

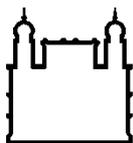
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DO VIRUS
HEPATITE A EM PACIENTES ATENDIDOS ENTRE 2013 E 2019
NO AMBULATÓRIO DE HEPATITES VIRAIS DO INSTITUTO
OSWALDO CRUZ, FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO

VINICIUS DA MOTTA DE MELLO

Rio de Janeiro
Abril de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Vinicius da Motta de Mello

Análise Epidemiológica e Molecular do vírus Hepatite A em Pacientes Atendidos entre 2013 a 2019 no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadoras: Profa. Dra. Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues
Profa. Dra. Barbara Vieira do Lago

RIO DE JANEIRO

Abril de 2020

de Mello, Vinicius da Motta.

Análise Epidemiológica e Molecular do vírus Hepatite A em Pacientes Atendidos entre 2013 a 2019 no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro / Vinicius da Motta de Mello. - Rio de Janeiro, 2020.

121 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2020.

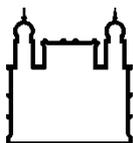
Orientadora: Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues.

Co-orientadora: Barbara Vieira do Lago.

Bibliografia: f. 77-94

1. Hepatite A. 2. Epidemiologia. 3. Epidemiologia Molecular. 4. Filogeografia. 5. Rio de Janeiro. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: VINICIUS DA MOTTA DE MELLO

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DO VIRUS HEPATITE A EM
PACIENTES ATENDIDOS ENTRE 2013 E 2019 NO AMBULATÓRIO DE
HEPATITES VIRAIS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, FIOCRUZ, RIO DE
JANEIRO**

**ORIENTADORAS: Profa. Dra. Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues
Profa. Dra. Barbara Vieira do Lago**

Aprovada em: 29/04/2020

EXAMINADORES:

**Prof. Dra. Luciane Almeida Amado Leon – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ -
Presidente**

Prof. Dra. Caroline Cordeiro Soares – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ - Titular

Prof. Dra. Tatiana Xavier de Castro – Universidade Federal Fluminense, RJ - Titular

Prof. Dra. Natalia Motta Araújo – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ - Suplente

**Prof. Dra. Noemi Rovaris Gardinali - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-
Manguinhos/Fiocruz, RJ - Suplente**

Rio de Janeiro, 29 de abril de 2020

Ao único digno de ser, D-s.

AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço pela graça alcançada, por ter me dado forças para superar desafios e por ter colocado pessoas maravilhosas nessa jornada para me apoiar.

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES sob o código de financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ sob o código de financiamento E-26/201.815/2019, agradeço pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IOC, em especial, as coordenadoras Dra Martha Murthis e Dra Vanessa de Paula. Agradeço também a secretária do programa Livia Mangeon, que sempre se põe a disposição para nos ajudar e tirar dúvidas.

Agradeço a todas as componentes da minha banca, todas vocês, mulheres, cientistas, que dispuseram um pouco do seu tempo para me avaliar e compartilhar seus conhecimentos com meu trabalho.

À minha orientadora Dra Lia Lewis-Ximenez, por todos os ensinamentos tantos de vida quanto profissionais e científicos. Agradeço por ter me guiado nesse mestrado com todo carinho e atenção, um dia quero ser um pesquisador tão bom e humano quanto você.

À minha orientadora Dra Barbara Lago, por me aturar durante esses dois anos (risos). Obrigado por ser mais que uma orientadora, você se tornou uma grande amiga. Agradeço a você por todos os ensinamentos aprendidos juntos, sabemos que foi uma troca, uma via de mão dupla onde ambos aprendemos nessa jornada. Você é uma das pessoas mais espiritualizadas e humanas que eu conheço.

À toda equipe do Ambulatório de Hepatite Virais onde fiz amigos e aprendi muito, em especial a recepcionista Luciana Santos, por me auxiliar com os prontuários. À equipe médica, que colaborou com o recrutamento dos pacientes, em especial a Laura Pinto, Caroline Baldin, Fernanda Couto, Louise Verdolin e Ludmila.

Não posso esquecer de agradecer a todos os pacientes que fazem parte desse estudo, que se disponibilizaram a doar sua amostra e seus dados para contribuir para

o conhecimento de construção de informação da saúde brasileira, mesmo em seu momento de doença e vulnerabilidade. Aprendi a ser mais humanos com cada um.

À toda equipe do Laboratório de Hepatites Virais, que me acolheram como uma família, por toda troca de aprendizagem e conhecimento científico. Obrigado a Dra Livia Villar, atual chefe e a Dra Elizabeth Lampe chefe anterior, obrigado pelo apoio. Em especial agradeço às amigas que fiz, Ana Carolina Mendonça, Vanessa Duarte e Tairine Monteiro.

Às minhas turmas de mestrado, no qual fiz amizades nesses dois anos eu agradeço muito. Especialmente da turma 2018, a Pamela Mosquera e Rafaela Miranda, por terem se tornado grandes amigas. Além dos demais as três Carolinas, Marcelo, Fernanda, Leandro. A turma 2019, que fiz algumas muitas disciplinas, no qual agradeço em especial a Anne Aline, Amanda e Ana Carolina por toda amizade e também aos demais.

À Msc. Nathalia Alves, doutoranda do Laboratório de Virologia Molecular, por ter colaborado integralmente nesse trabalho, auxiliando nas análises estatísticas.

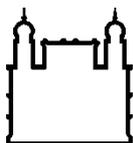
Agradeço agora, a duas pessoas que são muito mais que colegas de trabalho e se tornaram minha família. A Juliana Melgaço, por sempre puxar minha orelha com amor e me ensinar muito tanto pessoalmente quanto profissionalmente. Ao Paulo, o que dizer de você, dizer que o amor seria pouco, você é uma pessoa muito importante na minha jornada científica e na minha jornada de vida. Obrigado por ser meu parceiro, amigo, companheiro, por aturar meus choros, minhas reclamações, meus surtos (risos). Obrigado por estar do meu lado me apoiando sempre meu amor.

“Quando você tem pessoas despreparadas que assumem o poder, elas se sentem inferiorizadas diante dos que têm cultura, dos cientistas, dos intelectuais. Então elas perseguem”

Drauzio Varella, 2020

*“A ciência produz conhecimento...
...O conhecimento destrói mitos.”*

Tirinha Assembleia USFC - Alexandre Beck
viii



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

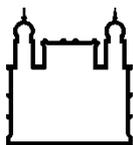
ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DO VIRUS HEPATITE A EM PACIENTES ATENDIDOS ENTRE 2013 A 2019 NO AMBULATÓRIO DE HEPATITES VIRAIS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Vinicius da Motta de Mello

Ao longo dos anos vem se observando um declínio do número de casos de infecção pelo vírus da hepatite A (HAV) em crianças, relacionado ao investimento nos programas de vacinação e a melhorias sanitárias. Porém, nota-se a mudança desse perfil de infecção, onde indivíduos jovens/adultos vêm sendo mais acometidos. Apesar do vírus ser transmitido principalmente pelo consumo de água e alimentos contaminados, diversos surtos têm ocorrido ao redor do mundo em adultos e sendo relacionados a práticas sexuais. Em nosso país, um aumento no número de casos nos últimos três anos foi observado após um período de declínio de notificações. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os comportamentos de risco e os aspectos moleculares associados à transmissão do HAV em indivíduos atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, entre os anos de 2017 e 2019. Para tal, foram coletadas amostras de soro e informações socioepidemiológicas de 52 pacientes com anti-HAV IgM reagente, que chegaram ao ambulatório. Posteriormente, essas amostras tiveram o genoma viral extraído e analisado através da técnica de RT-PCR. Após detecção, o RNA foi sequenciado e analisado filogeneticamente. Em seguida, foram realizadas análises filogeográficas para obter a rota de dispersão e período de introdução das estirpes virais no país. Com a análise dos dados dos prontuários, observou-se que 78,9% (41/52) pacientes eram do sexo masculino, nas faixas etárias 20 a 29 anos (n=24/52) e de 30 a 39 anos (n=20/52) com média 32,1 anos, sendo 63,5% (n=33) dele(a)s homens/mulheres que fazem sexo com homens/mulheres (HSH/MSM), e 89,9% eram residentes na região norte da cidade do Rio de Janeiro. Observou-se uma baixa frequência de exposição a fatores hídricos, alimentares e parenterais na população estudada, sendo 42,3%, 42,3%, 34,7%, respectivamente. Já algumas práticas sexuais apresentaram elevada frequência, destacando o sexo oral (75%) e sexo anal (65,3%). Através das análises filogenéticas, foi identificado um único subgenótipo IA da população estudada. Quatro clados deste subgenótipo foram formados, dos quais, três agruparam-se as sequências dos estirpes virais provenientes de surtos Europeus/Asiáticos, e um clado, formado por estirpes virais previamente circulantes no Brasil. Através da filogeografia, foi possível inferir o ano e país de introdução, além da data de origem das estirpes virais no Brasil. A estirpe VRD_521_2016 foi possivelmente introduzida entre 2016-2017 pela Espanha com provável origem em 2013, a RIVM-HAV16-090 europeia/asiática e V16-25801, possivelmente introduzida pela Alemanha, entre 2014-2015 e 2015-2016 respectivamente, com provável origem em 2000 e 2011. Nossos achados reforçam a necessidade de ampliação do acesso à vacina contra o HAV a grupos adultos de risco e do monitoramento da entrada de novos patógenos no Brasil. Além disso, medidas educativas são úteis para impedir a disseminação do HAV em populações-chave como os HSH.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF THE HEPATITIS A VIRUS IN PATIENTS ATTENDED BETWEEN 2013 TO 2019 AT THE VIRAL HEPATITIS AMBULATORY AT THE OSWALDO CRUZ INSTITUTE, FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Vinicius da Motta de Mello

Over the years, it has been observed that the number of infection cases in children have declined, related to investment in vaccination programs and sanitary improvements. However, there is a change in this infection profile, where young/adults individuals have been more affected. Despite the fact that the virus is transmitted mainly through the consumption of contaminated food and water, several outbreaks have occurred around the world and have been related to sexual practices in adults. In our country, has been observed an increase in the number of cases in the past three years after a period of declining notifications. Thus, the study's aim was to evaluate risk behaviors and molecular aspects associated with the transmission of HAV in individuals attended between 2017 and 2019, at the Viral Hepatitis Ambulatory at Oswaldo Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro. For This, serum samples and socio-epidemiological information from 52 patients with anti-HAV IgM reagent who arrived at the clinic were collected. Subsequently, these samples had the viral genome extracted and were analysed through RT-PCR. After detection, the RNA was sequenced and analysed phylogenetically. After, phylogeographic analysis were realized to obtain the route of dispersal and the period of introduction of viral strains in the country. With medical records data analysis, was observed that 78.9% (41/52) patients were male, in the age groups 20 to 29 years ($n = 24/52$) and 30 to 39 years ($n = 20/52$) with an average of 32.1 years, being 63,5% ($n=33$) their man/woman who have sex with man/woman (MSM/WSW), 89.9% residing in the northern region of the Rio de Janeiro city. It was observed a low frequency of exposure to water, food and parental factors in the studied population, being 42.3%, 42.3%, 34.7%, respectively. Some sexual practices had high frequency, with emphasis on oral sex (75%) and anal sex (65.3%). A low frequency of exposure to water, food and parenteral factors was observed in the studied population, being 42.3%, 42.3%, 34.7%, respectively. Some sexual practices, on the other hand, showed high frequency, highlighting oral sex (75%) and anal sex (65.3%). Through phylogenetic analyzes, a single genotype was identified, the IA subgenotype of the studied population. Four clades of this subgenotype were formed, of which, three clustered the sequences of viral strains from European/Asian outbreaks, and one clade, formed by viral strains previously circulating in Brazil. Through phylogeography, it was possible to infer the year and country of introduction, in addition to the date of origin of viral strains in Brazil. VRD_521_2016 was introduced possibly by Spain between 2016-2017, with probable origin in 2013, RIVM-HAV16-090 European/Asian and V16-25801 strains, possibly by Germany, between 2014-2015 and 2015-2016 respectively, with probable origin in 2000 and 2011. Our findings reinforce the need to expand access to the HAV vaccine to adult groups at risk and to monitor the entry of new pathogens in Brazil. Moreover, education measures are useful to prevent the spread of HAV to key populations like MSM.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Contextualização Histórica	1
1.2 O vírus da Hepatite A	3
1.2.1 Classificação Taxonômica	3
1.2.2 Características físico-químicas das partículas virais	5
1.2.3 Partícula viral: organização genômica e proteômica	5
1.2.4 Variabilidade genética viral: seus genótipos e distribuição mundial	9
1.2.5 Biossíntese Viral	10
1.3 Formas de Transmissão	13
1.4 Patogênese Viral e Manifestações Clínicas	14
1.5 Resposta Imune e marcadores sorológicos	16
1.6 Epidemiologia	18
1.6.1 Prevalência do HAV no Mundo.....	18
1.6.2 Prevalência do HAV no Brasil.....	21
1.7 Diagnóstico	27
1.7.1 Diagnóstico sorológico.....	27
1.7.2 Diagnóstico molecular.....	29
1.8 Prevenção e Controle	30
1.9 Justificativa	33
2 OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo Geral	34
2.2. Objetivos Específicos	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Considerações Éticas	35
3.2. Delineamento do Estudo	35
3.3. População de Estudo, Critérios de Inclusão e Exclusão de Pacientes e Seleção de Amostras de Soro	35
3.4. Coletas dos dados Socioepidemiológicos	36
3.5. Variáveis analisadas no estudo	37
3.5.1. Variáveis sociodemográficas	37

3.5.2.	Fatores de exposição ao vírus da hepatite A.....	37
3.6.	Análises de dados	39
3.7.	Extração de Ácidos Nucléicos Virais.....	39
3.8.	Detecção do Genoma Viral	39
3.9.	Purificação dos Produtos da PCR	40
3.10.	Quantificação dos Produtos Purificados	40
3.11.	Sequenciamento Nucleotídico	41
3.12.	Análises de Variabilidade, Genotipagem, Filogenia e Filogeografia.....	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Descrição dos pacientes	44
4.1.1	Distribuição Caso/ano.....	44
4.1.2	Distribuição caso/semestre.....	44
4.2	Análises das variáveis do estudo	46
4.2.1	Resultados das variáveis sociodemográficas	46
4.2.2	Fatores de exposição ao vírus da hepatite A.....	50
4.3	Resultados das coinfeções e/ou co-deteções	54
4.4	Resultados das análises moleculares	57
4.4.1	Número amostral do estudo.....	57
4.4.2	Detecção do RNA viral.....	59
4.4.3	Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética	59
4.4.4	Análise Filogeográfica por Inferência Bayesiana	66
5	DISCUSSÃO	68
6	PERSPECTIVAS	75
7	CONCLUSÕES	76
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9	ANEXOS	95
9.1	Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) 95	95
9.2	Protocolo One-Step RT-PCR e Semi-nested PCR (REGIÃO VP1/2A – HAV).....	98
9.3	Sequências de referência utilizadas no estudo	99
9.4	Artigo publicado	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A	4
Figura 1.2. Estrutura geral do HAV.....	6
Figura 1.3. Organização do genoma do HAV e processamento da poliproteína.....	7
Figura 1.4. Esquema do capsídeo viral maduro	8
Figura 1.5. Classificação do genótipo HAV.	9
Figura 1.6. Representação esquemática replicação do HAV no interior da célula hepática.....	12
Figura 1.7. Mapa de distribuição geográfica mundial da infecção pelo HAV	21
Figura 1.8. Padrão epidemiológico da hepatite A no Brasil de acordo com seus níveis de endemicidade nas macro-regiões brasileiras	23
Figura 1.9. Cinética virológica, sorológica e bioquímica durante a infecção causada pelo HAV	28
Figura 1.10. Forma farmacêutica, apresentação e composição da vacina contra hepatite A	31
Figura 4.1. Mapa de distribuição de casos de HAV (anti-IgM reagente) segundo bairro/zona geográfica de residência dos pacientes atendidos no AHV.....	49
Figura 4.2. Árvore filogenética comparativa composta por sequências dos diversos subgenótipos do HAV.....	60
Figura 4.3. Árvore filogenética composta por sequências do genótipo IA	61
Figura 4.4. Mapa da Cidade do Rio de Janeiro com distribuição das estirpes virais encontradas no estudo segundo bairro/zona geográfica.....	65
Figura 4.5. Árvore Bayesiana espaço-temporal do vírus da hepatite A.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Estimativas de prevalência por regiões no mundo, 2005.....	20
Tabela 3.1. Variáveis preditivas sociodemográficas	37
Tabela 3.2. Fatores de exposição à infecção pelo vírus da hepatite A	38
Tabela 4.1. Análise de frequência das características sociodemográficas e epidemiológicas dos pacientes com hepatite A aguda.....	46
Tabela 4.2. Frequências de fatores de exposição parenteral na população estudada	50
Tabela 4.3. Frequências de fatores de exposição alimentar na população estudada	51
Tabela 4.4. Frequências de fatores de exposição hídricos na população estudada.....	52
Tabela 4.5. Frequências de fatores de exposição parenteral na população estudada	53
Tabela 4.6. Frequências à outros fatores de exposição na população estudada	54
Tabela 4.7. Frequência de coinfeções e/ou co-deteções de HAV e outros patógenos.....	56

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1.1. Taxa de incidência de casos notificados de hepatite A segundo faixa etária e ano, 2008 a 2018	22
Gráfico 1.2. Taxa de incidência de casos notificados de hepatite A segundo região de residência e ano de notificação, 2008 a 2018	24
Gráfico 1.3. Taxa de incidência de casos notificados de hepatite A em homens de 20 a 39 anos, segundo região e ano de notificação, 2016 a 2018	24
Gráfico 1.4. Taxas de incidência de hepatite A (por 100.000 habitantes) segundo local e ano da notificação, 2006-2018. A) São Paulo; B) Rio de Janeiro e; C) Rio Grande do Sul	25
Gráfico 1.5. Taxa de incidência de casos notificados de hepatite A em homens de 20 a 39 anos, segundo UF e ano de notificação. Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande de Sul. 2016 a 2018.	26
Gráfico 1.6. Percentual de categoria de exposição dos casos notificados de hepatite A em homens de 20 a 39 anos. Brasil, 2016 a 2017	27
Gráfico 4.1. Distribuição dos casos agudos de HAV atendidos no AHV segundo distribuição mensal.....	45
Gráfico 4.2. Total de número de casos segundo de HAV segundo divisão de faixa etárias entre 2017 e 2019.	47
Gráfico 4.3. Distribuição do número de casos de HAV segundo ano/faixa etária	48
Gráfico 4.4. Número de indivíduos que apresentaram somente uma coinfeção e/ou co-deteção de HAV e outros patógenos segundo sexo.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Paramentos utilizados para análises nos nós internos	43
Quadro 4.1. Distâncias genéticas intra-clado.	62
Quadro 4.2. Distâncias genéticas entre os clados endêmicos (I, II, III) e epidêmicos (IV).	62

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 4.1. Esquematização do N amostral do estudo, de acordo com a detecção de anti-HAV IgM, HAV RNA e sequências obtidas nos períodos de 2013-2015 e 2017-2019.	58
---	----

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 4.1. Diagrama de Venn com os resultados de coinfeções e/ou co-deteções de HAV e outros patógenos (HBVp, HCV, HIV e/ou Sífilis).	55
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
±	mais ou menos
≈	aproximado
µg	microgramas
µl	microlitros
a.C	antes de Cristo
ACIP	do Inglês, <i>Advisory Committee on Immunization Practices</i>
AHV	Ambulatório de Hepatites Virais
anti-HBc IgG	<i>anticorpo contra o antígeno do core classe IgG</i>
anti-HBc IgM	<i>anticorpo contra o antígeno do core classe IgM</i>
anti-IgA	anticorpo contra a Imunoglobulina A
anti-IgG	anticorpo contra a Imunoglobulina G
anti-IgM	anticorpo contra a Imunoglobulina M
CDC	do Inglês, <i>Center of Disease Control</i>
cDNA	do Inglês, <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
eIF4G ou 4G	do Inglês, <i>eukaryotic translation initiation factor</i>
EUA	Estados Unidos da América
GTR	do Inglês, <i>General Time Reversible</i>
HAV	do Inglês, Hepatitis A virus
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
HBV	do Inglês, <i>Hepatitis B virus</i>
HBVa	Hepatite B aguda
HBVp	Hepatite B passada
HCV	do Inglês, <i>Hepatitis C virus</i>
HIV	do Inglês, <i>human immunodeficiency virus</i>
HPD	do Inglês, <i>High posterior density</i>
HSH	homens que fazem sexo com outros homens
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRES	do Ingles, <i>Internal ribosome entry site</i>
IST	infecções sexualmente transmissíveis
Kb	kilobases
KDa	Kilodalton
LACEN-RJ	Laboratório Central de Amostras do Estado do Rio de Janeiro
LAHEP	Laboratorio de Hepatites Virais
MCMC	Cadeia Markov Monte Carlo
mg	microgramas
mL	mililitros
MLE	do Ingles, <i>maximum likelihood estimation</i>
MSM	mulheres que fazem sexo com mulheres
n	numero
NCR	do Ingles, <i>no codificante region</i>
nm	nanômetros
NN	Noel Nutels
NTP	do Ingles, <i>Nucleosídeo-Trifosfate</i>
OMS	Organização Mundial da Saude
ORF	do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
pb	pares de bases
PCR	<i>do Ingles, polimerase reaction chain</i>
pp	do Ingles, <i>posterior probability</i>
RNA	do Inglês, <i>ribonucleic acid</i>
RNA_m	do Ingles, <i>messenger ribonucleic acid</i>
RT-PCR	do Ingles, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TBE	Tris-borate-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
tMRCA	do tempo do ancestral comum mais recente
UTRs	do inglês: <i>untranslated region</i>
VP1	Proteína do capsídeo viral do Ingles, <i>viral protein 1</i>
VP2	Proteína do capsídeo viral do Ingles, <i>viral protein 2</i>
VP3	Proteína do capsídeo viral do Ingles, <i>viral protein 3</i>
VP4	Proteína do capsídeo viral do Ingles, <i>viral protein 4</i>
VPg	do Ingles, <i>virion protein, genome linked</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização Histórica

As hepatites virais são um grupo de doenças infecciosas que afetam centenas de milhões de pessoas em todo o mundo. Essas infecções são consideradas graves problemas de saúde pública mundial. A infecção por alguns desses patógenos, pode causar doenças graves como câncer e/ou cirrose do fígado, além disso, pode levar um indivíduo a óbito, ainda no início do quadro infeccioso, denominada a fase aguda ⁽¹⁾. Dentro deste grupo de doenças infecciosas que acometem o fígado, estão cinco tipos principais de hepatites (A, B, C, D e E) ⁽¹⁻³⁾, tendo eles, características morfológicas distintas e classificações taxonômicas diferentes ⁽⁴⁾.

Embora a doença seja um atual problema de saúde pública, ela possui uma história muito antiga e remota. Informações encontradas em literaturas chinesas, já relatavam a ocorrência de icterícia há mais de cinco mil anos. Outros surtos epidêmicos de icterícia foram evidenciados também na Babilônia há mais de 2.500 anos ^(5, 6).

