

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**HEPEVÍRUS E HEPACIVÍRUS EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO: UMA
ABORDAGEM MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA**

MARIANA SOARES DA SILVA

Porto Alegre

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**HEPEVÍRUS E HEPACIVÍRUS EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO: UMA
ABORDAGEM MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA**

Autora: Mariana Soares da Silva

**Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul na área de Virologia Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

da Silva, Mariana Soares

HEPEVÍRUS E HEPACIVÍRUS EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO:
UMA ABORDAGEM MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA / Mariana
Soares da Silva. -- 2018.

91 f.

Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. virologia. 2. Hepatite E. 3. Hepacivírus
bovino. 4. HNV. 5. HEV. I. Canal, Cláudio Wageck,
orient. II. Título.

Mariana Soares da Silva

HEPEVÍRUS E HEPACIVÍRUS EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO: UMA
ABORDAGEM MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA

Aprovada em 22 de fevereiro de 2018.

APROVADA POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Membro da Comissão
Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki

Membro da Comissão
Prof^a. Dr^a. Franciele Maboni Siqueira

Membro da Comissão
Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais Jane e Luíz. Mãe, obrigada pelo suporte e carinho incondicionais, és meu grande exemplo de vida. Pai, que saudades, você se faz vivo em todas as minhas decisões, pois sei que se estivesse aqui, me apoiaria e se orgulharia de todas as minhas pequenas vitórias.

Agradeço aos meus irmãos, cunhados, afilhados, sobrinhos, tios, dindos e ao meu primo. Em especial às minhas irmãs Daniela e Juliana. Sou muito grata por ter vocês por perto. Amo minha família.

Agradeço ao meu companheiro Bruno, pelo apoio em absolutamente todas as minhas decisões. Obrigada pelo suporte, carinho e por acreditar em mim. É maravilhoso compartilhar esses momentos com alguém que não mede esforços para me ver feliz.

Agradeço aos meus amigos. Em especial à Ananda, Cibele, Karen e Marcela. Grandes amigas, que posso contar a qualquer momento. Vocês moram no meu coração. E também as minhas amigas especiais Carine e Priscilla. Sempre juntas independente da distância!

Agradeço as amigas que fiz recentemente, mas que com certeza estarão presentes na minha vida daqui para frente. Obrigada Lenise, Fernanda, Nati, Arlete e Larissa. Gratidão por ter conhecido vocês!

Agradeço aos meus colegas de laboratório. Todos foram essenciais na minha caminhada. Em especial à minha colega Ana Cristina, com a qual compartilhei a bancada inúmeras vezes; à Cíntia, que vez meus dias mais alegres no laboratório; ao Christian, meu amigo e colega; e aos pós-doutorandos (e co-orientadores) Matheus, Renata, e Samuel. Obrigada pelo auxílio em todos os momentos que precisei. E agradeço a uma colega querida que muito me ensinou e incentivou. Agradeço, também, aos colegas da Universidade de Passo Fundo, em especial à Rafaela e ao Prof. Rafael Frandoloso.

Agradeço ao meu orientador, Cláudio Canal, pelas oportunidades e por acreditar em mim.

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado e sabem o quanto foram e são importantes na minha jornada!

RESUMO

Os cinco principais vírus da hepatite humana, denominados de A-E, possuem estruturas genômicas e estratégias de replicação distintas, além de pertencerem a cinco famílias virais diferentes. As infecções pelo vírus da hepatite A (HAV) e vírus da hepatite E (HEV) são, geralmente, agudas e transmitidas por rotas oro fecais. Em contraste, as infecções pelo vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e vírus da hepatite D (HDV) podem ser transitórias ou crônicas e são transmitidas por via parenteral. Apesar dessas diferenças, todos possuem importantes características em comum, como replicação e infecção primária no fígado. HEV, que pertence à família *Hepeviridae*, possui distribuição mundial e é responsável por causar uma hepatite aguda em humanos com grave apresentação clínica em pacientes imunodeprimidos e mulheres grávidas. Os genótipos HEV-3 e HEV-4 são considerados zoonóticos, sendo os suínos os principais portadores assintomáticos e responsáveis pela manutenção dessa rota de transmissão. O HCV, pertencente à família *Flaviviridae*, era a única espécie de hepacivírus (HVs) conhecida desde 1989. Recentemente, HVs foram descritos em diversas espécies animais e, apesar de não haver evidência de transmissão zoonótica, o estudo dessas espécies homólogas auxilia no entendimento da origem do HCV, além de fornecer possíveis modelos experimentais para estudos de patogenicidade e compreensão de sua biologia. Assim, o presente estudo estrutura-se em dois capítulos. O Capítulo 1 aborda a soroprevalência e diversidade genética de HEV em suínos de subsistência do Estado do Rio Grande do Sul (RS) provenientes de dois inquéritos soropidemiológicos (2012 e 2014). Através de um ELISA *in house* para detecção de anticorpos IgG anti-HEV, os resultados mostraram uma alta soroprevalência de HEV nos suínos do RS (80,6% em 2012 e 67,4% em 2014). Além disso, a análise filogenética confirmou a circulação de HEV-3 zoonótico (0,8%), com a presença de três subtipos distintos que apresentaram alta identidade nucleotídica com sequências de HEV isoladas de humanos. O Capítulo 2 aborda a presença de HVs em amostras de soro de bovinos provenientes do Nordeste do Brasil resultando numa frequência de 0,6%. O sequenciamento completo de duas amostras foi realizado e, a partir de sua análise e de todas as sequências de hepacivírus bovinos (HNVs) disponíveis no GenBank, propusemos uma classificação a nível de genótipo e subtipo, resultando em um genótipo (Genótipo 1) e quatro subtipos (A-D). Além disso, baseado na região NS3, foi realizada uma análise filogenética por inferência Bayesiana e análise de tempo de divergência por datação molecular, utilizando o critério de relógio molecular relaxado. Essa análise indicou uma origem em comum entre os HNVs que circulam na Alemanha e no Brasil; e um maior tempo de circulação desse vírus no continente Africano. O entendimento sobre vírus em animais é de extrema importância para a saúde animal e pública e, além disso, tem o objetivo de mapear reservatórios de doenças zoonóticas e auxiliar na compreensão da origem e evolução viral.

Palavras-chave: hepatite viral, HEV, sorologia, HCV, HNV, zoonose, inferência Bayesiana, relógio molecular.

ABSTRACT

The five major human hepatitis viruses, named A–E, have distinct genomic structures and replication strategies and belong to five different virus families. Hepatitis A virus (HAV) and hepatitis E virus (HEV) infections are transient and transmitted mainly by oral–fecal routes. In contrast, hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), and hepatitis delta virus (HDV) infections may be either transient or chronic and are transmitted by parenteral routes. Despite these differences, all viruses share important features, like primary infection and replication in hepatocytes. HEV, which belongs to Hepeviridae family, are worldwide distributed and responsible to acute human hepatitis with severe clinical presentation in immunocompromised patients and pregnant women. HEV-3 and HEV-4 genotypes are zoonotic, and swine are the mainly asymptomatic reservoirs, responsible for this transmission route maintenance. HCV belongs to the Flaviviridae family, and since 1989, was the only recognized HVs specie. Recently, HVs has been detected in several animal species, and besides no zoonotic transmission evidence, this study helps to understand HCV origin. Besides that, it could provide animal models to pathogenesis and biology HCV studies. Therefore, the present study is structured in two chapters. The Chapter 1 addresses HEV seroprevalence and genetic diversity in backyard pigs from two surveillance studies (2012 and 2014) in Rio Grande do Sul State (RS). Through an in-house ELISA for anti-HEV IgG antibodies detection, the results showed a high HEV seroprevalence in pigs in RS (80.6% em 2012 e 67.4% em 2014). Also, phylogenetic analysis confirmed zoonotic HEV-3 presence and three different subtypes with high nucleotide identity with human HEV sequences. Chapter 2 addresses the presence of HVs in bovine serum samples from Northeastern Brazil resulting in 0.6% frequency. Complete sequencing of two samples was performed, and from its analysis with all bovine hepacivirus (HNVs) sequences available on GenBank, we proposed a genotype and subtype classification, resulting into unique genotype (Genotype 1) and four subtypes (A-D). In addition, based on NS3 region, Bayesian phylogenetic inference analysis and molecular clock dating were performed. The analyses indicated a common origin of the HNV circulating in Germany and Brazil, and a long time of circulation of these viruses in the African continent. The understanding of animal viruses is extremely important for animal and public health, and, in addition, aims to map zoonotic reservoirs and assist in evolution and viral origin understanding.

Keywords: viral hepatitis, HEV, serology, HCV, HNV, zoonosis, Bayesian inferences, molecular clock dating.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ALT	alanina transaminase
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay</i>
HAV	vírus da hepatite A
HBV	vírus da hepatite B
HCV	vírus da hepatite C
HDV	vírus da hepatite D
Hel	helicase
HEV	vírus da hepatite E
HNV	hepacivírus N
HVR	região hipervariável
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
nm	nanômetro
ORF	Fase aberta de leitura
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RNA	ácido ribonucleico
RS	Rio Grande do Sul
SPF	<i>specific pathogens free</i> – livre de patógenos específicos
UI/L	unidades internacionais/litro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças e semelhanças entre as características dos genótipos de HEV.	25
Tabela 2. Nova classificação da família <i>Hepacivirus</i>	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Os hepevírus	12
2.1.1	Biologia e Classificação.....	12
2.1.2	Estrutura genômica.....	16
2.1.3	Replicação viral.....	17
2.1.4	HEV em animais	18
2.1.4.1	Suínos.....	18
2.1.4.2	HEV em outros animais reservatórios.....	20
2.1.5	Meios de transmissão	21
2.1.5.1	Transmissão zoonótica.....	21
2.1.5.2	Água contaminada.....	22
2.1.5.3	Transfusão sanguínea.....	22
2.1.5.4	Transmissão vertical.....	23
2.1.5.5	Transmissão ocupacional	23
2.1.6	Curso clínico em humanos	24
2.1.6.1	Infecção aguda	24
2.1.6.2	Infecção crônica	25
2.1.6.3	Manifestações extra-hepáticas	25
2.1.6.4	HEV durante a gravidez.....	26
2.1.7	Diagnóstico	26
2.1.7.1	Sorologia	27
2.1.7.2	Diagnóstico molecular	28
2.1.8	Prevenção e controle	28
2.2	Os hepacivírus	29
2.2.1	Biologia e classificação.....	29
2.2.2	Estrutura genômica.....	31
2.2.3	Replicação viral do HCV	32
2.2.4	Hepacivírus em animais	34

2.2.5	Possíveis origens do HCV.....	36
2.2.6	Possíveis rotas de transmissão de HVs entre espécies.....	38
2.2.7	Modelos experimentais para o estudo de HCV.....	38
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivo geral.....	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4	CAPÍTULO 1- ARTIGO CIENTÍFICO: “Backyard pigs are reservoir of zoonotic hepatitis E virus in Southern Brazil”.....	41
5	CAPÍTULO 2- ARTIGO CIENTÍFICO: “Comprehensive Evolutionary and Phylogenetic Analysis of Hepacivirus N: Classification of novel subtypes”.....	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Os cinco vírus da hepatite humana, denominados de A-E, possuem estruturas genômicas e estratégias de replicação distintas, além de pertencerem a cinco famílias virais diferentes. As infecções pelo vírus da hepatite A (HAV) e vírus da hepatite E (HEV) são, geralmente, agudas e transmitidas por rotas oro fecais. Em contraste, as infecções pelo vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e vírus da hepatite D (HDV) podem ser transitórias ou crônicas e são transmitidas por via parenteral. Apesar dessas diferenças, todos possuem importantes características em comum, como replicação e infecção primária no fígado. O presente trabalho teve como enfoque o estudo do HEV, denominado *Orthohepevirus A* pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), pertencendo ao gênero *Orthohepevirus* dentro da família *Hepeviridae* (SMITH et al., 2014a), e do HCV, denominado *Hepacivirus C*, gênero *Hepacivirus*, dentro da família *Flaviviridae* (SMITH et al., 2016a).

A hepatite E, causada pelo HEV que pertence à família *Hepeviridae* e à espécie *Orthohepevirus A*, é considerada uma doença negligenciada, apesar de possuir distribuição mundial e representar um importante problema na saúde pública (MYINT; GIBBONS, 2008; PURCELL; EMERSON, 2008). O HEV é responsável por causar uma hepatite aguda autolimitante em humanos, presente em diversas partes do mundo (DUQUE et al., 2012; LOPES DOS SANTOS et al., 2010; SHALIMAR; ACHARYA, 2013). Em 1-4% dos casos, a infecção pode culminar em uma hepatite fulminante e a mortalidade pode chegar a 20% em mulheres grávidas em regiões endêmicas (PURCELL; EMERSON, 2008). Mais recentemente, um considerável aumento de casos de hepatite E crônica tem sido descrito em indivíduos imunodeprimidos, nas quais pode evoluir rapidamente para um quadro de cirrose (KAMAR et al., 2014).

Os principais reservatórios animais de HEV são os suínos e, apesar da infecção ser assintomática, são a principal fonte zoonótica de transmissão ao ser humano, principalmente através de carnes cruas e embutidos com produtos suínos e água contaminados (BRASSARD et al., 2012; DOCEUL et al., 2016; VIVEK et al., 2013). O Rio Grande do Sul (RS) é responsável por 21% da produção de carne suína brasileira, no entanto, 67% das propriedades rurais ainda são destinadas à produção de subsistência e abastecimento de pequenos comércios não fiscalizados (POETA et al., 2014). Essas propriedades caracterizam-se, na grande maioria, por baixas condições higiênico-sanitárias e falta de saneamento e tratamento de dejetos. Essas características favorecem

a transmissão de patógenos, inclusive do HEV (PURCELL; EMERSON, 2008). Tendo em vista a importância de monitorar a presença desse patógeno em suínos, o primeiro objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo sorológico e de diversidade genética de HEV em suínos de subsistência do Rio Grande do Sul (RS) utilizando amostras de dois inquéritos soroepidemiológicos realizados em 2012 e 2014.

O gênero *Hepacivirus*, pertencente à família *Flaviviridae* (ICTV), é composto por vírus de RNA fita simples de sentido positivo. De acordo com a nova classificação, o gênero é dividido em 14 espécies, designados de A-N (SIMMONDS et al., 2017b). O hepacivírus que pertence à espécie C (*Hepacivirus C*, HCV) infecta humanos e é causador de uma infecção hepática grave e crônica (SMITH et al., 2016a). Aproximadamente 180 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas no mundo, com alta probabilidade de desenvolver doenças hepáticas, como fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (HANAFIAH et al., 2013).

Desde 1996, quando um grupo de vírus chamado *Hepatitis C-like viruses* foi classificado como gênero *Hepacivirus* pelo ICTV, o HCV era a única espécie reconhecida. No entanto, hepacivírus (HVs) têm sido detectados em diversos animais domésticos e selvagens, incluindo equinos, cães, roedores, morcegos e, mais recentemente, bovinos (BEXFIELD et al., 2014; HARTLAGE; CULLEN; KAPOOR, 2016; LUKASHEV et al., 2013; QUAN et al., 2012; RAMSAY et al., 2015). Em 2016, foram incluídos na classificação outras 13 espécies virais, nomeadas de A à N. O hepacivírus bovino pertence à espécie N (*Hepacivirus N*, HNV) e foi detectado em amostras de soros de bovinos domésticos na Alemanha (BAECHLEIN et al., 2015) e África (CORMAN et al., 2015) e um estudo recente mostrou que sua circulação no Brasil ocorre há pelo menos 20 anos (CANAL et al., 2017).

As análises filogenéticas baseadas em regiões conservadas do genoma (NS3 e NS5) demonstram que os HNVs possuem grande similaridade entre si, no entanto, apresentam alta distância genética de outros HVs, sendo mais relacionados aos hepacivírus de morcegos e roedores (HARTLAGE; CULLEN; KAPOOR, 2016). O curso de infecção natural de HNV nos bovinos revela existência dos estágios agudo e crônico e, apesar de não apresentarem sintomatologia clínica, a presença de altos títulos virais no fígado e a predição do sítio de ligação miR-122 confirmam o hepatotropismo do HNV (BAECHLEIN et al., 2015).

Tendo em vista que não existe um modelo experimental de estudo para HCV e a multiplicação do vírus em cultivo de células é de difícil realização (BUKH, 2012), o

estudo de HVs, como o HNV, pode abrir novas áreas de pesquisa para compreender a biologia dos hepacivírus. Além disso, auxiliam a elucidar a origem e evolução viral do HCV e identificar possíveis reservatórios zoonóticos. Assim, o segundo objetivo do presente trabalho foi detectar hepacivírus em bovinos do Nordeste do Brasil, realizando o sequenciamento completo de duas amostras, além de propor uma classificação a nível de genótipo e subtipo para os HNVs.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os hepevírus

2.1.1 Biologia e Classificação

O vírus da hepatite E (HEV) é um vírus pequeno, esférico, com aproximadamente 27-34 nm de diâmetro e possui capsídeo icosaédrico. Seu genoma de RNA fita simples possui polaridade positiva e, aproximadamente, 7,2 Kb (EMERSON; PURCELL, 2006). HEV foi descrito pela primeira vez em 1978, em um surto de hepatite na Índia (KHUROO, 1980). Foi inicialmente isolado e visualizado em microscopia eletrônica como partículas não envelopadas, no entanto, estudos recentes mostram que HEV existe como um vírus “envelopado” na circulação sanguínea. Essas partículas envelopadas são denominados de vírions “*quasi-enveloped*” (eHEV) (YIN; LI; FENG, 2016).

Até 1998, o HEV era classificado como parte da família *Caliciviridae* devido às semelhanças morfológicas compartilhadas com outros vírus da mesma família (REYES, 1991). Posteriormente, observou-se que sua estrutura genômica assemelhava-se ao vírus da rubéola e foi, então, classificado na família *Togaviridae* (EMERSON; PURCELL, 2006). Em 2004, o ICTV aprovou a nova classificação do HEV no gênero *Hepevirus* da família *Hepeviridae* (Figura 1).

Posteriormente, a família foi dividida em dois gêneros, *Piscihepevirus* e *Orthohepevirus* (SMITH et al., 2014^a). O gênero *Piscihepevirus* é o novo membro e mais distinto na família *Hepeviridae* e foi identificado em trutas (BATTS et al., 2011). O gênero *Orthohepevirus* contém quatro espécies: *Orthohepevirus A*; *Orthohepevirus B*, que infecta aves (TSAI; STUDY, 2014); *Orthohepevirus C*, que infecta roedores e carnívoros (LI et al., 2013) e o *Orthohepevirus D* infecta morcegos (DREXLER et al., 2012). A espécie *Orthohepevirus A* é a mais representativa, composta por sete genótipos. Os genótipos 1 e 2 (HEV-1/HEV-2) (VINA-RODRIGUEZ et al., 2015) infectam somente humanos, os genótipos 5 e 6 (HEV-5/HEV-6) infectam javalis (KUKIELKA et al., 2016) e o genótipo 7 (HEV-7) infecta camelos (AFRICA et al., 2016). Os genótipos 3 e 4 (HEV-3/HEV-4), considerados potencialmente zoonóticos, infectam humanos, suínos, coelhos e outras espécies de mamíferos (SMITH et al., 2014a). A análise de genomas completos tem melhorado as reconstruções filogenéticas e a classificação de HEV, e mesmo, as árvores filogenéticas baseadas em regiões

parciais (geralmente da ORF1 e ORF2), demonstram topologia muito similar quando comparadas as realizadas com genoma completo (VINA-RODRIGUEZ et al., 2015).

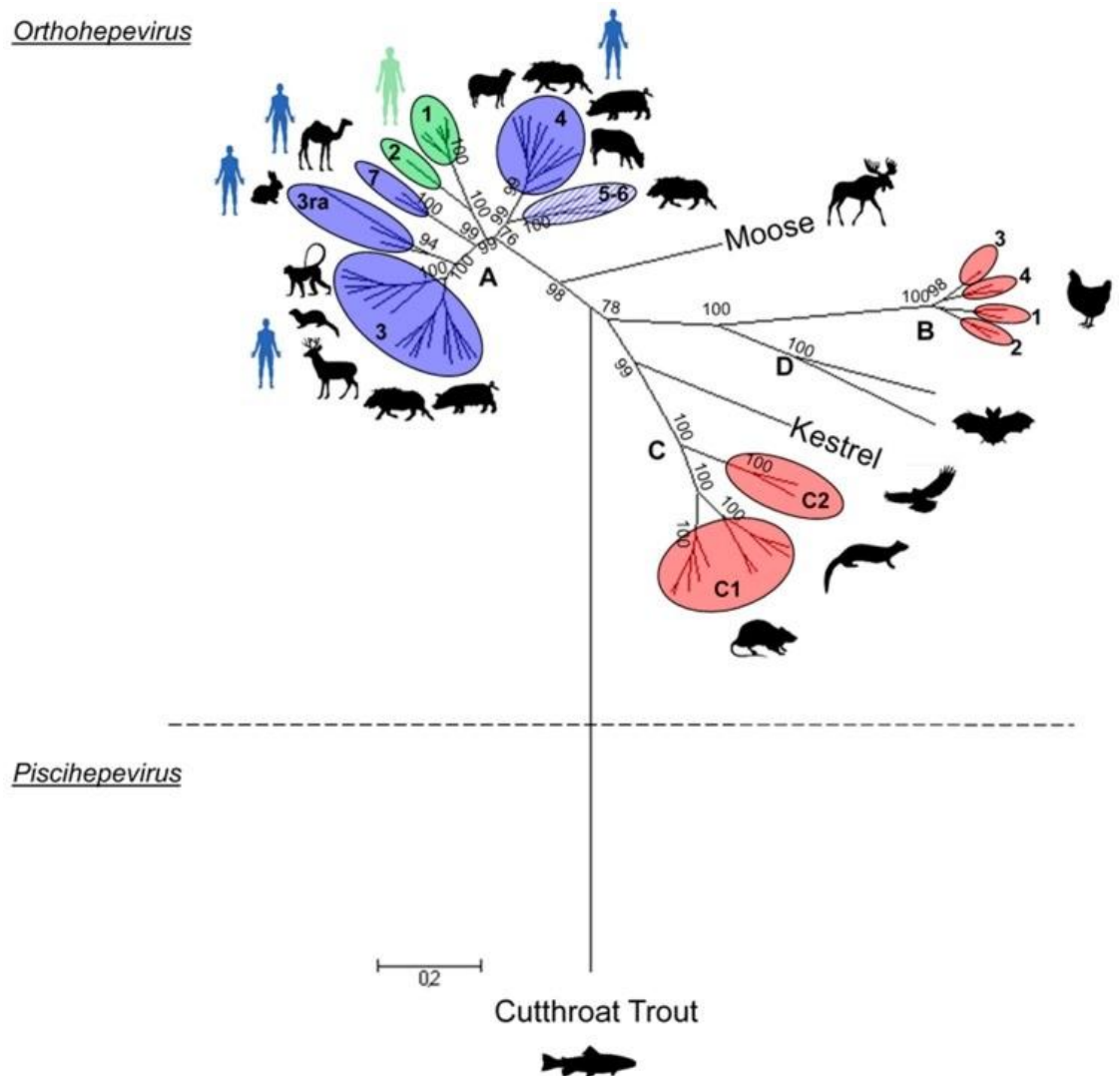


Figura 1. Árvore filogenética representativa da família *Hepeviridae*. Os gêneros *Orthohepevirus* e *Piscihepevirus* estão claramente divididos. As espécies pertencentes a genótipos não zoonóticos de HEV estão em vermelho, as espécies de genótipos isolados de animais e humanos estão em azul, e os genótipos que infectam somente humanos aparecem em verde. Fonte: adaptado de DOCEUL (2016b).

Os genótipos de HEV são, ainda, classificados em subtipos. Essa classificação não é tão clara quanto a que divide a família em genótipos uma vez que os critérios não são tão consistentes na definição das distâncias intra- e inter-subtipos (SMITH; PURDY; SIMMONDS, 2013). Por exemplo, a distância p de nucleotídeos entre subtipos de HEV-1 são todas inferiores a 0.12, enquanto que a entre subtipos de HEV-3 variam de 0.12 a 0.26, e de 0.13 a 0.18 para subtipos de HEV-4 (SMITH et al., 2014a, 2016b). Além disso, alguns estudos classificaram sequências tendo como base amostras em *pools*, o que provavelmente gerou uma mistura de sequências, tornando a classificação inconsistente (PEI; YOO, 2002; POEL et al., 2001).

