Mechanism for CCC DNA Synthesis in Hepadnaviruses. *PLoS One.* 2009;4(11).
 103. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):48–64.
 104. Yang H-C, Kao J-H. Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in

- hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance. *Emerg Microbes Infect.* 2014;3(9):e64.
105. Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol.* 1995;69(6):3350–7.
 106. Köck J, Schlicht HJ. Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol.* 1993;67(8):4867–74.
 107. Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol.* 1980 Dec;36(3):829–36.
 108. Wang HP, Rogler CE. Topoisomerase I-mediated integration of hepadnavirus DNA in vitro. *J Virol.* 1991 May;65(5):2381–92.
 109. Ganem D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991;168:61–83.
 110. Dubois MF, Pourcel C, Rousset S, Chany C, Tiollais P. Excretion of hepatitis B surface antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(8):4549–53.
 111. Carman WF. Infections associated with medical intervention: hepatitis viruses and HGV. *Br Med Bull.* 1998;54(3):731–48.
 112. Elgouhari HM, Tamimi TIAR, Carey WD. Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, course, and diagnosis. *Cleveland Clinic Journal of Medicine.* 2008. p. 881–9.
 113. Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology.* 2014;57(3–4):141–50.
 114. Zhang Q, Wu G, Richards E, Jia S, Zeng C. Universal primers for HBV genome DNA amplification across subtypes: a case study for designing more effective viral primers. *Virology.* 2007;4:92.
 115. Kao J-H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *Korean J Intern Med.* 2011;26(3):255–61.
 116. Torres C, Blanco Fernández MD, Flichman DM, Campos RH, Mbayed VA. Influence of overlapping genes on the evolution of human hepatitis B virus. *Virology.* 2013;441(1):40–8.
 117. Mizokami M, Orito E, Ohba K ichi, Ikeo K, Lau JYN, Gojobori T. Constrained evolution with respect to gene overlap of hepatitis B virus. *J Mol Evol.* 1997;44(1 Supplement).

118. Tedder RS, Bissett SL, Myers R, Ijaz S. The “Red Queen” dilemma - Running to stay in the same place: Reflections on the evolutionary vector of HBV in humans. *Antivir Ther.* 2013;18(3 PARTB):489–96.
119. Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, Gojobori T. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(18):7059–62.
120. Günther S, Sommer G, Von Breunig F, Iwanska A, Kalinina T, Sterneck M, Will H. Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: Frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):531–8.
121. Fares MA, Holmes EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol.* 2002;54(6):807–14.
122. Bouckaert R, Alvarado-Mora M V., Rebello Pinho JR. Evolutionary rates and HBV: Issues of rate estimation with Bayesian molecular methods. *Antivir Ther.* 2013;18(3 PARTB):497–503.
123. Andernach IE, Hunewald OE, Muller CP. Bayesian inference of the evolution of HBV/E. *PLoS One.* 2013;8(11).
124. Morozov V, Pisareva M, Groudinin M. Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus. *Gene.* 2000;260:55–65.
125. Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *Journal of Clinical Virology.* 2002. p. 97–106.
126. Kao J-H, Chen D-S. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(7):395–403.
127. Simmonds P, Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. *J Virol.* 2005;79(24):15467–76.
128. Jazayeri SM, Alavian SM, Carman WF. Hepatitis B virus: Origin and evolution. *Journal of Viral Hepatitis.* 2010. p. 229–35.
129. Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Sorrentino C, Presti A Lo, Tanzi E, Ciccozzi M, Galli M. Enigmatic origin of hepatitis B virus: An ancient travelling companion or a recent encounter? *World J Gastroenterol.* 2014;20(24):7622–34.
130. Echevarría JM, Avellón A. Hepatitis B virus genetic diversity. *Journal of Medical Virology.* 2006.
131. Littlejohn M, Locarnini S, Yuen L. Origins and evolution of hepatitis B virus and hepatitis D virus. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(1).

132. Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47(6):289–309.
133. Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005. p. 2409–23.
134. Yu H, Yuan Q, Ge S-X, Wang H-Y, Zhang Y-L, Chen Q-R, Zhang J, Chen P-J, Xia N-S. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype “I”. *PLoS One*. 2010;5(2):e9297.
135. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *Journal of General Virology*. 2002. p. 2059–73.
136. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: Complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000;81(1):67–74.
137. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*. 1988;69 (Pt 10):2575–83.
138. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 2009;83(20):10538–47.
139. Tran TTH, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*. 2008;82(11):5657–63.
140. Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T, Toriyama K, Muller CP. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(11):1777–80.
141. Mello FC a, Souto FJD, Nabuco LC, Villela-Nogueira C a, Coelho HSM, Franz HCF, Saraiva JCP, Virgolino H a, Motta-Castro ARC, Melo MMM, Martins RMB, Gomes S a. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol*. 2007;7:103.
142. Mahtab M, Mahtab M, Rahman S, Rahman S, Khan M, Khan M, Karim F, Karim F. Hepatitis B virus genotypes: an overview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008;7(5):457–64.
143. Mulders MN, Venard V, Njayou M, Edorh a P, Bola Oyefolu AO, Kehinde MO,