Hipócrates por sua vez, associou em seus relatos (datados possivelmente de 300 a 400 a.C.) que a icterícia causada nesses indivíduos doentes, provavelmente seria de origem infecciosa e o problema poderia estar no fígado. Algumas manifestações como acúmulo de líquido abdominal, que por sua vez, causava uma doença crônica nesse órgão, fez com que Hipócrates fizesse esta associação. Apesar da doença possuir uma história antiga, o termo hepatite para descrever inflamação do fígado, foi introduzido apenas no século XVIII, em um estudo realizado por Bianchi em 1725 ⁽⁶⁾.

Nas Américas, a história das hepatites virais é considerada um pouco mais recente. Os seus primeiros relatos deram-se durante a guerra da Secessão Norte Americana (1861-1865), onde mais de 40.000 soldados dos exércitos da União foram atingidos ^(5, 6). Já no Brasil, antes do início do século XIX, os relatos sobre a história das hepatites são escassos. Entretanto, uma urna funerária, pertencente ao antigo museu Porto Velho – Rondônia, confeccionada pelos índios Aruak que habitaram a região há mais de 500 anos, revelou do ponto de vista médico alguns sinais e estigmas

de cirrose hepática. Esse seria o primeiro provável registro antropológico sobre uma doença hepática de provável etiologia viral no país ^(5, 6).

A doença teve grandes proporções, principalmente durante as Guerras Mundiais, onde ocorreram diversas pandemias. Devido a superpopulação, às más condições de higiene e de destruição de redes de esgoto nesse período, foram estimados que aproximadamente 15 milhões de pessoas foram infectadas. Dentre estes infectados, encontravam-se soldados e civis. Todavia, ainda se desconhecia o agente causador da doença (sendo mais provável o vírus da hepatite A [HAV, do inglês *Hepatitis A virus*]), sendo a transmissão fecal-oral associada como principal via de infecção ^(6, 7).

Contudo, o primeiro relato escrito de uma doença de provável via de transmissão fecal-oral foi realizado por Cockayne em 1912 em uma revisão. Esse relato foi descrito durante uma epidemia na Ilha de Minorca – Espanha ⁽⁸⁾. Depois disso, muitos outros relatos de epidemias foram feitos e durante muito tempo, a doença foi denominada de “icterícia catarral” por Virchow, por causar obstruções biliares ^(9, 10). Apenas logo após a Segunda Guerra Mundial, foi demonstrado que a doença possuía transmissão de pessoa a pessoa através da via feco-oral. Essa descoberta se deu em pesquisas realizadas em voluntários humanos ⁽¹¹⁾ apud ⁽¹⁰⁾. Somente em 1931, admitiu-se que o agente causador da doença era um vírus ⁽¹²⁾.

Anos depois, apenas em 1973, pesquisadores americanos (Feinstone, Kapikian e Purcell) conseguiram visualizar através de microscopia eletrônica, partículas virais esféricas em fezes de pacientes portadores de “hepatite infecciosa” ou “hepatite A”. Partículas que foram depois utilizadas para aferir a produção de anticorpos no soro de 12 indivíduos infectados pelo HAV experimentalmente ou naturalmente, cujo resultados foram todos positivos. Esses resultados, puderam finalmente sugerir a etiologia do patógeno do vírus da hepatite A ^(6, 13).

Dois anos mais tarde, em 1975, Feinstone, Gravelle e colaboradores inocularam um concentrado de fezes de pacientes infectados com o vírus em chimpanzés ^(6, 14). Depois de um período de tempo, foram observadas (microscopia eletrônica) nas fezes dos chimpanzés, partículas esféricas similares ao tamanho e morfologia encontrados nas fezes dos indivíduos infectados pelo HAV, reportando assim o sucesso da infecção ⁽¹⁵⁾ apud ⁽⁶⁾.

Ainda no mesmo ano, Krugman e colaboradores, através de técnicas de imunoadesância e fixação de complemento, pesquisaram anticorpos contra o vírus da hepatite A em amostras de soro pertencentes a 20 pacientes com diagnóstico de hepatite aguda ^(6, 16). Logo depois, em 1979, os pesquisadores Provost e Hilleman obtiveram sucesso na propagação do vírus em cultura celular ⁽⁶⁾. Apenas 10 anos depois da descoberta do vírus, em 1983, foi realizada a primeira clonagem molecular e o sequenciamento ^(6, 17). Tanto a propagação do vírus em cultura celular, quanto o conhecimento do genoma viral, foram de grande contribuição e importância para o desenvolvimento de testes de diagnóstico da infecção e desenvolvimento da vacina ^(6, 17, 18).

Alguns anos mais tarde, em 1991, a vacina com o vírus inativado contra a hepatite A foi produzida, já em 1992 tornaram-se disponíveis no mercado. A partir deste, foi implementada no calendário de vacinação infantil em muitos países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos essas vacinas foram licenciadas apenas em 1995 ⁽¹⁸⁾. Atualmente, muitos países utilizam o esquema de duas doses de vacinação, como recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para garantir proteção a longo prazo ⁽¹⁹⁾. A Argentina em 2005 introduziu a vacina em seu calendário infantil em esquema de dose única. Os argentinos observaram, com base de uma dose única, que houve uma elevada resposta imunológica em 4-6 semanas nos indivíduos vacinados. Além disso, eles conseguiram observar uma proteção de longa duração induzida pela resposta de memória imunológica. A expectativa era de que esta estratégia interromperia a transmissão, não só em crianças, mas em outras faixas etárias, devido a proteção de rebanho ^(19, 20). Esses resultados foram considerados excelentes segundo a OMS ⁽¹⁹⁾. No Brasil, a vacina contra o HAV foi inserida no calendário de vacinação infantil em 2014, seguindo o esquema vacinal e de dose única, adotada a partir do sucesso obtido pela Argentina ^(19, 21).

1.2 O vírus da Hepatite A

1.2.1 Classificação Taxonômica

Comumente conhecido como vírus da hepatite A (**Figura 1.1**), a espécie *Hepatovirus A* ⁽²²⁻²⁴⁾ é classificado na família Picornaviridae ^(23, 25). Até 1991, era incluído no gênero *Enterovirus*. Contudo, devido a diferenças com os outros

representantes deste gênero, fez com que o HAV fosse reclassificado em um novo, o gênero o *Hepatovirus* (2, 4, 24, 26, 27).

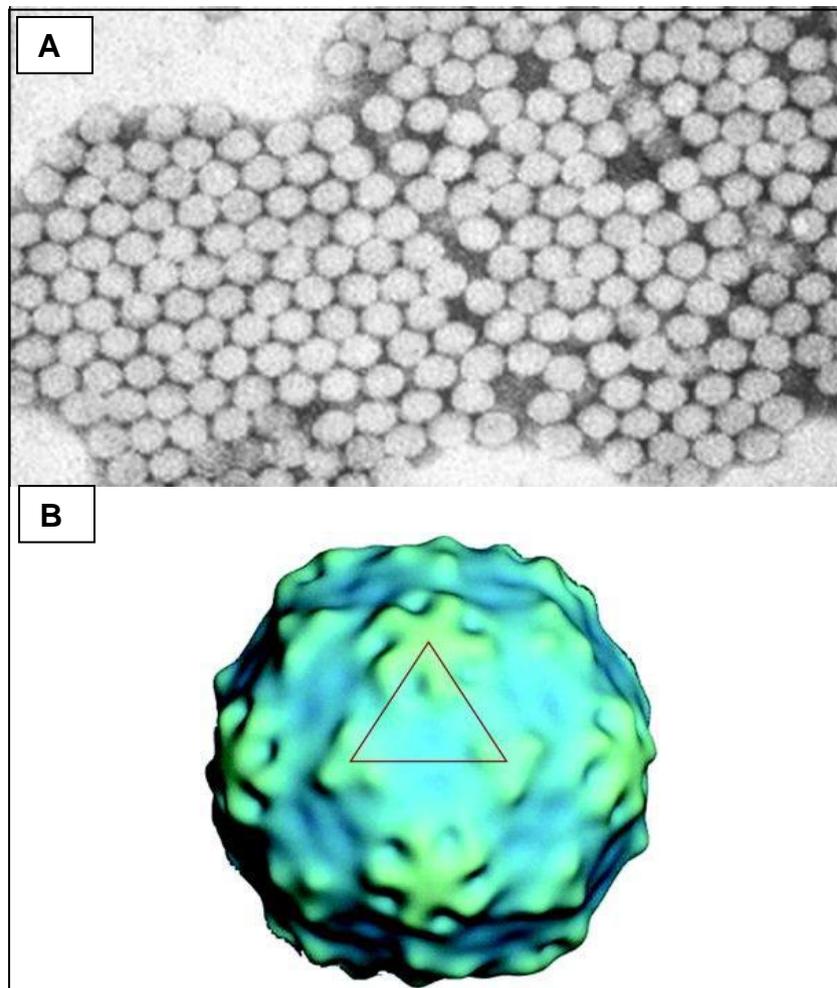


Figura 1.1. A) Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A. Fonte: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês: *Center of Disease Control*), 1998) (28). **B)** Imagem da estrutura da partícula do HAV obtida por criomicroscopia eletrônica. O triângulo define um eixo de simetria delimitado por um pentâmero (topo) e dois pequenos triângulos (vértices inferiores esquerdo e direito). Fonte: Martin e Lemon, 2006) (29).

Anteriormente, o HAV era o único representante do seu gênero (2, 22). Todavia, com o avanço da engenharia genética, que possibilitou a identificação e diferenciação de novas espécies virais, atualmente mais oito espécies (nomeadas de B a I) foram classificadas nesse gênero, sendo o HAV o único membro a infectar humanos até o presente momento (22, 24, 30-32).

1.2.2 Características físico-químicas das partículas virais

O HAV possui uma resistência ambiental relativamente alta, tendo uma termoestabilidade maior que os demais representantes da família Picornaviridae. A estabilidade do vírion (partícula viral completa) em diferentes temperaturas pode variar de 25°C a 60°C, podendo permanecer viável no ambiente por meses ^(2, 26, 27, 33). O vírus também possui resistência aos desinfetantes de superfície mais comuns, como o éter e os detergentes não iônicos, sendo resistente e estável também a pHs baixos entre 6,0 - 1,0 ^(2, 26, 27). Além disso, o HAV possui capacidade de resistência a drogas que são utilizadas contra outros picornavírus ^(2, 34).

Outras características que fazem com que o HAV pertença ao gênero em que é classificado são: um longo período de adaptação para crescer em cultura de células; possuir replicação lenta; raramente produz efeito citopático; e a falta de reatividade a anticorpos monoclonais específicos contra viroses pertencentes ao gênero *Enterovirus* ^(2, 26, 27, 34).

As maneiras de inativação total do vírus são: exposição a formaldeído a 0,25% por 72 horas, ao cloro na concentração de 1 miligrama por mililitro (mg/ml) por 30 minutos, à radiação ultravioleta e também a tampão-fosfato a 70°C por 30 minutos ⁽³⁵⁾.

1.2.3 Partícula viral: organização genômica e proteômica

A partícula viral do HAV não é envelopada, possui aproximadamente 27 a 32 nanômetros (nm) de diâmetro e simetria icosaédrica (**Figura 1.2**) ^(8, 36). Seu material genético é composto por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA, do inglês: *ribonucleic acid*) com polaridade positiva, com 7,5-kilobases (Kb), pronta para a tradução, servindo assim, como molde para produção das proteínas virais ^(22, 37).

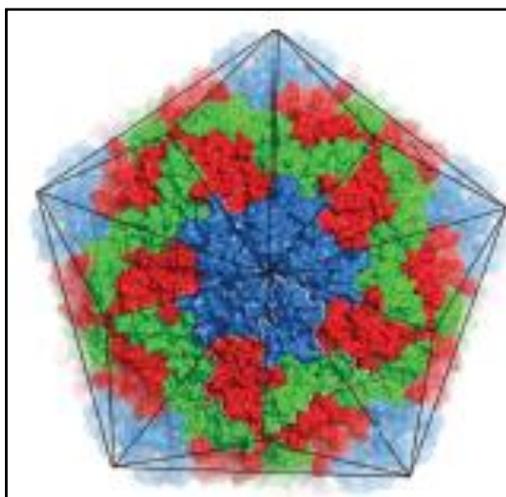


Figura 1.2. Estrutura geral do HAV (VP1, azul; VP2, verde; VP3, vermelho). Adaptado de: Wang et al., 2015 ⁽³⁸⁾.

Por sua vez, seu genoma é lido através de uma única fase de leitura aberta (ORF, do inglês: *Open Reading Frame*), que possui tamanho de 6681 nucleotídeos. O genoma viral se divide em três regiões no genoma, contendo duas regiões não traduzidas (UTRs, do inglês: *untranslated region*), com o flanqueamento de regiões 5' e 3' e uma codificante da poliproteína viral ^(7, 37, 39). Tendo aproximadamente 735 pares de bases (pb), a região 5' corresponde a cerca de 10% do genoma viral, a qual apresenta um sítio de entrada interna do ribossomo (IRES, do inglês: *Internal ribosome entry site*) e possui uma proteína covalentemente ligada (VPg, do Inglês: *Virion Protein, genome linked*). Já a região 3', possui aproximadamente 60 nucleotídeos, na qual se encontra uma cauda de poliadenina (poli-A), sendo esta região provavelmente responsável por interações entre as proteínas virais e celulares **(Figura 1.3)** ^(7, 37, 39).

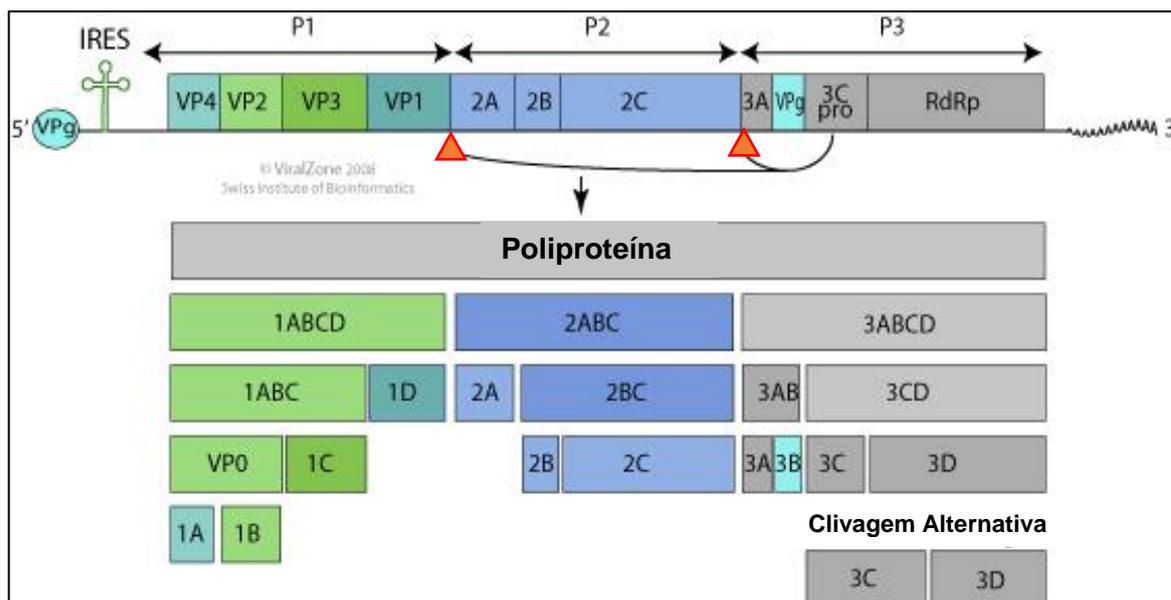


Figura 1.3. Organização do genoma do HAV e processamento da poliproteína. Demarcada com setas pretas estão as regiões precursoras das proteínas estruturais e não estruturais (P1, P2 e P3). O RNA genômico contém uma única fase de leitura aberta (ORF) que codifica uma poliproteína, a qual é clivada pela protease 3C (triângulos vermelhos). Adaptado de Viral Zone, 2008 ⁽⁴⁰⁾.

A região codificante por sua vez, após ser lida pelo ribossomo codificará a poliproteína viral (2227 aminoácidos). Após sua tradução, ela será clivada pela protease viral e será dividida em três regiões: P1, P2 e P3 ^(36, 39, 41). A partir da clivagem da região P1, são formadas as quatro proteínas estruturais do vírus: 1) Proteína Viral (VP, do inglês: *viral protein*) 1 (VP1) (33 Kilodalton [kDa], do; 300 aminoácidos), que é a proteína mais abundante no capsídeo viral e a mais imunogênica. Esta é a proteína formadora dos sítios conformacionais dominantes do vírus ^(36, 42); 2) VP2 (30 kDa; 222 aminoácidos) é uma proteína que pode auxiliar na estabilidade viral ⁽⁴¹⁾; 3) VP3 (28 kDa; 246 aminoácidos), tem um papel importante na virulência do HAV, sendo responsável também pela formação de sítios antigênicos que podem induzir respostas imunes do hospedeiro ⁽⁴³⁾; e 4) VP4 (2,5 kDa; 23 aminoácidos) é uma proteína que não é observada no capsídeo viral maduro, mas auxilia na permeabilidade da membrana, através de poros dinâmicos, sendo também auxiliadora da transferência do genoma viral para a célula hospedeira (**Figura 1.4**) ⁽⁴¹⁾.

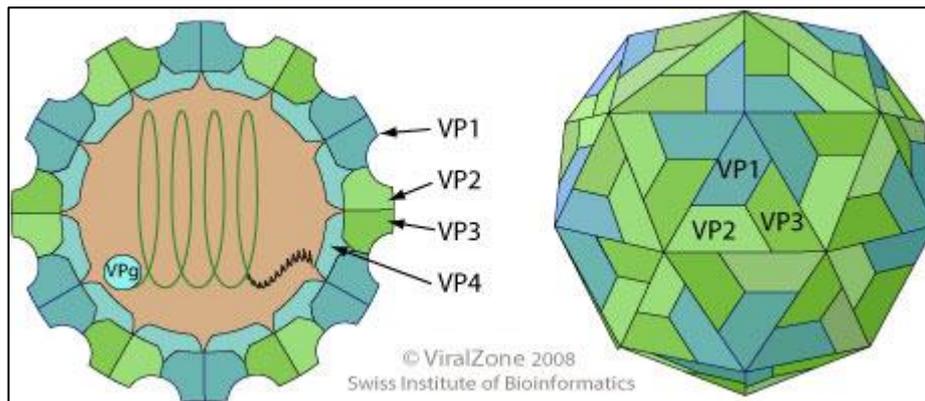


Figura 1.4. Esquema do capsídeo viral maduro, em destaque as proteínas estruturais, material genético e VPg. Fonte: Viral Zone, 2008 ⁽⁴⁰⁾.

Já as proteínas não estruturais, têm sua origem após a clivagem das regiões P2 e P3. A P2, após clivagem, dará origem as proteínas: 2A, 2B e 2C. A proteína 2A (189 aminoácidos) tem como papel principal o componente estrutural e está envolvido na morfogênese viral e juntamente com a proteína VP1 como precursor, é responsável pela virulência do HAV ^(37, 44, 45). A proteína 2B atua na remodelagem de membranas intracelulares para criar estruturas funcionais para a replicação do genoma viral (*viroporina-like*). Já a 2C, possui papel de helicase, proporcionando a abertura da hélice do genoma, atuando também como NTPase, clivando o trifosfato de nucleosídeo (NTP, do Inglês: *Nucleosídeo-Trifosfato*), liberando NTPs e posteriormente usando-os em uma nova fita sintetizada de RNA ^(37, 45).

O último produto da clivagem da poliproteína, a região P3, também passará por um processo de clivagem e dará origem as proteínas não estruturais 3A, 3B, 3C e 3D. A proteína 3A (74 aminoácidos) é considerada a pré-VPg, com capacidade de ancorar a proteína VPg ao RNA viral ^(39, 46). A proteína 3B (23 aminoácidos) dará origem a VPg propriamente dita. Ela, por sua vez, funciona como um primer proteico, sendo responsável pela iniciação da síntese do RNA viral ⁽⁴⁶⁾. A proteína 3C tem atividade de protease, realizando a clivagem proteolítica da poliproteína do HAV. Já a proteína 3D (489 aminoácidos), tem atividade de polimerase, ou seja, ela utiliza o molde de RNA para polimerizar novas fitas de RNA, portanto, esta é uma RNA polimerase RNA-dependente ^(29, 47).

1.2.4 Variabilidade genética viral: seus genótipos e distribuição mundial

O vírus da Hepatite A possui um genoma geneticamente conservado. Contudo, há um grau de diversidade genética suficiente para a diferenciação em genótipos (identidade de sequência nucleotídica >85%) e subgenótipos (≈7,5% de variabilidade genética) ^(39, 42). Tendo apenas um sorotipo, o HAV é classificado em seis (I a VI) genótipos, a partir do sequenciamento da região VP1 completa **(Figura 1.5)** ^(8, 42). Até o presente momento, foram identificados em humanos os genótipos I (subgenótipos IA e IB), II (subgenótipos IIA e IIB) e III (subgenótipos IIIA e IIIB), sendo os demais (IV, V e VI) identificados apenas em primatas não humanos ^(36, 39).

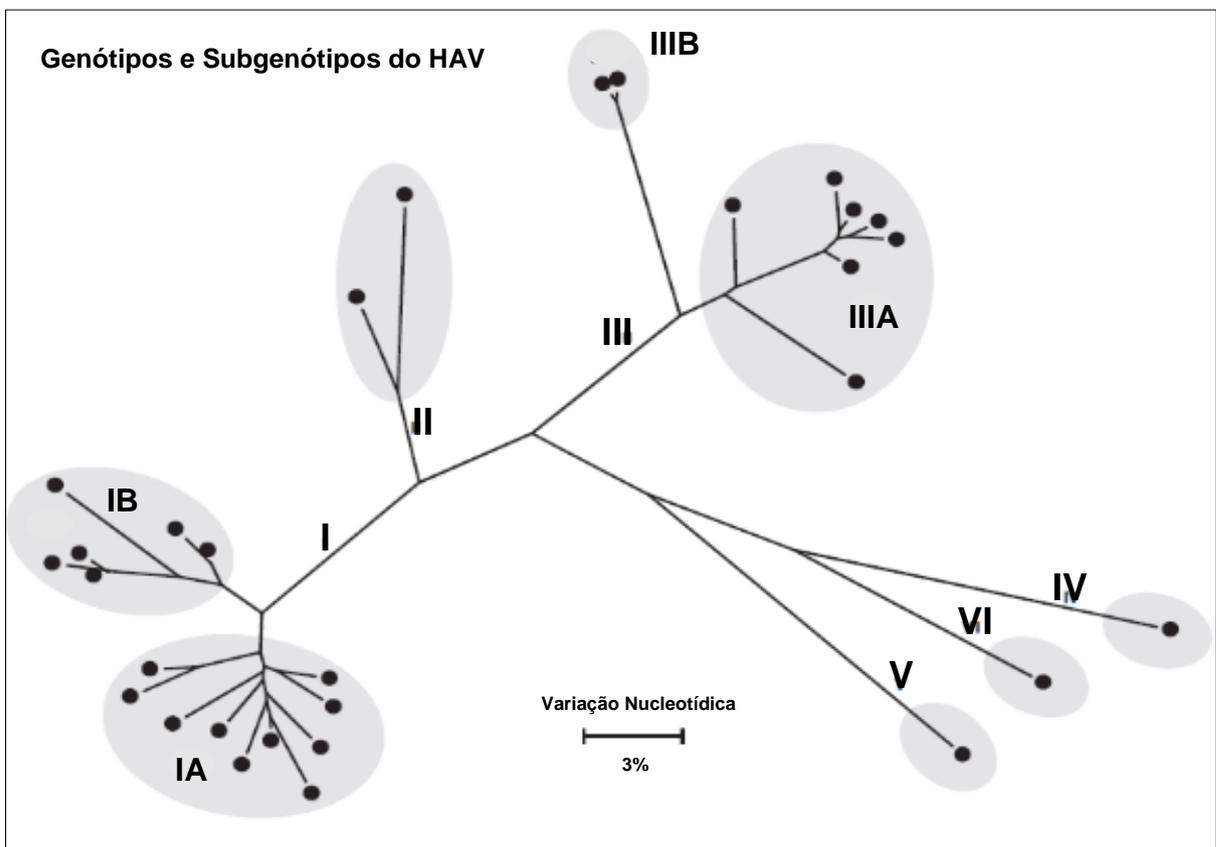


Figura 1.5. Classificação do genótipo HAV. A análise filogenética dos seis genótipos do HAV atualmente reconhecidos. Adaptado de Vaughan et al, 2014 ⁽³⁶⁾.