No entanto, após um estudo que propôs sequências referência para todos os subtipos (SMITH et al., 2016b), é possível realizar essa classificação baseando-se, principalmente, nas regiões ORF1 e/ou ORF2. É sabido, também, que a filogenia com essas regiões parciais são as que melhor refletem a realizada com os genomas completos (LU; LI; HAGEDORN, 2006). Atualmente, os subtipos de HEV-3 dividem-se em grandes grupos da seguinte forma: um clado maior composto pelos subtipos 3a, 3b, 3c, 3h, 3i e 3j (3abchij), enquanto que 3e, 3f, 3g (3efg) formam um segundo grupo (SMITH et al., 2016b) (Figura 2).

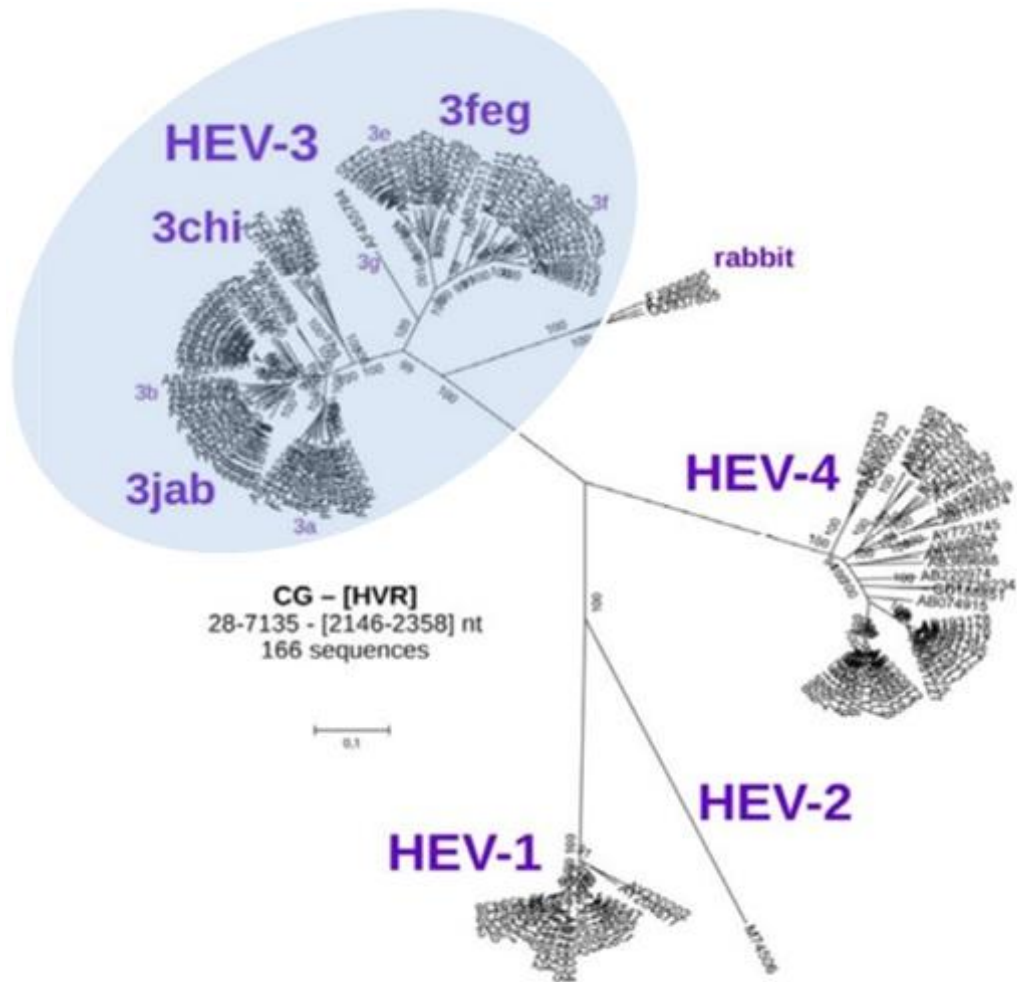


Figura 2 Árvore filogenética representativa dos genótipos de HEV e dos subtipos de HEV-3. Os subtipos de HEV-3 estão representados, o que permite visualizar a divisão em dois grandes grupos: subtipos 3abchij e subtipos 3efg. Fonte: adaptado de VINA-RODRIGUEZ (2015).

2.1.2 Estrutura genômica

O genoma de HEV consiste de uma fita simples de RNA, polaridade positiva, com a presença de CAP e uma cauda poli-A, com aproximadamente 7200 nucleotídeos. Possui duas regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR), e três fases abertas de leitura (ORFs) (SMITH; PURDY; SIMMONDS, 2013) (**Figura 3**). A ORF1 é a mais longa e codifica proteínas não estruturais (metiltransferase, RNA polimerase RNA-dependente, RNA helicase e papaína-cisteína protease). Ela inicia imediatamente após a região 5'UTR e codifica um polipeptídeo com 1693 aminoácidos envolvidos na replicação viral e no processamento das proteínas (AHMAD; HOLLA; JAMEEL, 2011; OKAMOTO, 2007; SMITH; PURDY; SIMMONDS, 2013).

A ORF2 codifica a proteína do capsídeo viral que contém os epítomos alvos da resposta imunológica neutralizante do hospedeiro. Possui 660 aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 72 kDa. Trata-se de uma proteína imunogênica, alvo de anticorpos, possuindo epítomos lineares e conformacionais. A ORF3, sobreposta entre a ORF1 e ORF2, é a menor região codificante do genoma e traduz uma fosfoproteína que se associa ao citoesqueleto dos hepatócitos, sendo essencial à infectividade do vírus *in vivo*, além de ser responsável pelo egresso das partículas virais das células infectadas (AHMAD; HOLLA; JAMEEL, 2011; OKAMOTO, 2007).

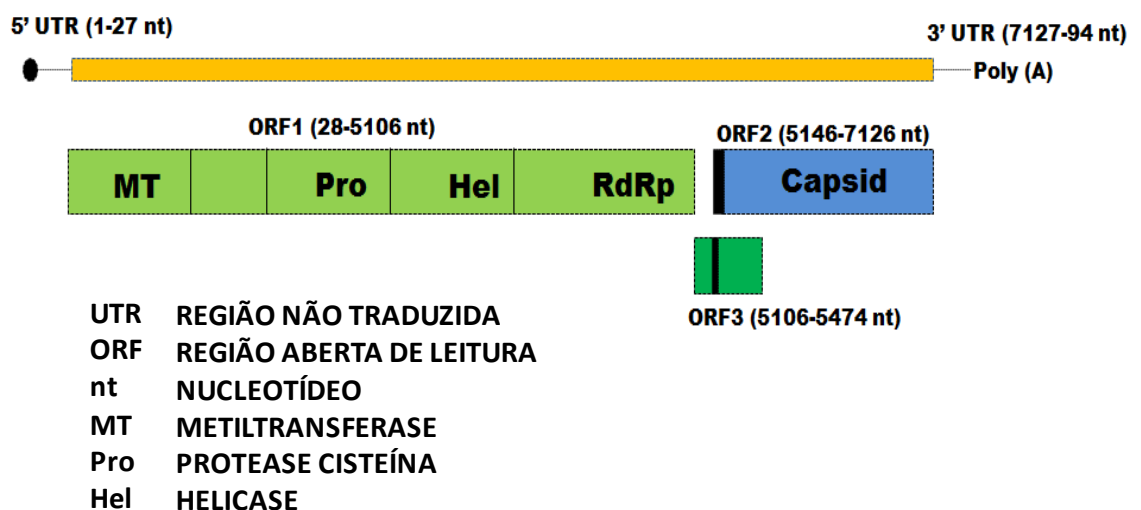


Figura 3. Organização genômica de HEV. O genoma possui duas regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR) e três ORFs. A ORF1 codifica proteínas não estruturais envolvidas na replicação viral, a ORF2 codifica a proteína do capsídeo e a ORF3 codifica uma pequena fosfoproteína regulatória. Fonte: adaptado de HUSSAIN (2013).

2.1.3 Replicação viral

Devido à dificuldade de replicação em cultivo celular, o ciclo do HEV ainda é pouco conhecido. Sabe-se que o RNA de fita positiva é produzido no citoplasma celular com o objetivo de traduzir as proteínas não estruturais codificadas pela ORF1. Algumas dessas proteínas comandam a síntese de um RNA antígenômico (negativo) iniciando pela extremidade 3' do genoma viral. Esse RNA atua como molde para síntese de novas fitas de RNA genômico (sentido positivo) e antígenômico (sentido negativo), responsáveis pela síntese das proteínas do capsídeo traduzidas a partir da ORF2 (**Figura 4**) (GROUP et al., 2008).

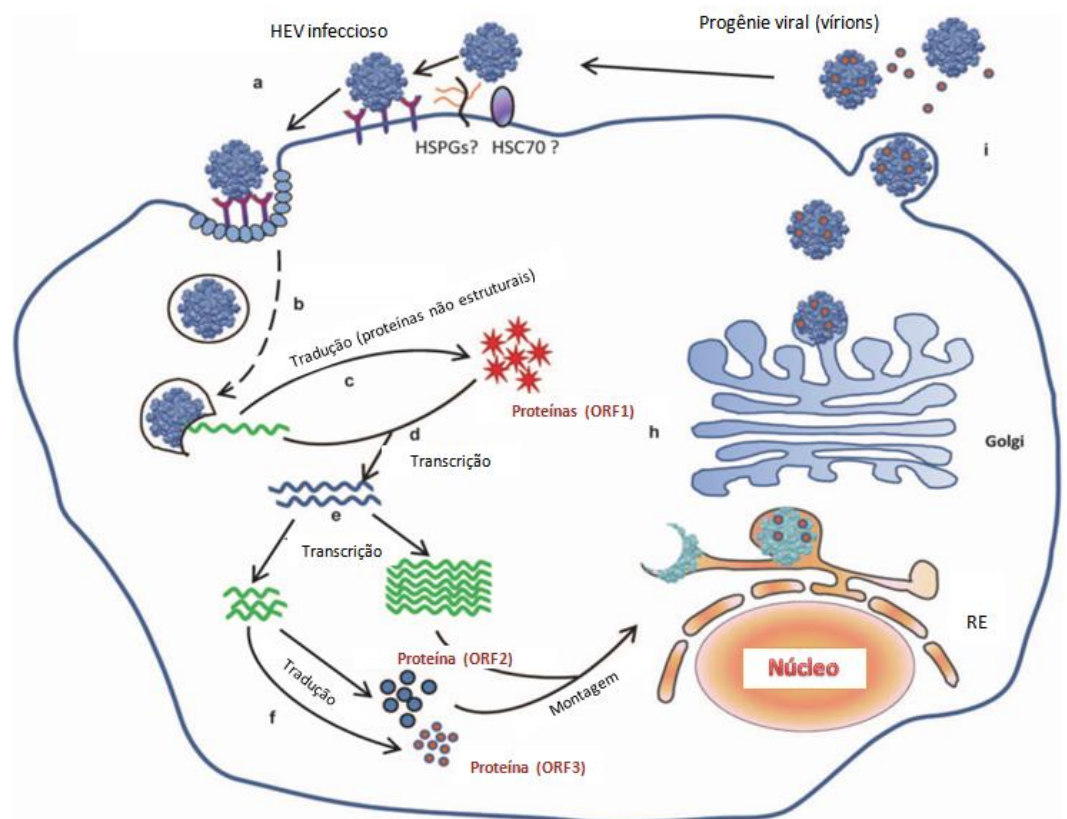


Figura 4. Ciclo de replicação de HEV. a) HEV adere à superfície celular através de HSPGs (glicoproteína, *Heparan sulfate proteoglycans*), HSC70 (chaperona, *Heat shock cognate 71 kDa protein*) ou outros prováveis receptores de ligação e entra na célula através de um receptor celular específico desconhecido. b) O vírion de HEV descapsidado penetra na membrana, entra na célula e então libera o RNA genômico de sentido positivo no citoplasma celular. c) O RNA genômico serve como molde para a tradução da região da ORF1 que codifica proteínas não estruturais no citoplasma. d) A RdRp viral sintetiza um RNA intermediário de sentido negativo a partir do RNA genômico que e) serve como molde para a produção dos genomas da progênie viral. f) As regiões ORF2 e ORF3 são traduzidas a partir de um RNA subgenômico. g) A proteína do capsídeo (ORF2) protege o RNA viral genômico e monta novos vírions. h) Os vírions nascentes são transportados para a membrana celular e a proteína ORF3 facilita o transporte do vírion. i) Os vírions nascentes são liberados das células infectadas. Fonte: adaptado de CAO; MENG (2012).

O sítio primário de replicação do HEV é nos hepatócitos, mas ocorre também no intestino, cólon e linfonodos. As partículas virais são liberadas no canal biliar com estrutura não envelopada. No entanto, algumas das partículas que são liberadas na circulação contêm componentes de envelope provenientes dos hepatócitos, as eHEV. A ligação das partículas eHEV nas células é menos eficiente quando comparada as partículas não envelopadas. Entretanto, essas novas partículas são infecciosas e, como não carregam antígenos virais em sua superfície, são muito menos sensíveis a anticorpos neutralizantes. O ciclo de vida duplo de HEV é similar ao vírus da hepatite A (HAV), um vírus também hepatotrópico, mas que não é filogeneticamente relacionado ao HEV. Recentemente, foi descoberto que HAV, vírus de biologia e transmissão similares ao HEV, também existe na circulação sanguínea na forma envelopada, enquanto vírions nus são liberados nas fezes (YIN; LI; FENG, 2016).

2.1.4 HEV em animais

2.1.4.1 Suínos

O primeiro reservatório animal identificado para o HEV foi o suíno, em 1995, no Nepal, quando anticorpos específicos e RNA foram detectados (CLAYSON et al., 1995a). Após dois anos, HEV foi identificado a partir de um estudo prospectivo em uma granja comercial de suínos nos Estados Unidos e as sequências foram, então, caracterizadas geneticamente. A partir do monitoramento dos animais desde o nascimento até os cinco meses de idade, foi possível estudar a infecção por HEV, incluindo a soroconversão, viremia e eliminação dos vírus nas fezes através de RT-PCR. O vírus, geneticamente relacionado ao HEV humano foi, então, designado HEV suíno (MENG et al., 1997).

Desde a sua descoberta, o HEV em suínos tem sido detectado mundialmente (BERTO et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2009; GARDINALI et al., 2012; HUANG et al., 2002; LANGE et al., 2016; LEGRAND-ABRAVANEL et al., 2009) e, até o momento, os genótipos de HEV identificados em suínos são o HEV-3 e HEV-4, também conhecidos por causar hepatite em humanos (DOCEUL et al., 2016). Os suínos naturalmente infectados por HEV são assintomáticos. Em um estudo realizado por Meng e colaboradores (1998), foram identificados sinais de hepatite e necrose hepatocelular em algumas lesões microscópicas. No entanto, na necropsia, não foram observadas lesões hepáticas graves.

A detecção de HEV-RNA é variável entre os estudos, como pode ser observado em trabalhos realizados no Brasil (20% de RNA positivos) (PASSOS-CASTILHO; GRANATO, 2017), Canadá (7%) (NANTEL-FORTIER et al., 2016) e Espanha (37%) (DE DEUS et al., 2007; RESERVOIRS; ROUTES, 2016). Essa variação nas taxas de detecção está muito relacionada à amostra escolhida, uma vez que a viremia persiste no máximo entre 1-2 semanas; enquanto que a excreção fecal pode perdurar por até sete semanas (BOUWKNEGT et al., 2009). Estudos no Reino Unido, Espanha e Japão demonstraram que a excreção pode se estender por 10-12 semanas, 13-16 semanas e até 1-3 meses, respectivamente (DE DEUS et al., 2008; MCCREARY et al., 2008; NAKAI et al., 2006).

A resposta de anticorpos IgM é imediata a infecção e, geralmente, ocorre quando os animais estão na creche, entre 8-10 semanas de idade. Essa resposta diminui rapidamente, seguida pela resposta de anticorpos IgG, que ocorre entre 4-8 semanas pós infecção ou inoculação experimental e permanece alta por tempo indeterminado (DE DEUS et al., 2008; MCCREARY et al., 2008; NAKAI et al., 2006). Sendo assim, quando se fala em detecção de anticorpos IgG anti-HEV os valores são mais altos, variando entre 46-100% de positivos (PAVIO; MENG; DOCEUL, 2015), como já foi observado em Laus (46%) (BLACKSELL et al., 2007), China (78,9%) (LI et al., 2011), Japão (93%) (TAKAHASHI et al., 2010), Nova Zelândia (90%) e Brasil (81%) (DOS SANTOS et al., 2009).

Os produtos alimentícios com derivados de carne ou miúdos de suínos têm sido amplamente testados quanto à presença de HEV. Estudo na Alemanha detectou RNA de HEV em 26% das salsichas cruas e 22% das salsichas de fígado suíno (SZABO et al., 2015). No Reino Unido, 10% das salsichas estavam contaminadas com HEV (BERTO et al., 2012), assim como 30% na França (MED et al., 2014). No Brasil, 36% dos produtos derivados de carne suína, estavam contaminados com HEV (HELDT et al., 2016). Um estudo comprovou filogeneticamente a transmissão zoonótica através de carne de suíno em um paciente que desenvolveu hepatite aguda na Espanha (RIVEIRO-BARCIELA et al., 2015).

Suínos livres de patógenos específicos (SPF) inoculados pela via endovenosa com amostras recuperadas de pacientes humanos com infecção por HEV-3 e HEV-4 (FEAGINS et al., 2008; MENG et al., 1998) apresentaram lesões microscópicas leves no fígado, soroconverteram e excretaram HEV viável nas fezes (LEE et al., 2009). A replicação extra-hepática também já foi demonstrada (WILLIAMS et al., 2001). A

transmissão experimental entre espécies foi realizada com sucesso ao infectar suínos SPF com diferentes cepas de HEV de coelhos e, mais recentemente, de javalis, mas não de roedores (COSSABOOM et al., 2012). No entanto, os suínos são, claramente, resistentes às infecções experimentais com HEV-1 e HEV-2 (LEE et al., 2009). A transmissão experimental de HEV-3 para suínos e primatas não-humanos foram executadas com sucesso. A análise das sequências durante a transmissão interespecie revelou 99,8% de identidade entre as sequências detectadas nos primatas não-humanos e coelhos (LIU et al., 2013; GARDINALI et al., 2017).

2.1.4.2 HEV em outros animais reservatórios

Em 1999, um vírus relacionado ao HEV foi associado à doença no fígado e no baço em frangos na Austrália. Este vírus possuía cerca de 62% de identidade com sequências de nucleotídeos de HEV dos genótipos 1-4. Em 2001, foi detectado a partir de amostras de bile de galinhas nos EUA com síndrome de hepato-esplenomegalia (HAQSHENAS et al., 2001). Posteriormente, o vírus foi denominado HEV aviário e, desde então, verificou-se que circula em frangos norte-americanos, europeus e asiáticos (HUANG et al., 2002; PERALTA et al., 2009; TSAI; STUDY, 2014). O HEV aviário pertence à espécie *Orthohepevirus B* e é considerado responsável pela síndrome de hepato-esplenomegalia em galinhas (SMITH et al., 2014a).

O genótipo que circula em coelhos é o HEV-3 e já foi detectado na China, Estados Unidos, França, Alemanha e outros países (BURT et al., 2016; GAREIS; EIDEN, 2017). A transmissão para os humanos não foi formalmente comprovada, mas é sugerida, pois o HEV de coelhos compartilha 80-85% de identidade com as sequências de HEV-3 humana. A transmissão experimental de HEV-3 de coelhos para primatas não-humanos e suínos foi realizada com sucesso, e os coelhos também podem infectar-se com HEV-4 suíno, além do HEV-1 e HEV-4 de humanos. A análise das sequências durante a transmissão inter-espécies revelou 99,8% de identidade entre as sequências isoladas dos coelhos e primatas não-humanos, sugerindo, novamente, que não é necessária uma maior adaptação durante a transmissão zoonótica de HEV-3 (BURT et al., 2016; GAREIS; EIDEN, 2017).

O HEV de roedores, pertencente ao *Orthohepevirus C*, tem sido detectado mundialmente com soroprevalência variando entre 13-90% (YUGO; MENG, 2013). A identidade nucleotídica entre os genomas de HEV detectados em roedores é de aproximadamente 60% com os genótipos HEV-1 e HEV-4 (VITRAL et al., 2005). A

detecção de HEV em bovinos não é muito comum, mas já foi identificado em bovinos na China (HU, 2010; YAN et al., 2016). Recentemente, um grupo detectou HEV-4 infeccioso em bovinos de leite e no próprio leite dos animais. Além disso, concluíram que a pasteurização não inativou o vírus, apenas a fervura, alertando para o alto risco de transmissão zoonótica (HUANG et al., 2016).

2.1.5 Meios de transmissão

2.1.5.1 Transmissão zoonótica

Desde sua descoberta, o risco de transmissão zoonótica de HEV vem sendo discutido, aumentando a preocupação para a saúde pública (MYINT; GIBBONS, 2008). A primeira evidência direta de transmissão zoonótica ocorreu após seguidos casos de hepatite entre pacientes que haviam ingerido sashimi de cervos. O RNA de HEV foi recuperado dessa carne apresentando sequência idêntica a detectada nesses pacientes (TEI et al., 2003). Após, outros casos reportaram uma evidência adicional da possível transmissão zoonótica de HEV através do consumo de alimento contaminado. Nesses estudos, sequências idênticas ou com alta identidade foram detectadas em pacientes com HEV e produtos de animais que haviam consumido carne de javali grelhado no Japão, carne de porco na Espanha e salsicha *ficatellu* na Córsega (LAPA; CAPOBIANCHI; GARBUGLIA, 2015; PAVIO; MENG; DOCEUL, 2015).

Os genótipos HEV-3 e HEV-4 estão presentes na cadeia alimentar de origem suína mundialmente. Estudos reportaram a presença de HEV em produtos comerciais contendo fígado e/ou carne suína em diversos países, como Estados Unidos (FEAGINS et al., 2007), Holanda (BOUWKNEGT et al., 2007), Reino Unido (BERTO et al., 2012), Espanha (BARTOLO et al., 2012) e Brasil (HELDT et al., 2016). O RNA de HEV também foi detectado em fígados de javalis, cervos e coelhos silvestres caçados na França (BERTAGNOLI et al., 2015) e no fígado de javalis caçados na Itália (PAVIO et al., 2014). Suínos inoculados pela via intravenosa com homogeneizado a partir de fígado suíno contaminado, comprados em supermercados nos Estados Unidos, infectaram-se com HEV (FEAGINS et al., 2007), mostrando que fígados suínos e produtos derivados da carne suína podem conter vírus infeccioso e são fontes de transmissão de HEV.

Outros alimentos que não são derivados de produtos de origem animal também podem estar contaminados com HEV e são possíveis fontes de transmissão. Por

exemplo, HEV-3 e HEV-4 foram detectados em mexilhões da Galícia (14,8% positivos) (MESQUITA et al., 2016) e em ostras na Coreia (8,7%) (SONG et al., 2010). Além disso, o RNA de HEV foi detectado em morangos no Canadá (BRASSARD et al., 2012) e em saladas de vegetais na Europa (MAUNULA et al., 2013) através da contaminação da água. A transmissão zoonótica de HEV para humanos através desses alimentos ainda não foi comprovada, no entanto, o consumo de frutos do mar foi relacionado a um caso de infecção com HEV-4 de um paciente japonês que viajou para o Vietnã e a um surto de HEV-3 em um navio cruzeiro (SAID et al., 2009).

A presença de HEV em produtos alimentícios derivados de animais reservatórios de HEV zoonótico ou alimentos que estão contaminados através de sua superfície pelo contato com água de irrigação contaminada é um problema, ainda negligenciado, na saúde pública (MYINT; GIBBONS, 2008). Poucos estudos estão sendo conduzidos usando cultivo de células ou modelos experimentais *in vivo* para avaliar a estabilidade de HEV no ambiente e em alimentos. Sabe-se que os vírus infecciosos permanecem nas suspensões de fezes ou no sobrenadante de cultivo de células após aquecimento entre 56-60°C (EMERSON; ARANKALLE; PURCELL, 2018). A inativação eficiente de HEV em alimentos infectados foi alcançada após, no mínimo, 20 minutos a uma temperatura interna de 71°C (BARNAUD et al., 2012).

2.1.5.2 Água contaminada

Nos países em desenvolvimento, principalmente os localizados no continente Asiático, ocorrem grandes surtos de HEV através da transmissão pela água. Esses surtos são, na maioria das vezes, ocasionados pelo HEV-1 e estão associados a más condições higiênico-sanitárias e de saneamento (GURLEY et al., 2014; GUTHMANN et al., 2006). O HEV-3 já foi detectado em amostras de água na Holanda (RUTJES et al., 2009), Itália (IACONELLI et al., 2015), Argentina (MARTÍNEZ WASSAF et al., 2014) e Brasil (VASCONCELOS et al., 2015). Na Eslovênia, 3,3% das amostras de água superficial próximas a propriedades de suínos estavam contaminadas (RICCI et al., 2017).