- Muyembe Tamfum J-J, Nebie YK, Maiga I, Ammerlaan W, Fack F, Omilabu S a, Le Faou A, Muller CP. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis.* 2004;190(2):400–8.
144. Alvarado Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, Pinho JRR. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: a Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol.* 2011;11(1):103–8.
 145. Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, Poblete F, Gutierrez MF, Botto C, Pujol FH. Subgenotype diversity of hepatitis B Virus American Genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol.* 2008;80(1):20–6.
 146. Jutavijittum P, Jiviriyawat Y, Yousukh A, Kunachiwa W, Toriyama K. Genotypes of hepatitis B virus among voluntary blood donors in northern Thailand. *Hepatol Res.* 2006;35(4):263–6.
 147. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2000;118(3):554–9.
 148. Lindh M, Andersson a S, Gusdal a. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis.* 1997;175(6):1285–93.
 149. Jutavijittum P, Yousukh A, Samountry B, Samountry K, Ounavong A, Thammavong T, Keokhamphue J, Toriyama K. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections among Lao blood donors. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal.* 2007;38(4):674–9.
 150. Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. Evolution of hepatitis B virus in an acute hepatitis B patient co-infected with genotypes B and C. *J Gen Virol.* 2006;87(1):39–49.
 151. Chen BF, Kao JH, Liu CJ, Chen DS, Chen PJ. Genotypic Dominance and Novel Recombinations in HBV Genotype B and C Co-Infected Intravenous Drug Users. *J Med Virol.* 2004;73(1):13–22.
 152. Wang Z, Liu Z, Zeng G, Wen S, Qi Y, Ma S, Naoumov N V., Hou J. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China. *J Gen Virol.* 2005;86(4):985–90.
 153. Yang W, Summers J. Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination. *J Virol.* 1995;69(7):4029–36.
 154. Yang J, Xi Q, Deng R, Wang J, Hou J, Wang X. Identification of interspecies recombination among hepadnaviruses infecting cross-species hosts. *J Med Virol.*

- 2007;79(11):1741–50.
155. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):14–21.
 156. Stein LL, Loomba R. Drug targets in hepatitis B virus infection. *Infect Disord Drug Targets.* 2009;9:105–16.
 157. Yousif M, Mudawi H, Bakhiet S, Glebe D, Kramvis A. Molecular characterization of hepatitis B virus in liver disease patients and asymptomatic carriers of the virus in Sudan. *BMC Infect Dis.* 2013;13:328.
 158. Lin Y-YY, Liu C, Chien W-HH, Wu L-LL, Tao Y, Wu D, Lu X, Hsieh C-HH, Chen P-JJ, Wang H-YY, Kao J-HH, Chen D-SS. New insights into the evolutionary rate of hepatitis B virus at different biological scales. *J Virol.* 2015;89(7):3512–22.
 159. World Health Organization. No Title [Internet]. [cited 2016 May 27]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204_Jul2014/en/
 160. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Abdulhak A Bin, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, De Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nasser K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm J, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP,

- Roberts T, De Léon FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJL. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095–128.
161. Ogholikhan S, Schwarz KB. Hepatitis Vaccines. *Vaccines*. 2016 Jan;4(1).
 162. Souto F. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *GED gastroenterol endosc dig*. 1999;
 163. José F, Souto D. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. *Rev Soc Bras Med Trop*.
 164. Benzaken A, Massad E, Mesquita F, Coutinho F, GFM P, Lopez L, Naveira M, Burattini M, Amaku M, Moreira M, Silva R. *Boletim Epidemiológico - Hepatites virais*. Ano IV - nº1. 2015;15(Hepatite B):62.
 165. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. Ministério da Saúde, Secr Vigilância em Saúde, Dep DST, Aids e Hepatites Virais. 2010;132.
 166. André F. Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa. *Vaccine*. 2000.
 167. Thimme R, Blum HE. [Therapy of hepatitis B]. *Prax (Bern 1994)*. 2006;95(36):1383–8.
 168. Dienstag JL. Hepatitis B Virus Infection. *N Engl J Med*. 2008;359(14):1486–500.
 169. Rizzetto M, Volpes R, Smedile A. Response of pre-core mutant chronic hepatitis B infection to lamivudine. *J Med Virol*. 2000;61(3):398–402.
 170. Lin M, Alla NR, XiaoMao L, Mynbaev OA, ZhongJie S. Mother-to-child transmission of HBV: review of current clinical management and prevention strategies. *Reviews in Medical Virology*. 2014. p. 396–406.
 171. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol*. 2005;34 Suppl 1:S1–3.
 172. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004;11(2):97–107.
 173. Shi Y-H, Shi C-H. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2009;15(25):3099–105.