O genótipo I é o mais prevalente em todo mundo, sendo ele dividido em dois subgenótipos IA e IB ^(36, 39, 42, 48). Contudo, um terceiro subgenótipo (IC) foi proposto em um estudo de Pérez-Sautu e colaboradores em 2011, onde foi sugerido que esse

este novo subgenótipo candidato tenha se derivado do subgenótipo IA pela dinâmica de *quasispécies* ⁽⁴⁹⁾.

Alguns estudos de epidemiologia molecular mostram que o genótipo IA tem circulação majoritária nas Américas do Norte e Sul, Europa, Ásia e África ^(34, 36), sendo predominantemente encontrado em países como Estados Unidos, norte do México, China e Tunísia ^(36, 50-52). Na América Latina foi isolado quase que exclusivamente o subgenótipo IA, o que sugere uma circulação endêmica destes isolados virais nesses países ⁽⁵²⁾. O genótipo IB é predominantemente encontrado no Oriente Médio e África do Sul ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. Entretanto, já houve a identificação de isolados IB na Jordânia, África do Norte, Austrália, Europa e Japão ⁽³⁶⁾.

Apesar dessa predominância do genótipo IB no Oriente Médio e África do Sul, estudos mostraram que no Brasil e Espanha há co-circulação dos subgenótipos IA e IB ^(49, 56). Além disso, o genótipo IB, já foi identificado em amostras ambientais na região oeste e sul do México ⁽⁵⁷⁾.

O genótipo II foi originalmente isolado na França e Serra Leoa, no entanto sua detecção é raramente reportada nesses países ⁽³⁶⁾. Todavia, um estudo realizado em 2010 por Desbois e colaboradores, sugeriu que o subtipo IIA fosse originário da África Ocidental e fosse endêmico de Benin ⁽⁵⁸⁾. Contudo, não está claro por que o genótipo II tem uma circulação tão limitada em todo o mundo ⁽³⁶⁾.

Comparado ao genótipo II, o genótipo III possui uma distribuição mais global ⁽⁴²⁾. Estirpes virais pertencentes ao subtipo IIIA, foram identificadas em países da Ásia e Europa, bem como em Madagascar e Estados Unidos da América (EUA) ^(36, 59). Foi relatado recentemente o aumento do número de casos de infecções pelo subgenótipo IIIA em países como Coreia, Rússia e Estônia ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾. Todos os surtos de hepatite A relatados na Índia até o momento foram causados pelo subgenótipo IIIA ⁽³⁶⁾. No Japão, os subtipos IIIA e IIIB co-circulam amplamente com as cepas IA e IB ^(36, 59).

1.2.5 Biossíntese Viral

Ainda não é muito claro o que ocorre com o HAV no aparelho digestivo do hospedeiro após sua entrada no organismo. Mas o que se sabe é que o vírus pode ser absorvido por células epiteliais da mucosa digestiva, caindo posteriormente na corrente sanguínea e chegando aos hepatócitos pela circulação portal e pela

circulação sistêmica ^(36, 63). Ao chegar às células hepáticas, inicia-se o processo de internalização da partícula viral. Essa internalização ocorre através de endocitose mediada por receptores de glicoproteínas de classe I que estão presentes na superfície da célula, denominados HAVcr-1/TIM-1 ^(36, 64). Essa ligação resulta na mudança conformacional do capsídeo viral, o que promove a entrada do material genético no citoplasma do hepatócito ^(36, 64).

Ao penetrar a célula hospedeira, e através de mudanças desencadeadas pelo ambiente citoplasmático, o HAV perde o capsídeo viral (desnudamento), promovendo a liberação do RNA viral (polaridade positiva) no interior do citoplasma. Este RNA de polaridade positiva, agirá diretamente como ácido ribonucleico mensageiro (RNAm, do inglês: *messenger ribonucleic acid*) ⁽⁶⁵⁾. Essa fita de RNAm será responsável pela síntese da poliproteína viral. Essa tradução é iniciada a partir do direcionamento do RNA viral ao ribossomo pelos IRES encontrado na região 5' NC do genoma do vírus ^(36, 39, 65).

Para que ocorra a tradução proteica propriamente dita, inicialmente será formado o complexo de tradução, que é composto do complexo ribossomal com a ligação do fator de inibição eucariótico não clivado, conhecido como eIF4G (fator eucariótico de inicialização de tradução, do Inglês: *eukaryotic translation initiation factor*) ou 4G. Esse fator eucariótico é característico dos membros da família Picornaviridae ^(65, 66). Ao ser clivado, possui papel importante na gênese viral, uma vez que reduz a produção de proteínas e RNAm das células do hospedeiro promovendo uma tradução mais eficiente do RNAm viral ⁽⁶⁵⁾. Ao contrário dos demais picornavírus, o HAV não realiza a clivagem desse fator de inibição celular, fazendo com que o vírus tenha que competir com a célula hospedeira pelo uso do maquinário celular. Essa não clivagem pode explicar a replicação lenta e a ausência de efeito citopático do vírus em cultura celular ^(36, 65, 67).

Paralelamente à tradução proteica, esse RNA genômico servirá também como um intermediário para síntese de RNA de polaridade negativa, que por sua vez, serve de molde para a produção de novas moléculas de RNA de polaridade positiva, catalisada principalmente pela RNA polimerase RNA dependente ⁽³⁶⁾.

Ao início da leitura do RNAm, quando o complexo ribossomal atinge o primeiro códon AUG, ocorre também simultaneamente a clivagem proteolítica realizada pela protease 3C, gerando as proteínas estruturais e não-estruturais maduras. Uma vez

que as proteínas estruturais já foram formadas no citoplasma da célula, inicia-se a produção do pró-capsídeo que permite a encapsulação ou não (partícula defectiva) do RNA genômico, para a montagem dos vírus ^(29, 36).

Depois de formada as partículas virais, inicia-se o processo de saída da célula, geralmente sem causar a lise celular (**Figura 1.6**). Esse mecanismo de liberação e secreção viral é desconhecido, mas claramente não é dependente da destruição das células. Esse fato é notado, uma vez que são observados altos títulos virais presentes nas fezes antes de haver qualquer evidência de necrose dos hepatócitos ^(29, 36).

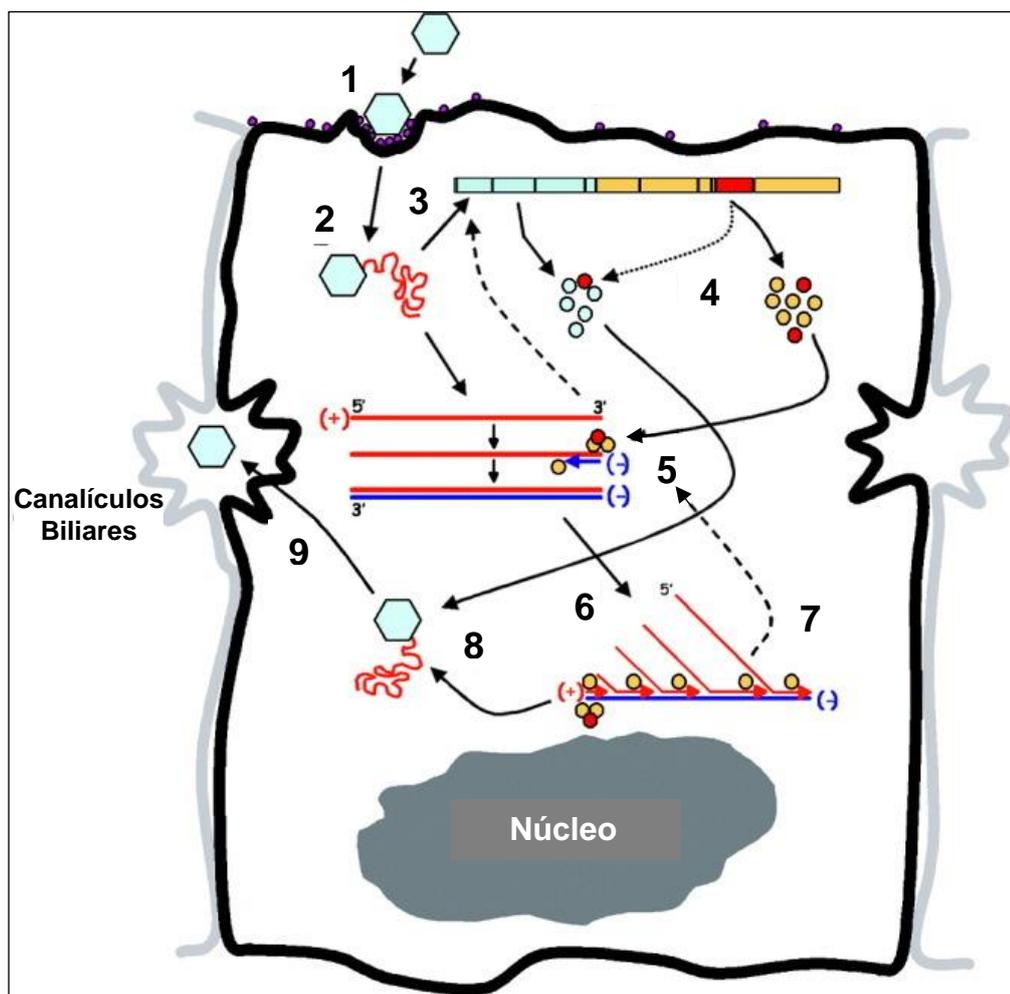


Figura 1.6. Representação esquemática replicação do HAV no interior da célula hepática. **1)** adsorção do vírus ao receptor celular. **2)** Desnudamento e liberação do RNA genômico. **3)** Tradução da poliproteína viral. **4)** Processamento proteolítico. **5)** Síntese da fita de RNA de polaridade negativa. **6)** Síntese de novas cópias de RNA genômico de polaridade positiva. **7)** Tradução das novas fitas de RNA de polaridade positiva para síntese de proteínas virais. **8)** Empacotamento do RNA e montagem de novas partículas virais. **9)** Liberação das novas partículas virais, para os canalículos biliares. Adaptado de MARTIN & LEMON, 2006 ⁽²⁹⁾.

Após a saída das partículas virais das células, elas aparecem na bile e sangue, sendo possivelmente liberadas, através da membrana apical do hepatócito para o canalículo biliar e através da membrana basolateral para a circulação sanguínea. Contudo, os mecanismos de eliminação do vírus na bile e no sangue ainda não são bem claros e conhecidos ^(2, 36). O vírus é liberado no intestino pelos canalículos biliares, juntamente com a bile, sendo eliminado com as fezes em altos títulos virais, é nesta fase que ocorre o pico da infectividade viral ^(8, 36).

1.3 Formas de Transmissão

A transmissão do HAV ocorre principalmente por veiculação fecal-oral, podendo ocorrer por via alimentar, hídrica ou de pessoa-a-pessoa, sendo o contato pessoa-a-pessoa subdividido em contato intradomiciliar (contato com pacientes e crianças infectadas) e contato sexual (sexo anal, oral e oroanal). Todos esses fatores podem ser responsáveis pela disseminação da infecção de um indivíduo a outro, principalmente entre crianças e adultos jovens ^(36, 68-70).

O HAV é estável à temperatura ambiente e a pH baixo, e estas características explicam a sua capacidade de sobreviver no ambiente e ser transmitida por alimentos contaminados e água potável ⁽²⁶⁾. Além disso, sua resistência a pH ácido e detergentes podem explicar a sua capacidade de transitar através do trato gastrointestinal ⁽²⁹⁾. Outro fator que auxilia sua persistência no ambiente e na água por mais tempo possivelmente pode estar relacionado a conformação do capsídeo do HAV que é altamente coesa e mediada através de uma dobra muito precisa ^(66, 71).

A transmissão através do contato pessoa-a-pessoa foi descrita pela primeira vez em voluntários na Alemanha na década de 1940 ⁽⁶³⁾. Esse contato está diretamente relacionado ao ambiente intradomiciliar e escolares, através do contato com superfícies contaminadas por resíduos fecais ou manipuladores de alimentos infectados ^(36, 69).

Além das formas de transmissões supracitadas, existem outras vias para transmissão feco-oral. A transmissão por práticas sexuais é uma delas, sendo descrita

e observada desde a década de 1980, principalmente em homens que fazem sexo com outros homens (HSH) ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. Contudo, tem sido evidenciada mais recentemente e associadas com o sexo oral-anal, por intermédio de recentes surtos (2016-2017) entre HSH em países do continente Europeu, Israel, EUA e Chile ⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾. Nesses surtos, vem sendo reportadas a circulação de estirpes virais filogeneticamente relacionadas entre si, bem como coinfeções com outros patógenos responsáveis por infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) como o vírus da imunodeficiência humana (HIV, do Inglês: *human immunodeficiency virus*) e/ou sífilis ⁽⁷⁵⁻⁸⁰⁾. Porém altas taxas de infecção pelo HAV são associadas com o contato oroanal independente da orientação sexual ^(8, 63). Mas é importante destacar que uma vez que variantes virais são introduzidas na população de HSH, elas se espalham rapidamente e persistem por muito tempo entre esse grupo ⁽³⁶⁾.

Em raras ocasiões, a infecção também pode ser transmitida através da transfusão de sangue ou hemoderivados provenientes de doadores infectados durante a fase virêmica ⁽⁸¹⁾. Além disso, há um grande risco de transmissão parenteral entre usuários de drogas injetáveis ⁽⁶⁸⁾.

1.4 Patogênese Viral e Manifestações Clínicas

O vírus da hepatite A, pode causar uma doença infecciosa aguda, apresentando manifestações clínicas ou por muitas vezes a ausência delas. O quadro clínico do paciente está diretamente relacionado à idade. Em crianças menores de 5 anos, apenas 3% apresentam icterícia, já em crianças com idades entre 5 a 15 anos, 27% em média, apresentaram icterícia e em adultos, 70 a 90%, podem apresentar icterícia ⁽⁶³⁾. O HAV é uma doença autolimitada, ou seja, tem um período limitado e determinado, no qual o indivíduo infectado pode ter resolução espontânea do quadro clínico e infecção em alguns meses. Em casos raros pode ocorrer falência hepática aguda com evolução para o óbito ^(36, 68).

A elevada viremia durante a infecção e fatores moleculares relacionados à gravidade da doença, ainda não estão definidos. Todavia, o que se sabe por consenso, é que esses fatores de virulência estão principalmente associados a algumas linhagens virais, e a fatores do hospedeiro, como sexo, idade e raça. Esses são os fatores principais que determinaram os desfechos clínicos da doença ^(82, 83).

Existe uma elevada replicação do vírus na célula hepática, a qual é eliminada nas fezes através da bile. Este ciclo, chamado de enterohepático, se mantém até que anticorpos neutralizantes do sistema imunológico o interrompam ⁽⁶³⁾.

Na infecção pelo HAV, o período virêmico dura em média 42 dias após o início das manifestações clínicas ^(84, 85). Pode ter um período de detecção de 81 a 90 dias após o período de incubação, com grandes quantidades de partículas virais eliminadas nas fezes (10^9 partículas virais por grama) ^(85, 86). Normann e colaboradores em um estudo realizado em 2004, demonstrou uma média de 70 dias de viremia no plasma de 11 indivíduos infectados pelo HAV, após início de sintomas, onde dois apresentaram viremias superiores a $3 \log_{10}$ por 408 e 490 dias ⁽⁵⁴⁾. Contudo, um estudo realizado em um paciente infectado com HIV-1 e coinfestado com HAV, mostrou uma detecção prolongada do vírus nas fezes (256 dias após o início da doença) com elevada viremia ⁽⁸⁴⁾.

O RNA viral pode ser detectado também em: amostras de soro/plasma, sendo detectados por até 490 dias após o início da icterícia, com cargas virais variando de 10^2 a 10^5 cópias/ml (84); amostras de sangue total, com períodos de detecção de 42 a 70 dias ^(54, 84, 85); e amostras saliva de pacientes com hepatite A, sendo sua carga viral de 1 a 3 unidades/UI de \log_{10} menores do que aqueles encontrados no soro ⁽⁸⁷⁾. Apenas um estudo até o momento, mostrou a detecção do HAV RNA em amostras de urina, através de reação da cadeia da polimerase qualitativa (PCR, do Inglês: *polimerase reaction chain*) ⁽⁸⁸⁾.

O curso da infecção pelo vírus da Hepatite A pode ser dividido em quatro fases clínicas em indivíduos sintomáticos. A primeira delas é o período de incubação viral, que varia de 15 a 50 dias, com média de 30 dias. Durante este período, o indivíduo não apresenta manifestações clínicas, apesar de uma intensa replicação viral ⁽⁶³⁾. O segundo período é conhecido como prodrômico ou fase pré-ictérica, onde ocorre o aparecimento das primeiras manifestações clínicas inespecíficas, como: febre, náusea, vômito, dor abdominal, anorexia e fadiga, que geralmente ocorrem entre 5 a 7 dias antes do início da icterícia. Essas manifestações, não podem ser distinguidas daquelas que ocorrem em outras infecções virais, e se não houver desenvolvimento de icterícia, a indicação de investigação sorológica será feita através da constatação dos níveis elevados das enzimas séricas ⁽⁸⁾.

Já a fase ictérica é considerada o terceiro estágio da doença. Nesta fase, ocorre a mudança da coloração normal da pele, para uma coloração amarelada, decorrente a deposição de bilirrubina. Por sua vez, também ocorre colúria (urina com coloração escura) e hipocolia (fezes esbranquiçadas devido a diminuição da secreção biliar). Sua duração pode ser bastante variável podendo ser de 4 a 29 dias. Neste período, também podem ocorrer manifestações extra-hepáticas como colecistite acalculosa, hemólise e falência renal aguda ⁽⁶³⁾. Outras complicações também já foram evidenciadas, tais como: manifestações neurológicas como Síndrome de Guillian Barré, meningite asséptica, meningoencefalite e manifestações hematológicas como anemia aplásica e hemolítica ^(8, 89, 90).

Em sua última fase, chamada de convalescência, em geral o paciente se recupera completamente das manifestações clínicas. Essas manifestações desaparecem gradativamente ao longo do tempo, sendo encontradas apenas algumas alterações enzimáticas. A resolução da doença é lenta, porém a recuperação do paciente é completa dentro de dois meses ⁽⁶³⁾. Na literatura, não existem registros de formas crônicas da doença ^(34, 36, 63). Existem relatos de que pacientes podem ter a doença prolongada ou recorrente com a duração acima de 6 meses. Nesses casos, o HAV pode ser detectado no soro desses indivíduos durante o tempo de 6 a 12 meses após a infecção ⁽⁹¹⁾.

Em raras ocasiões, a infecção pelo HAV pode resultar em hepatite fulminante (menos de 1,5% dos casos hospitalizados), isto é, insuficiência hepática aguda com encefalopatia e coagulopatia ^(34, 36, 92). A mortalidade é rara e mais frequente em pacientes com mais de 50 anos, tendo sido reportada também em crianças ^(86, 92, 93).

1.5 Resposta Imune e marcadores sorológicos

A resposta imune induzida pelo HAV é essencial para o mecanismo de defesa e eliminação da infecção. Primeiramente, ao que diz respeito à manifestação da doença, com o surgimento das manifestações clínicas, que em contrapartida, está fortemente associada com a resposta imune celular. Em segundo ponto, é de grande importância para o desenvolvimento de testes diagnósticos que confirmam a infecção pelo HAV, uma vez que depende da produção de anticorpos neutralizantes gerados pela resposta humoral ⁽⁶³⁾.

A resposta imune humoral contra o HAV, caracterizada pela produção de anticorpos contra as proteínas estruturais do capsídeo viral, ocorre antes do início das manifestações clínicas da doença. Os primeiros anticorpos a aparecerem são os da classe Imunoglobulina M (IgM) (anti-HAV IgM) tanto nas infecções naturais como nas experimentais. Eles podem ser detectados junto com as primeiras manifestações clínicas ou em alguns casos, só aparecendo no fim da primeira semana da doença. Os anticorpos anti-HAV IgM, persistem na maioria dos pacientes por até 4 meses, porém em raros casos podem persistir por até um ano. Na maioria das vezes, o desaparecimento do IgM pode ocorrer antes mesmo do fim das manifestações clínicas. Os anticorpos da classe Imunoglobulina G (IgG) (anti-HAV IgG) aparecem após a primeira semana de doença e persistem provavelmente por toda a vida, ainda que em títulos mais baixos, gerando memória sorológica ^(8, 68).

Também é observado o aparecimento precoce de anticorpos da classe Imunoglobulina A (IgA) (anti-HAV IgA), que desaparecem em alguns meses. Contudo, sua participação na resolução da infecção viral não é muito conhecida. O que se sabe é que o HAV parece não provocar uma resposta imune intestinal eficaz, ao contrário de outros membros da família Picornaviridae ^(36, 94).

Os anticorpos neutralizantes reconhecem um número pequeno de epítomos nos fragmentos altamente conservados das proteínas do capsídeo viral VP1 e VP3 e possivelmente VP2 ^(8, 36). Anticorpos contra proteínas não-estruturais do HAV também são produzidos. Embora o seu papel na manutenção da imunidade seja provavelmente menos importante do que o de anticorpos para os antígenos do capsídeo, devido à sua baixa concentração e falta de capacidade de neutralização ^(34, 36).

A resposta imune celular contra o vírus, é guiada principalmente pelos linfócitos T CD8+ citotóxicos, que possuem atividade citolítica contra as células infectadas. A ausência de casos de doença crônica em humanos, indica que esse tipo de resposta é eficiente no reconhecimento e combate ao vírus. Apesar da sua importância na eliminação do vírus, a resposta imune mediada por célula é relatada como a causa do dano hepatocelular na doença aguda e conseqüentemente dos sintomas relacionados ^(36, 63).