2.1.5.3 Transfusão sanguínea

Tendo em vista que HEV-3 e HEV-4 são, na maioria das vezes, caracterizados por infecções assintomáticas, a transmissão através de transfusão sanguínea é um grande risco (MANSUY et al., 2011). Um estudo no Reino Unido que testou 225.000 doadores de sangue detectou 78 pacientes positivos para HEV-RNA. Como os títulos virais, em

média, não eram considerados altos, seu maior risco de causar doença é em pacientes imunodeprimidos, principalmente os receptores de transplantes de órgãos. A partir disso, o serviço oficial de doação de sangue do Reino Unido instituiu que só poderiam ser realizadas transfusões em pacientes transplantados a partir de doadores negativos para HEV (HEWITT et al., 2014).

No Brasil, até o momento, foram conduzidos três estudos em bancos de doadores de sangue. No Estado de São Paulo, o mais populoso do País, o estudo apresentou 9,8% de soropositividade nos doadores de sangue (PASSOS-CASTILHO et al., 2017). Outro estudo conduzido no Sudeste Brasileiro apresentou 10% de soropositividade em um banco de sangue em 2014 (PASSOS-CASTILHO et al., 2016), e uma pesquisa recente realizada no Sul mostrou uma alta soroprevalência de HEV em doadores de sangue (40,3%) (PANDOLFI et al., 2017).

2.1.5.4 Transmissão vertical

A transmissão vertical de HEV a partir de mulheres que desenvolveram infecção durante a gestação é muito comum (KHUROO; KAMALI; JAMEEL, 2018). Vários estudos estimam uma taxa de transmissão entre 33-67% (GUTHMANN et al., 2006; JILANI et al., 2007; SHALIMAR; ACHARYA, 2013). Apesar da morte fetal ser comum, muitos recém-nascidos recuperam-se sem sequelas. O RNA de HEV tem sido detectado, inclusive, no leite materno de mulheres infectadas, mas até o momento faltam estudos que confirmem ou expliquem a possível transmissão através do aleitamento materno (RIVERO-JUAREZ et al., 2016).

2.1.5.5 Transmissão ocupacional

Além da transmissão através de alimentos, estudos de soroprevalência têm sugerido que o contato direto com animais reservatórios infectados é um fator de risco para a exposição ao vírus. Maior soroprevalência de anticorpos anti-HEV foi encontrada em produtores de suínos, médicos veterinários, caçadores e trabalhadores florestais (MENG et al., 2002; OLSEN et al., 2006). Na França, assim como no Brasil, estudos demonstraram que o contato com animais contaminados seria a mais provável causa de HEV aguda em um paciente (LOPES DOS SANTOS et al., 2010; RENOU et al., 2007).

A infecção por HEV tem sido relacionada com a exposição a animais, principalmente suínos, na África, Europa e Estados Unidos (OLSEN et al., 2006; TEO, 2009; VILLALBA et al., 2013). Algumas profissões, incluindo médicos veterinários,

fazendeiros que trabalham com produção de suínos, trabalhadores de abatedouros e profissionais em contato com esgoto estão bem mais susceptíveis a infecção por HEV (IVANOVA et al., 2015; MENG et al., 2002).

2.1.6 Curso clínico em humanos

Os diferentes genótipos de HEV diferem nas características de transmissibilidade, distribuição geográfica, fontes de infecção, distribuição geográfica, assim como no curso clínico da doença em humanos (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre localização geográfica, rota de transmissão principal, grupos de alto risco e transmissão zoonótica entre os quatro genótipos de HEV.

Característica	HEV-1	HEV-2	HEV-3	HEV-4
Localização geográfica	África; Ásia e Uruguai	México, África	América do Sul	China, Taiwan, Japão
Rota de transmissão	Água e alimento, rota oro-fecal	Água e alimento, rota oro-fecal	Alimento	Alimento
Grupos com alto risco	Adultos jovens	Adultos jovens	Adultos com >40 anos, pessoas imunocomprometidas	Adultos jovens
Transmissão zoonótica	Não	Não	Sim	Sim
Infecção crônica	Não	Não	Sim	Sim

Tabela adaptada de *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*.

Fonte: (<https://www.cdc.gov/hepatitis/hev/hevfaq.htm>).

2.1.6.1 Infecção aguda

Nos países em desenvolvimento, a hepatite E ocorre sob a forma de epidemia e é principalmente causada pelo HEV-1 na Ásia e HEV-2 na África e México (REIN et al., 2012). Também ocorre sob a forma de casos esporádicos, geralmente transmitidos através de água contaminada (VIVEK et al., 2013). Nesses casos, a maioria das infecções ocasiona uma doença aguda autolimitante de curta duração (HUANG et al., 2010). Após uma incubação de 2-6 semanas, os sintomas desenvolvidos pela hepatite E incluem febre, náusea, dor abdominal, vômitos, anorexia e mal-estar. A mortalidade é maior em crianças com menos de dois anos de idade e pode chegar a 25% em mulheres grávidas (SHALIMAR; ACHARYA, 2013).

Nos países desenvolvidos, a hepatite E aguda é causada por HEV-3 e HEV-4. A maioria dos casos são esporádicos e grandes surtos geralmente não ocorrem. Ainda assim, na maioria das vezes, a fonte de infecção não é clara. A icterícia ocorre em aproximadamente 75% dos pacientes. Outros sintomas comuns incluem náuseas, febre, mal-estar, vômitos, diarreia e dor abdominal. Os níveis de alanina aminotransferase (ALT) alcançam entre 1000 a 3000 UI/L. Raramente, os níveis sanguíneos de ALT permanecem dentro dos padrões de referência durante a viremia (ADJEI et al., 2010). Na maioria dos pacientes, a doença é autolimitante e a recuperação ocorre entre 4-6 semanas. Uma minoria dos pacientes pode apresentar alterações neurológicas e, quando isso ocorre, o diagnóstico correto pode ser facilmente ignorado devido ao quadro clínico (MANSUY et al., 2004).

2.1.6.2 Infecção crônica

O HEV-3 é conhecido por causar uma infecção crônica em humanos, definida pela persistência de HEV-RNA no soro ou nas fezes, por seis meses ou mais, em pacientes imunodeprimidos (KAMAR et al., 2008). A maioria dos casos ocorre em receptores de transplante de órgãos (DE NIET et al., 2012), mas também em pacientes HIV-positivos ou desordens hematológicas devido ao tratamento com quimioterapia (DALTON et al., 2016; DEBES et al., 2016). A incidência de portadores de HIV infectados cronicamente com HEV é baixa, variando entre 0-0,9% (DEBES et al., 2016; KAMAR et al., 2012).

Na França, a incidência de HEV-3 após transplante de órgãos é de 3,2 casos a cada 100 pessoas/ano (LEGRAND-ABRAVANEL et al., 2011). Apesar da maioria dos pacientes não apresentarem sintomatologia clínica, alguns apresentam icterícia, alterações nas taxas das enzimas hepáticas e os resultados dos testes sorológicos (detecção de anticorpos IgM e/ou IgG) geralmente são negativos sendo possível que a soroconversão nunca ocorra (KAMAR et al., 2018). A infecção pode ser fatal em alguns pacientes devido à descompensação da doença hepática crônica (GÉROLAMI; MOAL; COLSON, 2008).

2.1.6.3 Manifestações extra-hepáticas

Além das manifestações clássicas, há um crescente número de casos de HEV relacionadas a alterações extra-hepáticas. Essas alterações incluem síndromes neurológicas, insuficiência renal, pancreatite e outras alterações hematológicas (BAZERBACHI et al., 2016). Sintomas neurológicos têm sido descritos para HEV-1 e

HEV-3 e as manifestações observadas variam entre Síndrome de Guillain-Barré, amiotrofia neurálgica, mielite e meningoencefalite aguda (BAZERBACHI et al., 2016; KAMAR et al., 2011; SOOD; MIDHA; SOOD, 2000). Em um estudo retrospectivo que analisou 126 pacientes com HEV, os sintomas neurológicos foram observados em sete pacientes (5,5%), incluindo três com infecção aguda por HEV-3, três receptores de transplante de órgãos e um paciente HIV-positivo com infecção crônica (KAMAR et al., 2011).

2.1.6.4 HEV durante a gravidez

A infecção de HEV durante a gravidez no terceiro trimestre, principalmente a ocasionada pelo HEV-1, ocasiona a infecção mais severa e pode levar a falha hepática fulminante e morte. As taxas de mortalidade ficam entre 15-25% dos casos. Existe uma alta chance de transmissão vertical de HEV associada a baixas taxas de sobrevivência neonatal. Em dois estudos na Índia, 15-50% dos recém-nascidos de mães com infecção com HEV morreram na primeira semana de vida (JILANI et al., 2007; SHALIMAR; ACHARYA, 2013).

Apesar do mecanismo de injúria hepática não estar totalmente esclarecido, é possível que a interação entre mudanças hormonais, imunológicas e de sobrecarga da função hepática durante a gravidez associada a alta carga viral de HEV, torne a mulher mais vulnerável. As mudanças imunológicas promovem a manutenção do feto com supressão de células T imunomediadas, aumentando sua susceptibilidade a infecção. Durante a gravidez, os níveis de progesterona, estrógeno e gonadotropina coriônica aumentam com o avanço da gravidez. Esses hormônios possuem papel considerável na regulação imune e no aumento da replicação viral (JILANI et al., 2007).

2.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico de HEV, tanto em humanos como em suínos, pode ser realizado diretamente através da detecção de ácidos nucleicos pela PCR (DE DEUS et al., 2007; HUANG et al., 2002), ou indiretamente, por técnicas sorológicas, que incluem protocolos *in house* e kits comerciais (JILANI et al., 2007; LIU et al., 2015; PANDOLFI et al., 2017). Apesar da ausência de sintomatologia clínica nos suínos, as características do curso de infecção são muito semelhantes às que ocorrem nos humanos (**Figura 5**). O diagnóstico inicial geralmente é realizado por técnicas indiretas, tendo em vista o curto período de viremia em humanos e, também, em suínos (KAMAR et al., 2012).

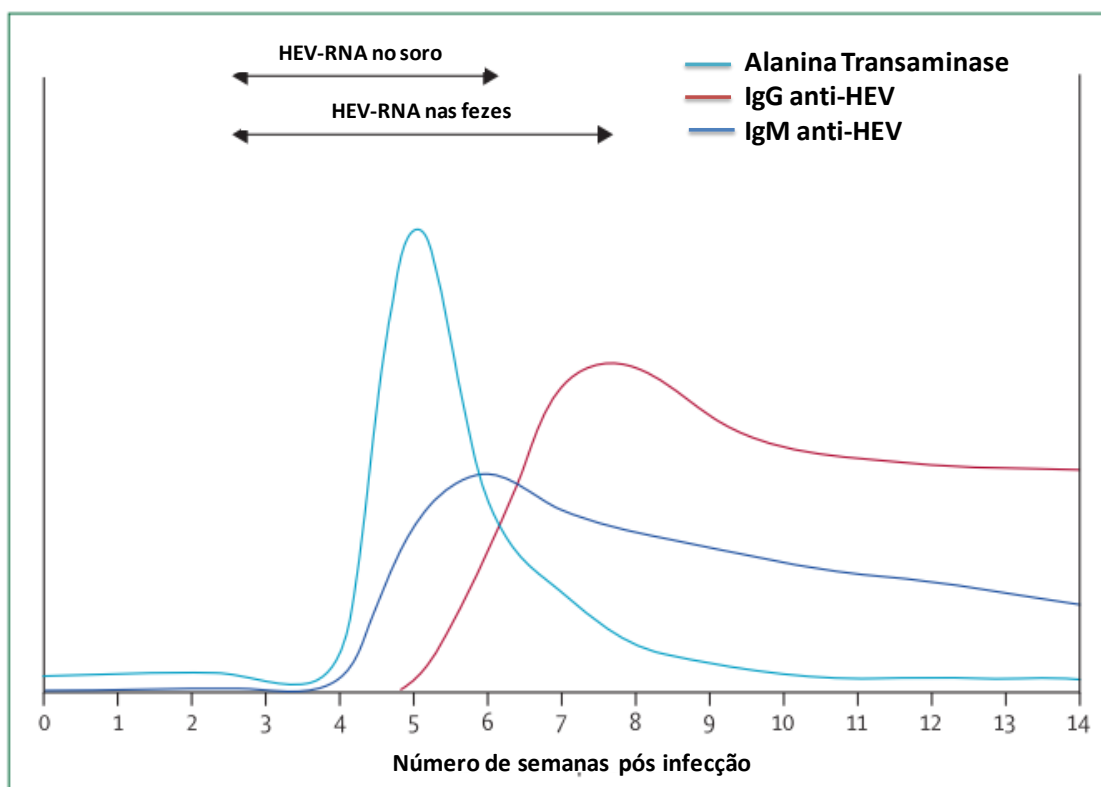


Figura 5. Representação esquemática do curso da infecção por HEV em humanos. O gráfico mostra a detecção de RNA de HEV no sangue e fezes, padrão de resposta sorológica (IgG e IgM) e da enzima alanina transaminase. Fonte: adaptado de DALTON (2018).

2.1.7.1 Sorologia

Tanto os ensaios imunoenzimáticos comerciais quanto os protocolos *in house* baseiam-se em peptídeos da ORF2 e ORF3 que podem detectar a presença de anticorpos IgG e IgM. Não existe um teste sorológico disponível que seja específico para cada genótipo e reações cruzadas entre os antígenos de HEV e outros patógenos nunca foram descritos (HUANG et al., 2010; PANDOLFI et al., 2017).

Após o período de incubação que varia entre 2-6 semanas, a imunidade ao HEV segue o padrão com uma resposta inicial curta de anticorpos IgM seguida pela resposta duradoura de anticorpos IgG. Na infecção aguda, o diagnóstico depende da detecção de anticorpos IgM específicos através de ensaios comerciais e *in house*, assim como kits de imunocromatografia (MYINT et al., 2005). Um estudo prévio em humanos determinou a cinética dos anticorpos anti-HEV após a infecção. Os níveis de anticorpos IgM atingiram o nível máximo aproximadamente cinco semanas pós-infecção e permaneceram em níveis relativamente altos durante 8 semanas (HUANG et al., 2010).

A determinação de imunidade ou de exposição prévia ao HEV é realizada pela detecção de anticorpos IgG específicos e é mais problemática devido a variabilidade dos

ensaios e dos diferentes antígenos utilizados (BENDALL et al., 2010). A exata duração da resposta dos anticorpos IgG permanece incerta; um estudo em humanos detectou a persistência dos anticorpos após 14 anos da infecção (SULTAN KHUROO et al., 2018).

2.1.7.2 Diagnóstico molecular

A detecção de RNA de HEV em amostras é um importante método de diagnóstico e monitoramento de HEV. Existe uma grande variabilidade na precisão dos testes moleculares entre diferentes laboratórios, mas isso também se deve as características da infecção. Em pacientes com infecção aguda, o RNA não persiste por muito tempo, tornando-se indetectável em aproximadamente três semanas após o aparecimento dos sintomas nos humanos. Nos suínos, portadores assintomáticos, essas características assemelham-se, e, após a infecção, o RNA viral não persiste por mais do que três semanas (BOUWKNEGT et al., 2009; CLAYSON et al., 1995b). Nas fezes, o vírus continua a ser excretado por mais tempo, permanecendo por duas a três semanas após o período de viremia em humanos e podendo chegar a meses em suínos (BOUWKNEGT et al., 2009). A janela de detecção de RNA é pequena e o HEV torna-se indetectável, mesmo que a infecção tenha sido recente. A infecção crônica está intimamente relacionada a pacientes imunocomprometidos e, assim, permite a detecção de RNA por um período mais longo.

2.1.8 Prevenção e controle

A prevenção de HEV, principalmente quando se trata do ciclo zoonótico, é complicada, tendo em vista as diferentes rotas de transmissão e a diversidade de animais reservatórios. A estratégia que deve ser seguida está relacionada à cocção dos alimentos, principalmente aqueles com carne suína, e também, da higienização de frutas e verduras (PAVIO; MENG; DOCEUL, 2015). A vacina HEV 239 (Hecolin®) desenvolvida também é uma das opções de prevenção mas, até o momento, só está disponível na China e não se sabe quando estará disponível em outros países. Além disso, deveria ser considerada principalmente em pessoas imunodeprimidas, no entanto, a imunogenicidade e segurança nesses grupos de risco ainda são desconhecidos (KAMAR et al., 2012). Além disso, a forma como o programa de vacinação funcionaria também deixa dúvidas, uma vez que os países com maior necessidade são aqueles com menos condições econômicas (DALTON et al., 2016; KAMAR et al., 2012).

2.2 Os hepacivírus

2.2.1 Biologia e classificação

O gênero *Hepacivirus* (**Figura 6**) pertence à família *Flaviviridae* (SIMMONDS et al., 2017a) que também inclui os gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Pegivirus*. São vírus pequenos, de aproximadamente 50 nm, envelopados e com genoma RNA fita simples de sentido positivo. Os hepacivírus (HVs) diferem de outros membros da família *Flaviviridae* por sua limitada multiplicação em cultivo celular (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006; SMITH et al., 2016a). Desde 1996, quando o gênero *Hepacivirus* foi criado, o vírus da hepatite C (HCV) era a única espécie conhecida. No entanto, com o conhecimento HVs em animais, uma nova classificação foi proposta (SMITH et al., 2016a). Essa nova classificação divide o gênero em 14 espécies (denominadas de A a N) (**Tabela 2**).

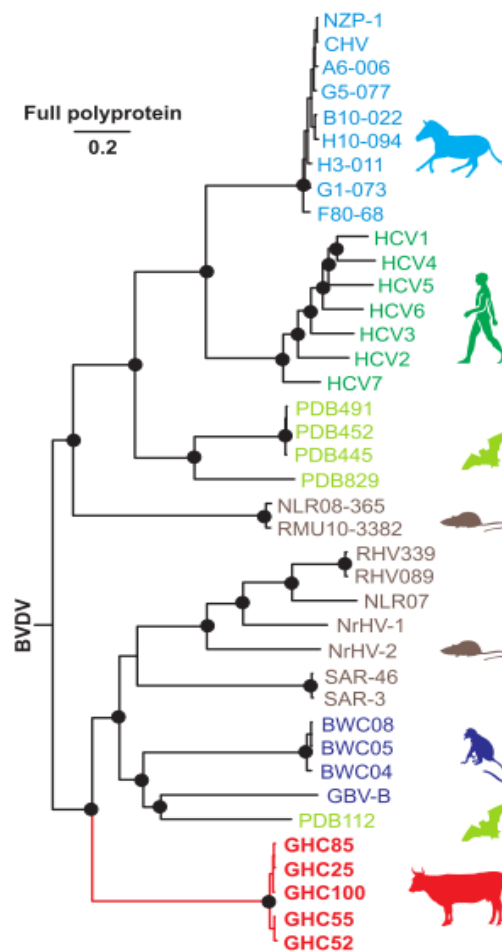


Figura 6. Árvore filogenética do Gênero *Hepacivirus*. Inferência Bayesiana realizada com a poliproteína completa de HVs das diferentes espécies realizada no software Mr.Bayes. O vírus da diarreia viral bovina (BVDV), também pertencente Família *Flaviviridae*, porém Gênero *Pestivirus* foi utilizado como outgroup. Fonte: adaptado de CORMAN (2015).

Tabela 2 - Nova classificação das espécies do gênero *Hepacivirus*, proposto por SMITH ET al. (SMITH et al., 2016a)

Nova classificação	Denominação prévia	Hospedeiro
<i>Hepacivirus A</i>	Hepacivírus canino, equino (não primata)	Equinos e cães (?)
<i>Hepacivirus B</i>	GBV-B	Primatas do Novo Mundo
<i>Hepacivirus C</i>	HCV	Humanos
<i>Hepacivirus D</i>	Hepacivírus Guereza	Primatas do Velho Mundo
<i>Hepacivirus E</i>	Hepacivírus de roedores	Roedores
<i>Hepacivirus F</i>	Hepacivírus de roedores	Roedores
<i>Hepacivirus G</i>	Hepacivírus de <i>Rattus norvegicus</i> 1	Roedores do Velho Mundo
<i>Hepacivirus H</i>	Hepacivírus de <i>Rattus norvegicus</i> 2	Roedores do Velho Mundo
<i>Hepacivirus I</i>	Hepacivírus de roedores	Roedores do Velho Mundo
<i>Hepacivirus J</i>	Hepacivírus de roedores	Roedores do Velho Mundo
<i>Hepacivirus K</i>	Hepacivírus de morcegos	Morcegos do Velho Mundo
<i>Hepacivirus L</i>	Hepacivírus de morcegos	Morcegos do Velho Mundo
<i>Hepacivirus M</i>	Hepacivírus de morcegos	Morcegos do Velho Mundo
<i>Hepacivirus N</i>	Hepacivírus de bovinos	Bovinos

? Desconhecido ou incerto.

O HCV, por exemplo, pertence à espécie C, e é atualmente classificado em sete genótipos, de 1 a 7, que possuem uma considerável heterogeneidade nas sequências genéticas, características de transmissão e distribuição geográfica. Os diferentes genótipos são classificados baseados na distância p, que deve diferir entre 0.23 e 0.31 a nível de aminoácidos. Dentro dos genótipos existe uma classificação em subtipos, diferindo entre 15-25% em nível de nucleotídeos (SMITH et al., 2016a). Até o momento, são 67 subtipos confirmados e 20 prováveis novos subtipos. Essa

considerável diversidade genética é marcada pela inerente infidelidade da RNA polimerase RNA-dependente associada a altas taxas de replicação *in vivo*. No entanto, todas as variantes exibem propriedades biológicas similares, incluindo hepatotropismo, propensão à persistência e características de patogenicidade (SMITH et al., 2014b).

Os bovinos são os hospedeiros em que os HVs foram mais recentemente detectados, e, diante da nova classificação, pertence à espécie N (*Hepacivirus N*, HNV). Apesar dos animais não apresentarem alterações macro ou microscópicas sugestivas de infecção viral, a carga viral no fígado é significativamente maior do que a encontrada no soro, evidenciando a sua característica hepatotrópica, como a encontrada no HCV (CORMAN et al., 2015).

2.2.2 Estrutura genômica

O genoma dos vírus da família *Flaviviridae*, incluindo o gênero *Hepacivirus*, compartilha uma estrutura muito semelhante. É composto por duas regiões não traduzidas (UTRs) nas regiões 5' e 3' do genoma, que desempenham importante função na tradução da poliproteína e na replicação do RNA viral. Além disso, a região 5'UTR é a região mais conservada do genoma, sendo muito utilizada no diagnóstico, juntamente com a região da proteína NS3 (ELIA et al., 2017; SMITH et al., 2016c). O genoma possui uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos (aa). Essa poliproteína, quando clivada por peptidases e proteases, origina pelo menos dez proteínas: proteína estrutural core (C), duas proteínas do envelope (E1 e E2), proteínas não estruturais relacionadas à montagem da partícula viral (p7 e NS3) e as não estruturais, envolvidas na replicação (NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007) (**Figura 7**).

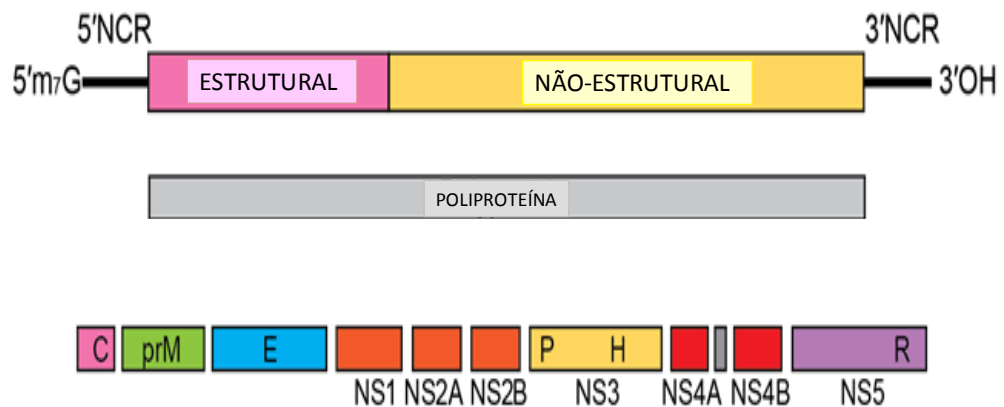


Figura 7. Organização genômica (acima) e processamento da poliproteína (abaixo). Flanqueada por duas regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR), uma única ORF codifica uma poliproteína. Essa poliproteína origina 10 proteínas, incluindo as estruturais e as não estruturais. Fonte: *International Comittee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*.