174. Yi P, Chen R, Huang Y, Zhou R-R, Fan X-G. Management of mother-to-child transmission of hepatitis B virus: Propositions and challenges. *J Clin Virol.* 2016 Apr;77:32–9.
175. Patient R, Hourieux C, Roingard P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cellular Microbiology.* 2009. p. 1561–70.
176. McCaffrey AP. RNA interference inhibitors of hepatitis B virus. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2009. p. 15–23.
177. Leemans WF, Janssen HL a, de Man R a. Future perspectives for the management of chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol.* 2007;13(18):2554–67.
178. Vial T, Descotes J. Clinical Toxicity of the Interferons. *Drug Safety.* 1994. p. 115–50.
179. Fattovich G, Giustina G, Favarato S, Ruol A. A survey of adverse events in 11,241 patients with chronic viral hepatitis treated with alfa interferon. *J Hepatol.* 1996;24(1):38–47.
180. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C, Koshy R, Liang TJ, Mason W. Antiviral drug-resistant HBV: Standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology.* 2007. p. 254–65.
181. Zoulim F. Emerging drugs for hepatitis B. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2007;12(2):199–217.
182. Lee M, Keeffe EB. Study of adherence comes to the treatment of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2011 Jan;54(1):6–8.
183. Xie Y, Hong R, Liu W, Liu J, Zhai J. Development of novel therapeutics for chronic hepatitis B. *Virol Sin.* 2010;25(4):294–300.
184. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol.* 2006;45(4):529–38.
185. Ratnam D, Visvanathan K. New concepts in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B: The importance of the innate immune response. *Hepatol Int.* 2008;2(SUPPL. 1).
186. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari F V. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2003;77(1):68–76.
187. Takagi A, Deguchi R, Kobayashi K, Miwa T. Cytokine expressions and H. pylori-associated gastric mucosal lesion. *Keio Journal of Medicine.* 2002. p. 51–2.
188. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical

- consequences. *N Engl J Med*. 2004;350(11):1118–29.
189. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860–7.
 190. Lu YW, Tan TL, Zhang J, Chen WN. Cellular apoptosis induced by replication of hepatitis B virus: possible link between viral genotype and clinical outcome. *Virology*. 2007;4(1):117.
 191. Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol*. 2004;78(23):12725–34.
 192. McMahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Seminars in Liver Disease*. 2005. p. 3–8.
 193. Schoeman JC, Hou J, Harms AC, Vreeken RJ, Berger R, Hankemeier T, Boonstra A. Metabolic characterization of the natural progression of chronic hepatitis B. *Genome Med*. 2016;8(1):64.
 194. Takashima H, Araki K, Miyazaki J, Yamamura K, Kimoto M. Characterization of T-cell tolerance to hepatitis B virus (HBV) antigen in transgenic mice. *Immunology*. 1992 Mar;75(3):398–405.
 195. Pungpapong S, Kim WR, Poterucha JJ. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. *Mayo Clin Proc*. 2007 Aug;82(8):967–75.
 196. Conjeevaram HS, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection: a hidden menace? *Hepatology*. 2001 Jul;34(1):204–6.
 197. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis*. 2002 Aug;2(8):479–86.
 198. Hu K-Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat*. 2002;9(4):243–57.
 199. Neau D, Winnock M, Jouvencel A-C, Faure M, Castéra L, Legrand E, Lacoste D, Ragnaud J-M, Dupon M, Fleury H, Lafon M-E, Dabis F, Groupe d'Epidemiologie Clinique du SIDA en Aquitaine. Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients with isolated antibodies to hepatitis B core antigen: Aquitaine cohort, 2002–2003. *Clin Infect Dis*. 2005 Mar 1;40(5):750–3.
 200. Hofer M, Joller-Jemelka HI, Grob PJ, Lüthy R, Opravil M. Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. Swiss HIV Cohort Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998 Jan;17(1):6–13.
 201. A.J. C, J.L. C, D. B, S. M. Reactivation of hepatitis B in an HIV-infected patient with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2005. p. 492–4.

202. Hui CK, Cheung WWW, Zhang HY, Au WY, Yueng YH, Leung AYH, Leung N, Luk JM, Lie AKW, Kwong YL, Liang R, Lau GKK. Kinetics and Risk of De Novo Hepatitis B Infection in HBsAg-Negative Patients Undergoing Cytotoxic Chemotherapy. *Gastroenterology*. 2006;131(1):59–68.
203. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. [cited 2016 Jun 4]. Available from: <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/index.htm>
204. Allain J-P, Cox L. Challenges in hepatitis B detection among blood donors. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(6):461–6.
205. Whalley S a, Murray JM, Brown D, Webster GJ, Emery VC, Dusheiko GM, Perelson a S. Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med*. 2001;193(7):847–54.
206. Villar LM, Cruz HM, Barbosa JR, Bezerra CS, Portilho MM, Scalioni L de P. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. *World J Virol*. 2015;4(4):323–42.
207. Mangia A, Antonucci F, Brunetto M, Capobianchi M, Faggioli S, Guido M, Farci P, Lampertico P, Marzano A, Niro G, Pisani G, Prati D, Puoti M, Raimondo G, Santantonio T, Smedile A, Lauria F, Italian Association for the Study of the Liver (AISF). The use of molecular assays in the management of viral hepatitis. *Dig Liver Dis*. 2008 Jun;40(6):395–404.
208. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: antigens, antibodies and viral genomes. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2008;22(6):1031–48.
209. Pawlotsky J-M. [Virologic techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B]. *Gastroentérologie Clin Biol*. 2008;32(1 Pt 2):S56-63.
210. Kwon SY, Lee CH. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Korean J Hepatol*. 2011;17(2):87–95.
211. A. S, C. F, M. N. Hepatitis B Virus (HBV) Variants in Hemodialysis Patients. *Special Problems in Hemodialysis Patients*. InTech; 2011.
212. Assad S, Francis a. Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine*. 1999;18:57–67.
213. Hessel L, West DJ. Antibody responses to recombinant hepatitis B vaccines. *Vaccine*. 2002 May 22;20(17–18):2164–5.
214. Blumberg BS. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 8;94(14):7121–5.
215. Jack a D, Hall a J, Maine N, Mendy M, Whittle HC. What level of hepatitis B antibody is protective? *J Infect Dis*. 1999;179:489–92.