1.6 Epidemiologia

1.6.1 Prevalência do HAV no Mundo

O HAV é um dos principais patógenos responsáveis por infecções através de alimentos contaminadas. Em 1988, aproximadamente 300 mil indivíduos foram infectados em Shangai, após ingestão de moluscos crus, onde 32 evoluíram para o óbito ⁽⁹⁵⁾. Em 2016, o vírus da hepatite A foi responsável por aproximadamente 7.134 mortes em todo o mundo segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) ^(96, 97).

As áreas de prevalência para o HAV podem ser caracterizadas como altas, intermediárias, baixas ou muito baixas ⁽⁹⁶⁾. Esses quatro padrões de endemicidade, são definidos com base em evidências sorológicas, que por sua vez se dá a partir da prevalência de anticorpos anti-HAV IgG por idade. Esse é o principal fator que ressalta as características epidemiológicas de cada região. Além da evidência sorológica, são incluídas nessa avaliação as taxas de doença e de transmissão predominantes nessas populações e faixas etárias ^(36, 98, 99). No entanto, infecção não significa doença, uma vez que as crianças infectadas quando muito jovens podem não apresentar sintomas ⁽⁹⁶⁾.

As áreas com elevada prevalência de infecção, conhecidas como regiões de alta endemicidade, ocorrem em países de baixa e média renda com más condições sanitárias e práticas de higiene. Nessas localidades, a infecção é comum e a maioria das crianças (90%) são infectadas pelo HAV antes dos 10 anos, grande parte das vezes sem sintomas. As epidemias são incomuns porque crianças e adultos mais velhos geralmente não são suscetíveis por apresentarem exposição prévia. As taxas de doenças sintomáticas nessas áreas são baixas e os surtos são raros ^(96, 98, 100).

Em áreas com baixas prevalências de infecção, consideradas áreas de endemicidade baixa ou muito baixa, encontram-se países que possuem alta renda com boas condições sanitárias e higiênicas. Pode ocorrer doença entre adolescentes e adultos em grupos de alto risco, como pessoas que injetam drogas, HSH, pessoas que viajam para áreas de alta endemicidade e em populações em vulnerabilidade,

como os sem-teto, além de grupos religiosos fechados (que possuem condições sanitárias precárias ou com hábitos religiosos com baixa higiene) ^(96, 98, 100). Surtos nessas populações, principalmente em HSH, foram recentemente observados em 22 países da União Europeia, o que levou a um aumento expressivo do número de casos nessa região entre 2016 e 2018, sendo acometidos pela infecção 20.067 indivíduos adultos ⁽¹⁰¹⁾.

Já quanto aos países de renda média e regiões onde as condições sanitárias são variáveis, são consideradas áreas com prevalências intermediárias de infecção, ou endemicidade intermediária. Por sua vez, as crianças frequentemente escapam da infecção na primeira infância e atingem a idade adulta sem imunidade. Paradoxalmente, essas melhores condições econômicas e sanitárias podem levar ao acúmulo de adultos que nunca foram infectados e que não têm imunidade. Essa maior suscetibilidade em faixas etárias mais velhas pode levar a taxas mais altas de doença sintomática em adultos e grandes surtos podem ocorrer nessas comunidades ^(96, 98, 100).

Um estudo de revisão sistemática realizado por Jacobsen e Wiersma em 2010, destaca as regiões do mundo segundo sua endemicidade analisando estudos de soroprevalência do vírus da hepatite A por idade e região mundial entre 1990 e 2005 ⁽¹⁰⁰⁾ **(Tabela 1.1)**.

Tabela 1.1. Estimativas de prevalência por regiões no mundo, 2005. Adaptado de Jacobsen e Wiersma, 2010 ⁽¹⁰⁰⁾.

Regiões (Regiões GDB) [*]	Regiões da OMS concordantes	Países mais populosos em 2005 ^a	Nível estimado de endemicidade ^b
1 Ásia-Pacífico de alta renda	Pacífico Ocidental	Japão, República da Coreia, Cingapura	Muito baixo
2 Ásia Central	Europa	Usbequistão, Cazaquistão, Azerbaijão	Intermediária
3 Leste Asiático	Pacífico Ocidental	China	Baixa
4 Sul Asiático	Sudeste Asiático/Mediterrâneo Oriental	Índia, Paquistão, Bangladesh	Alta
5 Sudest Asiático	Sudeste Asiático/Pacífico Ocidental	Indonésia, Filipinas, Vietnã	Baixa
6 Australásia	Pacífico Ocidental	Austrália, Nova Zelândia	Muito baixo
7 Região Caribenha	Americas	Cuba, República Dominicana, Haiti	Baixa
8 Europa Central	Europa	Polónia, Romênia	Baixa
9 Europa Oriental	Europa	Rússia, Ucrânia, Bielorrússia	Baixa
10 Europa Ocidental	Europa	Alemanha, França, Reino Unido	Muito baixo
11 América Latina Andina	Americas	Peru, Equador, Bolívia	Intermediária
12 América Latina Central	Americas	México, Colômbia, Venezuela	Intermediária
13 América Latina do Sul	Americas	Argentina, Chile, Uruguai	Intermediária
14 América Latina Tropical	Americas	Brasil, Paraguai	Intermediária
15 Norte da África/Oriente Médio	Mediterrâneo Oriental	Egito, Irã, Turquia	Intermediária
16 América do Norte de alta renda	Americas	Estados Unidos, Canadá	Muito baixo
17 Oceânia	Pacífico Ocidental	Papua Nova Guiné, Fiji, Ilhas Salomão	Intermediária
18 África Subsaariana Central	África	República Democrática do Congo, Angola	Alta
19 África Subsaariana Oriental	África	Etiópia, Tanzânia, Sudão	Alta
20 África Subsaariana do Sul	África	África do Sul, Zimbábue, Namíbia	Alta
21 África Subsaariana Ocidental	África	Nigéria, Gana, Costa do Marfim	Alta

* GBD = Estudo sobre Carga Global de Doenças, Lesões e Fatores de risco;

^a Dados populacionais da Situação da População Mundial do UNFPA em 2005;

^b Alto: ≥90% têm imunidade aos 10 anos de idade; intermediário: ≥50% têm imunidade aos 15 anos; baixo: ≥50% têm imunidade aos 30 anos; muito baixo: <50% têm imunidade aos 30 anos.

Em outra revisão sistemática realizada por Aggarwal e Goel publicado em 2015, no qual extrapolaram dados sobre taxas de soroprevalência relacionadas à idade de estudo encontrados na literatura até 2015, mostram mudanças mais marcantes de endemicidade nas Américas do Sul e Central, Ásia e em alguns países do continente Europeu, quando comparados aos estudos realizados por Jacobsen e Wiersma em 2010 ^(98, 100) (

Figura 1.7).

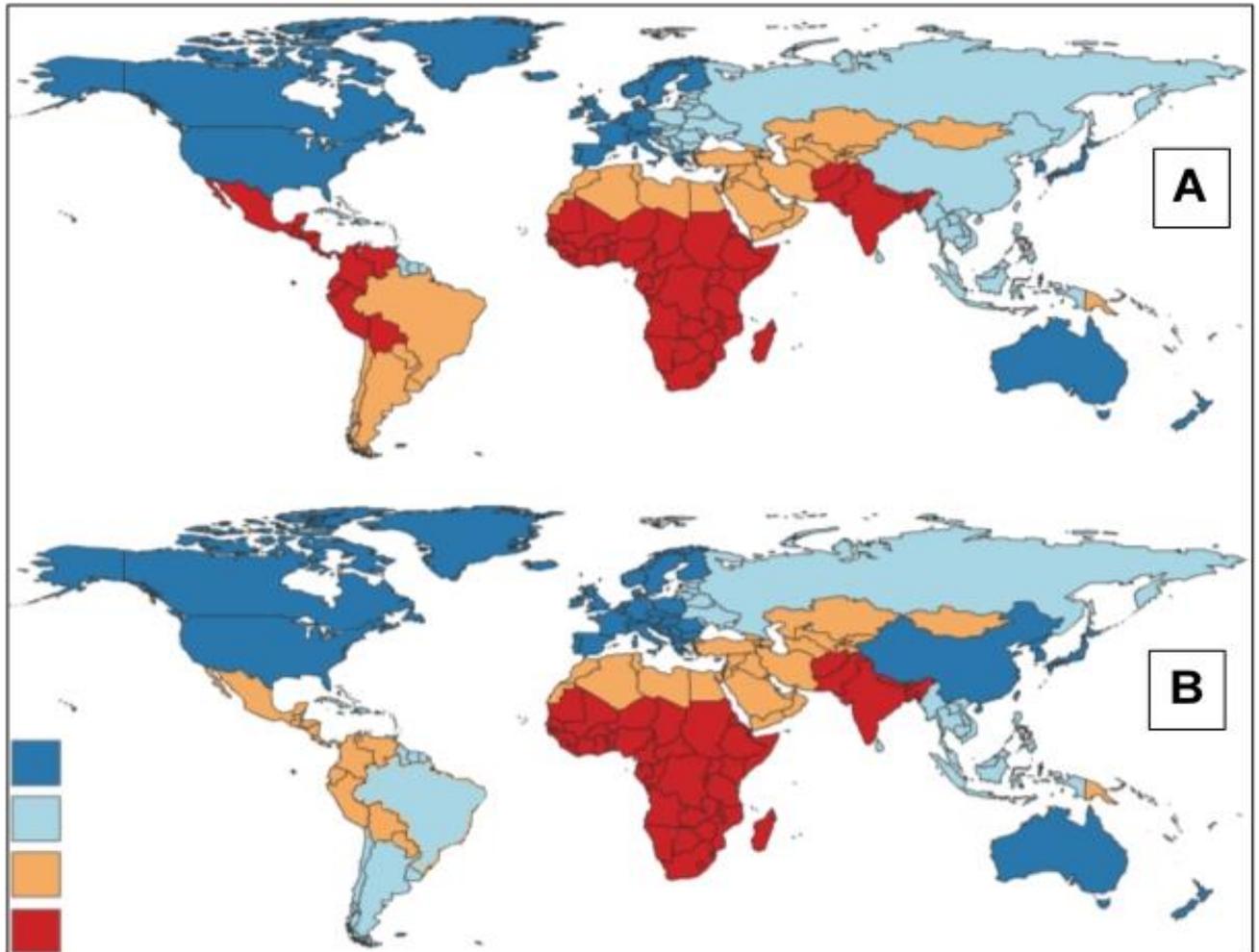


Figura 1.7. Mapa de distribuição geográfica mundial da infecção pelo HAV. **A)** Mapa baseado em dados do levantamento de 1990 a 2005 do estudo de Jacobsen e Wiersma, 2010 ⁽¹⁰⁰⁾. **B)** Mapa baseado nos dados das extrapolações para o ano de 2015, levando em conta a taxa anual de variação de soroprevalência específicas por idade. As cores representam diferentes padrões de endemicidade com base na idade em anos em que 50% da população tem positividade para o vírus anti-HAV total [vermelho escuro - endemicidade muito alta (<5 anos); laranja - alta endemicidade (5-14 anos); azul claro - endemicidade intermediária (15 a 34 anos); azul escuro - baixa endemicidade (> 50 anos)]. Adaptado de Aggarwal e Goel, 2015 ⁽⁹⁸⁾.

1.6.2 Prevalência do HAV no Brasil

No Brasil, foram notificados de 1999 a 2018 no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), cerca de 167.108 casos de infecção pelo vírus da Hepatite A. Dentro deste período, entre 2000 e 2017, foram identificados 1.142 óbitos associados à hepatite A, sendo 71,4% (815 casos) como causa básica ⁽¹⁰²⁾.

Segundo a OMS, o Brasil é considerado como uma área de endemidade intermediária para hepatite A. Isso se dá, principalmente devido ao risco de epidemias ser considerado baixo em crianças e maior suscetibilidade em faixas etárias mais velhas ⁽¹⁰³⁾. Contudo, um inquérito de soroprevalência de base populacional, realizado em todas as 27 capitais brasileiras mais o distrito federal, em indivíduos de 5 a 69 anos, mostrou que o país tem passado por uma fase de transição quanto ao padrão epidemiológico da hepatite A ⁽¹⁰⁴⁾. Por sua vez, esse fato foi demonstrado no Boletim do Ministério da Saúde, onde vem sendo observada uma redução nos últimos 10 anos no número de casos na faixa etária infantil e escolar (<10 a 19 anos) e um aumento de casos notificados em indivíduos adultos (20 a 39 anos) **(Gráfico 1.1)** ⁽¹⁰²⁾. Esse fato, pode ser possivelmente explicado pela inclusão da vacinação no calendário de imunização infantil em 2014 ^(21, 105).

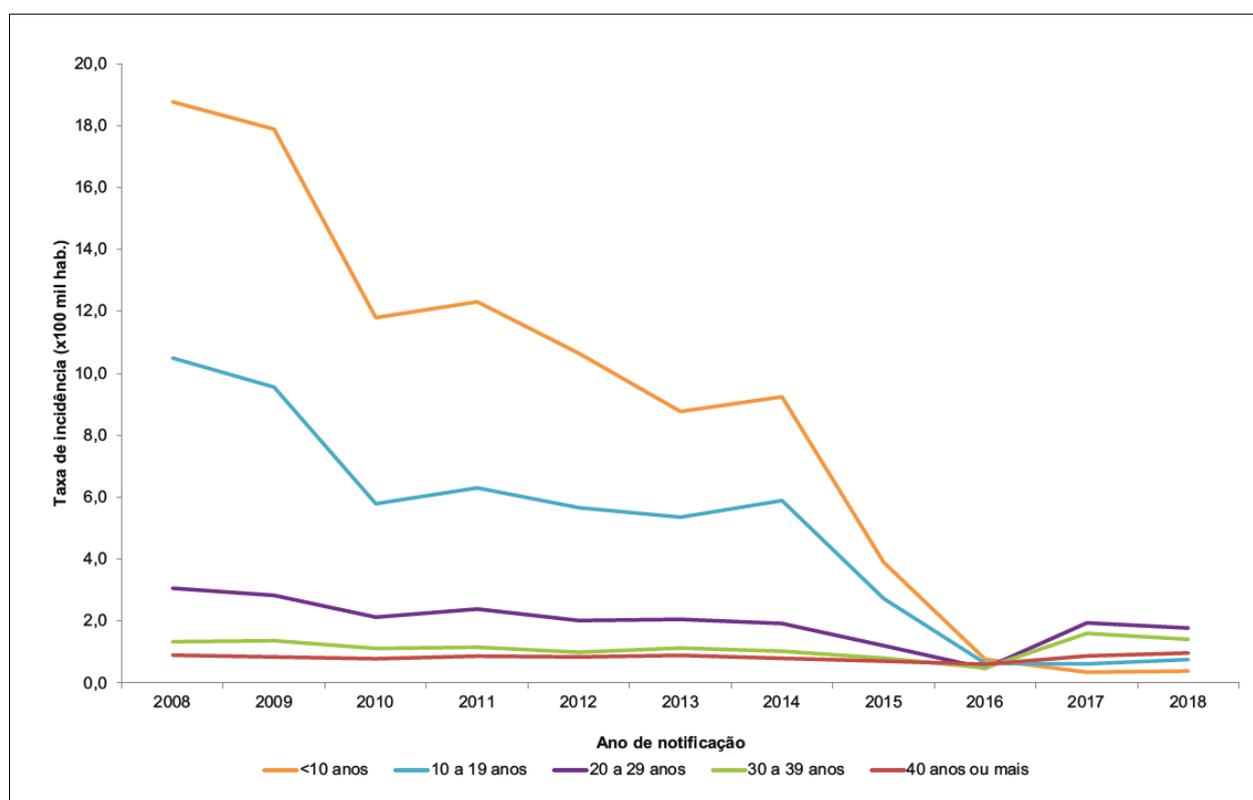


Gráfico 1.1. Taxa de incidência de casos notificados de hepatite A segundo faixa etária e ano, 2008 a 2018. Fonte Ministério da Saúde, 2019 ⁽¹⁰²⁾.

Além disso, esse mesmo inquérito mostrou uma soroprevalência heterogênea em todo o país, onde as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Distrito Federal apresentaram uma endemidade intermediária, enquanto as regiões, sudeste e Sul, foram classificadas como áreas de baixa endemidade **(Figura 1.8)** ⁽¹⁰⁴⁾.



Figura 1.8. Padrão epidemiológico da hepatite A no Brasil de acordo com seus níveis de endemicidade nas macro-regiões brasileiras (Adaptado de Ximenes *et al.*, 2014) (104).

No entanto, tem sido observada uma redução do número de casos notificados nas regiões de endemicidade intermediária segundo o Ministério da Saúde (102). Esse fato, pode estar relacionado a melhoria das condições socioeconômicas e sanitária dessas regiões (106) e também pela introdução da vacina no calendário infantil a partir de 2014 (21). Porém, nas regiões de baixa endemicidade (Sul e Sudeste) observou-se um aumento no número de casos notificados (

Gráfico 1.2), entre os anos de 2016 e 2018, principalmente em jovens adultos (20 a 39 anos) do sexo masculinos, tendo um incremento de 14 vezes na taxa de incidência, que passou de 0,4 casos por 100 mil habitantes em 2016 a 5,7 casos por 100 mil habitantes em 2017 (102) (**Gráfico 1.3).**

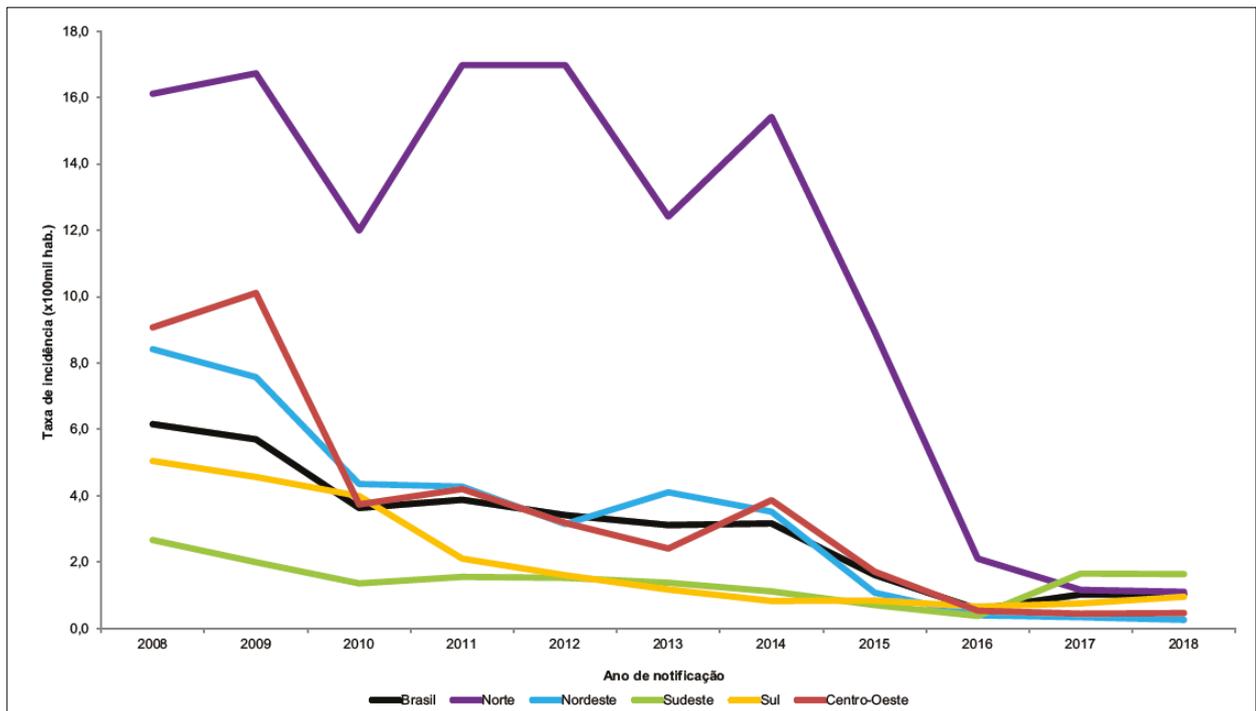


Gráfico 1.2. Taxa de incidência de casos notificados de hepatite A segundo região de residência e ano de notificação, 2008 a 2018. Fonte Ministério da Saúde, 2019 ⁽¹⁰²⁾.

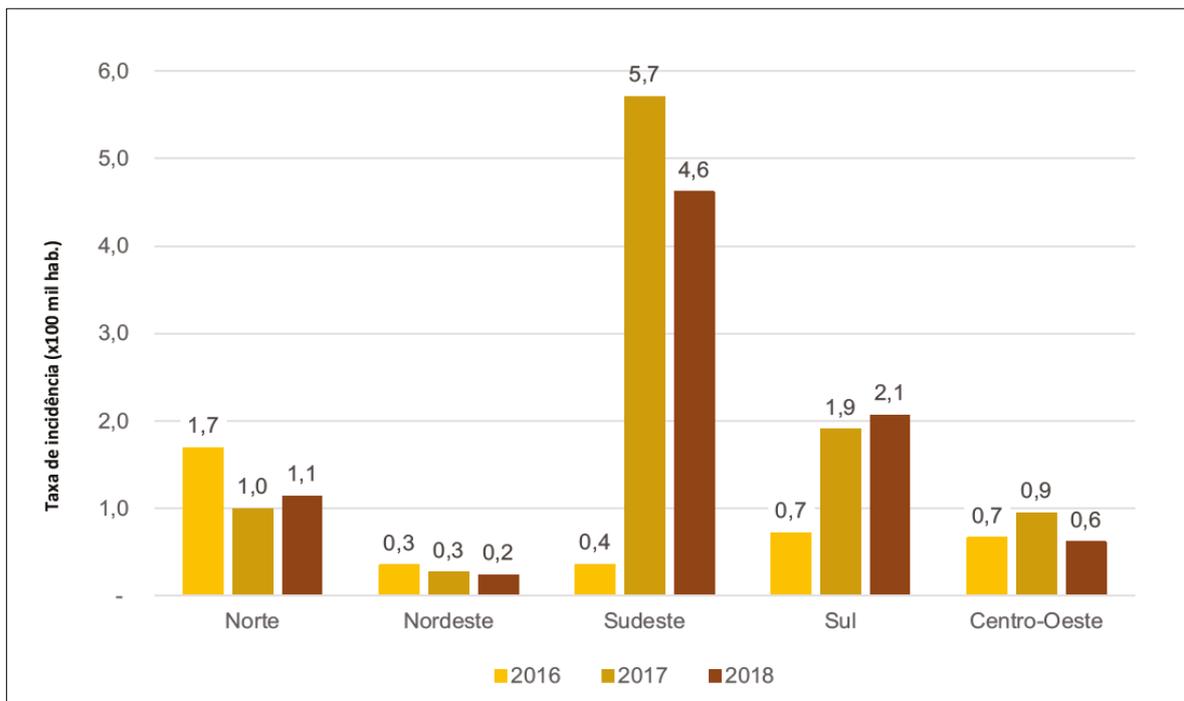


Gráfico 1.3. Taxa de incidência de casos notificados de hepatite A em homens de 20 a 39 anos, segundo região e ano de notificação, 2016 a 2018. Fonte Ministério da Saúde, 2019 ⁽¹⁰²⁾.