2.2.3 Replicação viral do HCV

O ciclo de replicação viral de HCV ainda não é totalmente esclarecido, principalmente devido à falta de um sistema de cultivo celular eficiente (CHEVALIEZ; PAWLITSKY, 2006). A partícula viral, através da interação das glicoproteínas do envelope, adere-se na superfície celular do hospedeiro. Apesar da existência de muitos estudos, é possível que exista mais de um receptor envolvido como CD81, receptor *scavenger* B tipo I (SR-BI), entre outros (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

Após a adesão, o vírus é liberado no citoplasma celular por endocitose, como resultado do processo de fusão entre as membranas virais e celulares do hospedeiro. No citoplasma, ocorre a descapsidação viral e liberação do RNA genômico. O RNA alcança os ribossomos da célula do hospedeiro, presentes no retículo endoplasmático rugoso e, inicialmente, ocorre a síntese de uma poliproteína precursora com três proteínas estruturais: core e glicoproteínas do envelope E1 e E2, além de seis proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4, NS5A e NS5B). A poliproteína originada será clivada pela ação da protease, que associada a RNA polimerase (codificada pelo gene NS5B) formará um complexo de replicação. As novas fitas serão “empacotadas” pelo core e envelope viral e liberadas do retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira, recomeçando o processo infeccioso (**Figura 8**) (CHEVALIEZ; PAWLITSKY, 2006; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007; PENIN et al., 2004).

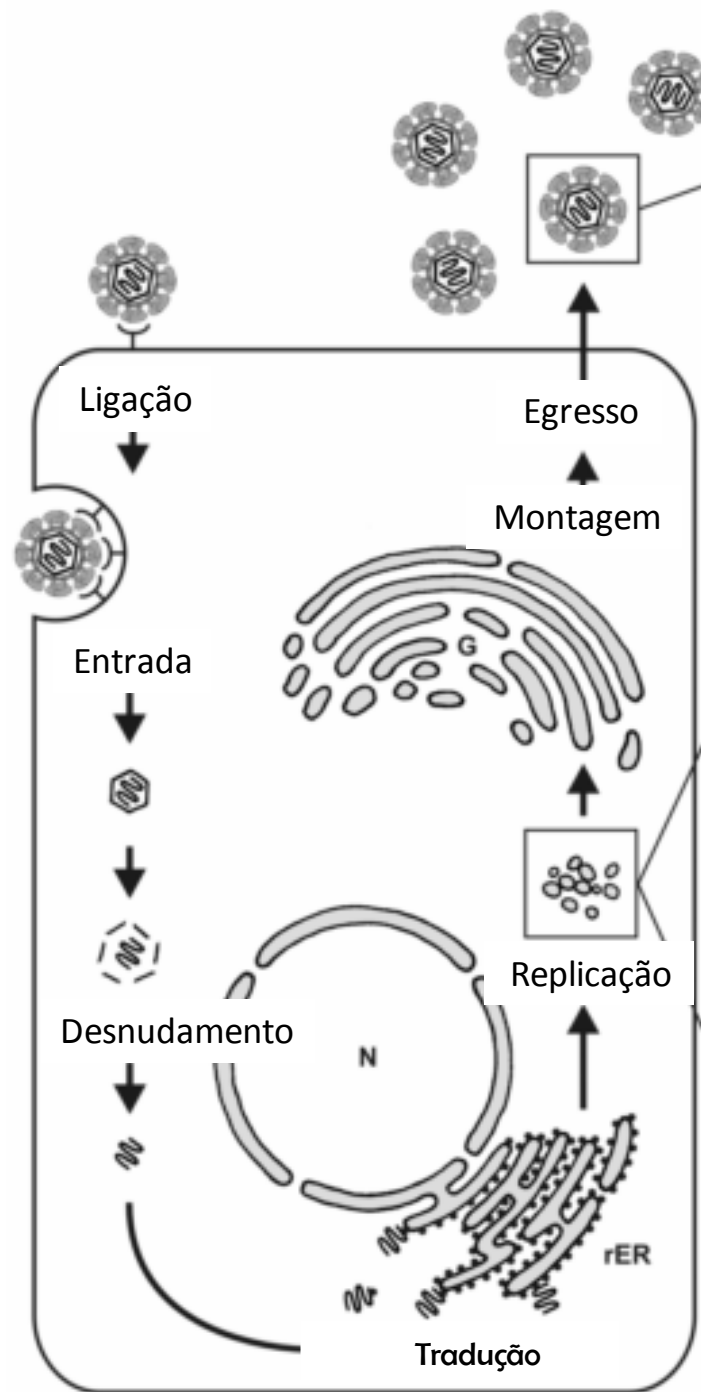


Figura 8. Ciclo de replicação hipotético de HCV. As partículas de HCV se ligam às células hospedeiras através de uma interação específica entre as glicoproteínas de envelope de HCV e um receptor celular ainda não totalmente esclarecido. As partículas são internalizadas por endocitose, e, após, o genoma viral é libertado do nucleocápsideo e traduzido no retículo endoplasmático rugoso. Após a amplificação do genoma e a expressão das proteínas do HCV, os virions da progênie são montados, e o ciclo infeccioso pode reiniciar. Fonte: adaptado de CHEVALIEZ; PAWLOTSKY (2006).

2.2.4 Hepacivírus em animais

Desde a descoberta do HCV em 1989, pesquisas propuseram-se a identificar HVs em animais, motivados pela hipótese de que as infecções por HCV poderiam ter uma origem em primatas não-humanos (SIMMONDS, 2013). Essa hipótese foi baseada na observação de que áreas endêmicas com alta diversidade genética na África e Ásia eram sobrepostas a populações de macacos do Velho Mundo. Essa observação é análoga à pandemia de HIV, que possuiu uma origem zoonótica a partir dos chimpanzés (GAO et al., 1999). No entanto, muitos estudos falharam na detecção de HVs nesses animais (MAKUWA et al., 2003). Ainda assim, muitos vírus de RNA são capazes de cruzar as barreiras entre espécies e se disseminam com facilidade entre animais e o homem. Consequentemente, eles são responsáveis por infecções zoonóticas e tais transmissões cruzadas geraram algumas das doenças infecciosas mais perigosas que ameaçam a saúde de milhões de pessoas (SCHEEL et al., 2016; SHARP; RAYNER; HAHN, 2013).

Em 2011, a primeira evidência de HVs em outro hospedeiro emergiu, quando, através da técnica de sequenciamento de alto desempenho, foi identificado um vírus relacionado ao HCV em cães em um surto de doença respiratória nos Estados Unidos. As sequências foram obtidas a partir de amostras de suabe nasal, o que causou certa estranheza, tendo em vista a característica hepatotrópica do HCV. Análises filogenéticas mostraram aproximadamente 50% de identidade nucleotídica com o HCV (BEXFIELD et al., 2014). Posteriormente, inúmeras tentativas de identificação de cães infectados ou soropositivos não obtiveram sucesso.

O mesmo grupo de pesquisa que descobriu o hepacivírus canino, realizou um ensaio sorológico para detecção de anticorpos anti-NS3 em uma série de espécies animais e observou alta soroprevalência (35%), sendo que oito dos animais foram positivos para RNA viral. As sequências de hepacivírus equino apresentaram alta identidade nucleotídica com as de caninos (aproximadamente 99%) (BURBELO et al., 2012). De acordo com a nova classificação, os HVs equinos (EHV) e caninos (CHV), pertencem à espécie A (*Hepacivirus A*, HAV), sendo atualmente consideradas linhagens distintas (SMITH et al., 2016a). A alta taxa de similaridade observada e a impossibilidade de detectar novamente hepacivírus em cães sugerem duas possibilidades: a primeira, de que a infecção em cães representa um evento recente de transmissão entre as espécies, e a segunda, de que o resultado possa ter sido falso

positivo, devido à alimentação de cães com carne de equinos, ou uso de produtos veterinários com soro equino contaminado, comumente utilizado na produção de vacinas, o que é mais provável (PYBUS; THÉZÉ, 2016).

No Brasil, um estudo realizado em 300 soros de equinos provenientes de oito localidades da região Amazônica do Brasil, resultou em 8,3% de animais positivos, mostrando que a prevalência no Brasil é maior do que a descrita em outros países (BURBELO et al., 2012; LUKASHEV et al., 2013; LYONS et al., 2012). Na Alemanha, um estudo investigou a prevalência (3.2%), curso clínico da infecção e tropismo tecidual de HVs equino (até então designado de *Nonprimate Hepacivirus*, NPHV). No estudo, evidenciaram a presença de anticorpos específicos, além de estágios agudos e crônicos de infecção. A análise do fígado não evidenciou doença grave, apesar dos níveis de enzimas hepáticas no sangue estarem aumentadas (PFAENDER et al., 2015a). Recentemente, uma inoculação experimental em equinos adultos resultou em doença aguda e crônica determinada por aumento dos níveis de enzimas hepáticas específicas além de sinais de dano hepatocelular (RAMSAY et al., 2015).

Em 2013, a partir do soro de 400 roedores selvagens de quatro gêneros de *Rodentia* capturados, foram identificados vários HVs geneticamente distintos em camundongos e ratos (KAPOOR et al., 2013). Nesse mesmo ano, um estudo detectou HVs em 1,9% dos camundongos (LUKASHEV et al., 2013). Posteriormente, um grupo relatou a descoberta de um novo HVs em amostras de soro obtidas de macacos *Colubua* (*Colobus guereza*). Foi a primeira descoberta de HVs em primatas não-humanos, no entanto, a análise filogenética não resultou como o esperado, tendo em vista que houve a formação de um grupo claramente divergente do HCV (LAUCK et al., 2013).

A mais recente detecção de HVs em animais foi em bovinos, em 2015. Na Alemanha, com o uso do sequenciamento de alto desempenho, uma nova espécie de HVs foi, então, descoberta em bovinos numa frequência de 3,2% em 158 propriedades investigadas. Além disso, observaram animais virêmicos durante seis meses e maiores títulos virais no fígado, quando comparado com outros órgãos (BAECHLEIN et al., 2015). Na mesma época, em Ghana, na África, foi detectada 8,5% de frequência de HNV, com uma maior divergência filogenética entre as amostras sequenciadas (CORMAN et al., 2015). No Brasil, em 2017, um estudo revelou que o hepacivírus bovino circula no país há pelo menos 20 anos. Os autores, no passado, utilizando oligonucleotídeos degenerados para pesquisa de pestivirus em soro de bovinos em 1996, sequenciaram amostras com baixa identidade nucleotídica com o gênero *Pestivirus*.

Com a descrição do hepacivírus bovino em 2015, o grupo pôde constatar que se tratava de HNV (CANAL et al., 2017).

2.2.5 Possíveis origens do HCV

Os humanos são os únicos hospedeiros naturalmente infectados por HCV, apesar dos chimpanzés serem passíveis da infecção experimental (YANAGI et al., 1997). Como o uso desses animais não é mais permitido na maioria dos estudos experimentais, existe uma necessidade da existência de modelos animais para o estudo de persistência, patogênese e imunidade de HCV (BUKH, 2012). Ainda não está claro até que ponto os HVs de animais refletem o HCV em seres humanos, mas é bem provável que o entendimento sobre eles possa tornar-se muito útil na compreensão da doença (HARTLAGE; CULLEN; KAPOOR, 2016). Além disso, o conhecimento do gênero *Hepacivirus* pode fornecer indícios sobre a origem de HCV, que até o momento permanece desconhecida.

Uma das possíveis origens de HCV está relacionada à descoberta de uma enorme diversidade genética de HVs em morcegos (QUAN et al., 2012) e roedores (KAPOOR et al., 2013). Acredita-se na possibilidade de que cada uma das espécies anteriormente identificadas (em equinos, humanos, cães) surgiu através da transmissão bem sucedida entre espécies de HVs de morcegos ou roedores (OLIVER G. PYBUS & REBECCA R. GRAY T, 2013). Um dos motivos é que aproximadamente um quarto dos patógenos humanos emergentes tenham sido originados de roedores ou morcegos (VAN BOHEEMEN et al., 2012). Esta transmissão cruzada não é necessariamente direta, mas pode ter ocorrido através de um hospedeiro intermediário em contato ainda mais próximo com seres humanos, como os suínos na transferência do vírus Nipah, originado de morcegos (CHUA et al., 2000).

Um estudo recente realizou análises filogenéticas, também com objetivo de compreender como o HCV se originou em humanos (PYBUS; THÉZÉ, 2016), uma vez que análises prévias da região mais conservada NS3 sugerem uma transmissão de HVs entre as espécies (SCHEEL et al., 2016). Apesar das linhagens EHV, de equinos, e CHV, de cães, da espécie HAV possuírem a menor distância genética de HCV, não há evidências para supor que ele tenha se originado de equinos ou cães. Ao invés disso, parece que tanto HCV, como EHV e CHV surgiram da transmissão independente entre espécies, com origens ainda desconhecidas (PYBUS; THÉZÉ, 2016).

Além da fonte zoonótica desconhecida de HCV, há uma maior incerteza quanto ao número de eventos cruzados que poderiam ter originado o vírus em seres humanos. O HCV contém um nível incomum de diversidade genética para uma única espécie de vírus, classificado em sete genótipos. Além disso, antes do século XX, os diferentes genótipos parecem ter existido em áreas geográficas restritas por pelo menos várias centenas de anos (YAP et al., 1997). Basedo nessas observações acredita-se que cada genótipo surgiu da transmissão de espécies cruzadas a partir de fontes zoonóticas separadas em diferentes locais (**Figura 9b**). No entanto, não há evidências diretas para rejeitar a hipótese alternativa de que o HCV se originou de uma única zoonose e que seus genótipos divergiram dentro das populações humanas (**Figura 9a**) (PYBUS; THÉZÉ, 2016). O problema pode ser resolvido através da descoberta contínua de novos hepacivírus.

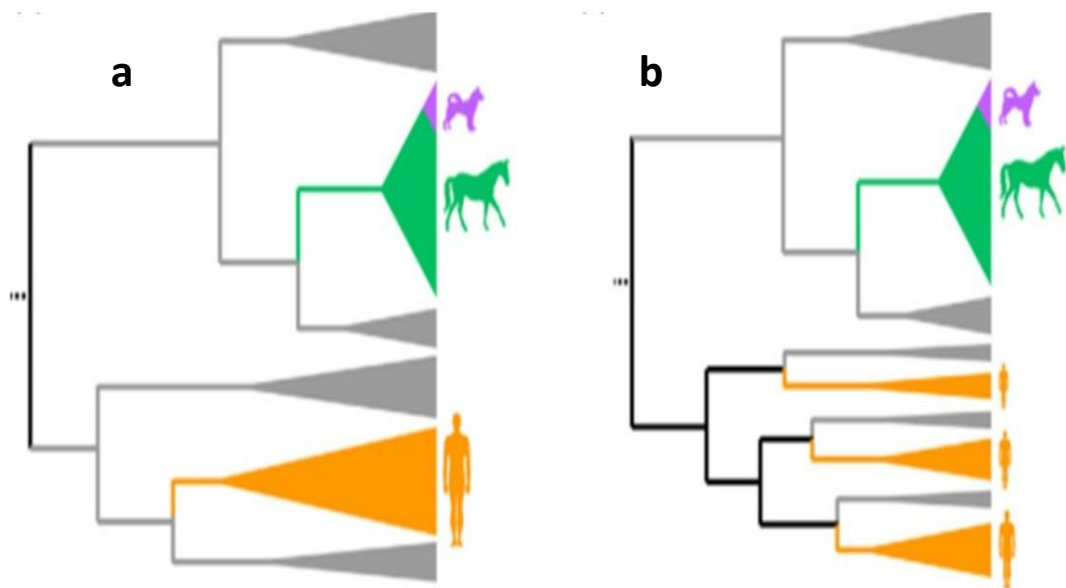


Figura 9. Possíveis cenários para as origens zoonóticas do HCV e da linhagem EHV/CHV. As silhuetas indicam as espécies hospedeiras de cada linhagem viral: cães (roxo), equídeos (verde), humanos (laranja). Em ambos os cenários, o HCV e EHV/CHV são postulados a partir de transmissões independentes de espécies cruzadas de HVs de uma ou mais espécies de origem não identificadas (*clusters*/triângulos cinza). Em **a**) esses vírus não identificados são parafiléticos em relação ao HCV, indicando que surgiu de um único evento de transferência ancestral. Em **b**) os vírus não identificados se enquadram na diversidade genética do HCV, indicando que possa ter surgido de duas ou mais transmissões separadas de espécies cruzadas. Fonte: adaptado de PYBUS; THÉZÉ (2016).

2.2.6 Possíveis rotas de transmissão de HVs entre espécies

Estudos especulam sobre a via de transmissão de HVs, e acredita-se que uma população de reservatórios (morcegos concomitantes ou roedores, talvez) possa ter transferido o vírus para humanos, equinos e bovinos. O HCV é transmitido pelo sangue e a maioria das pessoas é infectada através de injeções ou transfusão de sangue (KOLYKHALOV et al., 1997). EHV pode ser transmitido de forma semelhante através de inoculação direta (RAMSAY et al., 2015). Na natureza, os seres humanos e os equinos podem ser expostos a HVs de roedores ou morcegos através de contaminação fecal de gêneros alimentícios e camas, ou através de fômites ou aerossóis, mas não há evidências de que a transmissão por essas rotas ocorra ou não. No entanto, o RNA de EHV não foi detectado em um estudo de coorte em pessoas com exposição ocupacional a equinos (PFAENDER et al., 2015b).

Outro mecanismo possível para a zoonose hepaciviral é a transmissão através de artrópodes, que podem atuar como vetores mecânicos (não replicativos) ou biológicos (replicativos) (PYBUS et al., 2007). Pybus e colaboradores (2007) discutiram teorias atuais para a manutenção de HCV endêmico nas populações humanas antes do século XX e exploraram se a transmissão mecânica através de insetos poderia desempenhar um papel importante. O estudo concluiu que esta hipótese era mais viável para insetos, como o *Tabanidae*, que cortam a pele para se alimentar, transportando maiores volumes de sangue. Os tabanídeos são conhecidos por serem vetores mecânicos, conhecidos por transmitir o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) (PYBUS et al., 2007). A hipótese da transmissão mediada por insetos poderia, em teoria, fornecer uma única explicação para a transmissão de EHV entre cavalos, transmissão endêmica de HCV em seres humanos e a origem de ambos os vírus através da transmissão de espécies cruzadas a partir de uma espécie de reservatório (PYBUS; THÉZÉ, 2016).

2.2.7 Modelos experimentais para o estudo de HCV

Os atuais sistemas *in vitro* são muito limitados no que diz respeito aos tipos de células e genótipos de HCV. Não existe um modelo animal estabelecido que possa ser usado para estudar todo ciclo viral de infecção e de imunidade e patogênese associados (GOTTWEIN; BUKH, 2008; MCGIVERN; LEMON, 2011). Os chimpanzés são os únicos animais que poderiam ser usados para estudar completamente a infecção por HCV, pois eles podem ser infectados por todos os genótipos epidemiologicamente

importantes e possuem respostas inatas e adaptativas semelhantes às observadas em seres humanos. No entanto, O Instituto Nacional da Saúde (NIH) do governo dos Estados Unidos, tem restringido cada vez mais o uso de chimpanzés como modelos experimentais, o que limitou o estudo do HCV (BUKH, 2004, 2012).

O hepacivírus equino (HAV) é mais estudado entre as espécies animais. A infecção por HAV pode ser persistente, embora a taxa de cronicidade seja menor quando comparada ao HCV. Contudo, ainda há muitas dúvidas quanto ao ciclo da infecção em equinos, principalmente sobre transmissão. Sabe-se que as enzimas hepáticas se apresentam ligeiramente elevadas e que há infiltração de linfócitos no fígado, o que também se observa no HCV. HAV, portanto, poderia ser usado para estudar a evolução viral, respostas imunes, persistência e, também resposta imune. Uma desvantagem é a dificuldade e os custos para manter equinos como modelos experimentais em comparação a modelos convencionais de animais de laboratório (BILLERBECK et al., 2013; RAMSAY et al., 2015). Modelos de camundongos imunodeficientes enxertados com células de fígado humano foram desenvolvidos (VON SCHAEWEN; PLOSS, 2014) e, apesar desses modelos terem expandido a capacidade de estudar a infecção pelo HCV *in vivo*; as principais desvantagens incluem níveis baixos de infecção e/ou a necessidade crescente de contornar as vias imunes inatas e adaptativas para permitir a replicação de HCV (BILLERBECK et al., 2013; VON SCHAEWEN; PLOSS, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar genética e epidemiologicamente o vírus da hepatite E (HEV) em suínos de subsistência no estado Rio Grande do Sul, e de hepacivírus N (HNV) em bovinos do nordeste Brasileiro.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a circulação de vírus da hepatite E (HEV) em suínos de subsistência do Rio Grande do Sul, através de RT-PCR, assim como realizar o sequenciamento e análise fillogenética.
- Padronizar um ELISA *in house* para detecção de anticorpos IgG anti-HEV no soro de suínos.
- Realizar um estudo epidemiológico em soros de suínos de subsistência do Rio Grande do Sul coletados para inquérito de peste suína clássica pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Verificar a circulação de hepacivírus bovino (HNV) no Nordeste Brasileiro através de RT-PCR, , assim como realizar o sequenciamento e análise fillogenética.
- Realizar análise filogenética por inferência Bayesiana e análise de tempo de divergência por datação molecular de HNV.

4 CAPÍTULO 1 - ARTIGO CIENTÍFICO: “*Backyard pigs are reservoir of zoonotic hepatitis E virus in Southern Brazil*”

O artigo intitulado “*Backyard pigs are reservoir of zoonotic hepatitis E virus in Southern Brazil*” foi aceito para publicação na revista “*Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*”, no dia 06 de fevereiro de 2018.

Backyard pigs are reservoir of zoonotic hepatitis E virus in Southern Brazil

da Silva^a, M.S., Silveira^a, S., Caron, V.S.^a, Mósená, A.C.S.^a, Weber, M.N.^a, Cibulski S.P.^a, Medeiros, A.A.R.^b, Silva, G.S.^b, Corbellini, L.G.^b, Klein, R.^c, Kreutz, L.C.^c, Frandoloso, R.^c, Canal, C.W.^{a,*}.

^aLaboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91-540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bLaboratório de Epidemiologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91-540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cLaboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), BR 285, São José, CEP: 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91-540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Tel.: +55 51 33086926

E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br

1 **Abstract**

2 **Background:** Hepatitis E virus (HEV) is the causative agent of acute hepatitis worldwide.
3 There is no seroprevalence study in backyard farms, characterized by suboptimal hygienic
4 condition in Brazil. We aimed to determine the seroprevalence and genetic diversity of HEV
5 in backyard pigs in Brazil.

6 **Methods:** Swine serum samples collected in 2012 (n= 731) and 2014 (n= 713) were analyzed.
7 The presence of anti-HEV IgG in pig serum was evaluated by indirect ELISA. RT-PCR was
8 performed, and phylogenetic analyses were carried out based on the partial ORF1 and ORF2
9 coding regions.

10 **Results:** Anti-HEV antibodies were detected in 77.6% (567/731) [95% CI 74.5%-90.6%] of
11 serum samples in 2012 and 65.5% (467/713) [95% CI 62.0-69.0%] in 2014. The herd
12 seroprevalence was 91.7% (187/204) [95% CI 87.9-95.5%] in 2012 and 83.7% (164/196)
13 [95% CI 78.6-88.7%] in 2014. Further, HEV-RNA was detected in 0.8% (6/713) of samples
14 from 2014. Phylogenetic analysis showed three different genotype 3 subtypes with high
15 similarity to human HEV strains.

16 **Conclusions:** This study showed that backyard pigs are reservoir of HEV and alerts us of the
17 need to control infection and spillover from backyard farms.

18

19 **GenBank accession numbers:** MF438128 to MF438135.

20 **Keywords:** hepatitis E virus, backyard pig, swine, zoonosis, seroprevalence.

21

22 1. Introduction

23 Hepatitis E virus (HEV) belongs to the Hepeviridae family, and the major specie,
24 Orthohepevirus A, comprises seven genotypes [1]. Human epidemic HEV is caused by HEV-
25 1 and HEV-2 genotypes and mainly occurs in tropical and subtropical countries with poor
26 sanitation, while HEV-3 and HEV-4 are recognized worldwide as an important cause of
27 sporadic zoonotic hepatitis [2, 3]. Zoonotic transmission is associated with consumption of
28 undercooked or raw meat, specially swine, or water and food products contaminated with
29 HEV-3 and HEV-4 [2].