216. Szmunes W, Stevens CE, Harley EJ, Zang EA, Oleszko WR, William DC, Sadovsky R, Morrison JM, Kellner A. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *The New England journal of medicine*. 1980.
217. Poorolajal J, Mahmoodi M, Majdzadeh R, Nasseri-Moghaddam S, Haghdoost A, Fotouhi A. Long-term protection provided by hepatitis B vaccine and need for booster dose: a meta-analysis. *Vaccine*. 2010 Jan 8;28(3):623–31.
218. Perrillo RP, Campbell CR, Strang S, Bodicky CJ, Costigan DJ. Immune globulin and hepatitis B immune globulin. Prophylactic measures for intimate contacts exposed to acute type B hepatitis. *Arch Intern Med*. 1984;144(1):81–5.
219. Terrault NA, Zhou S, Combs C, Hahn JA, Lake JR, Roberts JP, Ascher NL, Wright TL. Prophylaxis in liver transplant recipients using a fixed dosing schedule of hepatitis B immunoglobulin. *Hepatology*. 1996;24(6):1327–33.
220. Ni Y-H, Chen D-S. Hepatitis B vaccination in children: the Taiwan experience. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Aug;58(4):296–300.
221. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: Update 2009. *Hepatology*. 2009. p. 661–2.
222. Piratvisuth T, Marcellin P, Popescu M, Kapprell H-P, Rothe V, Lu Z-M. Hepatitis B surface antigen: association with sustained response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatol Int*. 2013 Jun;7(2):429–36.
223. Turan I, Yapali S, Bademkiran F, Kose T, Duman S, Sozbilen M, Gunsar F, Ersoz G, Akarca US, Ozutemiz O, Karasu Z. Telbivudine in liver transplant recipients: Renal protection does not overcome the risk of polyneuropathy and myopathy. *Liver Transplant*. 2015;21(8):1066–75.
224. Song IH. Emerging therapeutics and relevant targets for chronic Hepatitis B. 2016 May 20;27(3).
225. Chotiyaputta W, Lok ASF. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009 Aug;6(8):453–62.
226. Makuwa M, Souquière S, Clifford SL, Mouinga-Ondeme A, Bawe-Johnson M, Wickings EJ, Latour S, Simon F, Roques P. Identification of hepatitis B virus genome in faecal sample from wild living chimpanzee (*Pan troglodytes troglodytes*) in Gabon. *J Clin Virol*. 2005;34(SUPPL. 1).
227. Jiménez-Clavero MA. Animal viral diseases and global change: Bluetongue and West Nile fever as paradigms. *Frontiers in Genetics*. 2012.
228. Bonvicino CR, Moreira MA, Soares MA. Hepatitis B virus lineages in mammalian

- hosts: Potential for bidirectional cross-species transmission. *World J Gastroenterol.* 2014;20(24):7665–74.
229. Vieira YR, Fm Silva M, Santos DR, Vieira AA, Ciacci-Zanella JR, Barquero G, Do Lago B V, Gomes SA, Pinto MA, De Paula VS. Serological and molecular evidence of hepadnavirus infection in swine. *Ann Agric Environ Med Ann Agric Env Med.* 2015;22(221):11–6.
230. Vieira YR, dos Santos DRL, Portilho MM, Velloso CEP, Arissawa M, Villar LM, Pinto MA, de Paula VS. Hepadnavirus detected in bile and liver samples from domestic pigs of commercial abattoirs. *BMC Microbiol.* 2014;14(1):1–6.
231. Chouteau P, Le Seyec J, Cannie I, Nassal M, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J Virol.* 2001 Dec;75(23):11565–72.
232. Starkman SE, MacDonald DM, Lewis JCM, Holmes EC, Simmonds P. Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology.* 2003;314(1):381–93.
233. Cunha, ARC; Ravasi, G; Moreira, MBR; Coelho, Ra; Silva, RN; Giozza, SP; Oliveira S. *Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais.* Ano III-. 2012.
234. Niel C, Moraes MT, Gaspar AM, Yoshida CF, Gomes SA. Genetic diversity of hepatitis B virus strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol.* 1994;44(2):180–6.
235. Motta-Castro ARC, Martins RMB, Yoshida CFT, Teles S a, Paniago AM, Lima KMB, Gomes S a. Hepatitis B virus infection in isolated Afro-Brazilian communities. *J Med Virol.* 2005;77(2):188–93.
236. Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA. Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2010;47(1):13–7.
237. Santos AO, Alvarado-Mora M V, Botelho L, Vieira DS, Pinho JRR, Carrilho FJ, Honda ER, Salcedo JM. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. *Virol J.* 2010;7:315.
238. Dutkiewicz J, Cisak E, Sroka J, Wójcik-Fatla A, Zajac V. Biological agents as occupational hazards - selected issues. *Ann Agric Environ Med.* 2011;18(2):286–93.
239. Vitral CL, Pinto M a, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, Santos DR Dos, Gaspar AMC. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(2):117–22.