Esse aumento notificado em ambas as regiões, Sudeste e Sul, concentraram-se principalmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (**Gráfico 1.4**)⁽¹⁰⁷⁾, sendo relacionadas a faixa de 20 a 39 anos e acometendo em sua grande maioria indivíduos do sexo masculino (**Gráfico 1.5**)⁽¹⁰²⁾. Importante destacar, que práticas sexuais possivelmente favoreceram a transmissão feco-oral no período de 2016 a 2018 no Brasil, como relatado pelo Boletim do Ministério da Saúde. Esse fato, difere-se de registros de anos anteriores a esse período, onde notou-se que a contaminação por vias alimentares e/ou hídricas foram as principais formas de transmissão do HAV no país^(102, 108). Neste mesmo período, vários países registraram inúmeros surtos de hepatite A entre homens nesta faixa etária principalmente entre HSH, a qual também poderia ter influenciado o aumento do número de casos nas três principais cidades brasileiras^(109, 110).

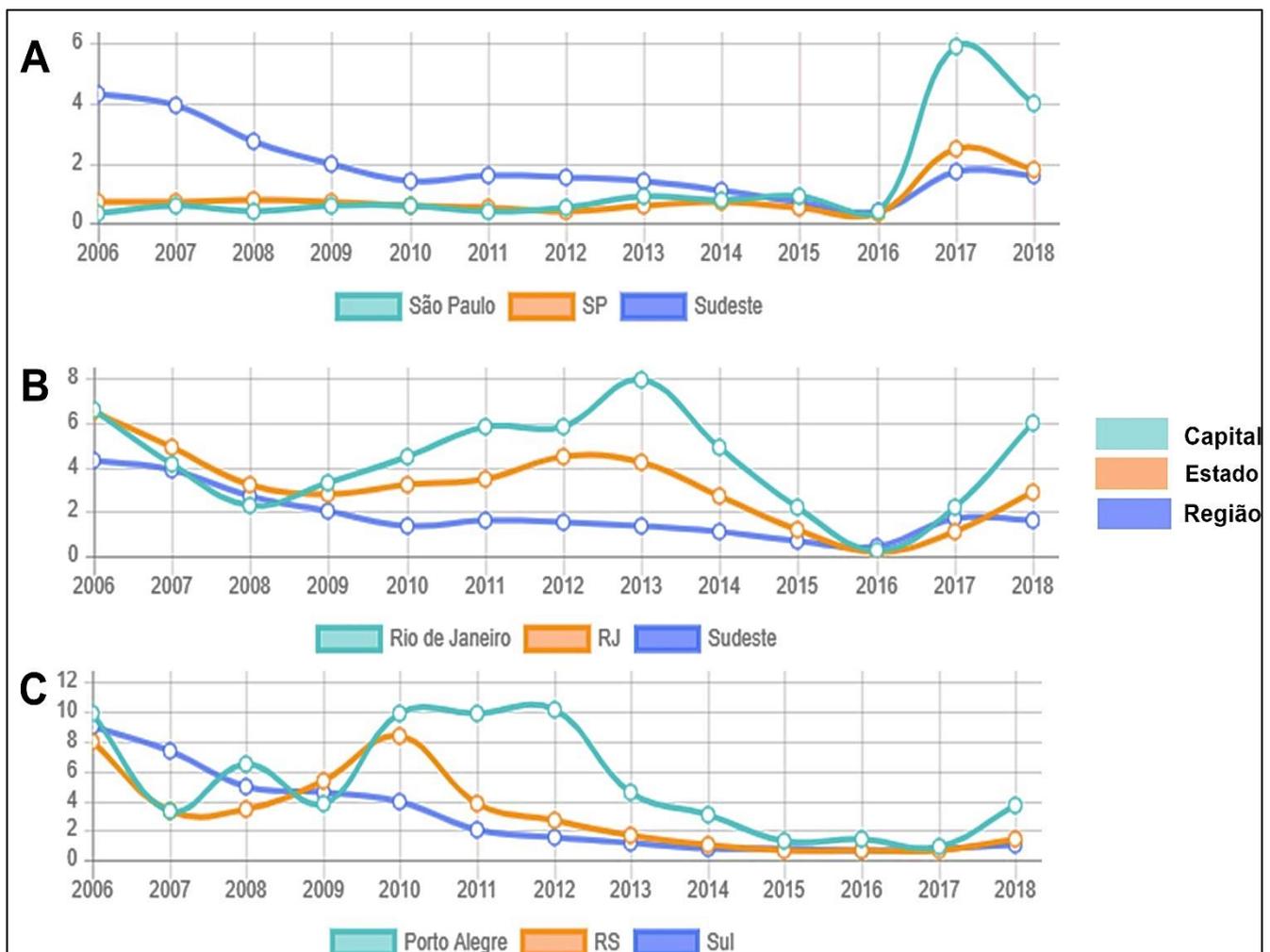


Gráfico 1.4. Taxas de incidência de hepatite A (por 100.000 habitantes) segundo local e ano da notificação, 2006-2018. **A)** São Paulo; **B)** Rio de Janeiro e; **C)** Rio Grande do Sul. Adaptada Sinan, 2019⁽¹⁰⁷⁾.

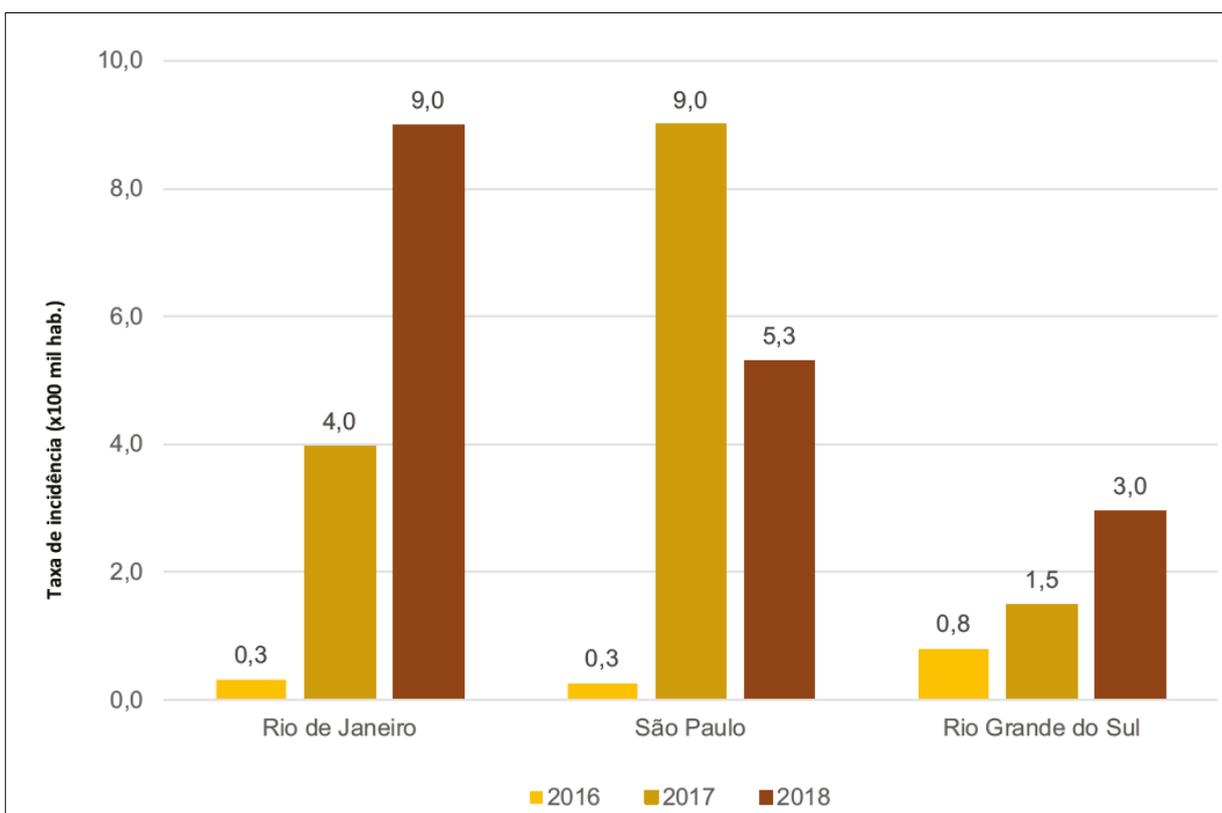


Gráfico 1.5. Taxa de incidência de casos notificados de hepatite A em homens de 20 a 39 anos, segundo UF e ano de notificação. Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande de Sul. 2016 a 2018. Fonte Ministério da Saúde, 2019 ⁽¹⁰²⁾.

Segundo o Boletim do Ministério da Saúde, foi observada uma mudança na categoria de exposição ao HAV. Notou-se um aumento de 97,7% de relatos através da via sexual, quando comparados os anos de 2016 e 2017. Em contrapartida foi observada também uma redução de infecções através do fator hídrico (52,4%) para o mesmo período. Esses dados correspondem principalmente ao sexo masculino, com faixas etárias de 20 a 30 anos, indicando que as práticas sexuais possivelmente foram responsáveis pelo aumento do número de infecções nesses indivíduos **(Gráfico 1.6)** ^(102, 111).

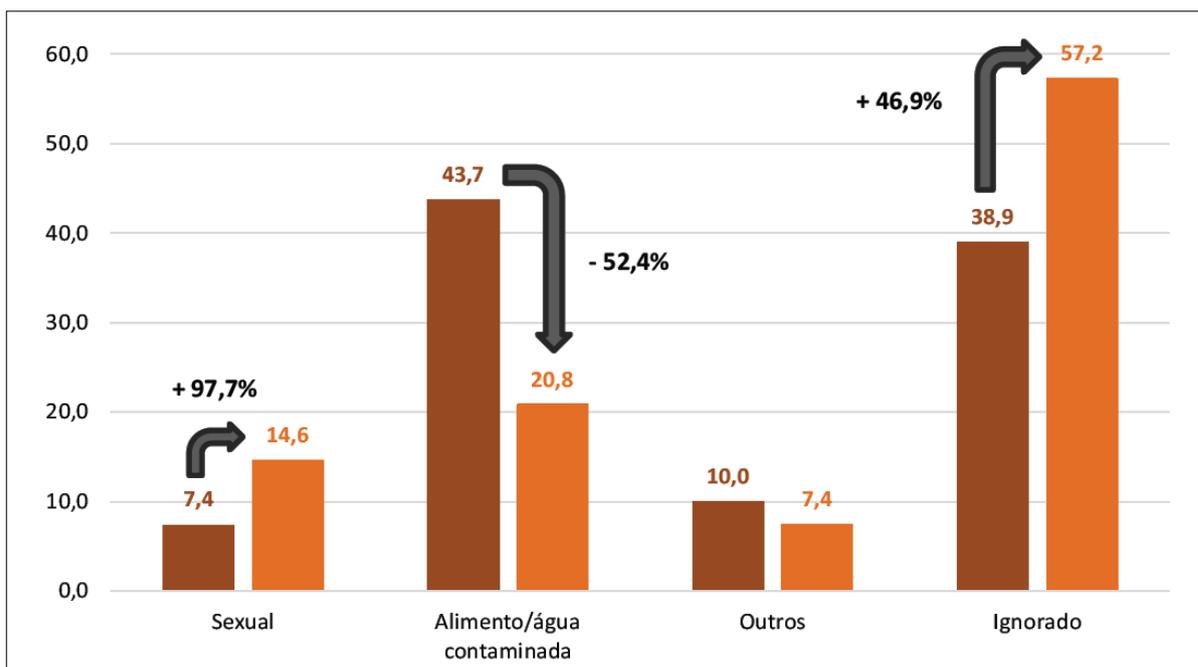


Gráfico 1.6. Percentual de categoria de exposição dos casos notificados de hepatite A em homens de 20 a 39 anos. Brasil, 2016 a 2017. Fonte Ministério da Saúde 2018 (111).

1.7 Diagnóstico

1.7.1 Diagnóstico sorológico

Nos testes sorológicos, a presença de anticorpos da classe IgM anti-HAV é fundamental para confirmar o diagnóstico da infecção aguda (63). Diversos ensaios têm sido utilizados para detectar as classes de anticorpos vírus-específicos, incluindo radioimunoensaio (112), imunoquímica (113), ensaio imunoenzimático (ELISA) (114), quimiluminescência (115), imunoblotting (116) e imunocromatograficos (testes rápidos) (117).

Os ensaios imunoenzimáticos, por exemplo, possuem alta especificidade e sensibilidade. Eles são baseados em placas adsorvidas com anticorpos anti-IgM humano. Por sua vez, esses anticorpos irão se ligar ao IgM anti-HAV, caso esse esteja presente na amostra de soro ou plasma. Logo após isso, é adicionada a partícula viral conjugada a peroxidase, que posteriormente após a adição do cromógeno, possibilitará a visualização de cor no ensaio (118). A detecção de anticorpos da fase aguda da doença, anti-HAV IgM, normalmente coincide com o pico de elevação de

transaminases e com o início da sintomatologia, cerca de 4 a 6 semanas após a infecção e declinam a níveis indetectáveis dentro de 4 meses ^(34, 68).

O anti-HAV IgG pode ser detectável simultaneamente à doença aguda (queda de IgM anti-HAV). De maneira gradual, o título de IgG se eleva, chega a altos níveis na fase de convalescência e permanece durante toda a sua vida, conferindo imunidade contra reinfecção ^(29, 68) (**Figura 1.9**). A associação da presença de anticorpos anti-HAV IgG e a ausência de anticorpos IgM anti-HAV pode ser usada para diferenciar uma infecção passada de uma infecção recente ^(34, 68).

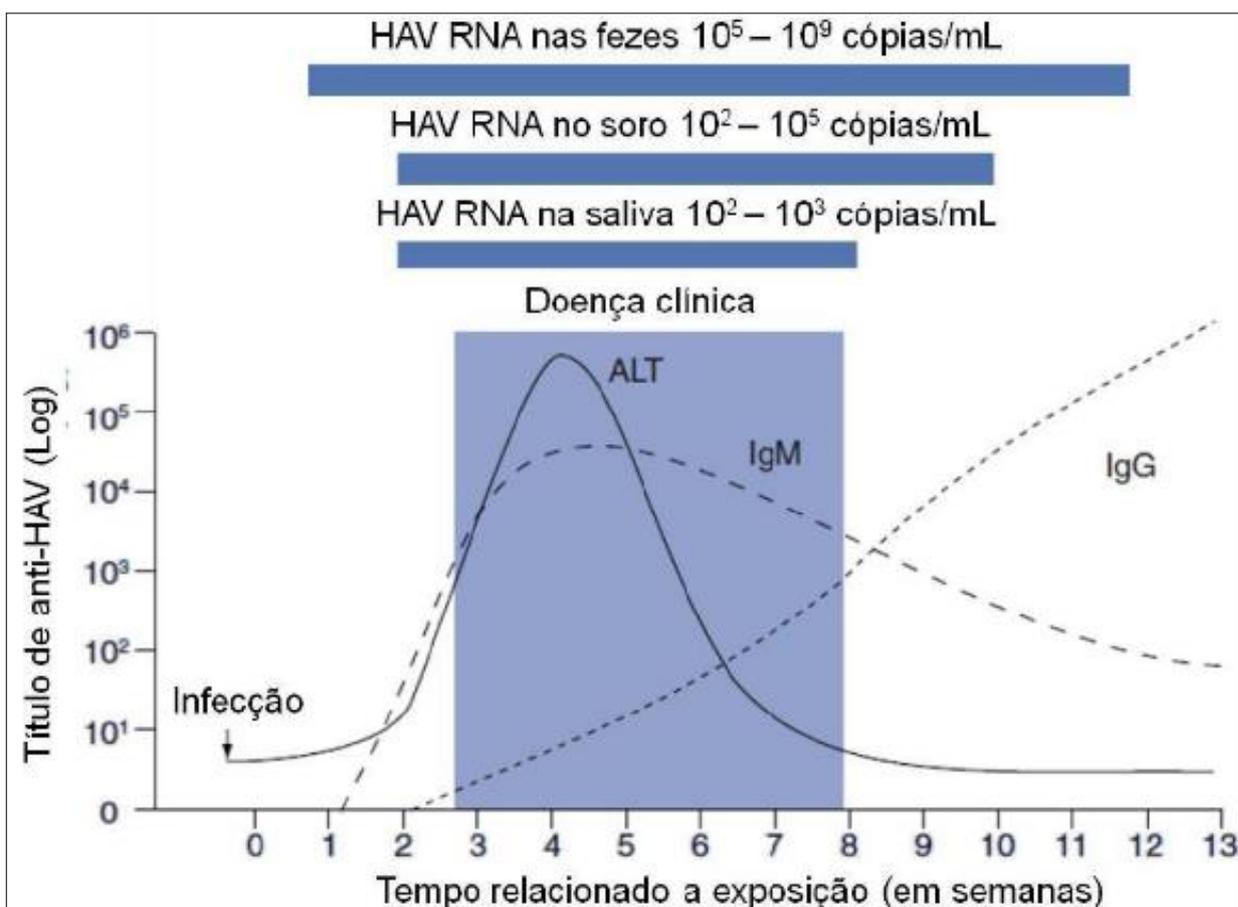


Figura 1.9. Cinética virológica, sorológica e bioquímica durante a infecção causada pelo HAV. Adaptado de De Paula, 2012 ⁽⁶⁸⁾.

Além dos testes sorológicos supracitados, existem também os testes rápidos. Eles também são conhecidos como testes imunocromatográficos, ensaios de fita ou ensaios de fluxo lateral, e são utilizados para detecção de diferentes patógenos ^(117, 119, 120). O método pode constituir também detecção de anticorpos em plasma, soro e saliva de humanos expressos através de linhas coloridas de fácil interpretação ⁽¹²¹⁾.

Por sua vez esses testes rápidos apresentam uma metodologia de utilização bem simples, os quais utilizam antígenos virais fixados em um suporte sólido (membranas de celulose ou nylon, látex, micropartículas ou cartelas plásticas) e são separados em embalagens individuais, o que permite a testagem de amostras separadamente ⁽¹²²⁾.

1.7.2 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular é realizado através da detecção do RNA viral. Este podendo ser qualitativo, onde se determina a presença ou não do RNA viral, ou quantitativo, onde se mensura a quantidade do RNA. O princípio dos testes moleculares é baseado na reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR, do Inglês *Reverse transcription polymerase chain reaction*) onde há uma amplificação do material genético por transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA, do inglês *complementary deoxyribonucleic acid*). Após isso, é realizada a reação em cadeia da polimerase aninhada, conhecido como *Nested PCR*. A *Nested PCR* é uma modificação da PCR, sendo destinada a reduzir a ligação não específica dos iniciadores (*primers*) em produtos ou sítios de ligação aos inesperados ^(36, 68).

A detecção do RNA viral pode ser realizada através da extração do RNA do HAV extraído de diferentes espécimes clínicos. Podendo ser esses espécimes: soro, plasma, fezes e amostras ambientais através dessas técnicas. Ainda que a carga viral do HAV seja mais elevada em amostras de fezes, a detecção, quantificação do RNA viral são realizadas principalmente em amostras de soro, devido à presença de inibidores encontrados nas fezes ⁽⁶⁸⁾.

Outra alternativa para detecção do genoma viral, é a utilização da PCR em tempo real. Ela vem sendo utilizada para detecção e quantificação do HAV em amostras biológicas e ambientais. Por sua vez, este método melhora a precisão e sensibilidade da PCR tradicional. A PCR em tempo real permite o estudo da carga viral e o conhecimento dos acontecimentos durante a infecção, especialmente sobre a duração da viremia em diferentes espécimes clínicos ^(68, 84).

O diagnóstico molecular pode basear-se na amplificação da região 5' não codificante (5'NCR do Inglês: *no codificante region*), aplicada na PCR em tempo real. Esta é a região mais conservada do vírus e é utilizada para detecção do genoma do

HAV. Outras regiões como, VP1, VP3 ou VP1/2A são comumente mais utilizadas em técnicas qualitativas para detecção do RNA viral. Por serem regiões consideradas mais variáveis, são altamente utilizadas para o estudo da variabilidade genética através do sequenciamento do genoma viral ^(68, 123).

O sequenciamento de ácidos nucleicos pode ser realizado para confirmar a especificidade da PCR, para identificar e genotipar o vírus. A técnica também tem sido utilizada para determinar relações genéticas entre os isolados, estudos filogenéticos, filogeográficos, e caracterização genética viral ^(50, 63, 110, 124, 125).

1.8 Prevenção e Controle

Por ser transmitido principalmente por água e alimentos contaminados, as principais medidas a serem adotadas quanto a prevenção da infecção pelo HAV são a de higiene pessoal e saneamento básico. Mas é importante destacar que medidas de controle mais eficazes devem evitar a contaminação fecal das mãos, alimentos, água ou outras fontes por indivíduos infectados, antes de sua doença clínica tornar-se evidente, sendo de suma importância, a lavagem das mãos após as evacuações, a higienização de alimentos. Vale ser destacado também, que sejam evitadas práticas de trabalho que facilitem a contaminação de outros indivíduos, principalmente crianças, que por sua vez é muitas vezes difícil de controlar sua higiene pessoal durante a fase aguda de infecção e presença das manifestações clínicas ^(2, 96, 126).

Além disso, em qualquer suspeita de infecção por hepatite A, deve ser considerada a restrição de atividades estudantis e laborais do indivíduo que apresentou as manifestações clínicas. Isso porque, a maior concentração dos vírus nas fezes ocorre na fase mais tardia do período de incubação e no período inicial da fase prodrômica, sendo um ponto crucial para infecção de novos indivíduos suscetíveis ⁽¹²⁷⁾.

A imunização contra a hepatite A é altamente eficaz e já é utilizada para prevenção da doença desde 1991 ⁽¹²⁸⁾. As vacinas atualmente existentes, são vacinas inativadas e provaram estar entre as mais imunogênicas, seguras e bem toleradas. Vacinas inativadas são imunogênicas, porém se tratando da infecção pelo HAV, que apresenta crescimento lento em cultura celular, a produção dessa vacina se torna dispendiosa e lenta. Desse modo, vacinas recombinantes baseadas em peptídeos

sintéticos do capsídeo do HAV (proteínas VP1 e VP3) estão sendo pesquisadas. Estes antígenos recombinantes são de grande interesse, uma vez que podem tornar a produção vacinal menos onerosa ^(129, 130).

Ambos os diferentes tipos de vacinas supracitadas (inativadas e recombinantes) são semelhantes em termos de proteção contra o vírus e sem efeitos colaterais. Aproximadamente 100% das pessoas, desenvolvem níveis protetores de anticorpos contra o vírus no prazo de um mês após uma única dose da vacina ^(19, 131). A vacina é apresentada em cartuchos com 1 ou 10 frascos-ampolas contendo em cada frasco ampola uma dose de 25 U/0,5 mL para uso em crianças. Atualmente, estão disponíveis no mercado duas vacinas eficazes contra a hepatite A compostas por vírus inativados por formalina que são a HAVRIX® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgica) e a VAQTA® (Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA) ⁽¹³²⁾. Sendo utilizado no Brasil, VAQTA® (Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA) ⁽¹³³⁾ **(Figura 1.10)**.