30 Brazil is the fourth largest producer and exporter of pork in the world, slaughtering
31 approximately 36 million animals annually where Rio Grande do Sul (RS) is responsible for
32 21% of these production [4]. However, according to the Brazilian Official Agriculture
33 Department, a large number of pig farms (67%) in RS are dedicated to non-commercial
34 production [5]. These backyard farms, mostly characterized by open breeding systems and
35 suboptimal hygienic conditions, do not restrict contact among local people and farmers with
36 pigs, which are reservoir of HEV [2, 3]. Such farms are intended to feed the rural producer,
37 his family, and uncertified local markets.

38 HEV is a small, non-enveloped virus containing a single-stranded positive-sense 7.5-
39 kb RNA genome. The viral genome contains three open reading frames (ORFs): ORF1
40 encodes the nonstructural protein; ORF2 encodes the capsid protein; and ORF3 encodes a
41 small, multifunctional protein that overlaps ORF1 and ORF2 and a short 5' non coding region
42 (NCR) [1, 3]. HEV presents a high degree of genetic variability, which makes it difficult to
43 detect and characterize phylogenetically. Therefore, partial sequences corresponding to ORF1
44 and/or ORF2 are commonly used for detection and enable phylogenetic reconstruction [6].

45 HEV is no longer seen only as a cause of human acute self-limited hepatitis and may
46 cause severe illness in pregnant woman, with mortality rates of 15-20% [3]. Disease control is
47 still neglected [7] and persistent infection is a problem for pregnant woman, solid-organ
48 transplant recipient, recipients of donated blood and patients infected with human
49 immunodeficiency virus (HIV) [3, 7]. Infection may cause extra-hepatic manifestations such
50 as acute pancreatitis, renal failure and neurological syndromes, including Guillain-Barré
51 syndrome, neuralgic amyotrophy and encephalitis [8]. In Brazil, HEV infection was detected
52 in pediatric female liver transplant recipient [9] and renal transplant recipients [10].

53 Anti-HEV antibodies have been detected in many animal species, including humans
54 and pigs, with seroprevalence ranging from 5% to 100% [11, 12]. A recently study performed
55 in Southern region showed high seroprevalence (40.25%) amongst blood donors [13]. Herein,
56 there is no epidemiological data about HEV in backyard pigs with a large representative
57 number of samples, and further investigation is needed. Thus, the goal of this study was to
58 investigate HEV circulation in backyard farm pigs through ELISA. Additionally, HEV RNA
59 sequences were phylogenetically characterized and the HEV zoonotic potential is discussed.

60

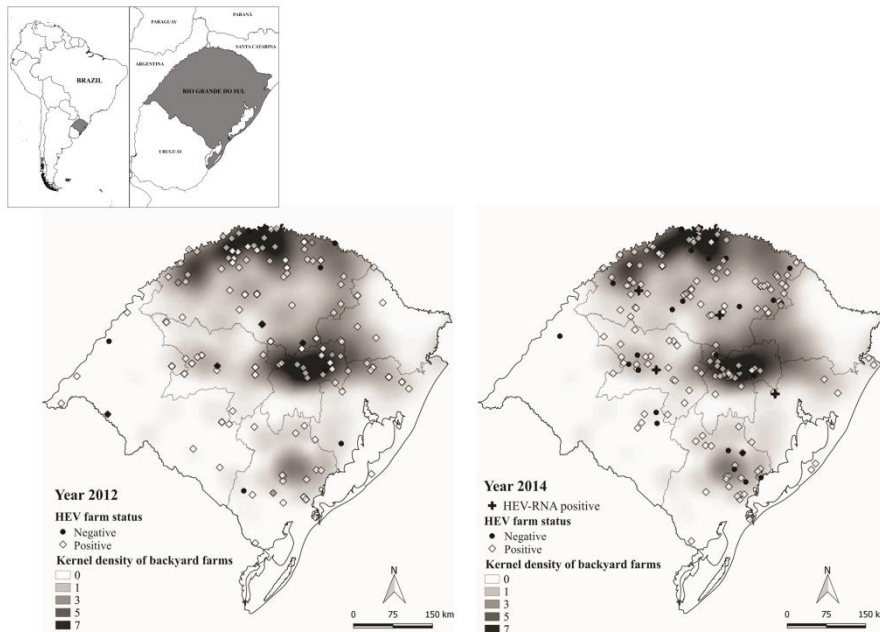
61 2. Materials and Methods

62 2.1 Samples

63 Serum samples were collected from pigs in Rio Grande do Sul (RS), Brazil. RS is in
64 the Southern region of Brazil, has an area of 268,781,896 km² (3.16% of the country), and is
65 bordered by Argentina and Uruguay (Figure 1). Backyard pig production is distributed in
66 approximately 130.000 farms with a population of 915.000 animals [4]. Sampling was
67 generated from the biannual surveillance for Classical Swine Fever virus (CSFV) performed
68 in RS by Official Veterinary Office (SEAPI-RS) and was realized in two stages. First, the
69 number of properties was defined to detect at least one positive farm using a confidence level
70 of 95% and an expected prevalence of CSFV of 1%. Secondly, the number of animals within
71 each farm was defined to detect at least one positive pig using a confidence level of 95% and
72 an expected prevalence of 10%. With these parameters, the number of farms sampled was 320
73 farms both in 2012 and 2014. The sera analyzed in this study were from 2012 (n= 731,
74 derived from 204 herds) and 2014 (n= 713, from 196 herds).

75 A purposive sampling was performed in which farms were randomly selected from a
76 population set according with predefined risk criteria for CSFV and this list of farms at risk
77 were provided by the local veterinary office. Animals were randomly selected within each
78 farm. Some risk criteria were: proximity to peri-urban areas or dumps, farms located within
79 indigenous reservations and also farms that practice feeding food waste to pigs. Those
80 samples were previously used for official surveillance studies and stored at -20°C, what is not
81 ideal for HEV posterior detection by RT-PCR. The project was conducted under the protocol
82 number #031/2014 approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the
83 Universidade de Passo Fundo.

84



85

86 **Figure 1. Geographical distribution of samples.** Maps indicating HEV seropositivity (2012
 87 and 2014) and HEV RNA detection (2014). The kernel density raster was created showing the
 88 density of backyard farms. In detail, map showing the location of Rio Grande do Sul
 89 (32°1'60" S, 52°5'55" W) in Southern Brazil and its border with Uruguay and Argentina.
 90 **2.2 In-house ELISA for HEV antibody detection**

91

92 The presence of anti-HEV IgG in pig serum was evaluated by an in-house indirect
 93 ELISA containing recombinant HEV-ORF2p antigen as previously described [13, 14].
 94 Briefly, ELISA plates were coated with ORF2p (1 µg/well) in carbonate buffer (pH 9.6) at 4
 95 °C for 12 h and then washed three times with phosphate-buffered saline 0.05% Tween 20
 96 (PBST, pH 7.2). The wells were blocked with 5% (v/v) skim milk (Sigma Aldrich) diluted in
 97 PBST. Pig test serum (diluted 1:200 in PBST with 1% skim milk) was added to the plates and
 98 incubated at 22°C for 1 hour. After PBST washing, peroxidase-conjugated rabbit anti-pig IgG
 99 (Sigma Aldrich) diluted 1: 10,000 in PBST with 1% skim milk was added, and the plates were
 100 incubated and washed as indicated above. Subsequently, a substrate solution containing 3,3,
 101 5,5'-tetramethylbenzidine + 0.06% H₂O₂ was added to each well, and plates were incubated

102 in the dark at 22°C for 10 min. The color-developing reaction was stopped by adding 50 μ L
103 of HCl 2N. Plates were read at 450 nm using a Synergy HI plate reader (BioTek®).

104 The ELISA protocol was established for the purpose of the present study. The receiver
105 operating characteristic (ROC) curve was used to set the optimal cut-off point. Forty negative
106 serum samples collected from colostrum-deprived 28-day-old pigs and 15 positive serum
107 samples from pigs experimentally infected with HEV genotype 3 were included in the ROC
108 analysis. The area under the curve (AUC) analysis was used to evaluate the test accuracy.
109 Thus, the cut-off point of this ELISA was adjusted to $OD_{450} \geq 0.32$. The AUC of this test
110 was 0.9432 (95% confidence interval = 0.9 to 0.98). The assay showed relative sensitivity and
111 specificity estimates 95.2% (95% confidence interval = 86.7% to 99.0%) and 95.9% (95%
112 confidence interval = 86.0% to 99.5%), respectively.

113

114 **2.3 HEV-RNA detection**

115 RT-PCR was performed for 713 samples collected in 2014. Viral RNA was isolated
116 from 250 μ L of serum using Trizol® LS Reagent (Life Technologies) and resuspended in 30
117 μ L of ultrapure water according to the manufacturer's instructions. The cDNA was
118 synthesized using GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) with random primers
119 (Promega), according to manufacturer's instructions, in a total volume of 25ml. We selected
120 sets of primers designed to amplify partial ORF1 and ORF2 regions of the HEV genome that
121 are commonly used in HEV detection studies [6, 15]. Nested-PCR was conducted using
122 GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega) with sets of primers designed to amplify partial
123 ORF1 and ORF2 regions of the HEV genome. Primers to amplify partial ORF1, which
124 corresponds to the methyltransferase coding region, amplify a 287-base pair (bp) fragment

125 [6]. Primers used to amplify partial ORF2, which corresponds to the structural capsid gene,
126 yield a product of 348 bp [16].

127

128 **2.4 Sequencing and phylogenetic analysis**

129 PCR amplification products were purified using PureLink® PCR Purification Kit
130 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Both strands were sequenced using the Big Dye Terminator
131 cycle sequencing kit version 3.1 and read on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied
132 Biosystems). Partial ORF1 and ORF2 region sequences generated in this study were
133 assembled using Geneious software (version 9) (<http://www.geneious.com>) [17]. Multiple
134 sequence alignment with representative Hepeviridae family sequences (retrieved from
135 GenBank) was carried out using the MUSCLE program contained in the Molecular
136 Evolutionary Genetics Analysis software package, version 7 (MEGA7) [18].

137 Genotypes were defined by comparing proposed genotype reference sequences in the
138 partial methyltransferase gene region (ORF1) [6]. Reconstruction of the phylogenetic tree was
139 performed by applying the maximum-likelihood method and a Kimura 2-parameter model
140 with gamma distribution. Statistical robustness and reliability of the branching order were
141 confirmed by bootstrap analysis using 1,000 reiterations using MEGA7.

142 The subtyping procedure was carried out based on partial ORF1 and ORF2 coding
143 regions. Subtyping was determined by employing a neighbor joining phylogenetic tree using
144 the Kimura-2 parameter as the model for nucleotide substitution (MEGA7) [18]. Statistical
145 robustness and reliability of the branching order were confirmed by bootstrap analysis using
146 1,000 replicates. This analysis was performed using the reference sequences proposed in the
147 literature [19] in addition to Brazilian human and swine HEV strains [9, 10, 20, 21] and
148 Uruguayan human HEV strains [15].

149 **2.5 Descriptive analysis**

150 A database in MS Excel 2016 (Microsoft) was created with information about the properties,
151 animals, serological status and HEV-RNA detection. Seroprevalence was adjusted according
152 to the test sensitivity and specificity [22]. Confidence intervals (CI) were calculated using the
153 normal approximation method. The descriptive analysis was performed in the software R and
154 the spatialization was performed in QGIS version 2.18 software (available in
155 <http://www.qgis.org/en/site/>). The kernel density raster for the number of backyard farms in
156 the state was created using a radius of 50 km using information provided by SEAPI-RS.

157

158 **3 Results**

159 **3.1 Detection of anti-HEV antibodies**

160 High HEV seroprevalence was observed in both surveillance studies, showing HEV
161 circulation in Rio Grande do Sul in 2012 and 2014 (Figure 1). IgG anti-HEV was detected in
162 567 out of 731 (77.6%) serum samples in 2012 and 467 out of 713 (65.5%) in 2014 (Table 1).
163 Adjusted seroprevalence was 80.6% (95% CI 77-84%) in 2012 and 67.4% (95% CI 63-71%)
164 in 2014. The herd seroprevalence was 91.7% (187/204) [95% CI 91-99%] in 2012 and 83.7%
165 (164/196) [95% CI 78-89%] in 2014. The sampled herds mainly overlap regions with the
166 largest numbers of backyard farms, highlighting the representativeness of the sample
167 collection (as shown in the kernel density raster in Figure 1).

168

169 **3.2 Detection of HEV-RNA and phylogenetic analysis**

170 A nested RT-PCR was carried out individually for 713 swine serum samples, of which
171 six (0.8%) were positive for the ORF1 gene protocol and two were also positive for the ORF2
172 gene protocol. Four sequences were unable to amplify with ORF2 gene protocol. The positive

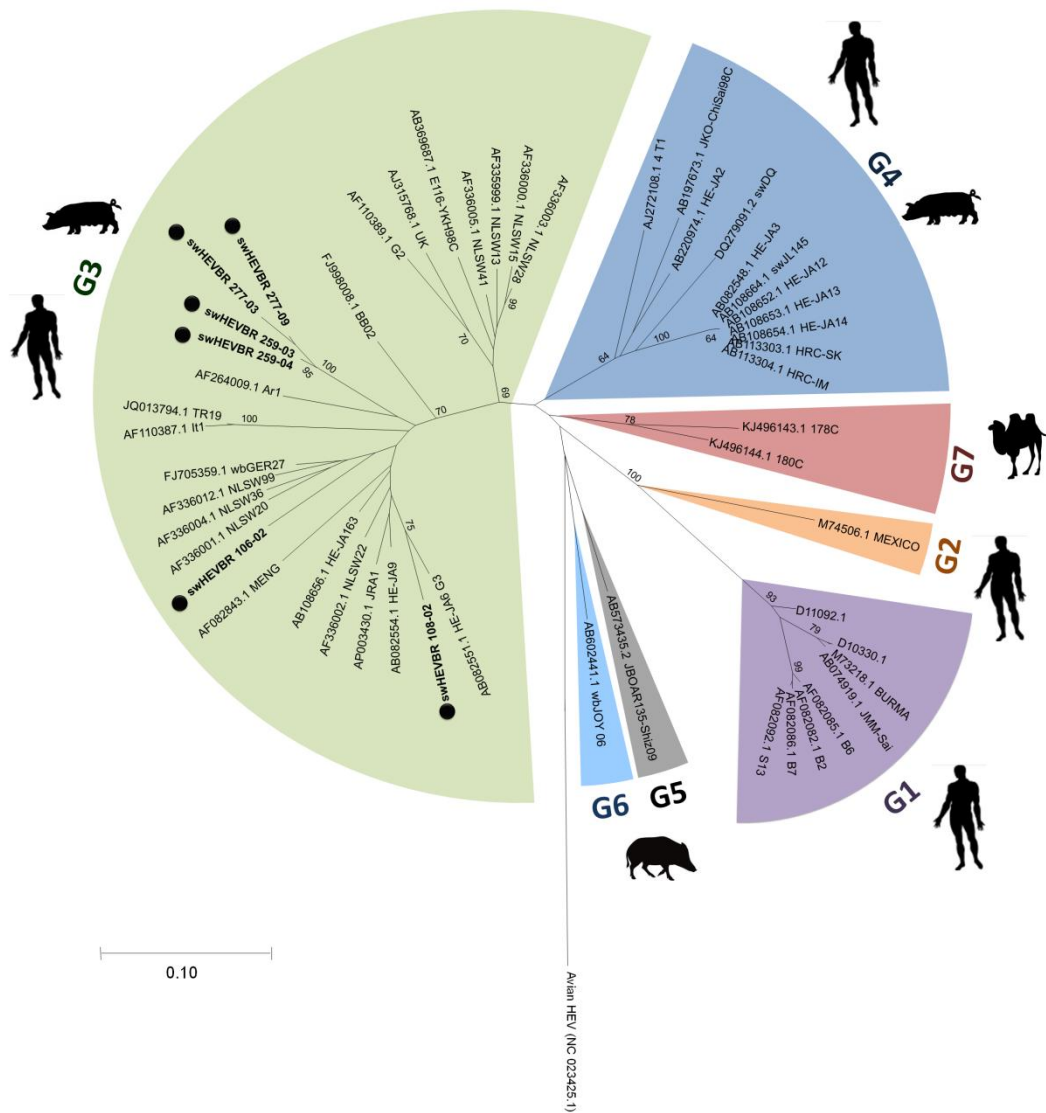
173 samples were from four different herds located in the central west, northwest, and Porto
174 Alegre metropolitan regions of the state. Phylogenetic inferences from sequences identified in
175 this study (swHEV106-02, swHEVBR108-02, swHEVBR259-03, swHEVBR259-04,
176 swHEVBR277-03 and swHEVBR277-09), showed that all grouped in zoonotic genotype 3
177 HEV (Figure 2). All sequences were deposited in GenBank under accession nos. MF438128
178 to MF438135.

179 Currently, genotype 3 is subdivided into at least eleven subtypes (3a-3j, 3ra) [19].
180 Based on the ORF1 phylogenetic tree, sequences obtained herein were clearly separated into
181 three different subtypes (Figure 3). Sequences swHEVBR259-03, swHEVBR259-04,
182 swHEVBR277-03 and swHEVBR277-09 clustered with the 3h subtype. These samples are
183 closely related (88-91% of nucleotide identity) with human HEV subtype 3h isolates detected
184 in Uruguay (GenBank accession numbers: JX880212.1 to JX880214.1) and clearly clustered
185 with 3h reference sequence TR19 (GenBank accession number: JQ013794.1) [19].

186 The sequences swHEVBR106-02 and swHEVBR108-02 consistently clustered (ORF1 and
187 ORF2 phylogenies) into 3c and 3b subtypes, respectively (Figure 3 and 4).

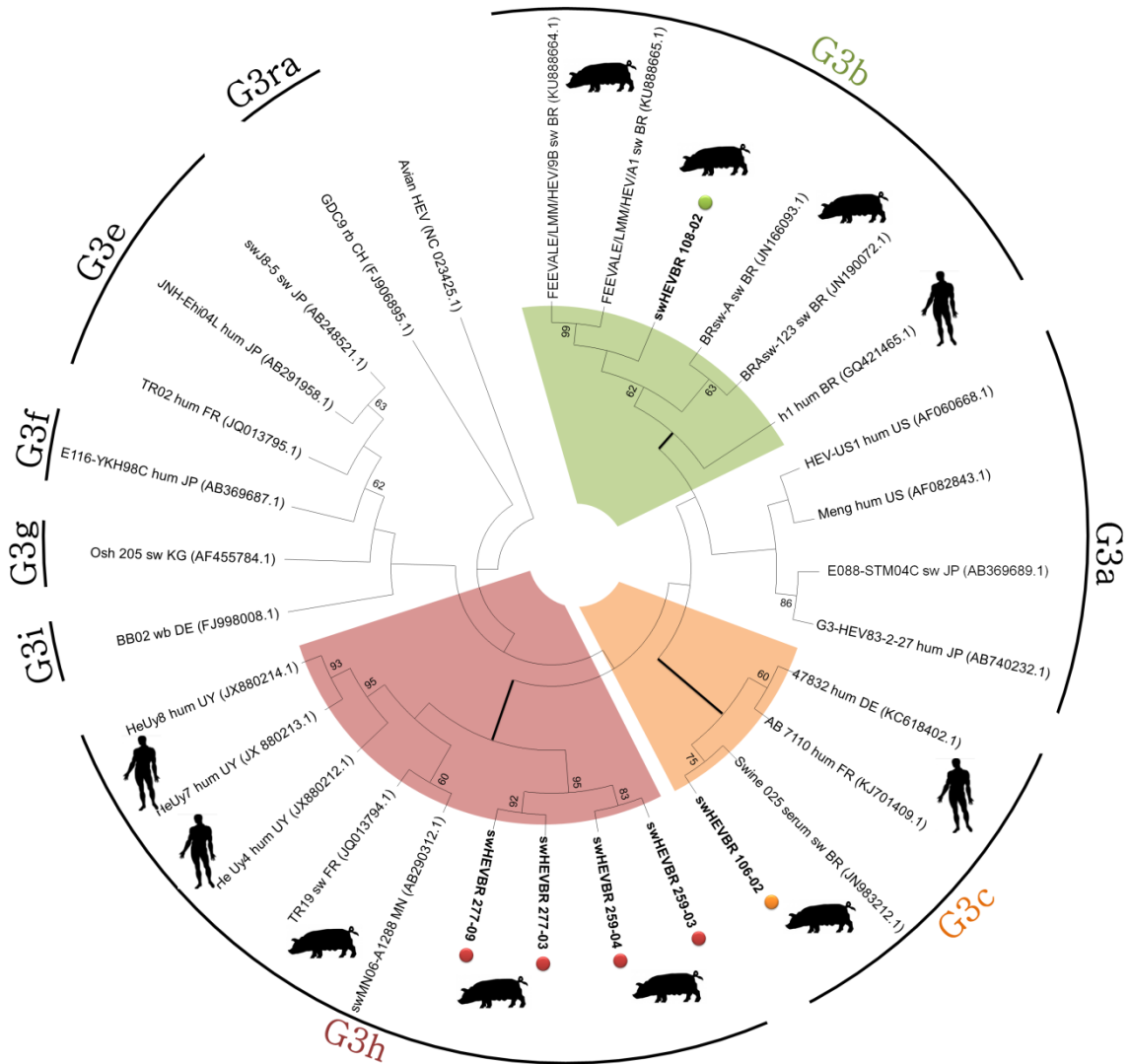
188 Sequence swHEVBR108-02 presented ORF2 high similarity (above 93% of nucleotide
189 identity) with a Brazilian human 3b sequences (GenBank accession numbers: KX173928.1;
190 KM502569.1; KF152884.1). Furthermore, this sequence presented ORF1 high similarity
191 (89% nucleotide identity) with a human 3b sequence isolated in Brazil (GenBank accession
192 number KF152884.1). Sequence swHEVBR106-02 clustered with subtype 3c reference
193 sequence WBGER27 (GenBank accession number: FJ705359.1) [19] on the ORF2 phylogeny
194 (Figure 4) and presented ORF1 high similarity (89% of nucleotide identity) with swine
195 Brazilian 3c subtype (GenBank accession number: JN983212.1).