240. dos Santos DRL, Vitral CL, de Paula VS, Marchevsky RS, Lopes JF, Gaspar AMC, Saddi TM, Júnior NCDM, Guimarães FDR, Júnior JGC, Ximenes LLL, Souto FJD, Pinto MA, Junior NC de M, Guimar??es F de R, J??nior JGC, Ximenes LLL, Souto FJDJD, Pinto MA. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J.* 2009;182(3):474–80.
241. Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MFM, de Sousa PSF, Gaspar AMC, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol.* 2010;47(3):276–9.
242. Tian J, Xia K, She R, Li W, Ding Y, Wang J, Chen M, Yin J. Detection of Hepatitis B virus in serum and liver of chickens. *Virol J.* 2012;9(1):2.
243. Figueiredo AS, Lampe E, do Espírito-Santo MP, do Amaral Mello FC, de Almeida FQ, de Lemos ERS, Godoi TLOS, Dimache LAG, dos Santos DRL, Villar LM. Identification of two phylogenetic lineages of equine hepacivirus and high prevalence in Brazil. *Vet J.* 2015;206(3):414–6.

10. Anexos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-49/11

Certificamos que o protocolo (P-1/11-6), intitulado ""Pesquisa de marcadores de hepatite viral em suínos adultos. Estudo preliminar baseado na estreita relação imunológica com o vírus da hepatite B humana."" , sob a responsabilidade de VANESSA SALETE DE PAULA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 07/12/2013 e inclui o uso total de :

Sus domesticus

- 100 Machos, Idade: 5, Peso: 100,0000 Kilo(s).
- 100 Fêmeas, Idade: 5, Peso: 100,0000 Kilo(s).

Rio de Janeiro, 7 de dezembro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA E PECUÁRIA
SUPERINTENDÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
COORDENADORIA DE CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS
AGROPECUÁRIOS INDUSTRIALIZADOS
SERVIÇO DE INSPEÇÃO ESTADUAL (SIE/RJ)

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

A Superintendência de Defesa Agropecuária, através da Coordenadoria de Controle de Qualidade de Prod. Agropecuários Industrializados,
autoriza: Marcelo Alves Pinto
Identidade 005.921.858-6 IEP, CPF 008.402.557-30 Instituição Fiocruz
a visitar/retirar veturas peças no Matadouro-Frigorífico/Outras Industrias/Estabelecimentos
Comerciais/Propriedades Rurais Farming Alimentos
SIE nº 582, localizado Petropolis Fiscal Sanitário
Estadual Malkhas Mientelovskiy
CRMV/RJ nº 419.2

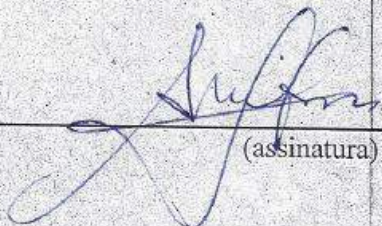
Outrossim, informamos que a Instituição em epígrafe já cumpriu as exigências administrativas necessárias para o procedimento em questão.

Local:

Niterói

Data:

8/08/13


(assinatura)



SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA E PECUÁRIA
SUPERINTENDÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
COORDENADORIA DE CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS
AGROPECUÁRIOS INDUSTRIALIZADOS
SERVIÇO DE INSPEÇÃO ESTADUAL (SIE/RJ)

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

A Superintendência de Defesa Agropecuária, através da Coordenadoria de Controle de Qualidade de Produtos Agropecuários Industrializados,
autoriza: Marcelos Alves Pinto
Identidade 005921858-6 IEP, CPF 008402557-3 Instituição Fiscoez
a visitar/retirar retirar peças no Matadouro-Frigorífico/Outras Industrias/Estabelecimentos
Comerciais/Propriedades Rurais Pajam Produtos Alimentícios
SIE nº 815, localizado Itaocara Fiscal Sanitário
Estadual José Antônio Monteiro Pereira
CRMV/RJ nº 1470.

Outrossim, informamos que a Instituição em epígrafe já cumpriu as exigências administrativas necessárias para o procedimento em questão.

Local: Niterói Data: 8/18/13

(assinatura)



SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA E PECUÁRIA
SUPERINTENDÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
COORDENADORIA DE CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS
AGROPECUÁRIOS INDUSTRIALIZADOS
SERVIÇO DE INSPEÇÃO ESTADUAL (SIE/RJ)

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

A Superintendência de Defesa Agropecuária, através da Coordenadora de Controle de Qualidade de Prod. Industrializados
autoriza: Marcelo Alves Pinto
Identidade 005.921.858-6 IEP, CPF 008.402.557-30 Instituição Fieccug
a visitar/retirar retirar peças no Matadouro-Frigorífico/Outras Industrias/Estabelecimentos
Comerciais/Propriedades Rurais Itaperuna - Frigorífico
SIE nº 995, localizado _____ Fiscal Sanitário
Estadual José Antônio Monteiro Pereira
CRMV/RJ nº 1470

Outrossim, informamos que a Instituição em epígrafe já cumpriu as exigências administrativas necessárias para o procedimento em questão.