LABORATÓRIO PRODUTOR	APRESENTAÇÃO	COMPOSIÇÃO	IMUNOBOLÓGICO/ ILUSTRAÇÃO
MERCK SHARP & DOHME	VAQTA - Frasco-ampola (Merck Sharp & Dohme) Suspensão injetável - frasco ampola - monodose de 0,5 mL /cada dose	Cada dose de 0,5 mL contém aproximadamente 25 U do antígeno do vírus da hepatite A, 0,225 mg de alumínio na forma de sulfato de hidroxifosfato de alumínio amorfo e 35 mcg de borato de sódio como estabilizador de pH, em cloreto de sódio a 0,9%.	

Figura 1.10. Forma farmacêutica, apresentação e composição da vacina contra hepatite A. Fonte: Ministério da Saúde, 2014 ⁽¹³³⁾.

Segundo CDC (2006), em seu Comitê Consultivo sobre Práticas de Imunização (ACIP do Inglês: *Advisory Committee on Immunization Practices*), para que ocorra a prevenção da hepatite A, recomenda-se a vacinação de: crianças a partir de 12 meses de idade que residem em comunidades de alta endemicidade; viajantes para regiões de alta endemicidade; usuários de drogas ilícitas; homens homossexuais; pacientes portadores de doenças crônicas do fígado; pessoas com risco de infecção ocupacional; além de membros de família e pessoas com contato pessoal próximo de crianças adotadas recém-chegadas de países com alta endemicidade de hepatite A ⁽¹³⁴⁾. Mais recentemente, a vacinação contra o HAV foi reforçada pela OMS para

indivíduos da comunidade HSH. Esse fato se deu mediante aos surtos que vem acometendo essa população em diversos países ao redor do mundo ⁽⁹⁶⁾.

A Organização Mundial da Saúde recomenda a realização de programas de vacinação em massa contra a hepatite A nos países com endemicidade baixa a moderada ⁽⁹⁶⁾. O Brasil, no ano de 2014, iniciou sua estratégia de imunização contra a hepatite A em crianças de um a dois anos incompletos em um período de 12 meses segundo a PORTARIA Nº 2, DE 18 DE JANEIRO DE 2013, isso equivale a cerca de três milhões de crianças no país. O esquema vacinal é de dose única ⁽²¹⁾. Contudo, atualmente vacinação foi estendida para de 15 meses a 5 anos incompletos (4 anos, 11 meses e 29 dias) ⁽¹³⁵⁾.

Além de serem oferecidas para crianças, as vacinas também são administradas para pessoas de qualquer idade que tenham: hepatopatias crônicas de qualquer etiologia incluindo os tipos B e C; coagulopatias; pessoas vivendo com HIV; portadores de quaisquer doenças imunossupressoras; doenças de depósito; fibrose cística; trissomias; candidatos a transplante de órgãos; doadores de órgãos, cadastrados em programas de transplantes; pessoas com hemoglobinopatias ⁽¹³⁵⁾.

Após a inclusão da vacinação no país em 2014, foi observado um declínio no número de casos principalmente em indivíduos de faixas etárias mais jovens (crianças) ^(102, 105). No entanto, devido ao aumento do número de casos de hepatite A no Brasil, principalmente indivíduos jovens adultos do sexo masculino, por surtos que acometeram principalmente HSH na cidade de São Paulo, recentemente, o Ministério da Saúde ampliou a indicação da vacina contra o HAV para indivíduos que praticam sexo oral-anal, especialmente entre HSH ⁽¹³⁶⁾.

1.9 Justificativa

Apesar da infecção por HAV ser mais comumente adquirida na infância através da ingestão de água e alimentos contaminados por material fecal, surtos atuais de HAV reportados em homens que fazem sexo com homens apontam para uma possível transmissão por práticas sexuais, através do contato por sexo oral-anal ^(102, 111).

Além dos surtos de HAV mundialmente reportados e do aumento de casos observados no Brasil, foi notado também um aumento no número de casos de hepatite A em indivíduos atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais (AHV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) entre 2017 e 2018, quando comparados à 2016, sendo acometidos pela infecção, principalmente homens jovens.

Diante desses eventos ocorridos, a fim de encontrar respostas sobre quais comportamentos de risco estão envolvidos na aquisição dessa infecção, visamos investigar através de métodos moleculares e análises de dados socioepidemiológicos, todos os pacientes com anticorpos IgM reagentes para hepatite A que deram entrada no AHV entre 2013 e 2019. Além de melhor entender os fatores de risco e grupos populacionais mais acometidos, faz-se necessário mapear também as estirpes virais circulantes relacionadas a esses casos, a fim de identificar a entrada e circulação de isolados virais importados. Para tanto, é importante também a análise molecular de isolados virais circulantes no Brasil em anos anteriores (2013-2015), a fim de verificar a existência de possíveis diferenças genômicas entre as estirpes virais endêmicas e epidêmicas. Os resultados do presente estudo contribuirão para o conhecimento dos aspectos epidemiológicos e virológicos associados ao aumento da incidência de uma doença até então em declínio.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os comportamentos de risco e os aspectos moleculares associados a transmissão do vírus da hepatite A em indivíduos atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro entre os anos de 2013 e 2019.

2.2. Objetivos Específicos

- A.** Investigar os fatores comportamentais de risco e grupos mais acometidos pela infecção pelo vírus da hepatite A;
- B.** Identificar os genótipos do HAV circulantes na população de estudo;
- C.** Analisar a variabilidade genética das estirpes virais encontradas;
- D.** Estabelecer a distribuição espaço-temporal das estirpes virais, comparando com isolados circulantes em anos anteriores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Considerações Éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o CAAE Nº 50230015.0.0000.5248 (**Anexo 9.1**). Todos os pacientes do estudo estiveram cientes e de acordo com sua participação na pesquisa, após terem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, conforme resolução número 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde.

3.2. Delineamento do Estudo

O presente estudo trata-se de uma pesquisa observacional, analítica e transversal.

3.3. População de Estudo, Critérios de Inclusão e Exclusão de Pacientes e Seleção de Amostras de Soro

O estudo foi composto por três grupos, os grupos 1 e 2 compostos por pacientes atendidos e que chegaram por demanda espontânea ao Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (AHV/IOC/FIOCRUZ), sendo: 1) pacientes de casos esporádicos atendidos entre 2013 e 2015, dos quais foram utilizadas amostras (soro) de conveniência apenas para análises comparativas da variabilidade genética e distribuição temporal do HAV e 2) pacientes de casos esporádicos atendidos entre 2017 e 2019, dos quais foram utilizadas amostras (soro) de conveniência de para investigar a variabilidade viral, distribuição temporal e dados socioepidemiológicos, a fim de entender quais fatores poderiam estar relacionados ao aumento do número de casos de HAV no AHV durante esse período. O grupo 3, foi composto por seis amostras de conveniência (soro) de casos esporádicos cedidas pelo Laboratório Central de Amostras do Estado do Rio de Janeiro Noel Nutels (LACEN-RJ) dos anos de 2018 e 2019, sendo todas positivas para o anti-HAV IgM. Foram avaliados nessas amostras a variabilidade genética e distribuição temporal do HAV.

Como critérios de inclusão no estudo: os indivíduos deveriam possuir diagnóstico sorológico reagente para hepatite A aguda (Anti-HAV IgM reagente), ter idade igual ou superior a 18 anos, aceitar participar da pesquisa e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram excluídos do estudo todos os indivíduos que eram incapazes de consentir voluntariamente, como pessoas sob embriaguez ou portadores de doenças cognitivas e neurológicas.

Para isso, as amostras provenientes dos anos 2013 a 2015 foram selecionadas de maneira randômica utilizando o programa Excel® versão 1802 Build 9029.2167 (Microsoft Office®, Las Vegas, Estados Unidos da América), com seleção máxima de sete amostras para cada ano, seguindo os principais critérios de inclusão supracitados. Além disso, para seleção dessas amostras, foi levado em consideração a distribuição mensal de casos que apresentavam o anti-HAV IgM, de modo a contemplar os dois semestres de cada ano. Já para os pacientes identificados entre 2017 e 2019, foi selecionada a primeira amostra, após o primeiro atendimento no AHV.

3.4. Coletas dos dados Socioepidemiológicos

Com o objetivo de coletar os dados socioepidemiológicos dos pacientes, todos os prontuários de indivíduos atendidos entre os anos de 2017 e 2019 no AHV. Foram incluídos neste estudo aqueles indivíduos encaixavam-se nos critérios de inclusão e exclusão, citados no tópico 3.3.

Para a realização das análises descritivas dos dados, foram coletados através dos prontuários dos pacientes atendidos no AHV entre 2017 e 2019: estado civil, orientação sexual, sexo, idade e fatores de exposição a infecção pelo HAV (exposição a fatores hídricos e alimentares, práticas sexuais, exposição parenteral, contato interpessoal [contato com pessoas sabidamente infectadas com HAV] e viagens para regiões endêmicas e/ou em que ocorreram surtos recentes de HAV). Além disso, foi verificada a presença de outras infecções sexualmente transmissíveis como o vírus da hepatite B (HBV do Inglês: *Hepatitis B virus*), com o vírus da hepatite C (HCV do Inglês: *Hepatitis C virus*), vírus da imunodeficiência humana (HIV) e/ou Sífilis.

3.5. Variáveis analisadas no estudo

3.5.1. Variáveis sociodemográficas

Para o presente estudo foram utilizadas as seguintes variáveis categóricas preditivas sociodemográficas, como descritas na **Tabela 3.1**

Tabela 3.1. Variáveis preditivas sociodemográficas

Variável sociodemográficas	Categoria
Sexo Biológico	Masculino ou Feminino
Faixa Etária	20 a 29 anos; 30 a 39 anos; 40 a 59 anos; e 60 ou mais anos
Orientação Sexual	Heterossexual ou HSH/MSM ¹
Cidade	Municípios do Estado do Rio de Janeiro.
Zonas Geográficas	Norte; Sul; Oeste; Central; Baixada e; Metropolitana.
Ano de Infecção	2017-2019
Semestre de Infecção	Primeiro ou segundo semestres

¹ MSM = mulheres que fazem sexo com mulheres

3.5.2. Fatores de exposição ao vírus da hepatite A

Diversos fatores de risco de exposição à infecção pelo HAV foram explorados neste estudo, sendo todas variáveis categóricas. Foram incluídos aqueles fatores descritos pelo paciente de 15 a 30 dias antes do aparecimento das primeiras manifestações clínicas, como descrito na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2. Fatores de exposição à infecção pelo vírus da hepatite A

Fatores de Exposição*

Fator Parenteral

Remédios injetáveis

Drogas Injetáveis

Tatuagens

Piercing

Tratamento dentário

Transfusão de Sangue

Fatores Alimentares

Ingestão de carne crua ou mal passada

Vegetais e legumes crus ou mal lavados

Ingestão de água de poço ou cisterna

Fatores Hídricos

Contato com Enchente

Banho de Praia

Banho de Rio e/ou Lago

Abastecimento por água de poço

Abastecimento por água de cisterna

Abastecimento por água encanada

Possui esgoto tratado

Fatores Sexuais

Sexo oral

Sexo oroanal (contato boca ânus)

Sexo anal

> de 3 parceiros sexuais

Sexo desprotegido

Contato com pessoas sabidamente infectadas com HAV

Viagens para regiões endêmicas e/ou que ocorreram surtos recentes de HAV

Outras infecções e/ou co-deteções

HBV agudo (HBVa) (presença de HBsAg + anti-HBc IgM)

HBV passado (HBVp) (presença de anti-HBc IgG)

HCV

Sífilis

HIV

* Todas as categorias foram avaliadas através de respostas SIM ou NÃO

3.6. Análises de dados

Foi realizada uma análise descritiva para os dados do estudo, sendo utilizado a média para a categoria de idade e análises de frequências para as demais categorias. Por sua vez, esses dados foram coletados e categorizados (como descritos nos itens 3.5.1 e 3.5.2) em uma planilha utilizando o programa Excel® versão 1802 Build 9029.2167 (Microsoft Office©, Las Vegas, Estados Unidos da América). Posteriormente, a planilha obtida foi processada através do programa estatístico R *studio*

3.7. Extração de Ácidos Nucléicos Virais

Para extração do material genético viral, foram utilizados dois kits comerciais disponíveis no Laboratório de Hepatites Virais: o *Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche Diagnostics, Suíça) e o *QIAamp® Viral RNA Minikit* (Quiagen, Alemanha), o procedimento foi realizado de acordo com as instruções dos fabricantes.

As técnicas baseiam-se na afinidade do material genético viral a uma membrana de sílica. Primeiramente, o espécime clínico de interesse (neste estudo foram utilizadas amostras de soro) passa por um processo de lise, utilizando um tampão disponível no kit. Após lise, essa solução é adicionada à coluna de sílica e centrifugada. Logo após, são realizadas diversas etapas de lavagem para a remoção de inibidores e ao final deste processo, o material genético viral aderido a membrana de sílica é eluído utilizando tampão de dissociação apropriado. Ao final do processo, o produto recuperado é armazenado a -80° C.

3.8. Detecção do Genoma Viral

Para a detecção do material genético do HAV, foi utilizada a técnica de *One-Step RT-PCR*, seguido por *semi-nested PCR*. A amplificação foi realizada a partir da região VP1/2A do genoma do vírus, utilizando oligonucleotídeos previamente descritos por de Paula e colaboradores em 2002 ⁽⁴⁸⁾, sendo amplificada uma região de aproximadamente 340 pb (**Anexo 9.2.**).

Primeiro, foi realizada uma reação de transcrição reversa seguida de uma reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), sendo utilizado o kit comercial *SuperScript III Reverse One-step RT-PCR* (Invitrogen, Estados Unidos da América), seguindo as informações do fabricante. Junto a isso, foi adicionada uma etapa de variação e redução de temperatura a cada ciclo (*touchdown*), afim de aumentar a sensibilidade e especificidade de detecção viral. Após a RT-PCR, foi realizada uma etapa de semi-nested PCR utilizando a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Califórnia, EUA) seguindo as instruções do fabricante, afim de aumentar ainda mais a sensibilidade de detecção.

Ao final dos ciclos de PCR, os resultados foram visualizados através de uma corrida de eletroforese (~80 a ~90 volts por 1h) em gel de agarose 1,5%, tampão Tris-borate-EDTA (TBE). As bandas foram coradas com brometo de etídio, visualizadas em câmara com luz ultravioleta *UVP Transilluminator* (ClinX, Shanghai, China)

3.9. Purificação dos Produtos da PCR

Após a identificação de caracterização das amostras em gel de agarose, foi realizado a purificação dos produtos da PCR, para as amostras que tiveram a detecção do genoma do HAV. Para tal processo de purificação, utilizamos o kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics, Suíça), seguindo as recomendações do fabricante.

Esse processo é realizado para remoção de resíduos da PCR e possíveis interferentes, permitindo uma maior qualidade na reação de sequenciamento. A metodologia é baseada na afinidade do cDNA amplificado a uma membrana de sílica, posteriormente passando por sucessivas lavagens com tampões disponíveis no kit e ao final uma eluição com tampão específico.

3.10. Quantificação dos Produtos Purificados

Os produtos de PCR purificados foram quantificados, a fim de saber quanto de DNA havia em cada produto amplificado. Essa etapa foi realizada para garantir o mínimo de DNA aceitável para o sequenciamento. Para isso, foi utilizado o kit comercial *Quant-iT™ Qubit™ dsDNA BR Assay Kit* (Invitrogen, EUA), seguindo as

recomendações do fabricante. A técnica baseia-se em quantificação por fluorimetria. As amostras de interesse são inseridas no tampão disponível pelo fabricante e comparado com dois padrões oferecidos pelo kit, que por sua vez possuem diferentes concentrações. Esses padrões e as amostras inseridas ao tampão, são lidas em um aparelho que mede a densidade ótica de cada amostra, dando ao final o resultado de cada um em microgramas (μg).

3.11. Sequenciamento Nucleotídico

Os produtos de PCR purificados e quantificados foram sequenciados utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Estados Unidos da América). Para tal, esse procedimento foi realizado no Laboratório de Hepatites virais seguindo o protocolo adaptado de Sanger e colaboradores ⁽¹³⁷⁾. Em uma placa de sequenciamento de 96 poços, foram adicionados $6\mu\text{L}$ de solução de sequenciamento contendo *BigDye*, tampão de reação na concentração de 5x, os respectivos iniciadores (*primers*) senso ou anti-senso e água destilada ultrapura. Após a solução ser distribuída homogeneamente em cada poço, foram adicionadas 4 microlitros (μL) dos produtos de PCR purificados em seus respectivos poços. Logo após as amostras purificadas serem adicionadas a placa, a mesma foi colocada em um termociclador para realização da reação de sequenciamento e hibridização dos iniciadores (*primers*) ⁽¹³⁷⁾.

Ao final do ciclo, foi iniciado o processo de precipitação. Inicialmente, a placa foi retirada do termociclador e com auxílio de uma pipeta multicanal foi adicionado 80 μL de isopropanol a 75% em cada poço, sendo incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi centrifugada por 45 minutos à 4000xg em temperatura ambiente. Logo após, a placa foi vertida em papel absorvente, a fim de retirar todo o excesso de isopropanol. Depois de vertida, foi realizada uma centrifugação da placa invertida em papel absorvente por 1 minuto a 900xg, afim de retirar todo o resquício de isopropanol que possa ter permanecido.

Posteriormente à centrifugação, a placa foi inserida em um termociclador por 5 minutos a 70°C para secagem. Depois do processo de secagem, foi adicionado à placa 10 μL de formamida *HiDi* em temperatura ambiente e após esta etapa, colocada novamente no termociclador por três minutos a 95°C para reação de desnaturação.

Imediatamente, após o processo de desnaturação, a placa foi colocada em gelo por dois minutos para a realização de choque térmico para finalizar o processo de desnaturação.

Por fim, após o processo de precipitação, a leitura foi realizada utilizando um sequenciador automático de 48 capilares, modelo 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Estados Unidos da América), disponível no Laboratório de Hepatites Virais.

3.12. Análises de Variabilidade, Genotipagem, Filogenia e Filogeografia

As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas, alinhadas e analisadas com o software Mega versão 7 (*The Pennsylvania State University*, Estados Unidos da América) para a determinação dos genótipos. A análise filogenética foi realizada usando o método de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo de substituição *General Time Reversible* (GTR + G (gamma) +I) (definido a partir da ferramenta *Model Selection*), com *bootstrap* de 3000 replicatas⁽¹³⁸⁾. A fim de classificar em subgenótipos, investigar os padrões migratórios e pontos de diversificação entre as amostras brasileiras e de outros continentes, um banco de sequências composto por 75 sequências de VP1-2A de referência disponíveis nas bases de dados internacionais foi montado, contendo tamanhos iguais ou maiores a 345 bp, das quais: 1) 65 sequências pertenciam ao subgenótipo IA, sendo: A) sete de diferentes estados brasileiros; B) cinco de diferentes países do continente africano; C) 19 de países asiáticos; D) sete de diferentes países dos continentes americanos; E) 26 de países do continente europeu; e F) uma sequência da Oceania. 2) Para os demais subgenótipos do HAV, foram selecionadas dez sequências, sendo: A) duas do subgenótipo IB; B) quatro do subgenótipo IIA e uma do IB; C) uma do subgenótipo IIIA e duas do IIIB. Os respectivos números de acesso do *GenBank*, anos, países e subgenótipos das sequências utilizadas neste estudo encontram-se no **Anexo 9.3**.

As análises filogeográficas foram realizadas através da Inferência Bayesiana. Os cálculos do tempo do ancestral comum mais recente (tMRCA) dos nós internos, foram estimados avaliando diversos parâmetros segundo o **Quadro 3.1**, o melhor modelo escolhido foi determinado a partir do maior valor de estimativa de máxima verossimilhança (MLE) (do Inglês *maximum likelihood estimation*).

Quadro 3.1. Paramentos utilizados para análises nos nós internos

Modelo de Relógio Molecular	Distribuição Logarítmica	Modelo de Arvore Filogeográfica
Relaxado	Lognormal	Bayesiana Horizontal Coalescente
Relaxado	Lognormal	Crescimento Exponencial Coalescente
Relaxado	Exponencial	Bayesiana Horizontal Coalescente
Relaxado	Exponencial	Crescimento Exponencial Coalescente

A análise de Cadeia Markov Monte Carlo (MCMC), foi executado por 100×10^6 gerações usando heterogeneidade da taxa distribuída pelo modelo de substituição GTR + G + I, implementada no programa BEAST v1.8.10 ⁽¹³⁹⁾. A convergência da corrida MCMC (avaliada pelos valores de ESS > 200) foi realizada usando o programa Tracer versão 1.7.

Incertezas nos parâmetros foram avaliadas em 95% Alta densidade posterior (HPD do Inglês: *High posterior density*). A árvore de consenso foi estimada pelo programa TreeAnnotator versão 1.6.1 ⁽¹³⁹⁾, sendo editada e analisada utilizando o programa FigTree versão 1.4.4.

4 RESULTADOS

4.1 Descrição dos pacientes

Um total de 264 pacientes com sintomas de hepatite aguda foram encaminhados ao AHV entre o período de 2017 a maio de 2019, dos quais 57 deles possuíam diagnóstico reagente para anti-HAV IgM, representando um total de 21,6% dos casos de hepatite aguda atendidos nesse período. Destes 57 pacientes, 52 possuíam idade igual ou superior a 18 anos e se enquadravam nos demais critérios de inclusão do estudo.

4.1.1 Distribuição Caso/ano

A distribuição por ano dos 52 pacientes com anti-HAV IgM atendidos no AHV entre 2017 a 2019, se deu da seguinte maneira: 13 indivíduos atendidos em 2017, 33 em 2018 e seis pacientes até maio de 2019. O maior número de casos de hepatite A concentrou-se no ano de 2018, como demonstrado pelo.

4.1.2 Distribuição caso/semestre

Quanto à distribuição dos 52 casos por semestre, eles se distribuíram da seguinte forma: em 2017 os casos concentraram-se em sua maioria no segundo semestre do ano (n=12/13); em 2018, um maior número de casos no primeiro semestre (n=22/33); e. Em 2019, todos os casos (n=6) foram recrutados no primeiro semestre do ano. A distribuição de casos/semestres está representada no **gráfico 4.1**.