196



197

198 **Figure 2. Radial phylogenetic tree for HEV genotyping based on the 213-bp ORF1**
 199 **nucleotide sequence.** A phylogenetic tree was reconstructed using the maximum-likelihood
 200 method and a Kimura 2-parameter model with gamma distribution conducted with 1,000
 201 bootstrap replicates. The GenBank accession numbers for sequences from reference strains
 202 used in phylogenetic analysis are shown in the tree. Genotype groups are indicated by major
 203 branches. Avian HEV was used as an outgroup. Brazilian swine HEV sequences from this
 204 study are indicated by a black dot (●).
 205



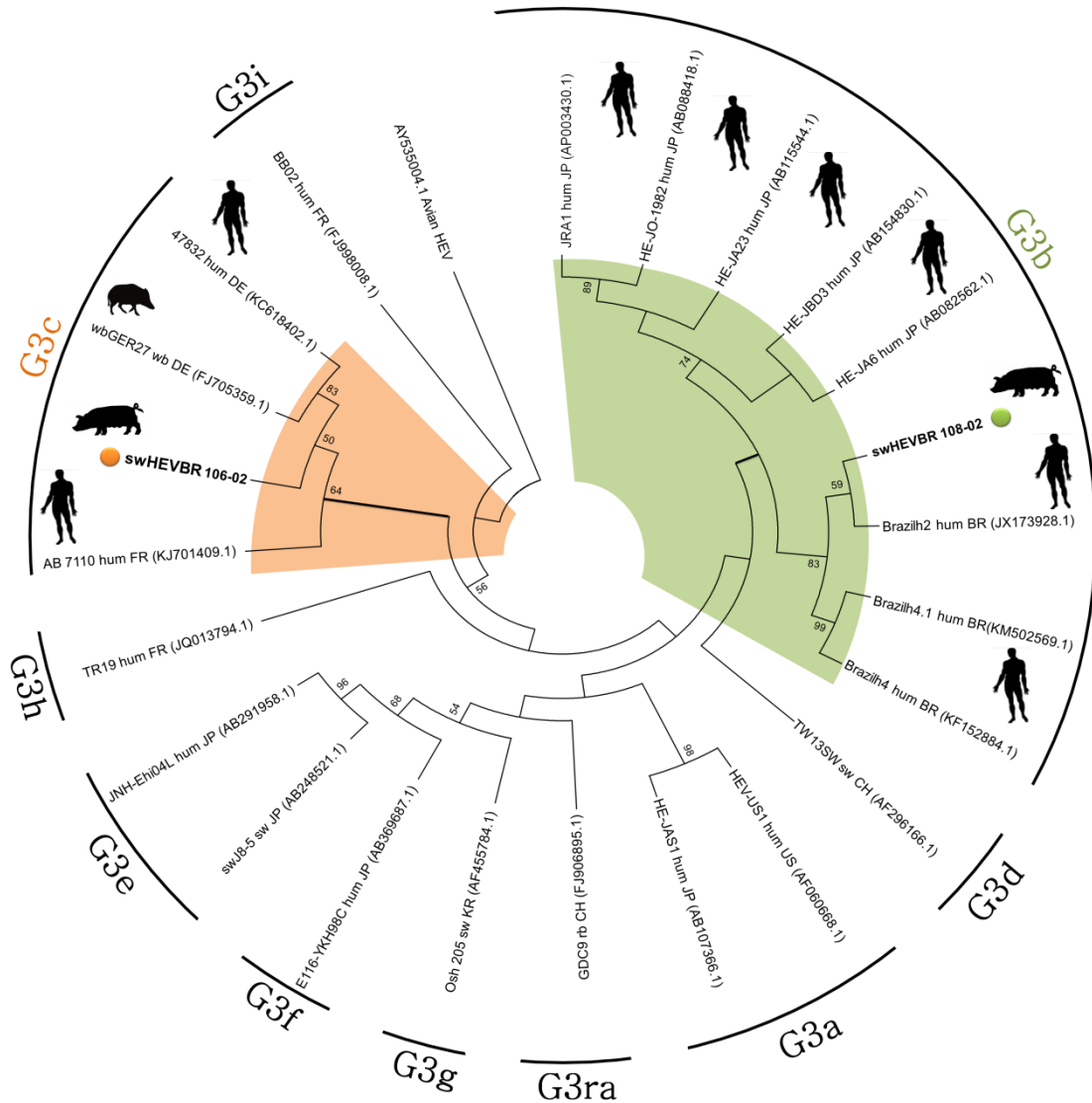
206

207

208 **Figure 3. Phylogenetic tree for HEV subtyping based on the 213-bp ORF1 nucleotide**
 209 **sequence.** A phylogenetic tree was reconstructed using the neighbor-joining method and the
 210 Kimura 2-parameter model conducted with 1,000 bootstrap replicates. The GenBank
 211 accession numbers for sequences of reference strains used in phylogenetic analysis are shown
 212 in the tree. Subtype groups are indicated by major branches. Avian HEV was used as an
 213 outgroup. Sequences detected in this study are marked by a color dot (●).

214

215



216

217 **Figure 4. Phylogenetic tree for HEV subtyping based on the 314-bp ORF2 sequence.** A
 218 phylogenetic tree was reconstructed using the neighbor-joining method and the Kimura 2-
 219 parameter model conducted with 1,000 bootstrap replicates. The GenBank accession numbers
 220 for sequences of reference strains used in phylogenetic analysis are shown in the tree. Subtype
 221 groups are indicated by major branches. Avian HEV was used as an outgroup. Sequences
 222 detected in this study are marked by a color dot (●).

223

224

225

226 **4 Discussion**

227 Until now, numerous studies suggested the zoonotic nature of HEV ^{2,23}. The data
228 presented in this work represents the first HEV seroprevalence survey in backyard pigs in
229 Southern Brazil, and highlights about the circulation of HEV in backyard pigs. The anti-HEV
230 antibody frequency detected in this study (> 70%) was higher than that found for commercial
231 pigs in Brazil (24.3%) [12], Japan (56%) [23], Germany (46.9%) [24] and Italy (50.2%) [25].
232 A similar study of backyard pigs in the Philippines showed that 66.5% of pig farms were
233 positive for anti-HEV IgG, IgM, or viral RNA[11], indicating that backyard pigs may
234 contribute to HEV spillover to humans.

235 High seropositivity showed that Southern Brazilian backyard pigs are widely exposed
236 to zoonotic HEV. Contact with HEV reservoirs is an important public concern, since previous
237 studies showed higher seroprevalence in pig farmers and veterinarians [26]. Furthermore, a
238 large number of seropositive pigs raised in a backyard setting offer a potential infection risk
239 through ingestion of contaminated food [27], since these farms are intended to feed the rural
240 producer, his family, and uncertified local commercial market. These small-scale backyard
241 farms provide considerable opportunity for HEV maintenance, since these animals have
242 greater possibilities of contact with humans and exposure to wild reservoirs [2].

243 A possible hypothesis for the high seroprevalence is that the target population was
244 composed by farms that meet the risk criteria for CSFV such as farms located near peri-urban
245 areas or dumps, located within indigenous reservations and also farms that practice feeding
246 food waste to pigs. This type of environment should be more vulnerable to HEV infection and
247 could overestimate seroprevalence data. It is beyond the scope of this study to test the risk
248 factor hypothesis for HEV seropositivity, however results obtained in this study can encourage
249 the evaluation of this topics in future studies.

250 Despite the high seroprevalence, we detected a small number of HEV RNA-positive
251 serum samples (0.8%, 6/713). The HEV RNA detection is limited by short period of viraemia
252 (two-three weeks), which are transient and low [28] . A similar study performed in Brazil but
253 using stool samples found a higher frequency (20%) of HEV-RNA [29], since there is a
254 longer HEV stool excretion [28]. Furthermore, considering that samples were previously used
255 for official surveillance studies, storage conditions may not have been ideal for preservation
256 of viral RNA for HEV detection by RT-PCR.

257 Currently, the most widely accepted classification divides it into eleven subtypes (3a-
258 3j, 3ra) and proposes a reference sequence for each one [19]. ORF1 and ORF2 regions are
259 commonly used for HEV classification, but not always both analyses are available [15]. Four
260 of the positive samples detected in our study did not allow to amplify to ORF2 region,
261 probably due to HEV genetic variability or low sensitivity of the technique.

262 Three different subtypes (b, c and h) were identified in the present study. Four
263 sequences were classified into the 3h subtype that had not yet been reported in Brazil, which
264 came from two different farms located over 200 km apart. These samples are closely related
265 with human HEV isolates detected in Uruguay [15]. Rio Grande do Sul shares common
266 borders with Uruguay, and commercial and tourist movement is very common between the
267 regions. In addition, there are extensive borders between them, which makes it difficult to
268 control human and animal movement.

269 The most common HEV subtype previously detected in Brazil is the 3b [9, 10, 30].
270 The sequence swHEVBR108-02 presented ORF2 high similarity with a Brazilian human
271 HEV sequence isolated from a pediatric female liver transplant recipient [9] and from a renal
272 transplant recipients [10]. Furthermore, this sequence also presented high ORF1 nucleotide
273 similarity with a sequence isolated from a Brazilian acute case of HEV in 2010 with a

274 phylogenetically suggested zoonotic origin [30]. These genetic findings highlight the potential
275 zoonotic transfer of the HEV 3b subtype from swine in Brazil.

276 The present study revealed that backyard pig farms might represent an important
277 reservoir for human HEV infection. We found a high proportion of anti-HEV antibodies in
278 samples, and partial genomic characterization showed three different subtypes of HEV with
279 high similarity to HEV sequences detected in humans. It is evident from our study that HEV
280 is present and should be a concern to public health authorities in Southern Brazil, and
281 highlights the need for similar studies around the world.

282

283 **Funding**

284 This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
285 Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
286 (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and
287 PROPESQ/UFRGS (Pró Reitoria de Pesquisa).

288

289 **Conflict of interest**

290 The authors whose names are listed below certify that they have no affiliations with or
291 involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria,
292 educational grants, participation in speakers' bureaus, membership employment,
293 consultancies, stock ownership, or other equity interest, and expert testimony or patent-
294 licensing arrangements), or non-financial interest (such as personal or professional
295 relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in
296 this manuscript. We have no conflict of interest.

297

298 Ethical approval

299 Ethics Committee of the Use of Animals (CEUA) of the University of Passo Fundo
300 (UPF) under protocol number #031/2014.

301

302 Acknowledgements

303 The authors wish to thank Doctor Fernando Rosado Spilki for providing HEV positive
304 sample.

305

306 References

- 307 1. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, et al. Consensus proposals for classification of the
308 family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014;95:2223–32.
- 309 2. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, et al. Zoonotic hepatitis E virus:
310 Classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses.* 2016;8:1–24.
- 311 3. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis e. *Lancet.* 2012;379:2477–
312 88.
- 313 4. IBGE. Produto Interno dos Municípios. Instituto Brasileiro de Estatística IBGE. Censo
314 Agropecuário 2012; 4–8.
- 315 5. Poeta APS, Santiago Neto W, Vergara EN, et al. Panorama da suinocultura no Rio
316 Grande do Sul. *Dep Def e Agropecuária* [Internet]. 2014;33:1–16. Available from:
317 http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/conteudo/6918/?Caracterizacao_da_Suinocultura.
- 318 6. Erker JC, Desai SM, Mushahwar IK. Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by
319 reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J*
320 *Virol Methods.* 1999;81:109–13.
- 321 7. Myint KSA, Gibbons R V. Hepatitis E: a neglected threat. *Trans R Soc Trop Med*
322 *Hyg.* 2008;102:211–12.
- 323 8. Bazerbachi F, Haffar S, Garg SK, et al. Extra-hepatic manifestations associated with
324 hepatitis E virus infection: a comprehensive review of the literature. *Gastroenterol Rep.*
325 2016;4:1–15.
- 326 9. Guimarães T, Seda J, Antunes E, et al. Chronic Hepatitis E Virus Infection in a
327 Pediatric Female Liver Transplant Recipient. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:4425-27.
- 328 10. Passos, AM, Heringer, TO, Medina-Pestana, et al. First Report and Molecular
329 Characterization of Hepatitis E Virus Infection in Renal Transplant Recipients in Brazil. *J*
330 *Med Virol.* 2013;85:615–19.
- 331 11. Liu X, Saito M, Sayama Y, et al. Seroprevalence and molecular characteristics of
332 hepatitis E virus in household-raised pig population in the Philippines. *BMC Vet Res.*
333 2015;11-
- 334 12. Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, et al. Serological evidence of hepatitis E
335 virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo*
336 *Cruz Rio Janeiro.* 2005; 22:100-17.

- 337 13. Pandolfi R, Almeida DR De, Pinto MA, et al. In house ELISA based on recombinant
338 ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti- hepatitis E virus amongst blood donors
339 in south Brazil. *PLoS One*. 2017;1–12.
- 340 14. De Almeida Ramos D, Miani M, Pandolfi R, et al. Production and characterization of
341 a Brazilian candidate antigen for Hepatitis E Virus genotype 3 diagnosis. *FEMS Microbiol*
342 *Lett*. 2016;363:1–9.
- 343 15. Mirazo S, Ramos N, Russi JC, et al. Genetic heterogeneity and subtyping of human
344 Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res*. 2013;173:364–70.
- 345 16. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, et al. Detection by Reverse Transcription-PCR
346 and Genetic Characterization of Field Isolates of Swine Hepatitis E Virus from Pigs in
347 Different Geographic Regions of the United States. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1326–32.
- 348 17. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable
349 desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*.
350 2012;28:1647–9.
- 351 18. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
352 version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33.
- 353 19. Smith DB, Simmonds P, Izopet J, et al. Proposed reference sequences for hepatitis E
354 Virus subtypes. *J Gen Virol*. 2016;97:537–42.
- 355 20. Vasconcelos J, Soliman MC, Staggemeier R, et al. Molecular detection of hepatitis E
356 virus in feces and slurry from swine farms , Rio Grande do Sul , Southern Brazil. *Arq Bras*
357 *Med Veterinária e Zootec*. 2015;67:1-8.
- 358 21. Gardinali NR, Barry AF, Otonel RAA, et al. Hepatitis E virus in liver and bile samples
359 from slaughtered pigs of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107: 935-939.
- 360 22. Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science Publication. 2007. 610 p.
- 361 23. Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MFM, et al. First report of a
362 human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J Clin Virol*. 2010;47:276–9.
- 363 24. Takahashi M, Nishizawa T, Tanaka T, et al. Communication Correlation between
364 positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed
365 among farm pigs in Japan. *J Gen Virol* 2017:1807–13.
- 366 25. Krumbholz A, Joel S, Neubert A, et al. Age-related and regional differences in the
367 prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in pigs in Germany. *Vet Microbiol*.
368 2013;167:394–402.
- 369 26. Martinelli N, Luppi A, Cordioli P, et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in
370 pigs in Northern Italy. *Infect Ecol Epidemiol*. 2017;8686:7–10.
- 371 27. Chaussade H, Rigaud E, Allix A, et al. Hepatitis E virus seroprevalence and risk
372 factors for individuals in working contact with animals. *J Clin Virol*. 2013;58:504–8.
- 373 28. Heldt FH, Staggmeier R, Gularte JS, et al. Hepatitis E Virus in Surface Water,
374 Sediments, and Pork Products Marketed in Southern Brazil. *Food Environ Virol*. 2016;8:200–
375 5.
- 376 29. Bouwknecht M, Rutjes S a, Reusken CBEM, et al. The course of hepatitis E virus
377 infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res*. 2009;5:7.
- 378 30. Passos-Castilho AM, Granato CFH. High frequency of hepatitis E virus infection in
379 swine from South Brazil and close similarity to human HEV isolates. *Brazilian J Microbiol*
380 [Internet]. 2017:1–7.
- 381

5 CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO: “*Comprehensive Evolutionary and Phylogenetic Analysis of Hepacivirus N: Classification of novel subtypes*”

O artigo intitulado “*Comprehensive Evolutionary and Phylogenetic Analysis of Hepacivirus N: Classification of novel subtypes*” foi aceito na revista “Journal of General Virology”.

Comprehensive Evolutionary and Phylogenetic Analysis of *Hepacivirus N*: Classification of novel subtypes

da Silva¹, M.S.; Junqueira, D.M.²; Baumbach, L.F¹.; Cibulski, S.P.¹; Mósena, A.C.S¹; Weber, M.N.¹; Silveira, S.¹; Canal. C.W.^{1,*}

¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9090 - Agronomia, CEP 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Centro Universitário Ritter dos Reis – UniRitter. Rua Orfanotrófio, 555 - Santa Tereza, Porto Alegre - RS, CEP 90840-440. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Cláudio W. Canal.

E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br

Keywords: *Hepacivirus*; cattle; HNV; HCV; Bayesian inferences.

Subject category: Animal – RNA viruses.

No. of figures: 4

No. of supplementary table: 1

GenBank accession numbers: MG781018-MG781025 and MG800843- MG800848.

1 **Comprehensive Evolutionary and Phylogenetic Analysis of Hepacivirus N:**
2 **Classification of novel subtypes**

3
4 **Summary**

5 Hepatitis C virus (HCV), which belongs to the family Flaviviridae, is a major human
6 pathogen causing persistent infection that can lead to hepatic injury. After two decades
7 of the discovery of HCV, animal hepaciviruses (HVs) have been described in many
8 animal species. The actual classification divides the Hepacivirus genus into 14 species
9 (A-N), according to their phylogenetic relationships, including the bovine hepacivirus
10 (Hepacivirus N, HNV). In this study, we confirmed HNV circulation in Brazil and
11 sequenced the whole genome of two strains. Based on the current classification of HCV,
12 which is divided into genotypes and subtypes, we analyzed all available bovine
13 hepacivirus sequences in the GenBank database and proposed an HNV classification.
14 All sequences were grouped into a single genotype, putatively named “Genotype 1.”
15 This genotype can be clearly divided into 4 subtypes: A and D containing sequences
16 from Germany and Brazil respectively, and B and C containing Ghanaian sequences. In
17 addition, the NS3-coding region was used to estimate the time to the most recent
18 common ancestor (Tmrca) of each subtype, using a Bayesian approach and a relaxed
19 molecular clock model. The analyses indicated a common origin of the virus circulating
20 in Germany and Brazil. Ghanaian sequences seemed to have an older Tmrca, indicating
21 a long time of circulation of these viruses in the African continent.

22

23

24 **Introduction**

25 Hepacivirus is a genus of single-stranded positive-sense RNA viruses, and a
26 member of the Flaviviridae family. According to new classification proposals, based on
27 phylogenetic relationships, the genus is divided into 14 species, from A to N [1]. At
28 present, the best characterized Hepacivirus is hepatitis C virus (HCV), which is a
29 member of the species C. The virus only infects humans and is a leading global cause of
30 chronic liver disease Hepacivirus N (HNV), also named bovine hepacivirus, is the
31 newest member and apparently only infects cattle [2].

32 Hepaciviruses (HVs) contain two untranslated regions (UTR) at the 5' and
33 3'ends, and a single large ORF encoding a unique polyprotein. This polyprotein is
34 cleaved by signal peptidase, NS2/NS3 protease and NS3 protease enzymes into at least
35 10 mature products: the structural core protein (C), two envelope proteins (E1 and E2),
36 nonstructural assembly proteins (p7 and NS2), and other nonstructural proteins involved
37 in replication (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) [3, 4]. Phylogenetic analysis has
38 focused on the highly-conserved NS3 protein, which encodes a viral helicase and a
39 serine protease that antagonizes the host innate immune response [5, 6].

40 HVs has been detected in several domestic and wild animals such as horses [7],
41 dogs [8], rodents [9], bats [10], and cattle [5, 6, 11], although each virus species tends to
42 have a narrow host range. Consequently, identification and characterization of animal-
43 derived viruses would be important to understand viral evolution and could establish
44 new animal HCV model alternatives.

45 Recently, HNV was described in serum samples from domestic cattle in Europe
46 [6] and Africa [5], Another recent study showed that HNV has been in circulation in
47 Brazil for at least 20 years [11]. There is no animal model in which HCV infection can

48 be studied straight forward, and current cell culture systems are limited in scope, so a
49 better understanding of related viruses, such as HNV, could provide valuable insights
50 into the knowledge of hepaciviruses' biology [12].

51 In order to contribute to the HVs database and expand the knowledge pertaining
52 to genetic variability and evolution, we detected and analyzed Brazilian HNV genomes.
53 The analysis included phylogenetic inferences and Bayesian molecular clock dating.
54 Besides, we proposed classification criteria for HNV based on HCV classification.

55

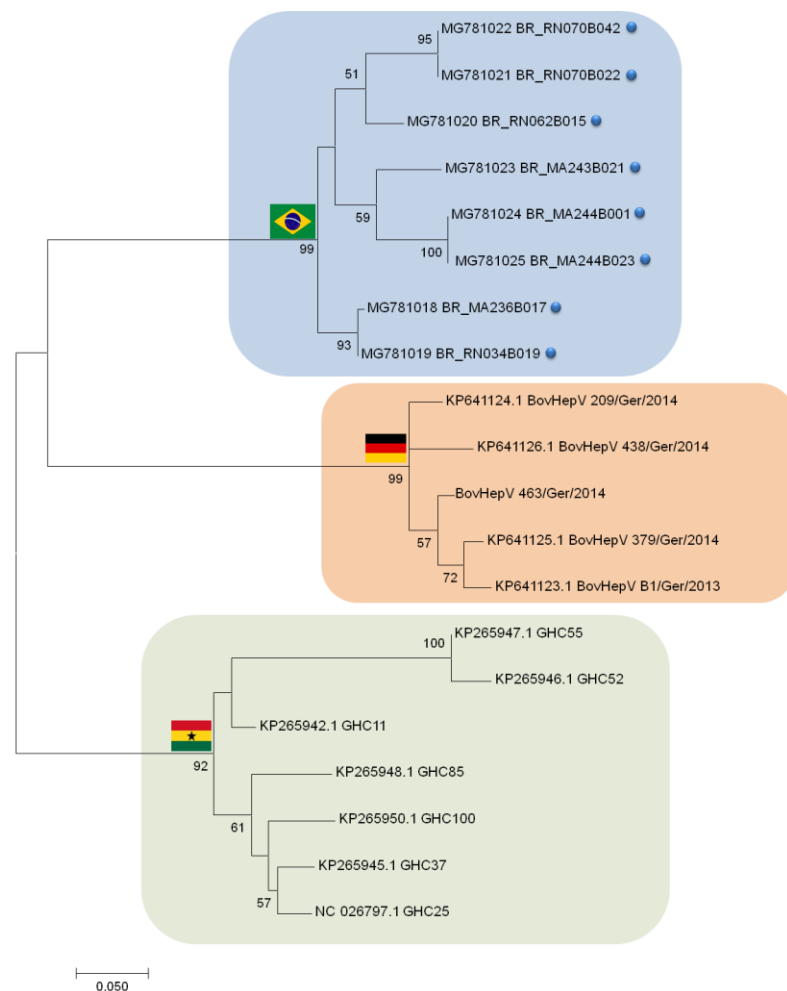
56 **Results and Discussion**

57 **HNV detection and phylogenetic analysis**

58 A total of 1,300 serum samples were tested with the help of RT-PCR using
59 primers to amplify 310 bp from the NS3 region [6]. Eight positive pools were detected
60 and individually tested at NS3 and 5'UTR regions, resulting in eight individual positive
61 samples (8/1,300). Four samples were collected from RN and another four from MA
62 (northeast Brazil). The frequency of detection of HNV in this study was 0.6 %
63 (8/1,300). This frequency was slightly lower than the ones found in the studies
64 performed in Germany and Ghana, which detected 1.6 % and 8.5 % of HNV positive
65 samples respectively.

66 The positive samples had its partial 5'UTR and NS3 submitted to DNA
67 sequencing. The nucleotide identity within the sequences generated herein ranged from
68 90–99 % in NS3 and 96–99 % in 5'UTR. Upon nucleotide BLASTn analysis, all
69 sequences obtained in this study shared a high degree of identity with HNV strains
70 available in the GenBank, ranging from 83–87% in NS3 and 95–99% in 5'UTR.

71 The phylogenetic tree obtained for partial NS3 coding region indicates the
 72 subdivision of the HNV sequences into two well separated clades: One only including
 73 Ghanaian samples and the other grouping German and Brazilian sequences (Fig.1).
 74 Both Brazilian and German clades were separated into monophyletic groups. These
 75 results may suggest a common origin for the Brazilian and European strains from
 76 African viruses. However, by increasing the number of HNV sequences, more details of
 77 the HNV dissemination can be incorporated.



78

79 **Figure 1. Phylogenetic tree based on partial NS3 coding region of HNV.**
 80 MEGA7 was used for phylogeny inference under the Maximum Likelihood method.
 81 Only bootstrap values greater than 70 were shown. German HNV sequences are
 82 indicated by a blue square, Ghanaian sequences by a grey square, and Brazilian
 83 sequences, isolated in this study, are indicated by a blue dot (●).
 84

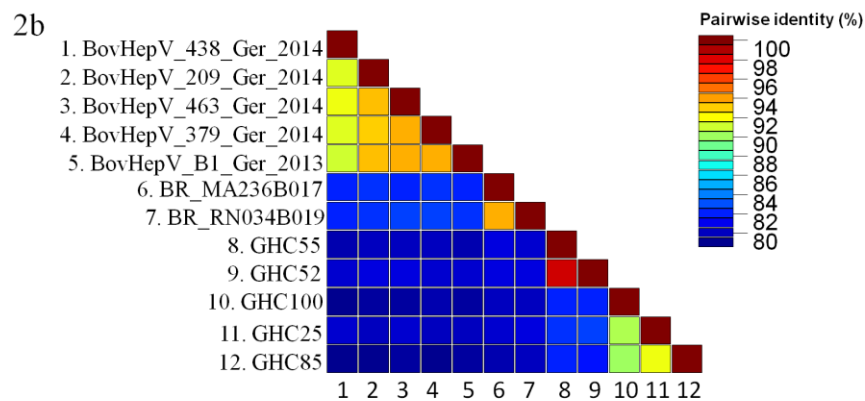
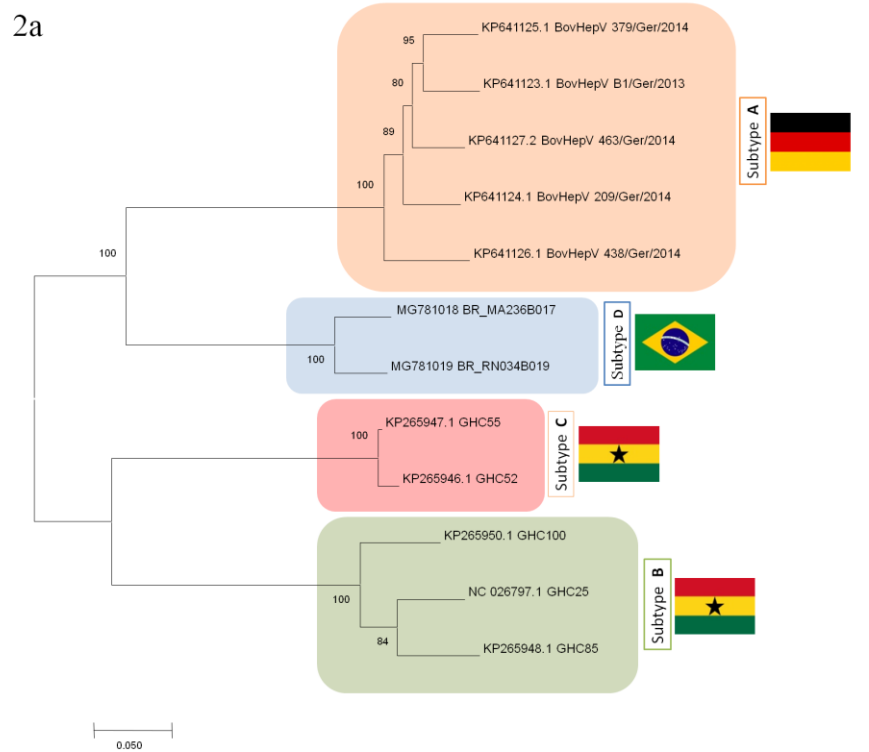
85 **Complete HNV genome sequencing and analysis**

86 The two sequenced HNV genomes, Br_RN034B019 and Br_MA236B017, were
87 8,721 and 8,670 nt long respectively, sharing 98 % of their identity with each other. The
88 sequences corresponded to nearly complete genomes and included the full polyprotein
89 gene (8,412 nt). The genomes were arranged as linear RNA molecules, with GC content
90 for BR_MA236B017 and BR_RN034B019 amounting to 52.4 % and 52.3 %
91 respectively, which were similar to those described for bovine hepatitis virus [5, 6]. Both
92 genomes generated herein displayed a classical Flaviviridae family genome
93 organization, with one single ORF flanked by 5' and 3' untranslated regions. The
94 predicted cattle HNV polyprotein contained the 10 typical HNV proteins in the order
95 Core-E1-E2-p7- NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B.