Local: Niterói Data: 8/8/13

(assinatura)



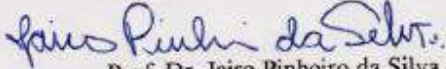
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo Nº 375/2013

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "*Detecção e caracterização de hepacivírus (NHPV) em equinos (Equus ferus caballus) no Estado do Rio de Janeiro*" sob a responsabilidade da Profa. Dra. Debora Regina Lopes dos Santos, Instituto de Veterinária, processo 23083.005958/2013-42, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 02/09/2013.


Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva
Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa e Pós-graduação

Jairo Pinheiro da Silva
Pró-reitor Adjunto de
Pesquisa e Pós-Graduação
SIAPE nº 1109655



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 500/2013 da Pesquisadora Aiesca Oliveira Pellegrin, referente ao projeto de pesquisa “Epidemiologia da brucelose e tuberculose na interface dos porcos-monteiro (*Sus scrofa*) com bovinos no Pantanal do Mato Grosso do Sul”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 18 de julho de 2013 .


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 22 de julho de 2013.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184

CERTIFICADO

Declaramos que o projeto intitulado “**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Brucella spp* EM *Canis familiaris* E O PAPEL DESTA HOSPEDEIRO NA EPIDEMIOLOGIA DA BRUCELOSE NO PANTANAL SUL MATOGROSSENSE.**”, protocolo nº. **001/2013**, sob a responsabilidade de **Carina Elisei de Oliveira** - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, para fins de pesquisa científica, está de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Católica Dom Bosco.

We certify that the research entitled “**DETECTION AND IDENTIFICATION OF *Brucella ssp* IN *Canis familiaris* IN THIS PAPER AND HOST IN THE EPIDEMIOLOGY OF BRUCELLOSIS PANTANAL.**”, protocol number **001/2013**, under the responsibility of **Carina Elisei de Oliveira**, which involves the breeding and/or animals of Chordata phylum, for scientific research, is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College for Control of Animal Experimentation, and was approved by the Ethical Committee For Animal Research of Universidade Católica Dom Bosco.

Vigência do Projeto	Nº. de animais/ Espécie/ Linhagem
28/05/2013 à 28/05/2015	138 / <i>Canis familiaris</i>

Campo Grande, 28 de maio de 2013.

Profa. Dra. Susana Elisa Moreno
Coordenadora da CEUA /UCDB



Goiânia, 10 de novembro de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 086/14

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Outros – projeto isolado

II - Identificação:

- Título do projeto:** Projeto ecologia e conservação da raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) em áreas antropizadas de Cerrado no Brasil Central
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Frederico Gemesio Lemos/ Regional Catalão
- Pesquisadores Participantes:** Frederico Gemesio Lemos, Fernanda C. de Azevedo, Ricardo Corasa Arrais, Mozart Caetano de Freitas Júnior
- Unidade onde será realizado:** Regional Catalão
- Data de apresentação a CEUA:** 19/09/14

III - Objetivos e justificativa do projeto: Aumentar o conhecimento sobre a ecologia da espécie e conhecer sua relação com outros carnívoros sintópicos em fazendas de gado no município de Cumari, Goiás, Brasil. Os objetivos específicos do projeto são: 1) descrever a área de vida, o uso de habitat, o padrão de atividade e o comportamento social da raposa-do-campo em um ambiente alterado com matriz de pastagens antrópicas e fragmentos de cerrado; 2) descrever o cuidado do casal à prole, a dieta, idade da dispersão dos filhotes e o sexo que dispersa; e 3) descrever a sobreposição de nicho espacial e as interações da espécie com outros canídeos sintópicos.

IV - Sumário do projeto:

- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** O projeto propõe a investigação dos processos ecológicos de canídeos silvestres. Estas questões permeiam o acompanhamento de indivíduos de vida livre, através da captura e instalação de coleira radiotransmissora, para obtenção de dados ecológicos e comportamentais dificilmente obtidos utilizando-se de outra metodologia. O número de animais a serem empregados na pesquisa foi estabelecido baseado em um projeto piloto realizado na área de estudo utilizando focagem noturna e 30 armadilhas fotográficas (que possuem sensores de calor e movimento que disparam automaticamente) entre os anos de 2013 e 2014.
- Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** Serão utilizadas 3 diferentes espécies, a saber: *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo) com peso de 2.5kg - 4.2kg, *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) com peso de 6 kg – 8 kg, *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) com peso de 20kg - 30kg. Todos da linhagem Canidae, todos adultos e subadultos, entre machos e fêmeas.
- Espécie e número total de animais utilizados:** Serão utilizadas: 30 *Lycalopex vetulus*, sendo 15 fêmeas e 15 machos; 30 *Cerdocyon thous*, sendo 15 fêmeas e 15 machos; 08 *Chrysocyon brachyurus*, sendo 04 fêmeas e 04 machos.
- Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Serão capturados canídeos de vida livre na área de

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -

CEP: 74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



estudo, localizada na Região do Limoeiro, município de Cumari, Goiás, Brasil. Os animais serão observados em seu habitat natural.

Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos: Não se aplica. Por se tratar da captura de carnívoros silvestre em área natural, toda a equipe deve estar preparada para eventuais riscos. Para que todo o procedimento anestésico e a coleta de dados, incluindo a vistoria presencial das armadilhas, os integrantes deste projeto de pesquisa possuem cursos e especializações no manejo de fauna silvestre. Será utilizada pela equipe durante toda execução das atividades equipamentos de proteção física como roupas resistentes, perneiras, luvas de couro, chapéus ou bonés, botas antiderrapantes e resistentes à água. A equipe também dispõe de cambão com cabo de 1,80 m, puçá de aro grande, arma anestésica reserva (pistola e zarabatana), lanternas potentes, equipamento de telemetria e sistema de rádio comunicação. Obrigatoriamente todos os membros da equipe executora estão devidamente protegidos contra a raiva (carteira de vacinação e sorologia atualizados), febre amarela e tétano.

Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais: Vide pág. 18 a 21 do projeto de pesquisa.

Método de eutanásia: Não se aplica.

Destino do animal: Permanecerá em seu ambiente natural.

IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

Quanto a documentos: A documentação está de acordo com o exigido pela CEUA/UFPG.

Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: As informações constantes no projeto e ficha protocolo quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores estão de acordo com princípios éticos indicados pelo CONCEA.

V - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Reiteramos a importância deste parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFPG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

VI - Data da reunião: 10/11/14

Assinado de forma digital por
RENATA MAZARO:12343522812
Dados: 2014.11.14 13:12:52
-02'00'

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFPG



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 35296-1	Data da Emissão: 25/03/2013 10:02	Data para Revalidação*: 24/04/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Aiesca Oliveira Pellegrin	CPF: 400.629.960-53
Título do Projeto: Epidemiologia, impacto e distribuição de espécies de Brucella spp e Mycobacterium spp na interface mamíferos silvestres, asselvajados, bovinos no Bioma Pantanal.	
Nome da Instituição : EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA CPAP	CNPJ: 00.348.003/0036-40

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 63855715



Página 5/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49647-1	Data da Emissão: 29/07/2015 16:59	Data para Revalidação*: 27/08/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Luiz Flamarion Barbosa de Oliveira	CPF: 200.412.250-15
Título do Projeto: Porcos-monteiros (<i>Sus scrofa</i> L.) no norte do Pantanal do Mato Grosso: caracterização morfológica e genética, biologia reprodutiva e contexto espacial de uma forma exótica em um mosaico de paisagens em evolução	
Nome da Instituição: Museu Nacional (UFRJ)	CNPJ: 33.663.683/0029-17

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36496338



Página 4/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14576-6	Data da Emissão: 03/08/2015 22:56	Data para Revalidação*: 01/09/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: FREDERICO GEMESIO LEMOS	CPF: 014.293.776-23
Título do Projeto: Ecologia e Conservação da Raposa-do-campo (<i>Lycalopex vetulus</i>) em áreas antropizadas de Cerrado no Brasil Central	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS	CNPJ: 01.567.601/0001-43

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 69677934



Página 3/3



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares do vírus da hepatite B e do vírus da hepatite E entre os profissionais em contato estreito com suínos e seus derivados.

Pesquisador: Vanessa Salete de Paula

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08756312.5.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 275.608

Data da Relatoria: 20/05/2013

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

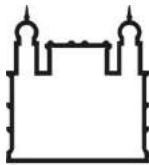
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: **Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares do vírus da hepatite B e vírus da hepatite E entre os profissionais em contato estreito com rebanhos suínos e seus derivados.**

Você está sendo convidado a participar do primeiro estudo dirigido à investigação do risco profissional de infecção pelo vírus da hepatite B e vírus da hepatite E.

Objetivo da pesquisa: Pesquisar marcadores sorológicos e moleculares do vírus da hepatite B e vírus da hepatite E entre os profissionais em contato estreito com rebanhos suínos e seus derivados, correlacionando com o tempo de atividade e o grau de exposição profissional.

Exames e procedimentos: Coleta de sangue por punção venosa periférica.

Riscos: Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa estão relacionados à coleta de sangue, que pode causar dor e sangramento local após a punção venosa. Para minimizar esse risco, o procedimento será realizado por profissional especializado, de acordo com as normas de biossegurança e, o local puncionado será tamponado durante o tempo necessário à hemostasia.

Benefícios: Caso aceite participar, você será orientado quanto às possíveis formas de transmissão do vírus da hepatite B, e poderá descobrir se está imune, susceptível à infecção ou infectado pelo vírus. Caso a susceptibilidade seja confirmada, você será aconselhado à vacinação. Além disso, você também será orientado quanto às possíveis formas de transmissão do vírus da hepatite E. Caso as infecções sejam diagnosticadas, você será encaminhado (a) a um ambulatório especializado de hepatologia da rede pública para acompanhamento. Além disso, sua participação nesse estudo irá contribuir para o progresso da pesquisa epidemiológica do vírus da hepatite B e hepatite E.