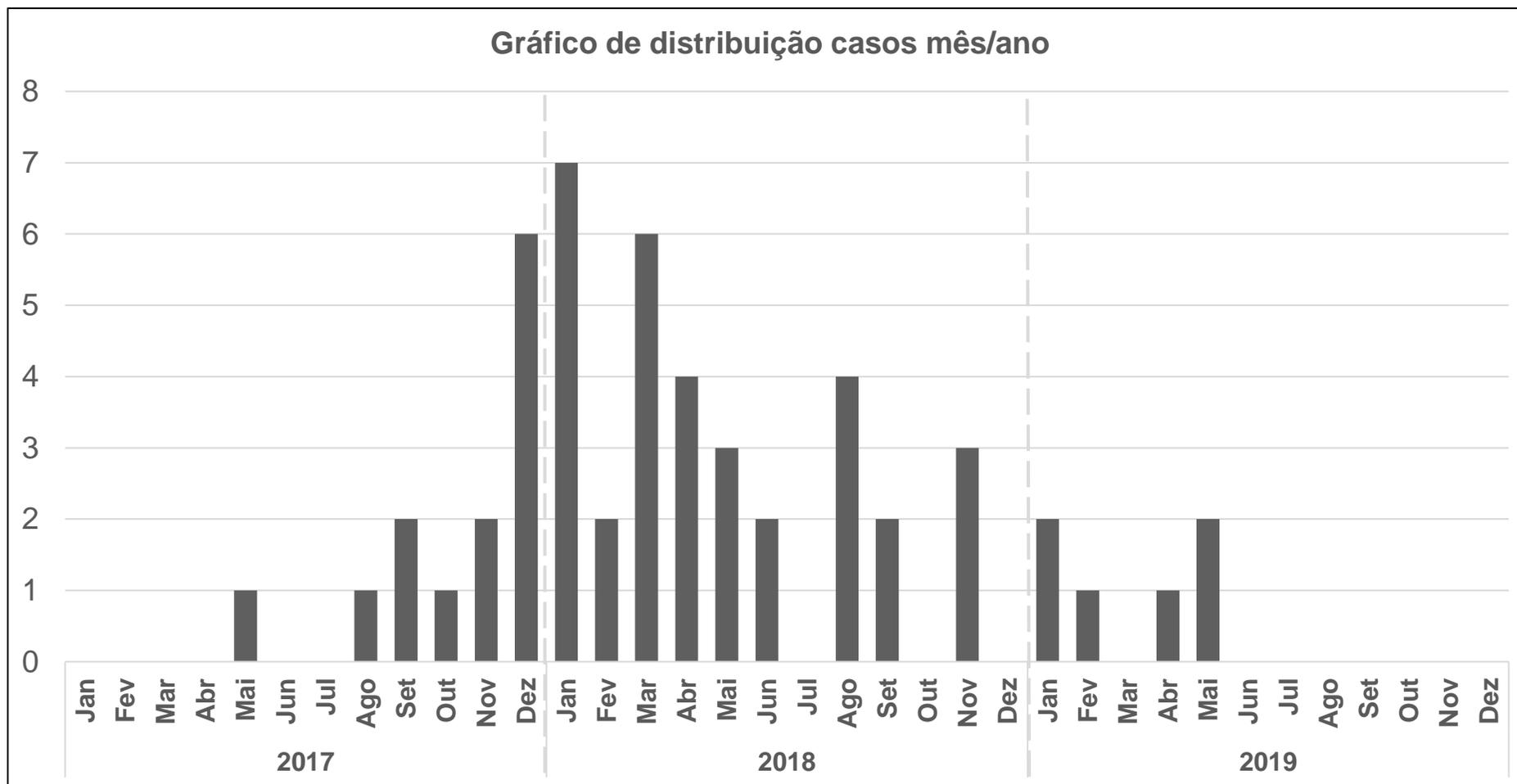


Gráfico 4.1. Distribuição dos casos agudos de HAV atendidos no AHV segundo distribuição mensal.

4.2 Análises das variáveis do estudo

4.2.1 Resultados das variáveis sociodemográficas

A descrição das características sociodemográficas e epidemiológicas da população estudada (n=52) de 2017 a 2019 estão resumidas na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1. Análise de frequência das características sociodemográficas e epidemiológicas dos pacientes com hepatite A aguda (anti-HAV IgM reagente).

Variáveis	N	Frequência (%)
Sexo Biológico		
Feminino	11	(21,1)
Masculino	41	(78,9)
Faixa etária		
20 a 29 anos	24	(46)
30 a 39 anos	20	(38)
40 a 59 anos	7	(13)
60 ou mais anos	1	(2)
Média de Idade	32,1±10,5 (20 a 73 anos)	
Orientação Sexual		
Heterossexual	19	(36,5)
HSH ¹ /MSM ²	33	(63,5)
Cidade		
Rio de Janeiro	47	(89,9)
Duque de Caxias	3	(5,7)
Nova Iguaçu	1	(2,2)
São Gonçalo	1	(2,2)
Zona Geográfica		
Norte	31	(59,6)
Sul	1	(1,9)
Oeste	8	(15,3)
Central	7	(13,4)
Baixada	4	(7,6)
Metropolitana	1	(1,9)

A análise dos dados mostrou que 41/52 (78,9%) dos agudos de HAV pertenciam ao sexo masculino e apenas 11/52 (21,1%) eram do sexo feminino. A razão de sexo/ano variou ao longo dos três anos de estudo com razões de 12:1, 25:8 e 4:2, respectivamente para os anos de 2017, 2018 e 2019.

Para os resultados de idade da população, foi observada uma média de $32,1 \pm 10,5$ (20 a 73 anos). A maioria dos indivíduos (84,61%; 44/52) do estudo concentrou-se na faixa etária entre 20 a 39 anos. Por sua vez, as idades foram categorizadas de acordo com os grupos etários seguindo a classificação do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde ⁽¹⁰²⁾, onde: indivíduos de 20 a 29 anos foram considerados jovens; indivíduos de 30 a 39 anos, adultos jovens; de 40 a 59 anos, adultos; e indivíduos com idade de 60 ou mais anos, foram classificados como idosos. A partir dessa divisão, as análises dos dados mostram que os pacientes infectados por HAV em nossa população encontravam-se em sua maioria nas faixas etárias de jovens (46%; 24/52) e adultos jovens (38%; 20/52) (**Gráfico 4.2**). As análises mostraram também, que esses grupos etários (jovens e adultos jovens) concentraram-se principalmente em 2018, comparados a 2017 e 2019 (**Gráfico 4.3**).

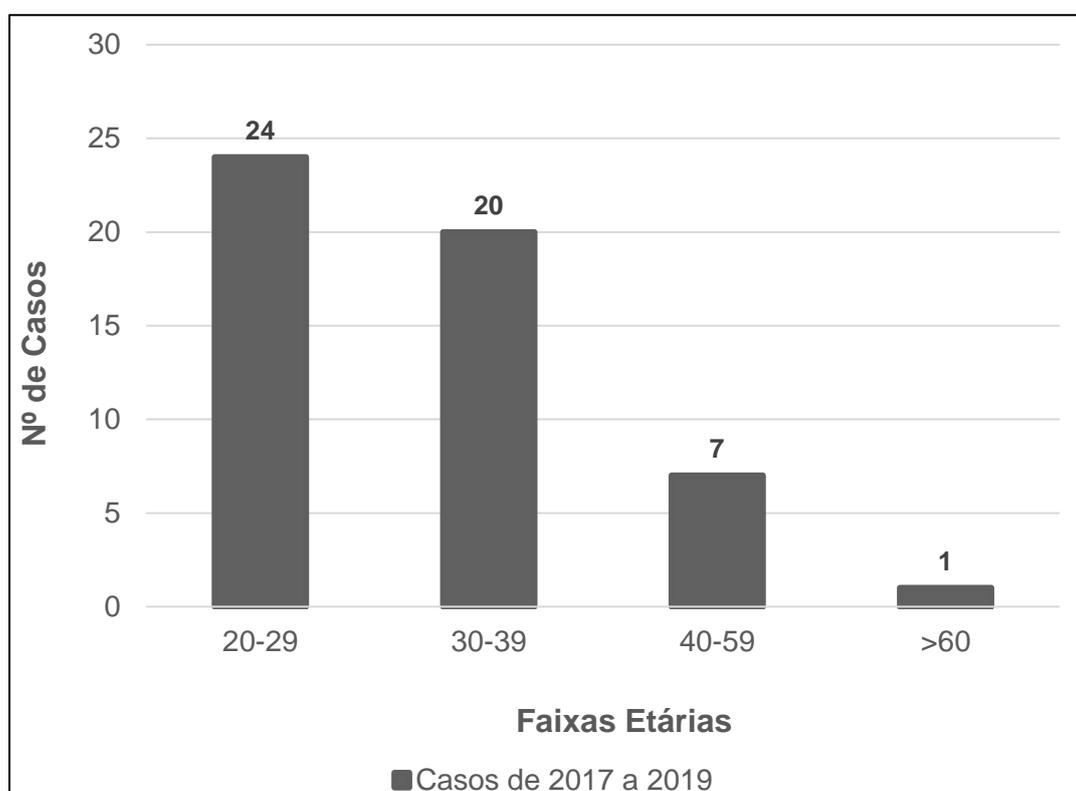


Gráfico 4.2. Total de número de casos segundo de HAV segundo divisão de faixa etárias entre 2017 e 2019.

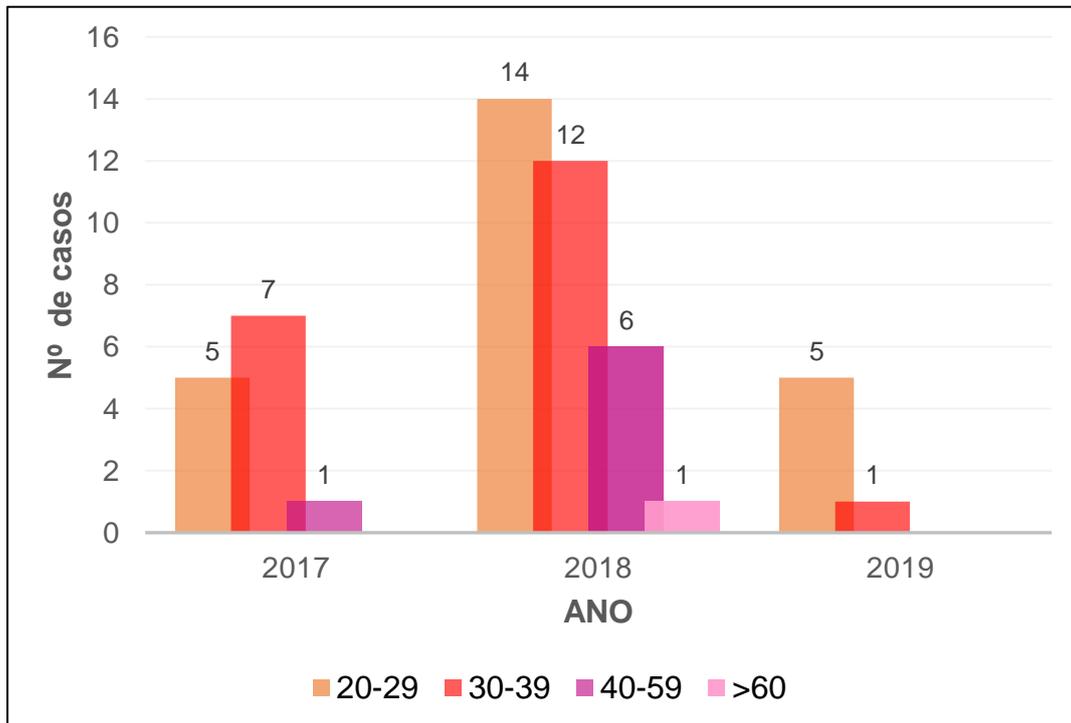


Gráfico 4.3. Distribuição do número de casos de HAV segundo ano/faixa etária

Quanto a orientação sexual, os indivíduos HSH ou MSM representaram a maioria dos casos, já que 63,5% (33/52) pertenciam a este grupo. Entre os 41 indivíduos do sexo masculino, 30 (73%) relataram ser HSH e, entre as 11 mulheres, 3 relataram (27%) ter práticas sexuais com outras mulheres.

A distribuição geográfica desses casos deteve-se principalmente na cidade do Rio de Janeiro, representando 89,9% (47/52) dos casos. Por sua vez, esses casos concentraram-se, majoritariamente, na região norte da cidade, com 31/52 (59,6%), as outras regiões detiveram 15,3% (Zona Oeste), 13,4% (Zona Central) e 1,9% (Zona Sul), respectivamente. A **figura 4.1.** apresenta a distribuição de casos de HAV (anti-HAV IgM reagente) por bairro/zona geográfica.

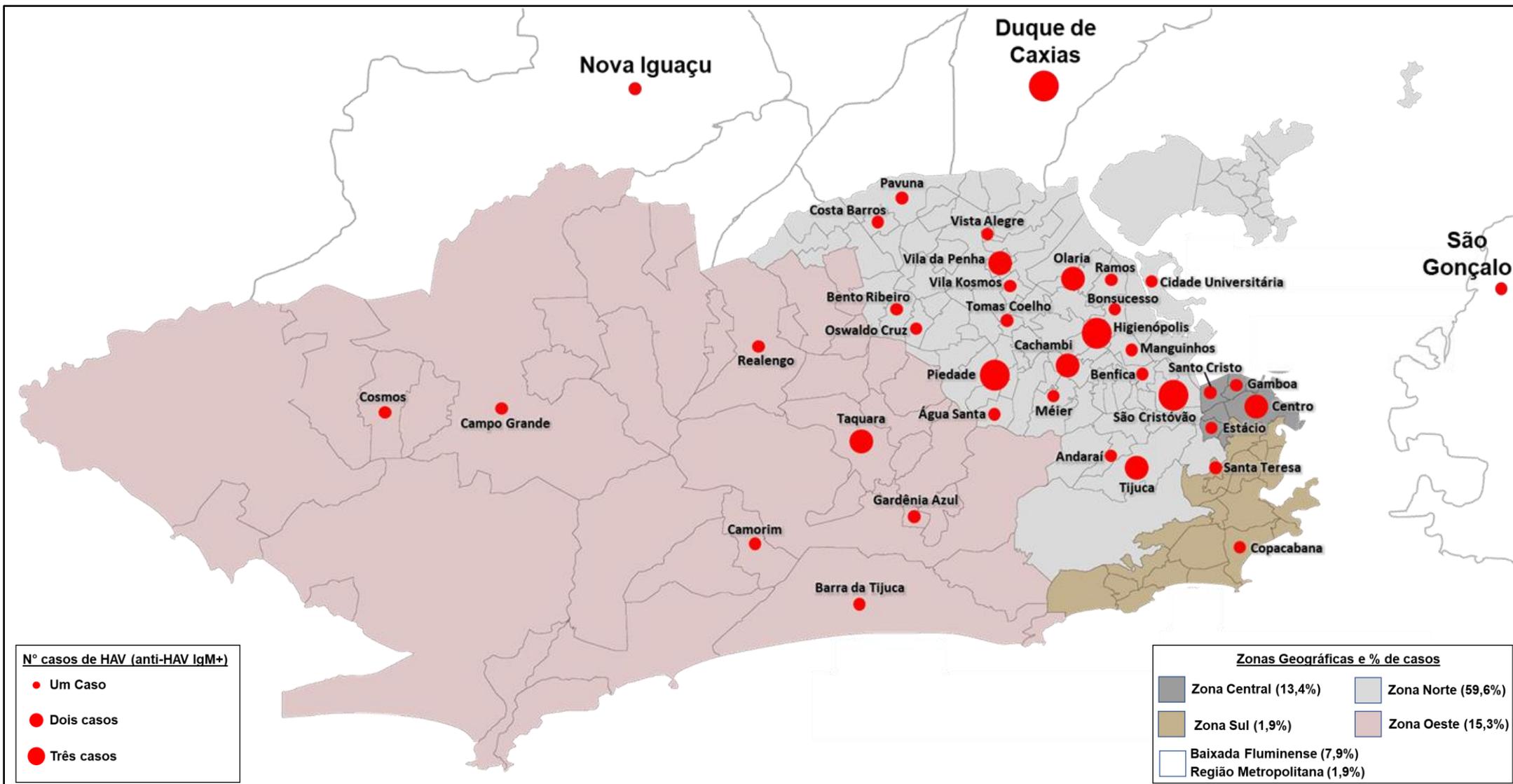


Figura 4.1. Mapa de distribuição de casos de HAV (anti-IgM reagente) segundo bairro/zona geográfica de residência dos pacientes atendidos no AHV.

4.2.2 Fatores de exposição ao vírus da hepatite A

Para o fator parenteral, 65,3% (34/52) dos indivíduos do estudo não apresentou esse fator de exposição. Quando observada de maneira estratificada os resultados desta categoria, nota-se uma menor ocorrência nos diversos tipos de exposição dentro fator parenteral, sendo possível observar todos esses resultados na **Tabela 4.2**

Tabela 4.2. Frequências de fatores de exposição parenteral na população estudada

Fator de Exposição Parenteral	N	Frequência (%)
Remédios Injetáveis		
Não	34	(82,6)
Sim	18	(34,7)
Sem Info ¹	0	
Drogas Inaláveis		
Não	47	(89,9)
Sim	5	(10,1)
Sem Info	0	
Drogas Injetáveis		
Não	52	(100)
Sim	0	
Sem Info	0	
Tatuagens		
Não	46	(88,4)
Sim	6	(11,6)
Sem Info	0	
Piercings		
Não	47	(89,9)
Sim	5	(10,1)
Sem Info	0	
Tratamento dentário		
Não	43	(82,6)
Sim	9	(17,4)
Sem Info	0	
Transfusão de Sangue		

Não	50	(96,1)
Sim	2	(3,9)
Sem Info	0	
Total geral		
Não	34	(65,3)
Sim	18	(34,7)
Sem Info	0	

N= número total de casos; ¹ Sem Info = Sem informações

Já quanto ao fator de exposição alimentar, 53,8% (28/52) dos indivíduos do estudo não apresentou nenhum dos fatores dentro desta categoria. Quando analisados de maneira estratificada, os resultados dessa categoria apresentaram uma baixa frequência nos diversos tipos de exposição dentro fator alimentar, sendo 15/52 (28,8%) para ingestão de carne crua e/ou mal passada; 8/52 (15,4%) para ingestão de vegetais crus; e 4/52 (7,7%) para ingestão de água e poço e/ou cisterna (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3. Frequências de fatores de exposição alimentar na população estudada

Fator de Exposição Alimentar	N	Frequência (%)
Ingestão de carne crua e/ou mal passada		
Não	34	(65,4)
Sim	15	(28,8)
Sem Info	3	(5,7)
Ingestão de vegetais crus		
Não	38	(73,0)
Sim	8	(15,4)
Sem Info	6	(11,5)
Ingestão de água de poço e/ou cisterna		
Não	31	(59,6)
Sim	4	(7,7)
Sem Info	17	(32,7)
Total geral		
Não	28	(53,8)
Sim	22	(42,3)
Sem Info	2	(3,9)

N= número total de casos; ¹ Sem Info = Sem informações

Quanto ao fator de exposição hídrica, 57,6% (30/52) dos pacientes relataram não possuir nenhum fator desta categoria. Os dados de maneira estratificada mostram uma baixa frequência dos diversos tipos de exposição, como ocorrido nos fatores parenterais e alimentar. A maioria dos indivíduos do estudo declaram também possuir abastecimento por água encanada (88,4%; 46/52) e esgoto tratado (88,4%; 46/52) (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4. Frequências de fatores de exposição hídricos na população estudada

Fator de Exposição Hídrico	N	Frequência (%)
Contato com Enchentes		
Não	44	(84,6)
Sim	7	(13,4)
Sem Info	1	(2)
Banho de Praia		
Não	42	(80,7)
Sim	10	(19,3)
Sem Info	0	
Banho de Rio e/ou Lago		
Não	48	(92,3)
Sim	4	(7,7)
Sem Info	0	
Abastecimento por água de poço		
Não	48	(92,3)
Sim	3	(5,7)
Sem Info	1	(2)
Abastecimento por água de cisterna		
Não	47	(89,9)
Sim	2	(3,9)
Sem Info	3	(6,2)
Abastecimento por água encanada		
Não	4	(7,7)
Sim	46	(88,4)
Sem Info	2	(3,9)
Possui esgoto tratado		
Não	4	(7,7)
Sim	46	(88,4)

Sem Info	2	(3,9)
Total geral		
Não	30	(57,7)
Sim	22	(42,3)
Sem Info	0	

N= número total de casos; ¹ Sem Info = Sem informações

Enquanto que para os resultados do fator de exposição sexual, 92,3% (48/52) dos pacientes relataram ter tido pelo menos um tipo de pratica sexual de risco, antes do início das manifestações clínicas e quadro icterico. Pode ser observado na **Tabela 4.5**, os resultados das análises de maneira estratificada por tipo de pratica sexual, onde para a maioria delas, os indivíduos estudados declararam ter algum dos tipos de exposição.

Tabela 4.5. Frequências de fatores de exposição parenteral na população estudada

Fator de Exposição Sexual	N	Frequência (%)
Sexo Oral		
Não	5	(9,6)
Sim	39	(75,0)
Sem Info	8	(15,4)
Sexo Oroanal		
Não	24	(46,1)
Sim	19	(36,5)
Sem Info	9	(17,3)
Sexo anal		
Não	12	(23,1)
Sim	34	(65,4)
Sem Info	6	(11,5)
> de 3 parceiros sexuais		
Não	32	(61,5)
Sim	11	(21,1)
Sem Info	9	(17,4)
Sexo desprotegido		
Não	10	(19,3)
Sim	36	(69,2)

Sem Info	6	(11,5)
Sexual		
Não	2	(3,8)
Sim	48	(92,3)
Sem Info	2	(3,8)

N= número total de casos; ¹ Sem Info = Sem informações

Por fim, a maioria os pacientes estudados, informaram não ter realizado viagens para regiões endêmicas e/ou áreas de surtos (55,7%) ou contato interpessoal com pessoas infectadas por HAV (57,6%) (**Tabela 4.6**).

Tabela 4.6. Frequências à outros fatores de exposição na população estudada

Fator de Exposição	N	Frequência (%)
Viagens p/ regiões endêmicas e/ou áreas de surtos		
Não	29	(55,7)
Sim	15	(28,8)
Sem Info	8	(15,5)
Contato com pessoas infectadas por HAV		
Não	30	(57,7)
Sim	15	(28,8)
Sem Info	7	(13,5)

N= número total de casos; ¹ Sem Info = Sem informações

4.3 Resultados das coinfeções e/ou co-deteções

As análises dos dados mostram que 36,5% (19/52) dos indivíduos apresentavam coinfeções e/ou co-deteções de HAV com HIV; HBV passada (HBVp) [infecção passada com a presença de anticorpo anti-core do vírus da hepatite B de classe IgG (anti-HBc IgG reagente)]; HCV (com pelo menos um dos marcadores, anti-HCV reagente ou HCV RNA, ou ambos presentes); e Sífilis (presença do anticorpo anti-*Treponema pallidum*) (**Diagrama 4.1 e Tabela 4.7**).