96 In agreement with data from the partial sequencing of 5'UTR and NS3, Brazilian HNV
97 genomes were more similar to the genomes found in Europe (82.4–83.09 %) when
98 compared to Ghanaian genomes. The nucleotide identity among Brazilian and Ghanaian
99 genomes is around 80 %, ranging from 80.1–81.13 %.

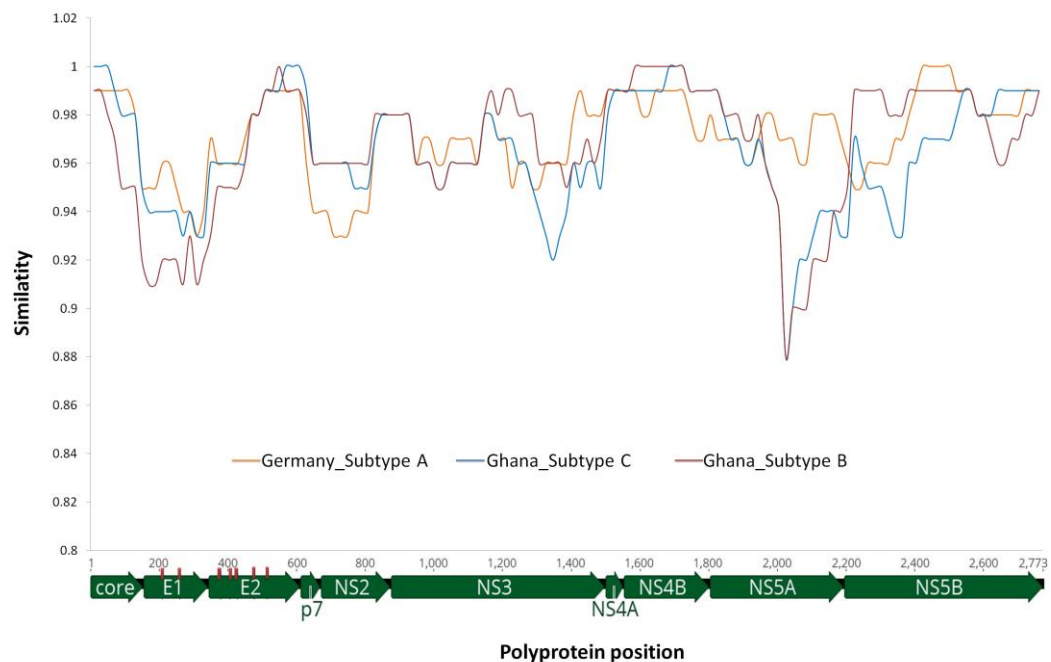
100 Keeping in mind the diverse mechanisms of high genetic plasticity of RNA
101 viruses, including homologous recombination [29], we searched for putative
102 homologous recombination sites using the RDP4 software in HNV whole genome
103 sequences. No evidence of putative homologous recombination event was observed
104 although this phenomena is frequently reported in the major hepatitis virus member HCV
105 [30–32]. It is important to highlight that there are few HNV genomes available in public
106 databases, to date, which makes the detection of putative recombinants difficult.
107 Continuous studies in HNV genetic variability can provide tools for the evaluation of
108 distinct phenomena in the generation of HNV genetic variants.

109 N-linked glycosylation is one of the most common types of protein modification
110 that occurs with the help of the transfer of an oligosaccharide to an asparagine residue in
111 the consensus sequence N-X-T/S. The HVs envelope glycoproteins E1 and E2 are
112 released from the polyprotein through signal peptidase cleavages [4]. These
113 glycoproteins are type I transmembrane proteins with a highly glycosylated N-terminal
114 ectodomain and a C-terminal hydrophobic anchor. In applying the NetNGlyc 1.0
115 software to search for N-linked glycosylation sites into the translated E1 and E2
116 sequences, two and five putative sites were observed respectively (Fig. 3). The E1 and
117 E2 proteins of cattle HVs, similar to HCV, contained several predicted N-glycosylation
118 sites that could play a major role in folding, entry functions, or modulating the immune
119 response [33].
120



121
122

123 **Figure 2. Subtyping HNV based on complete genome.** (a) Phylogenetic tree based on
124 bovine HVs complete genomes. MEGA7 was used for phylogeny inference in
125 accordance with the Maximum Likelihood method. Bootstrap analyses that were
126 supported by > 70 % of 1,000 replicates are indicated in nodes. The countries of origin
127 from the samples are indicated by their national flags (b) Complete bovine HVs
128 nucleotide genome pairwise distances were calculated using SDT (Species Demarcation
129 Tool). GenBank accession numbers: Germany sequences (KP641123 to KP641127);
130 Brazilian sequences (MG781018 and MG781019); Ghana sequences (KP265942 to
131 KP265950).



132
 133 **Figure 3. Pairwise polyprotein comparison of HNV subtypes using SimPlot**
 134 **program.** The graphic shows similarity between the HNV grouped subtypes,
 135 according to the amino acid position in the polyprotein. The y axis shows the similarity
 136 between grouped HNV subtypes, and x axis corresponds to the genome architecture as
 137 showed on the bottom. Red arrows indicate N-linked glycosylation sites.

138

139 **HNV genotyping and subtyping proposal**

140 HCV is classified into genotype and subtype levels. The actual yardstick for
 141 HCV classification uses a p-distance between 0.23 and 0.31 at amino acid level to
 142 distinguish among different genotypes [2]. Applying p-distance to the complete HNV
 143 polyproteins available in the GenBank and the sequences obtained in this study, a
 144 difference of 0.01–0.07 was found, suggesting that all bovine HVs were allocated into a
 145 unique genotype, putatively named “Genotype 1.”

146 However, at nucleotide level,, HCV subtypes differ by 15–25 % [2] and this
 147 difference was observed between HNV sequences. Indeed, the phylogenetic tree

148 obtained for all HNV complete genomes indicates the existence of four clearly
149 separated branches, which is supported by a bootstrap value of 100. Therefore, based on
150 complete genome phylogeny (Fig. 2a) and on the nucleotide dissimilarity (Fig. 2b), we
151 propose, herein, the existence of four different HNV subtypes: Subtype A, which
152 includes the German sequences (BovHepV_438_Ger_2014; BovHepV_209_Ger_2014,
153 BovHepV_379_Ger_2014, BovHepV_B1_Ger_2014 and BovHepV_B1/Ger/2013);
154 subtypes B and C, which includes the two clades of Ghanaian sequences (GHC 100,
155 GHC85 and GHC25, GHC55 and GHC52); and subtype D, which includes the Brazilian
156 sequences characterized in this study (BR_MA236B017, BR_RN034B019).

157 A SimPlot program was performed by grouping HNV Germany (subtype A) and
158 Ghana (subtype B and C) proposed subtypes with Brazilian subtype D. This analysis
159 compares the entire genome length relationship of homologous sequences groups. The
160 SimPlot graph clearly shows the high degree of similarity between all groups, but
161 especially among the Brazilian and German subtypes. The Ghanaian and Brazilian
162 subtypes present highly divergent NS5A regions, which are responsible by formation of
163 RNA replication complexes [34].

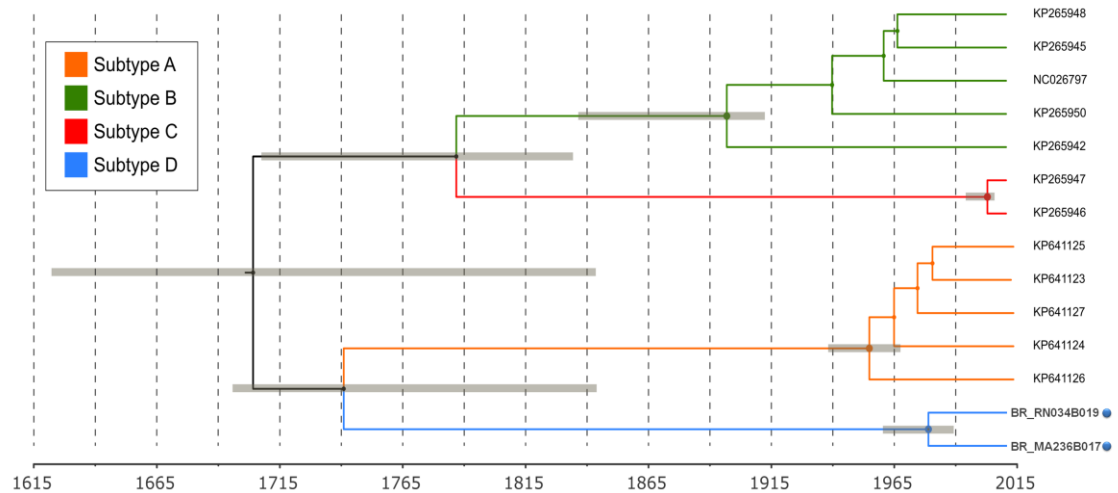
164

165 **Bayesian Molecular Clock Dating**

166 A Bayesian phylogenetic tree of 14 HNV NS3 sequences (including the two
167 complete genomes recovered in this study) corroborated the results of the maximum
168 likelihood phylogeny (Fig. 4). Four well-supported clades were clearly observed,
169 indicating the subdivision of HNV sequences into four distinct subtypes (A to D). In
170 addition, by using a relaxed molecular clock parameter in the analysis, it was possible to
171 estimate the time of the most common ancestral (Tmrca) from each subtype.

172 These analyses indicated a common origin of the strains circulating in Germany
173 and Brazil (subtypes A and D respectively) and estimated the Tmrca for these clades to
174 be 1944 (1938–1967) and 1979 (1960–1988) respectively. The Brazilian HNV origin is
175 concomitant to the major increase of cattle raising in Brazil, which occurred around
176 1970, marked by enhancement of the Brazilian bovine population [35]. The older
177 common origin between these subtypes dated back to the XVIII century (1725), and this
178 period was marked by the Sugarcane cycle in colonial Brazil, which increased livestock
179 mainly in the northeast region by way of the entrance of European cattle for the purpose
180 of preparing and assisting the land, and planting and harvesting sugarcane [36]. This
181 hypothesis may explain some common origin between Brazilian and European HNV.

182 The Ghanaian sequences seemed to have an older Tmrca, estimated to be 1787
183 (1703–1832). However, two subtypes arose (subtypes B and C) in different periods
184 from this ancestral sequence: Subtype B most likely emerged in 1897 (1835–1909) and
185 subtype C in 2003 (1997–2006). These results indicate a longer circulation time of these
186 viruses in the African continent.



187

188

189 **Figure 4. Bayesian phylogenetic tree of 14 HNV NS3 sequences (1,874 nt long).** All
 190 internal nodes presented Bayesian posterior probabilities greater than 0.70. Gray
 191 horizontal bars denote the 95 % credible region for the age of each node (see timescale
 192 below the phylogeny). The phylogeny was estimated using the Bayesian MCMC
 193 approach in BEAST under a log-normal relaxed clock model and a strong normal prior
 194 distribution (mean = 0.0009; std. dev. = 0.00002) placed on the clock rate parameter.
 195 The accession number of each sequence is shown on the right and the bolded ones mark
 196 the sequences generated in this study. Branches were colored according to the
 197 subdivision in subtype as proposed in this study.

198

199 **Concluding remarks**

200 The present report showed that the frequency of detection of HNV observed in
201 the bovines from the northeastern region of Brazil was 0.6 % (8/1,300), which is
202 slightly lower than the percentage detected in Europe and Africa. Complete genome
203 characterization of two Brazilian HNV genomes revealed that Brazilian HNV sequences
204 are more closely related to European HNV when compared with Ghanaian HNV
205 sequences. Second, we proposed a classification at genotype and subtype level,
206 concluding that HNV sequences should be classified into a unique genotype, putatively
207 named “Genotype 1,” and four subtypes (A to D). Finally, the Bayesian molecular clock
208 dating was performed, which indicated a common origin of the virus circulating in
209 Germany and Brazil (subtypes A and D respectively), and an older Tmrca estimated to
210 Ghanaian sequences (subtypes B and C) indicated a long time of circulation of these
211 viruses in the African continent. Summing up, these findings provide important insights
212 into the HVs database, expand the knowledge pertaining to genetic HNV variability,
213 which is important to understand viral HNV evolution.

214

215

216 **Methods**

217 **Study area, target population**

218 Bovine serum samples were obtained from farms located in the federative states
219 of Maranhão (MA) and Rio Grande do Norte (RN), northeast Brazil. The samples were
220 collected in 2012–2013 as part of the biannual surveillance study performed in the
221 country to expand the Foot-and-mouth disease (FMD)-free zone using vaccination.
222 Samples were stored at -20°C until the analysis was performed in 2017. The target
223 population included all farms enrolled in the national FMDV control and eradication
224 program from the states of MA and RN. The samples were randomly drawn from farms
225 located in counties with high cattle movement, as defined by the State Veterinary Office
226 data on livestock movement.

227

228 **Sample size, RNA isolation and RT-PCR**

229 In this study, 1,300 sera samples were collected from MA and RN in the
230 northeastern region of Brazil. The samples were analyzed in 26 pools of up to 50
231 samples containing equal volume of each serum. The total RNA was isolated using
232 Quick-Zol® (Ludwig Biotec, Porto Alegre, Brazil) in accordance with the
233 manufacturer's instructions. cDNA synthesis and PCR were performed using
234 GoScript™ Reverse Transcription System and GoTaq® G2 Hot Start Polymerase
235 (Promega, Madison, USA) respectively. The samples were initially tested for HNV by
236 targeting a 310 nt-highly conserved partial NS3 coding region, using Hepaci_NS3_fwd
237 and Hepaci_NS3_rev set of primers [6].

238 Individual samples from the positive pools were further tested at NS3 [6] and 5'UTR
239 regions. Primers to amplify partial 5'UTR (Supplementary Table 1) were designed in

240 this study, following alignment of all HNV nucleotide sequences available in GenBank
241 to date. Two individual positive samples (one from MA and one from RN states) were
242 randomly chosen for whole genome sequencing. For primer design, an alignment of
243 HNV genomes available in GenBank was built using MUSCLE [13]. Primers sequences
244 were available in Supplementary Table 1.

245

246 **Sequencing and phylogenetic analysis**

247 The RT-PCR products generated with the sets of sequencing primers were
248 purified using the PureLink® PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.).
249 Both DNA strands were sequenced with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer using a
250 BigDye Terminator v.3.1 cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).
251 Overlapping fragments were assembled using Geneious software (version 9) [14].
252 Multiple sequence alignments were generated using MUSCLE [13]. All HNV
253 sequences were retrieved from the GenBank database
254 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Phylogenetic reconstructions were performed
255 by applying the Maximum Likelihood method [15] on a Kimura 2-parameter nucleotide
256 substitution model, which was selected using the Molecular Evolutionary Genetics
257 Analysis software package 7 (MEGA7) [16]. All phylogenetic analyses were conducted
258 using MEGA7 with 1,000 bootstrap replicates each. Pairwise identity scores were
259 calculated with the Species Demarcation Tool (SDT) [17].

260 In order to identify putative N-linked glycosylation sites, envelope E1 and E2 sequences
261 were analyzed using NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

262 Putative homologous recombination sites were predicted in the whole HNV genome
263 sequences using Recombination Detection Program version 4 (RDP4) software

264 (<http://web.cbio.uct.ac.za/~darren/rdp.html>) [18] by applying RDP [19], GENECONV
265 [20], BootScan [21], MaxChi [22], Chimaera [23], SisCan [24] and 3Seq [25]
266 algorithms. Putative recombinant events were considered significant when $P < 0.01$ was
267 observed for the same event using four or more algorithms.

268

269 **Bayesian Molecular Clock Analysis**

270 In order to estimate the time to the most recent common ancestor (Tmrca) of
271 each HNV clade, dated phylogenies were reconstructed using the Bayesian MCMC
272 method implemented in BEAST v1.8.3 [26]. As recommended, the Bayesian analyses
273 assumed an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock and a non-parametric
274 Bayesian skyline plot. Due to the low temporal signals of the datasets, a strong normal
275 prior distribution (mean = 0.0009; std. dev. = 0.00002) was placed on the clock rate
276 parameter [27]. The MCMC chain was run for 2.0×10^8 chain steps, and the
277 convergence was evaluated in TRACER v1.5, excluding an initial 10 % for burn-in
278 [28]. Maximum clade credibility trees (MCC) were summarized using TreeAnnotator
279 v1.8.3 and the resulting tree was visualized with FigTree v.1.4.3. Uncertainty in
280 parameter estimates were reflected in the 95 % highest probability density (HPD)
281 values.

282

283 **Funding information**

284 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
285 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and
286 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) supported this
287 work. The serum samples were kindly supplied by the official veterinary services of

288 Instituto de Defesa e Inspeção Agropecuária do Rio Grande do Norte (IDIARN),
289 Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED-MA), Ministério da
290 Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, and Laboratório de Epidemiologia
291 Veterinária (EPILAB-UFRGS).

292

293 **Conflicts of interest**

294 The authors declare that there are no conflicts of interest.

295

296 **References**

297

- 298 1. Smith DB, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, et al. Proposed update to the
299 taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen*
300 *Virol* 2016;97:2894–2907.
- 301 2. Smith DB, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, et al. Proposed update to the
302 taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen*
303 *Virol* 2016;97:2894–2907.
- 304 3. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. 2007;5:453–
305 463.
- 306 4. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky J-M. Structural biology
307 of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39:5–19.
- 308 5. Corman VM, Grundhoff A, Baechlein C, Fischer N, Gmyl A, et al. Highly
309 divergent hepaciviruses from African cattle. *J Virol* 2015;89:JVI.00393-15.
- 310 6. Baechlein C, Fischer N, Grundhoff A, Alawi M, Indenbirken D, et al.
311 Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. *J Virol*
312 2015;89:7007–15.
- 313 7. Lyons S, Kapoor A, Sharp C, Schneider BS, Wolfe ND, et al. Nonprimate
314 Hepaciviruses in Domestic Horses , United Kingdom. 18.
- 315 8. Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, et al. Characterization of a
316 canine homolog of hepatitis C virus. 2011;108:1–6.
- 317 9. Lukashev AN, Drexler JF, Corman VM, Mu MA, Gmyl A, et al. Evidence for
318 Novel Hepaciviruses in Rodents. 9. Epub ahead of print 2013. DOI:
319 10.1371/journal.ppat.1003438.
- 320 10. Quan P, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-torrel CM. Bats are a
321 major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. 2012;3–8.
- 322 11. Canal CW, Weber MN, Cibulski SP, Silva MS, Puhl DE, et al. A Novel Genetic
323 Group of Bovine Hepacivirus in Archival Serum Samples from Brazilian Cattle. 2017.
- 324 12. Bukh J. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related
325 liver disease. *Gastroenterology* 2012;142:1279–1287.e3.
- 326 13. Edgar RC, Drive RM, Valley M. MUSCLE : multiple sequence alignment with
327 high accuracy and high throughput. 2004;32:1792–1797.

- 328 14. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, et al. Geneious Basic:
329 An integrated and extendable desktop software platform for the organization and
330 analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012;28:1647–1649.
- 331 15. Uindon PG, Ranc JEAN. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-
332 Likelihood Phylogenies : Assessing the Performance of PhyML 3 . 0. 2017;59:307–321.
- 333 16. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics
334 Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets Brief communication. *Mol Biol Evol*
335 2016;33:1870–1874.
- 336 17. Muhire BM, Varsani A, Martin DP. SDT : A Virus Classification Tool Based on
337 Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. 9. Epub ahead of print 2014.
338 DOI: 10.1371/journal.pone.0108277.
- 339 18. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. RDP4 : Detection and
340 analysis of recombination patterns in virus genomes. 2015;1:1–5.
- 341 19. Martin DP, Williamson C, Posada D. RDP2: recombination detection and
342 analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 2005;21:260–262.
- 343 20. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM. Possible Emergence of New Geminiviruses
344 by Frequent Recombination. *Virology* 1999;265:218–225.
- 345 21. Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C. A Modified Bootscan
346 Algorithm for Automated Identification of Recombinant Sequences and Recombination
347 Breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:98–102.
- 348 22. Smith JM. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 1992;34:126–
349 129.
- 350 23. Posada D, Crandall KA. Evaluation of methods for detecting recombination
351 from DNA sequences: Computer simulations. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:13757–
352 13762.
- 353 24. J Gibbs M, S Armstrong J, Gibbs A. Sister-Scanning: A Monte Carlo procedure
354 for assessing signals in recombinant sequences. 2000. Epub ahead of print 1 August
355 2000. DOI: 10.1093/bioinformatics/16.7.573.
- 356 25. Boni MF, Posada D, Feldman MW. An Exact Nonparametric Method for
357 Inferring Mosaic Structure in Sequence Triplets. *Genetics* 2007;176:1035–1047.
- 358 26. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by
359 sampling trees. *BMC Evol Biol* 2007;7:1–8.
- 360 27. Pybus OG, Thézé J. Hepacivirus cross-species transmission and the origins of
361 the hepatitis C virus. *Curr Opin Virol* 2016;16:1–7.
- 362 28. AJ RAD. Tracer v1.4. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (2017).
- 363 29. Simon-Loriere E, Holmes EC. Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev*
364 *Microbiol* 2011;9:617–626.
- 365 30. Hedskog C, Doehle B, Chodavarapu K, Gontcharova V, Crespo Garcia J, et al.
366 Characterization of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strains and associated
367 virological response to sofosbuvir/ribavirin. *Hepatology* 2015;61:471–480.
- 368 31. Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnus LO. A Natural Intergenotypic
369 Recombinant of Hepatitis C Virus Identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002;76:4034–
370 4043.
- 371 32. Echeverría N, Moratorio G, Cristina J, Moreno P. Hepatitis C virus genetic
372 variability and evolution. *World J Hepatol* 2015;7:831–845.
- 373 33. Voisset C, Dubuisson J. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins.
374 *Biol Cell* 2004;96:413.