Autorizo, portanto, os profissionais do Instituto Oswaldo Cruz a utilizar amostras de soro para a realização dos exames de diagnóstico para o vírus da hepatite B e vírus da hepatite E para fins de pesquisa científica. As amostras poderão ser armazenadas durante o período que durar o projeto. Os resultados desta pesquisa poderão ser utilizados para publicação científica, de maneira confidencial, e para notificação às Instituições de Saúde Pública em nível de Ministério da Saúde e Secretarias de Saúde Estadual e Municipal.

Caso tenha alguma dúvida ou necessidade de qualquer esclarecimento sobre o estudo, você poderá entrar em contato com as pesquisadoras: **Dr.^a Vanessa de Paula ou Yasmine Rangel Vieira - Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, sala B219, tel: 2562-1876.**

Assinatura _____

RG _____ Fone: _____

Endereço: _____

Assinatura do pesquisador responsável _____

Testemunhas

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____



QUESTIONÁRIO SOBRE PREVALÊNCIA DE HEPATITE B EM TRABALHADORES DE MATADOUROS

Identificação: _____ Data de Nascimento: ____/____/____
Sexo: Masc Fem Profissão: _____ Estado Civil: _____
Escolaridade:
Analfabeto:
Educação Infantil:
Ensino fundamental (1º grau): incompleto completo
Ensino médio (2º grau): incompleto completo
Ensino superior (3º grau): incompleto completo
Curso de Pós-Graduação: incompleto completo

1. A renda da sua família está em torno de quantos salários mínimos (salário mínimo = R\$ 678,00)?

- Menos de 1 1 a 3 4 a 6 7 a 9
 10 a 12 Mais de 12

2. Você alguma vez já ficou com a pele e os olhos amarelos e/ou urina muito escura (cor de 'chá preto' ou 'coca-cola') ou teve hepatite confirmada por exames de sangue?

- Sim Não Não sabe

3. Você já foi vacinado(a) contra hepatite B?

- Sim Não Não sabe

Em caso afirmativo, descreva o número de doses:

- 1 2 3 4 Não sabe

4. Você já foi submetido(a) a transfusão de sangue ou de plasma?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, você foi transfundido antes de 1994?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

5. Você tem alguma tatuagem no corpo?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

6. Você tem algum *piercing* no corpo?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

7. Você já furou as orelhas para colocar brincos?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

8. Você já teve problemas com seus rins que necessitou de tratamento com hemodiálise?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

9. Você já fez acupuntura?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

10. Você já cuidou das suas unhas com manicure/pedicure?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, você usou seu próprio alicate?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, o alicate que você usou era esterilizado?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

11. Você já fez depilação em salão de beleza?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, os materiais usados eram descartáveis ou esterilizados?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

12. Você já compartilhou lâmina ou gilete com outra pessoa?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

13. Você já compartilhou escova de dentes com outra pessoa?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

14. Você já fez algum tipo de tratamento dentário (extração, canal, cirurgia gengival, implante)?

- Sim Não Não sabe Não quis responder

15. Você já foi atendido, por qualquer motivo, em alguma unidade de emergência ou urgência e mantido com acesso venoso ou recebeu medicamento(s) injetável(is)?

Sim Não Não sabe Não quis responder

16. Você já fez uso de algum tipo de droga ilícita injetável ou inalatória?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, descreva a frequência?

Raramente De vez em quando
 Frequentemente Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, descreva o tipo?

Cocaína Heroína Crack Êxtase
 Outra Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, você já compartilhou agulha, seringa, canudo ou outro objeto com outra pessoa?

Sim Não Não sabe Não quis responder

17. Qual a sua orientação sexual?

Heterossexual Homossexual Bissexual
 Não sabe Não quis responder

18. Você já teve alguma relação sexual com alguém?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, qual o número de parceiros(as) por ano?

≤ 5 por ano 6-10 por ano > 10 por ano
 Fixo Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, com que frequência você usa camisinha?

Raramente De vez em quando
 Frequentemente Sempre Não sabe
 Não quis responder

19. Você já fez sexo oral?

Sim Não Não sabe Não quis responder

20. Você já fez sexo anal?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, qual foi o tipo?

Insertivo Receptivo Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, houve sangramento?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, houve ejaculação?

Sim Não Não sabe Não quis responder Não se aplica

21. Você já teve relação sexual com parceiro(a) com hepatite viral ou AIDS?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, qual foi o tipo?

22. Você já teve contato dentro de casa com alguém com hepatite viral ou AIDS?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, qual foi o tipo?

23. Você já teve alguma doença sexualmente transmissível ou venérea?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, qual foi o tipo?

24. Já sofreu algum acidente de trabalho no manejo com os animais ou manipulando suas vísceras?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, qual a frequência?

Raramente De vez em quando
 Frequentemente Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, houve exposição ou contato direto com o sangue dos animais sem proteção (luvas, jaleco, máscara, botas)?

Sim Não Não sabe Não quis responder

25. Costuma utilizar algum tipo de proteção individual para as mãos/ pés na rotina de trabalho?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, descreva qual:

26. Costuma utilizar algum tipo de proteção individual para olhos/ rosto na rotina de trabalho?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, descreva qual:

27. Tem o hábito de ingerir carne de porco?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, a ingestão é de carne crua ou mal cozida?

Sim Não Não sabe Não quis responder

Em caso afirmativo, descreva a frequência da ingestão por semana:

Assinatura do entrevistador