- 375 34. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. HCV Genome and Life Cycle. In: Hepatitis C
376 Viruses: Genomes and Molecular Biology. p. 1–47.
- 377 35. Brasileira E. Modernização e produtividade da agropecuária no Brasil. 2018.
- 378 36. Linhares MYL. Pecuária, alimentos e sistemas agrários no Brasil (séculos XVII
379 e XVIII). In: Tempo (RJ). pp. 132–150.
- 380
- 381

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O estudo de HEV em suínos de subsistência do Rio Grande do Sul mostrou que esses animais representam uma importante fonte de infecção deste vírus para humanos. Isso se deve a alta proporção de animais com anticorpos anti-HEV nas amostras e na detecção de HEV-RNA. A caracterização através do sequenciamento de duas regiões parciais do genoma mostrou a presença de três subtipos diferentes com alta similaridade com sequencias de HEV isoladas de humanos. O estudo alerta para a necessidade monitoramento da circulação de HEV no RS.
- O estudo de Hepacivírus bovino (HNV) mostrou a circulação deste vírus em bovinos do Nordeste Brasileiro. A caracterização de dois genomas completos mostrou que os HNV detectados nesse estudo apresentam uma maior similaridade aos HNVs Europeus quando comparados com os de Ghana. Além disso, nós propusemos uma classificação a nível de genótipo e subtipo, mostrando que todos os HNVs devem pertencer a um único genótipo, proposto como “Genótipo” e quatro subtipos (A-D). Uma análise filogenética por inferência Bayesiana e análise de tempo de divergência por datação molecular dos subtipos propostos foi realizada, mostrando uma origem em comum entre os HNVs Brasileiros e Europeus, e uma circulação mais antiga de HNV no continente Africano. O ancestral comum que originou os HNVs da Alemanha e do Brasil foi datado no século XVIII, uma época marcada pelo Ciclo Colonial da cana-de-açúcar, caracterizado pela grande entrada de bovinos europeus no Nordeste Brasileiro, com o objetivo de auxiliar no plantio e colheita da cana. O estudo forneceu informações importantes sobre o banco de dados de HVs e expandiram os conhecimentos relativos à variabilidade genética do HNV.

REFERÊNCIAS

- ADJEI, A. A. et al. Unexpected elevated alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase levels and hepatitis E virus infection among persons who work with pigs in accra, ghana. **Virology Journal**, [s. l.], v. 7, n. 336, p. 1–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995795/>>
- AFRICA, E. et al. Hepatitis E Virus Infection in Dromedaries, North and East Africa, United Arab Emirates, and Pakistan, 1983–2015. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1249–1252, 2016.
- AHMAD, I.; HOLLA, R. P.; JAMEEL, S. Molecular virology of hepatitis E virus. **Virus Research**, [s. l.], v. 161, n. 1, p. 47–58, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170211000621>>
- AMIT, K. et al. Identification of Rodent Homologs of Hepatitis C Virus and Pegiviruses. **mBio**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.00216-13>>
- BAECHLEIN, C. et al. Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. **Journal of virology**, [s. l.], v. 89, n. 14, p. 7007–15, 2015.
- BARNAUD, E. et al. Thermal Inactivation of Infectious Hepatitis E Virus in Experimentally. **Applied Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 15, p. 5153–59, 2012.
- BARTOLO, I. Di et al. Hepatitis E Virus in Pork Production Chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. **Emerging Infectious Disease journal**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1282, 2012.
- BATTS, W. et al. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). **Virus Research**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 116–123, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170211001122>>
- BAZERBACHI, F. et al. Extra-hepatic manifestations associated with hepatitis E virus infection : a comprehensive review of the literature. **Gastroenterology Report**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–15, 2016.
- BENDALL, R. et al. A Comparison of Two Commercially Available Anti-HEV IgG Kits and a Re-Evaluation of Anti-HEY IgG Seroprevalence Data in Developed Countries. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 82, p. 799–805, 2010.
- BERTAGNOLI, S. et al. Wildlife Reservoir for Hepatitis E Virus, Southwestern France Sebastien. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 7–9, 2015.
- BERTO, A. et al. Hepatitis E Virus in Pork Food Chain, United Kingdom, 2009–2010. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1358, 2012. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/8/11-1647>>
- BEXFIELD, N. H. et al. Canine hepacivirus is not associated with chronic liver disease in dogs. **Journal of Viral Hepatitis**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 223–228, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4079338/>>
- BILLERBECK, E. et al. Animal Models for Hepatitis C. In: BARTENSCHLAGER, R. (Ed.). **Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 49–86.
- BLACKSELL, S. D. et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in pigs: implications for human infections in village-based subsistence pig farming in the Lao PDR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 101, n. 3, p. 305–307, 2007.
- BOUWKNEGT, M. et al. Hepatitis E Virus RNA in Commercial Porcine Livers in The Netherlands. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 70, n. 12, p. 2889–95, 2007.

BOUWKNEGT, M. et al. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 1–12, 2009.

BRASSARD, J. et al. Detection of Human Food-Borne and Zoonotic Viruses on Irrigated, Field-Grown Strawberries Julie. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 10, p. 3763–66, 2012.

BUKH, J. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. **Hepatology**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 1469–75, 2004.

BUKH, J. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 142, n. 6, p. 1279–87, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.016>>

BURBELO, P. D. et al. Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. **Journal of Virology**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 86, n. 11, p. 6171–6178, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3372197/>>

BURT, S. A. et al. Hepatitis E Virus in Farmed Rabbits , Wild Rabbits and Petting Farm Rabbits in the Netherlands. **Food and Environmental Virology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 227–229, 2016.

CANAL, C. W. et al. A Novel Genetic Group of Bovine Hepacivirus in Archival Serum Samples from Brazilian Cattle. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2017, p. 1–4, 2017.

CAO, D.; MENG, X. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 451–464, 2012.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J.-M. **HCV Genome and Life Cycle**. Norfolk: Horizon Bioscience, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1630/>>

CHUA, K. B. et al. Nipah Virus: A Recently Emergent Deadly Paramyxovirus. **Science**, [s. l.], v. 26, n. 288, p. 1432–35., 2000. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/288/5470/1432.abstract>>

CLAYSON, E. T. et al. Detection of Hepatitis E Virus Infections among Domestic Swine in the Kathmandu Valley of Nepal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 228–232, 1995. a.

CLAYSON, E. T. et al. Viremia, Fecal Shedding, and IgM and IgG Responses in Patients with Hepatitis E. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 172, n. 4, p. 927–933, 1995. b.

CORMAN, V. M. et al. Highly divergent hepaciviruses from African cattle. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 89, n. 11, p. 5876–5882, 2015.

COSSABOOM, C. M. et al. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 93, n. 8, p. 1687–1695, 2012. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.041509-0>>

DALTON, H. R. et al. Hepatitis E Virus: Time to Change the Textbooks. **Digestive Diseases**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 308–16, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/27170383/?i=1&from=guillain_barre_hepatitis%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27170383>

DALTON, H. R. et al. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 698–709, 2018.

DE DEUS, N. et al. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions.

Veterinary Microbiology, [s. l.], v. 119, n. 2–4, p. 105–114, 2007.

DE DEUS, N. et al. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 132, n. 1–2, p. 19–28, 2008.

DE NIET, A. et al. Chronic hepatitis E after solid organ transplantation. **Netherlands Journal of Medicine**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 261–66, 2012.

DEBES, J. D. et al. Hepatitis E virus infection in the HIV-positive patient. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 80, p. 102–6, 2016.

DOCEUL, V. et al. Zoonotic hepatitis E virus: Classification, animal reservoirs and transmission routes. **Viruses**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1–24, 2016.

DOS SANTOS, D. R. L. et al. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 182, n. 3, p. 474–80, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.08.001>>

DREXLER, J. F. et al. Bats Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus within the Family Hepeviridae. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 86, n. 17, p. 9134–47, 2012. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00800-12>>

DUQUE, V. et al. First report of acute autochthonous hepatitis E in Portugal. **Journal of Infection in Developing Countries**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 201–3, 2012.

ELIA, G. et al. Identification and genetic characterization of equine hepaciviruses in Italy. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 207, p. 239–47, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.004>>

EMERSON, S.; PURCELL, R. Hepatitis E virus. In: KNIFE, D. et al. (Eds.). **Fields Virology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 3047–3058.

EMERSON, S. U.; ARANKALLE, V. A.; PURCELL, R. H. Thermal Stability of Hepatitis E Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 192, n. 5, p. 930–33, 2018.

FEAGINS, A. R. et al. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 912–17, 2007.

FEAGINS, A. R. et al. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 80, n. 8, p. 1379–1386, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21223>>

GAO, F. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. **Nature**, [s. l.], v. 397, p. 436–441, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/17130>>

GARDINALI, N. R. et al. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 107, n. 7, p. 935–39, 2012.

GARDINALI, N. R. et al. Cynomolgus monkeys are successfully and persistently infected with hepatitis E virus genotype 3 (HEV-3) after long-term immunosuppressive therapy. **PLoS ONE**, San Francisco, CA USA, v. 12, n. 3, p. e0174070, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5362194/>>

GAREIS, D. H. M.; EIDEN, M. H. G. M. Hepatitis E virus in wild rabbits and European brown hares in Germany. **Zoonoses Public Health**, [s. l.], v. 64, p. 1–11, 2017.

GÉROLAMI, R.; MOAL, V.; COLSON, P. Chronic Hepatitis E with Cirrhosis in a Kidney-Transplant Recipient. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 358, n. 8, p. 859–60, 2008.

GOTTWEIN, J. M.; BUKH, J. B. T.-A. in V. R. Cutting the Gordian Knot-Development and Biological Relevance of Hepatitis C Virus Cell Culture Systems. **Advances in Virus Research**, [s. l.], v. 71, p. 51–133, 2008. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006535270800002X>>

GROUP, V. et al. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 451–64, 2008.

GURLEY, E. S. et al. Outbreak of Hepatitis E in Urban Bangladesh Resulting in Maternal and Perinatal Mortality. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 658–65, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4130310/>>

GUTHMANN, J.-P. et al. A Large Outbreak of Hepatitis E among a Displaced Population in Darfur, Sudan, 2004: The Role of Water Treatment Methods. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 1685–91, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/504321>>

HANAFIAH, K. M. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 1333–1342, 2013. Disponível em: <<http://https://doi.org/10.1002/hep.26141>>

HAQSHENAS, G. et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis–splenomegaly syndrome in the United States. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 82, n. 10, p. 2449–62, 2001. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-82-10-2449>>

HARTLAGE, A. S.; CULLEN, J. M.; KAPOOR, A. The Strange, Expanding World of Animal Hepaciviruses. **Annual Review of Virology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 53–75, 2016. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-100114-055104>>

HELDT, F. H. et al. Hepatitis E Virus in Surface Water , Sediments , and Pork Products Marketed in Southern Brazil. **Food and Environmental Virology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 200–5, 2016.

HEWITT, P. E. et al. Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. **The Lancet**, [s. l.], v. 384, n. 9956, p. 1766–73, 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61034-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61034-5)>

HU, M. X. Detection and sequences analysis of bovine hepatitis E virus RNA in Xinjiang Autonomous Region. **Chinese Journal of Virology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 27–32., 2010.

HUANG, F. et al. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. **Hepatology**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 350–359, 2016.

HUANG, F. F. et al. Detection by Reverse Transcription-PCR and Genetic Characterization of Field Isolates of Swine Hepatitis E Virus from Pigs in Different Geographic Regions of the United States. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 1326–32, 2002.

HUANG, S. et al. Profile of Acute Infectious Markers in Sporadic Hepatitis E. **PLoS one**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 1–7, 2010.

HUSSAIN, Z. Genomic Heterogeneity of Hepatitis Viruses (A-E): Role in Clinical Implications and Treatment. In: SERVIDDIO, G. B. T.-P. M. of C. V. H. (Ed.). Rijeka: InTech, 2013. p. Ch. 02.

IACONELLI, M. et al. Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy. **Food and Environmental Virology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 316–324, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12560-015-9207-3>>

IVANOVA, A. et al. Hepatitis E Virus in Domestic Pigs, Wild Boars, Pig Farm Workers, and Hunters in Estonia. **Food and Environmental Virology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p.

403–412, 2015.

JILANI, N. et al. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. **Journal of gastroenterology and hepatology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 676–82, 2007.

KAMAR, N. et al. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 358, n. 8, p. 811–817, 2008.

KAMAR, N. et al. Hepatitis E Virus and Neurologic Disorders. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 173–179, 2011.

KAMAR, N. et al. Hepatitis e. **The Lancet**, [s. l.], v. 379, n. 9835, p. 2477–2488, 2012.

KAMAR, N. et al. Factors Associated With Chronic Hepatitis in Patients With Hepatitis E Virus Infection Who Have Received Solid Organ Transplants. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 140, n. 5, p. 1481–1489, 2018.

KHURROO, M. S. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A non-B type. **Am J Med**, [s. l.], v. 80, p. 818, 1980.

KHURROO, M. S.; KAMALI, S.; JAMEEL, S. Vertical transmission of hepatitis E virus. **The Lancet**, [s. l.], v. 345, n. 8956, p. 1025–1026, 2018.

KOLYKHALOV, A. A. et al. Transmission of Hepatitis C by Intrahepatic Inoculation with Transcribed RNA. **Science**, [s. l.], v. 277, n. 5325, p. 570 LP-574, 1997. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/277/5325/570.abstract>>

KUKIELKA, D. et al. Constant Hepatitis E Virus (HEV) Circulation in Wild Boar and Red Deer in Spain: An Increasing Concern Source of HEV Zoonotic Transmission. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. e360–e368, 2016.

LANGE, H. et al. Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 3, p. 1–6, 2016. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0950268816002144>

LAPA, D.; CAPOBIANCHI, M. R.; GARBUGLIA, A. R. Epidemiology of hepatitis E virus in European countries. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 25711–25743, 2015.

LAUCK, M. et al. A Novel Hepacivirus with an Unusually Long and Intrinsically Disordered NS5A Protein in a Wild Old World Primate. **Journal of Virology**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 87, n. 16, p. 8971–8981, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3754081/>>

LEE, Y. H. et al. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 179, n. 3, p. 417–421, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307003759>>

LEGRAND-ABRAVANEL, F. et al. Hepatitis E Virus Genotype 3 Diversity, France Florence. [s. l.], v. 15, n. 1, 2009.

LEGRAND-ABRAVANEL, F. et al. Hepatitis E Virus Infection without Reactivation in Solid-Organ Transplant Recipients, France. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 30–37, 2011.

LI, W. et al. Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in Yunnan Province, China. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 156, n. 11, p. 1989–1995, 2011.

LI, W. et al. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 165, n. 3, p. 275–280, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113513001879>>

LIU, X. et al. Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis E virus in household-raised pig population in the Philippines. **BMC veterinary research**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 11, 2015.

LOPES DOS SANTOS, D. R. et al. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 276–279, 2010.

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

LUKASHEV, A. N. et al. Evidence for Novel Hepaciviruses in Rodents. [s. l.], v. 9, n. 6, 2013.

LYONS, S. et al. Nonprimate Hepaciviruses in Domestic Horses , United Kingdom. [s. l.], v. 18, n. 12, 2012.

MAKUWA, M. et al. Occurrence of hepatitis viruses in wild-born non-human primates: a 3 year (1998–2001) epidemiological survey in Gabon. **Journal of Medical Primatology**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 307–314, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1600-0684.2003.00042.x>>

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

MANSUY, J. M. et al. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 419–424, 2004.

MARTÍNEZ WASSAF, M. G. et al. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 334–339, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.016>>

MAUNULA, L. et al. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 177–185, 2013.

MCCREARY, C. et al. Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 163, n. 9, p. 261–265, 2008. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/163/9/261>>

MCGIVERN, D. R.; LEMON, S. M. Model systems for hepatitis C research: The cup half empty? **Gastroenterology**, [s. l.], v. 141, n. 3, p. 806–809, 2011.

MED, I. et al. Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus from Raw Pork Liver Sausage , France. [s. l.], v. 20, n. 11, p. 2010–2012, 2014.

MENG, X.-J. et al. Genetic and Experimental Evidence for Cross-Species Infection by Swine Hepatitis E Virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 72, n. 12, p. 9714–9721, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC110481/>>

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

MENG, X. J. et al. Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Veterinarians Working with Swine and in Normal Blood Donors in the United States and Other Countries. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 117–122, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120098/>>

MESQUITA, J. R. et al. Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Spain. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 58, p. 13–15, 2016.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. [s. l.], v. 5, p. 453–463, 2007.

MYINT, K. S. A. et al. EVALUATION OF A NEW RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR SERODIAGNOSIS OF ACUTE HEPATITIS E INFECTION. [s. l.], v. 73, n. 5, p. 942–946, 2005.

MYINT, K. S. A.; GIBBONS, R. V. Hepatitis E: a neglected threat. **Transactions of**

- the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 211–212, 2008.
- NAKAI, I. et al. Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 1171–1177, 2006.
- NANTEL-FORTIER, N. et al. Detection and Phylogenetic Analysis of the Hepatitis E Virus in a Canadian Swine Production Network. **Food Environ Virol**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 296–304, 2016.
- OKAMOTO, H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. **Virus Research**, [s. l.], v. 127, n. 2, p. 216–228, 2007.
- OLIVER G. PYBUS & REBECCA R. GRAY T. The virus whose family expanded. **Nature**, [s. l.], v. 498, p. 11–12, 2013.
- OLSEN, R. N. et al. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. [s. l.], n. August 2005, p. 1–4, 2006.
- PANDOLFI, R. et al. In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti- hepatitis E virus amongst blood donors in south Brazil. [s. l.], p. 1–12, 2017.
- PASSOS-CASTILHO, A. M. et al. High prevalence of hepatitis E virus antibodies among blood donors in Southern Brazil. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 361–364, 2016.
- PASSOS-CASTILHO, A. M. et al. High prevalence of hepatitis E virus antibodies in Sao Paulo, Southeastern Brazil: analysis of a group of blood donors representative of the general population. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 535–539, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867017301885>>
- PASSOS-CASTILHO, A. M.; GRANATO, C. F. H. High frequency of hepatitis E virus infection in swine from South Brazil and close similarity to human HEV isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], n. 2016, p. 1–7, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216303495>>
- PAVIO, N. et al. Frequent Hepatitis E Virus Contamination in Food Containing Raw Pork Liver, France. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 10–12, 2014.
- PAVIO, N.; MENG, X. J.; DOCEUL, V. Zoonotic origin of hepatitis e. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 10, p. 34–41, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.006>>
- PEI, Y.; YOO, D. Genetic Characterization and Sequence Heterogeneity of a Canadian Isolate of Swine Hepatitis E Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 4021–4029, 2002.
- PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 5–19, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/hep.20032>>
- PERALTA, B. et al. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 31–36, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350800583X>>
- PFAENDER, S. et al. Clinical course of infection and viral tissue tropism of hepatitis C virus-like nonprimate hepaciviruses in horses. **Hepatology**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 447–459, 2015. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/hep.27440>>
- PFAENDER, S. et al. Assessment of cross-species transmission of hepatitis C virus-related non-primate hepacivirus in a population of humans at high risk of exposure. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 96, n. 9, p. 2636–2642, 2015. b.
- POEL, W. H. M. Van Der et al. Hepatitis E Virus Sequences in Swine Related to Sequences in Humans , the Netherlands. [s. l.], v. 7, n. 6, p. 970–976, 2001.

POETA, A. P. S. et al. Panorama da suinocultura no Rio Grande do Sul. **Departamento de Defesa e Agropecuária**, [s. l.], v. 33, n. 199, p. 1–16, 2014. Disponível em:

<http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/conteudo/6918/?Caracteriza%20o_da_Suinocultura>

PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 494–503, 2008.

PYBUS, O. G. et al. Investigating the endemic transmission of the hepatitis C virus. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 839–849, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907001324>>

PYBUS, O. G.; THÉZÉ, J. Hepacivirus cross-species transmission and the origins of the hepatitis C virus. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 16, p. 1–7, 2016.

QUAN, P. et al. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. **PNAS**, [s. l.], p. 3–8, 2012.

RAMSAY, J. D. et al. Experimental transmission of equine hepacivirus in horses as a model for hepatitis C virus. **Hepatology**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 1533–1546, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/hep.27689>>

REIN, D. B. et al. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. **Hepatology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 988–997, 2012.

RENOU, C. et al. Possible Zoonotic Transmission of Hepatitis E from Pet Pig to Its Owner. [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1094–1096, 2007.

RESERVOIRS, A.; ROUTES, T. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. **Viruses**, [s. l.], v. 8, n. 270, p. 1–24, 2016.

REYES, A. W. T. M. S. M. E. G. C.-C. H. D. W. B. K. E. F. G. R. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. **In Virology**, [s. l.], v. 185, n. 1, p. 120–131, 1991.

RICCI, A. et al. Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. [s. l.], v. 15, n. June, 2017.

RIVEIRO-BARCIELA, M. et al. Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. **Journal of clinical gastroenterology**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 165–8, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637729>>

RIVERO-JUAREZ, A. et al. Isolation of Hepatitis E Virus From Breast Milk During Acute Infection. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 62, n. 11, p. 1464, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw186>>

RUTJES, S. A. et al. Sources of Hepatitis E Virus Genotype 3 in the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 381–387, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2681103/>>

SAID, B. et al. Hepatitis E Outbreak on Cruise Ship. [s. l.], v. 15, n. 11, 2009.

SCHEEL, T. K. H. et al. Surveying the global virome: Identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses Troels. **Anti viral Res.**, [s. l.], v. 115, p. 83–93, 2016.

SHALIMAR; ACHARYA, S. K. Hepatitis E and Acute Liver Failure in Pregnancy. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 213–224, 2013.

SHARP, P. M.; RAYNER, J. C.; HAHN, B. H. Evolution. Great apes and zoonoses. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 340, n. 6130, p. 284–6, 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84876331896&partnerID=tZotx3y1>>

SIMMONDS, P. The Origin of Hepatitis C Virus BT - Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. In: BARTENSCHLAGER, R. (Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 1–15.

SIMMONDS, P. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **The Journal of General Virology**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017. a.

SIMMONDS, P. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **The Journal of General Virology**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5370391/>>

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

SMITH, D. B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 318–327, 2014. b.

SMITH, D. B. et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 97, n. 11, p. 2894–2907, 2016. a.

SMITH, D. B. et al. Proposed reference sequences for hepatitis E Virus subtypes. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 537–542, 2016. b.

SMITH, D. B. et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 97, n. 11, p. 2894–2907, 2016. c.

SMITH, D. B.; PURDY, M. A.; SIMMONDS, P. Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. **Journal of virology**, [s. l.], v. 87, n. 8, p. 4161–9, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3624379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

SONG, Y.-J. et al. Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 583–591, 2010.

SOOD, A.; MIDHA, V.; SOOD, N. Guillain-Barré syndrome with acute hepatitis E. **American Journal Of Gastroenterology**, [s. l.], v. 95, p. 3667, 2000.

SULTAN KHUROO, M. et al. Hepatitis E and long-term antibody status. **The Lancet**, [s. l.], v. 341, n. 8856, p. 1355, 2018.

SZABO, K. et al. Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 215, p. 149–156, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.013>>

TAKAHASHI, M. et al. Hepatitis e virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: Characterization of HEV virions in blood circulation. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 1112–1125, 2010.

TEI, S. et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. **The Lancet**, [s. l.], v. 362, n. 9381, p. 371–373, 2003.

TEO, C. G. Much meat , much malady : changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. **European Society of Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 24–32, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03111.x>>

TSAI, H.; STUDY, T. Avian hepatitis E virus in chickens, Taiwan, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 2013–15, 2014.

VAN BOHEEMEN, S. et al. Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans. **mBio**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 3, n. 6, p. e00473-12, 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3509437/>>

VASCONCELOS, J. et al. Molecular detection of hepatitis E virus in feces and slurry from swine farms , Rio Grande do Sul , Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 1–8, 2015.

VILLALBA, M. de la C. M. et al. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Cuba. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 14, n. Supplement C, p. 335–339, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813000075>>

VINA-RODRIGUEZ, A. et al. Hepatitis E virus genotype 3 diversity: Phylogenetic analysis and presence of subtype 3b in wild boar in Europe. **Viruses**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 2704–2726, 2015.

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

VIVEK, R. et al. Characterization of hepatitis E virus from sporadic hepatitis cases and sewage samples from Vellore, south India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 107, n. 6, p. 363–367, 2013.

VON SCHAEWEN, M.; PLOSS, A. Murine models of hepatitis C: What can we look forward to? **Antiviral research**, [s. l.], v. 104, p. 15–22, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4068254/>>

WILLIAMS, T. P. E. et al. Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model. **Journal of Clinical Microbiology** , [s. l.], v. 39, n. 9, p. 3040–3046, 2001. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/39/9/3040.abstract>>

YAN, B. et al. Hepatitis E Virus in Yellow Cattle, Shandong, Eastern China. **Emerging Infectious Disease journal**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 2211, 2016. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/12/16-0641>>

YANAGI, M. et al. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. **Medical Sciences**, [s. l.], v. 94, n. 16, p. 8738–8743, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23104/pdf/pq008738.pdf%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

YAP, P. L. et al. The origin of hepatitis C virus genotypes. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 321–328, 1997. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-78-2-321>>

YIN, X.; LI, X.; FENG, Z. Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. [s. l.], p. 1–8, 2016.

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