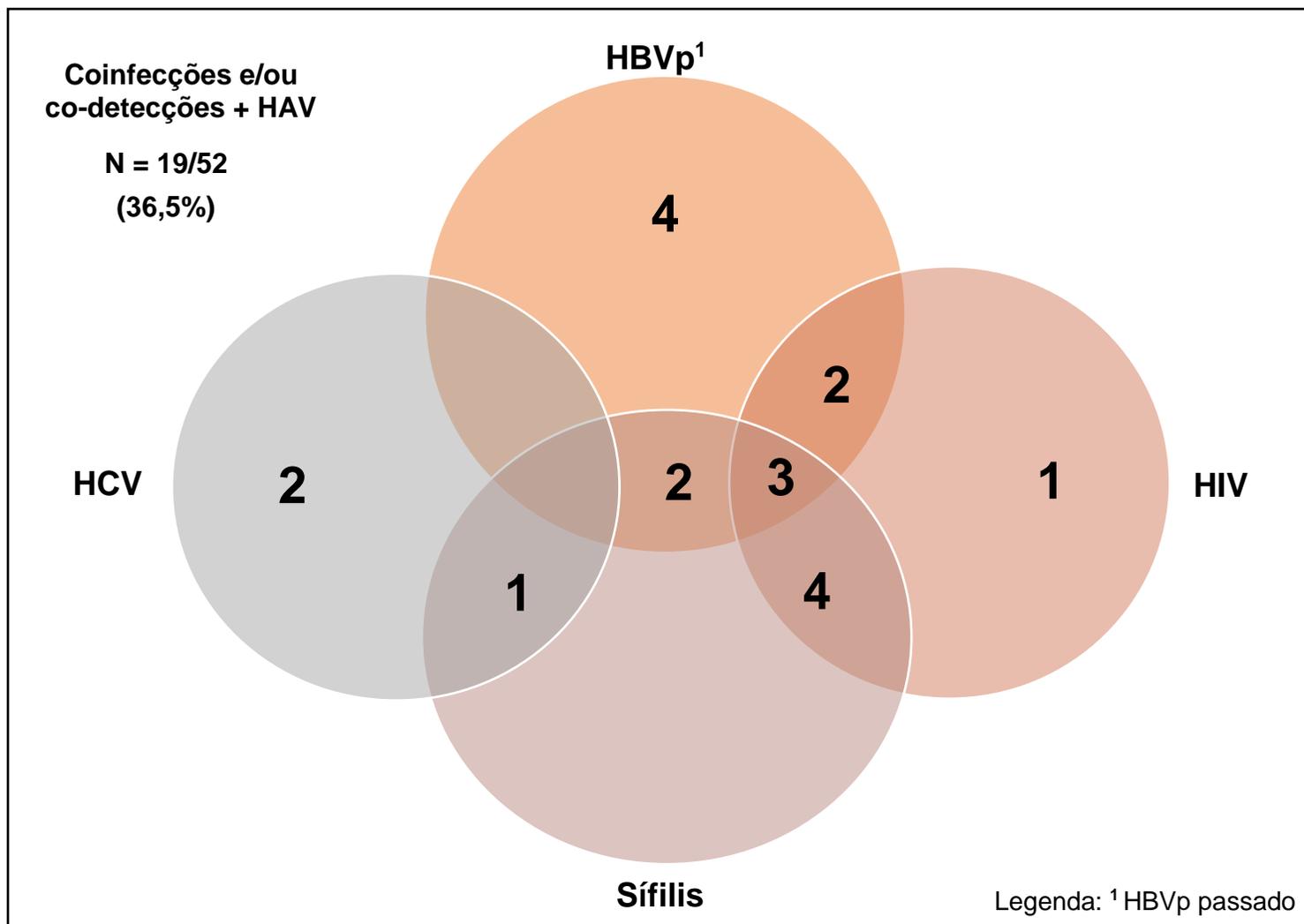


Diagrama 4.1. Diagrama de Venn com os resultados de coinfecções e/ou co-deteccões de HAV e outros patógenos (HBVp, HCV, HIV e/ou Sífilis).

Tabela 4.7. Frequência de coinfeções e/ou co-deteccões de HAV e outros patógenos.

Coinfeções e/ou co-deteccões	N	Frequência (%)
<i>HBVp</i>		
Não	36	(69,2)
Sim	11	(21,1)
Sem Info ¹	5	(9,6)
<i>HBVa</i>		
Não	49	(94,3)
Sim	0	
Sem Info	3	(5,7)
<i>HCV</i>		
Não	46	(88,4)
Sim	3	(5,7)
Sem Info	3	(5,7)
<i>HIV</i>		
Não	35	(67,3)
Sim	10	(19,3)
Sem Info	7	(13,4)
<i>Sífilis</i>		
Não	31	(59,6)
Sim	10	(19,3)
Sem Info	9	(21,1)

¹ Sem info = Sem informações

As coinfeções ocorreram principalmente em indivíduos do sexo masculino, nos quais foram detectados todos os casos de HIV e/ou Sífilis. Apenas 27,2% (3/11) dos pacientes do sexo feminino apresentaram alguma coinfeção e/ou co-deteccão. O **Gráfico 4.4** apresenta os indivíduos que tiverem pelo menos uma coinfeção e/ou co-deteccão com HAV, segundo o sexo biológico.

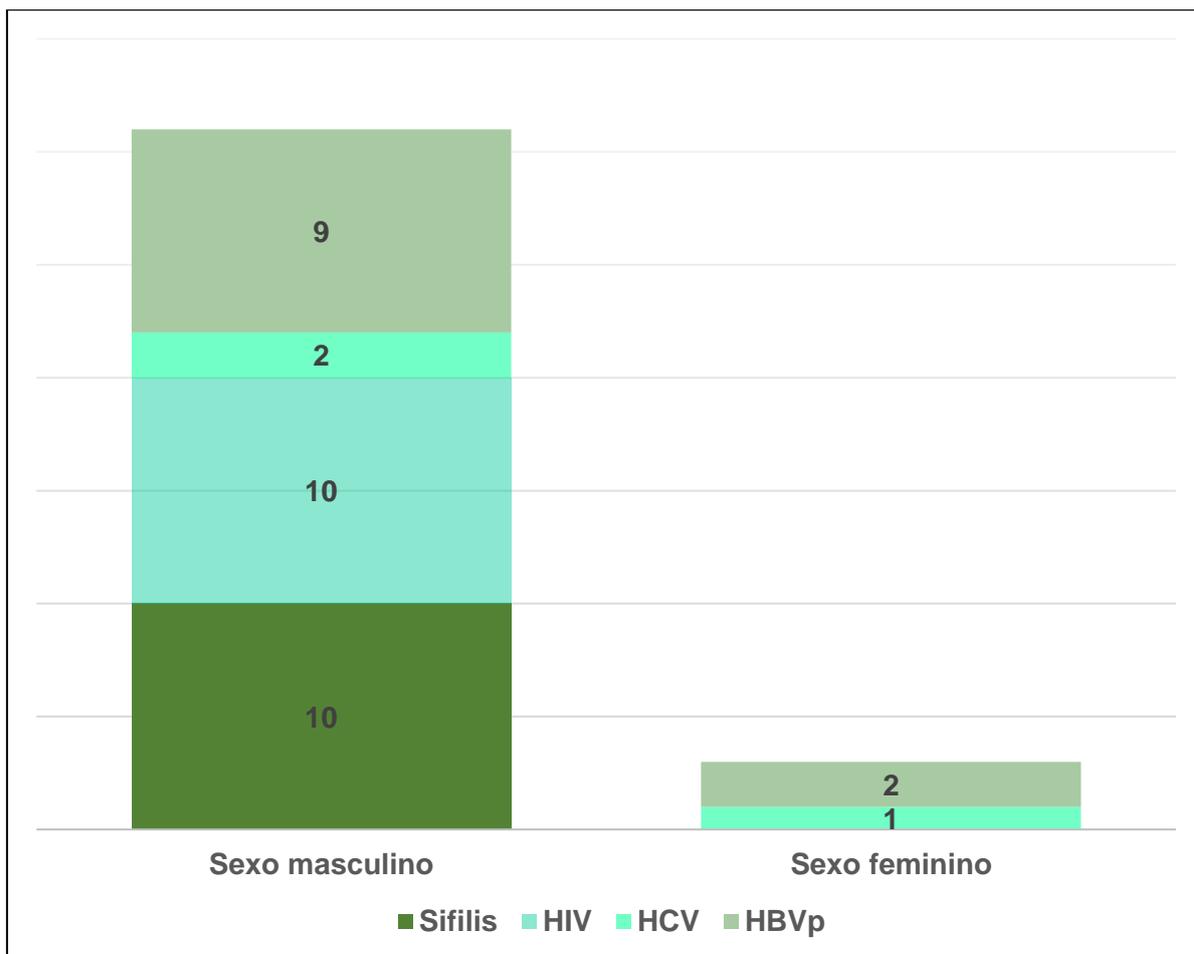
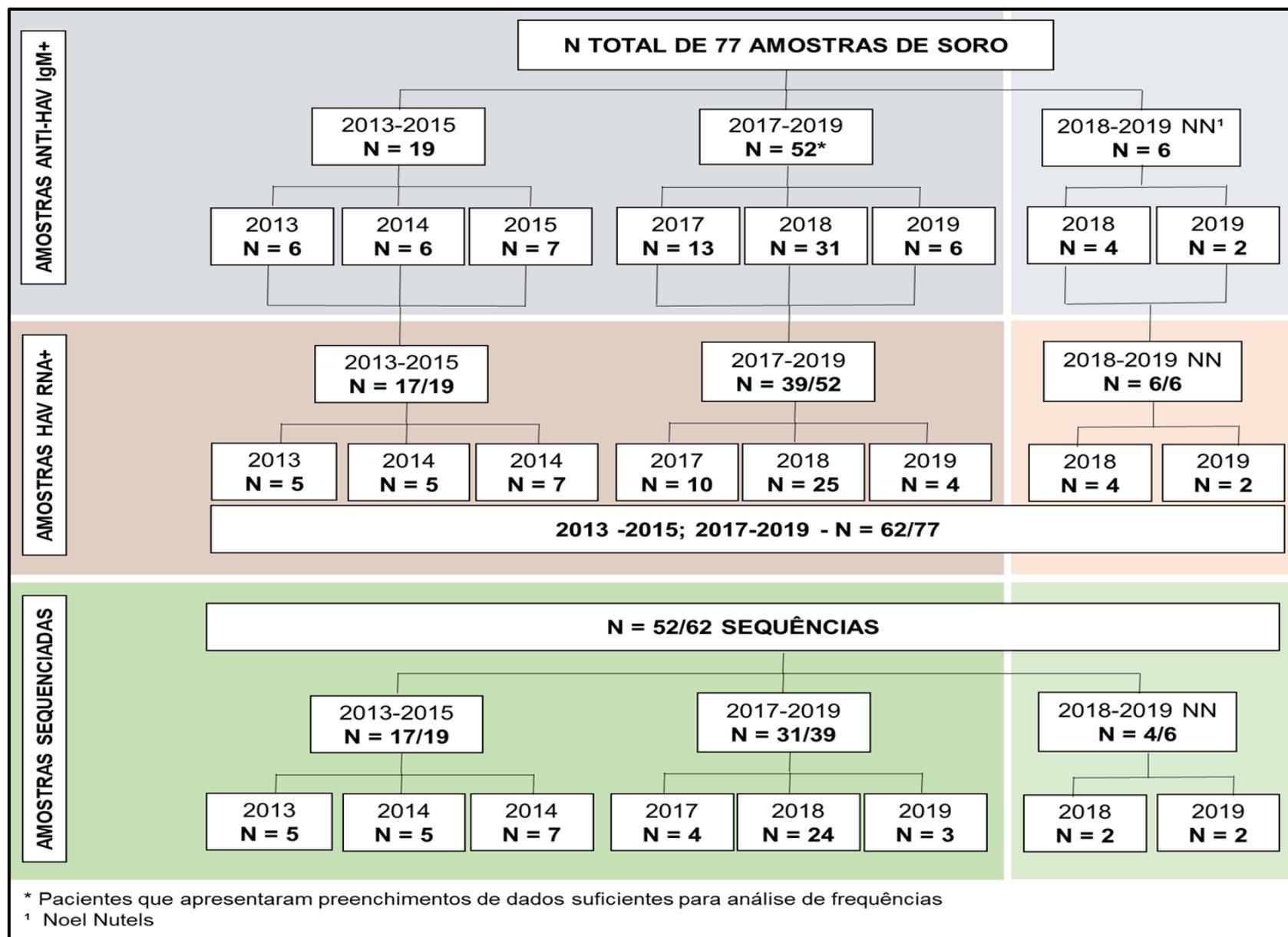


Gráfico 4.4. Número de indivíduos que apresentaram somente uma coinfeção e/ou co-deteção de HAV e outros patógenos segundo sexo.

4.4 Resultados das análises moleculares

4.4.1 Número amostral do estudo

Para as análises moleculares, o estudo foi composto de 77 amostras reagentes para o anticorpo anti-HAV IgM entre 2013-2015 e 2017-2019, sendo possível detectar o RNA do HAV em apenas 62/77 (80,5%). Entre as amostras com RNA detectável, foi possível obter 52/62 (83,8%) sequências através do sequenciamento nucleotídico. O **Fluxograma 4.1** apresenta as amostras utilizadas para as análises moleculares.



Fluxograma 4.1. Esquemática do N amostral do estudo, de acordo com a detecção de anti-HAV IgM, HAV RNA e sequências obtidas nos períodos de 2013-2015 e 2017-2019.

4.4.2 Detecção do RNA viral

Um total de 19 amostras foram selecionadas entre 2013 e 2015 para análises comparativas, sendo 6 do ano de 2013, 6 de 2014 e sete referentes ao ano de 2015. Não foi possível obter amostras HAV IgM+ do ano de 2016. Todas foram submetidas à amplificação do genoma viral pela técnica de RT-PCR, com RNA do HAV sendo detectado com sucesso em cinco amostras de 2013, cinco amostras do ano de 2014. Já para o ano de 2015, todas as amostras testadas tiveram o genoma viral detectado, totalizando 17 amostras com HAV RNA reagente entre 2013-2015.

Entre as 52 amostras obtidas dos pacientes dos anos 2017-2019, foi possível detectar RNA do HAV em 75% (39/52). Todas as seis amostras cedidas pelo LACEN-RJ tiveram o RNA do HAV detectados, totalizando assim 45 amostras detectadas entre 2017 e 2019. Assim, considerando o total de amostras obtidas de pacientes do Rio de Janeiro no período do surto (entre 2017-2019; n=45), somado às amostras de anos anteriores (2013-2015; n=17), o presente estudo conta com um *N* amostral de 62 amostras para as análises moleculares, onde o HAV RNA foi detectado com sucesso.

4.4.3 Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética

Com a detecção do RNA do HAV nas 62 amostras de soro (cinco de 2013, cinco 2014, sete de 2015 e 45 de 2017 a 2019) foi possível realizar o sequenciamento nucleotídico de 83,8% (52/62) delas. A análise filogenética do fragmento genômico amplificado mostrou que todas as amostras pertencem ao genótipo IA (**Figura 4.2**). Isso pode ser melhor observado através da árvore filogenética, que foi composta por sequências obtidas neste estudo e por sequências representativas do genótipo IA de diversos surtos de hepatite A ocorridos ao redor do mundo (**Figura 4.3**), além de amostras circulantes endemicamente no Brasil. Todas as amostras de 2015 e duas amostras de 2017 já se encontram publicadas em um estudo prévio realizado por nosso grupo ⁽¹⁰⁹⁾ e disponíveis no Genbank (número de acesso sequências 2015: MK170460 a MK170466; sequências 2017: MK170458 e MK170459).

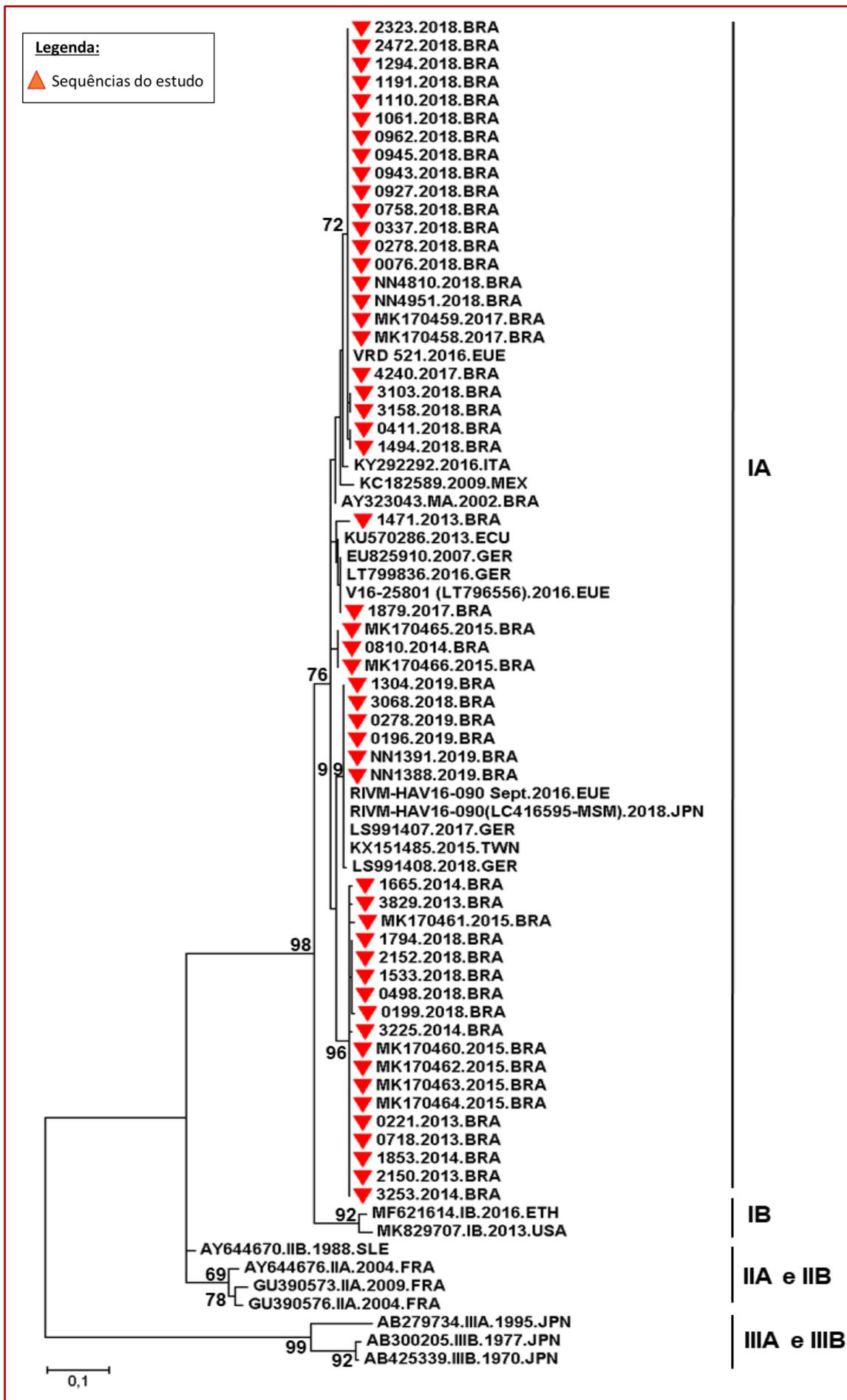


Figura 4.2. Árvore filogenética comparativa composta por sequências dos diversos subgenótipos do HAV (IA, IB, IIA, IIB, IIIA e IIIB). Em destaque com triângulos vermelhos as sequências do estudo, as demais (sem marcação) sequencias de referencia

As análises mostram que as amostras sequenciadas (2013 a 2015 e 2017 a 2019) se agrupam em quatro grandes clados distintos (nomeados de 'Clado I a IV'). Para melhor análise e compreensão desses dados, classificamos estes clados em: A) clados epidêmicos (todas as amostras que agruparam-se com estirpes virais de surtos recentes que acometeram principalmente os continentes Europeu e Asiático), os quais contemplam os clados I, II e III; B) e clado endêmico (todas as amostras que agruparam-se com estirpes virais não relacionadas aos recentes surtos e com relação filogenéticas com estirpes virais previamente circulantes no Brasil), sendo incluído nessa última classificação o clado IV. O **Quadro 4.1** representa as distâncias genéticas intra-clado, onde se pode observar a identidade genética entre as estirpes virais circulantes (estirpes relacionadas aos surtos Europeu/Asiático e/ou estirpes já circulante no Brasil) e as sequencias analisadas no estudo. Já o **Quadro 4.2**, apresenta a comparação de variabilidade genética entre os quatro clados (endêmico e epidêmicos).

Quadro 4.1. Distâncias genéticas intra-clado.

Clados	Distancia Genética entre as sequencias do clado	Desvio Padrão
Clado I	0,001	±0,001
Clado II	0,001	±0,001
Clado III	0,004	±0,002
Clado IV	0,002	±0,002

Quadro 4.2. Distâncias genéticas entre os clados endêmicos (I, II, III) e epidêmicos (IV).

Clados Comparados	Distancia Genética entre os Clados	Desvio Padrão
Clado I x Clado II	0,036	±0,012
Clado I x Clado III	0,041	±0,012
Clado I x Clado IV	0,036	±0,012
Clado III x Clado IV	0,052	±0,014
Clado III x Clado II	0,038	±0,011
Clado IV x Clado II	0,039	±0,012

Os clados I, II e III representam os clados epidêmicos. As análises filogenéticas mostraram que 53,8% (28/52) das sequências dos anos 2017 a 2019 do nosso estudo distribuíram-se entre esses três clados.

Nos clados I e II houve o agrupamento de amostras sequenciadas neste presente estudo. No Clado I, ocorreu presença predominante de sequências do ano de 2019 (n=5) e uma de 2018. Nossas sequências se agruparam principalmente com estipes virais de surtos que acometeram os continentes Europeu (RIVM-HAV16-090_Sept.EUE) e asiático (RIVM-HAV16-090.JPN), tendo 100% de identidade de nossas amostras com amostras desses surtos. Quanto ao clado II, apenas uma sequência de 2017 agrupou-se a ele. Este clado contém uma estirpe viral encontrada com menor frequência nos surtos europeus, a V16-25801. Entre si, essas estipes tiveram uma identidade genética de 99,99%.

Conforme mostrado na árvore filogenética, nossas sequências se agruparam principalmente com a estirpe relacionada aos surtos Europeus, a VDR_521_2016. Neste clado, denominado Clado III, agruparam-se 44,2% das nossas sequências (23/52), sendo elas principalmente de 2018 (n=20) e três de 2017 (duas previamente publicadas por Mello et al 2019). Além disso, agrupou-se ao Clado III uma sequência representativa do surto que ocorreu na cidade de São Paulo em 2017. Por meio das análises, foi estimada uma identidade genética de 99,99% entre nossas sequências e a sequência do surto.

Quanto ao clado endêmico, ou Clado IV, notou-se a predominância de sequências de 2013 (n=4), 2014 (n=4) e 2015 (n=5) (estas últimas, amostras previamente publicadas por Mello et al, 2019). Além das sequências de 2013 a 2015, houve agrupamento de algumas sequências de 2018 (n=5). Já quanto a identidade genética desse clado, a análise mostrou que as sequências possuem 99,99% de semelhança entre si. O Clado IV aproximou-se a um clado composto de amostras brasileiras pertencentes a 2002. A árvore filogenética mostrou também, que ambos os clados (Clado IV e sequências do Brasil 2002) possuem ancestral comum, tendo sua origem em um mesmo nó. As análises de identidade genética mostraram que esses clados possuem 99,97% de similaridade.

O mapa representa a distribuição das estirpes virais por bairro e zona geográfica da Cidade do Rio de Janeiro, afim de mostrar a dispersão e detecção dessas estirpes (**Figura 4.4**)

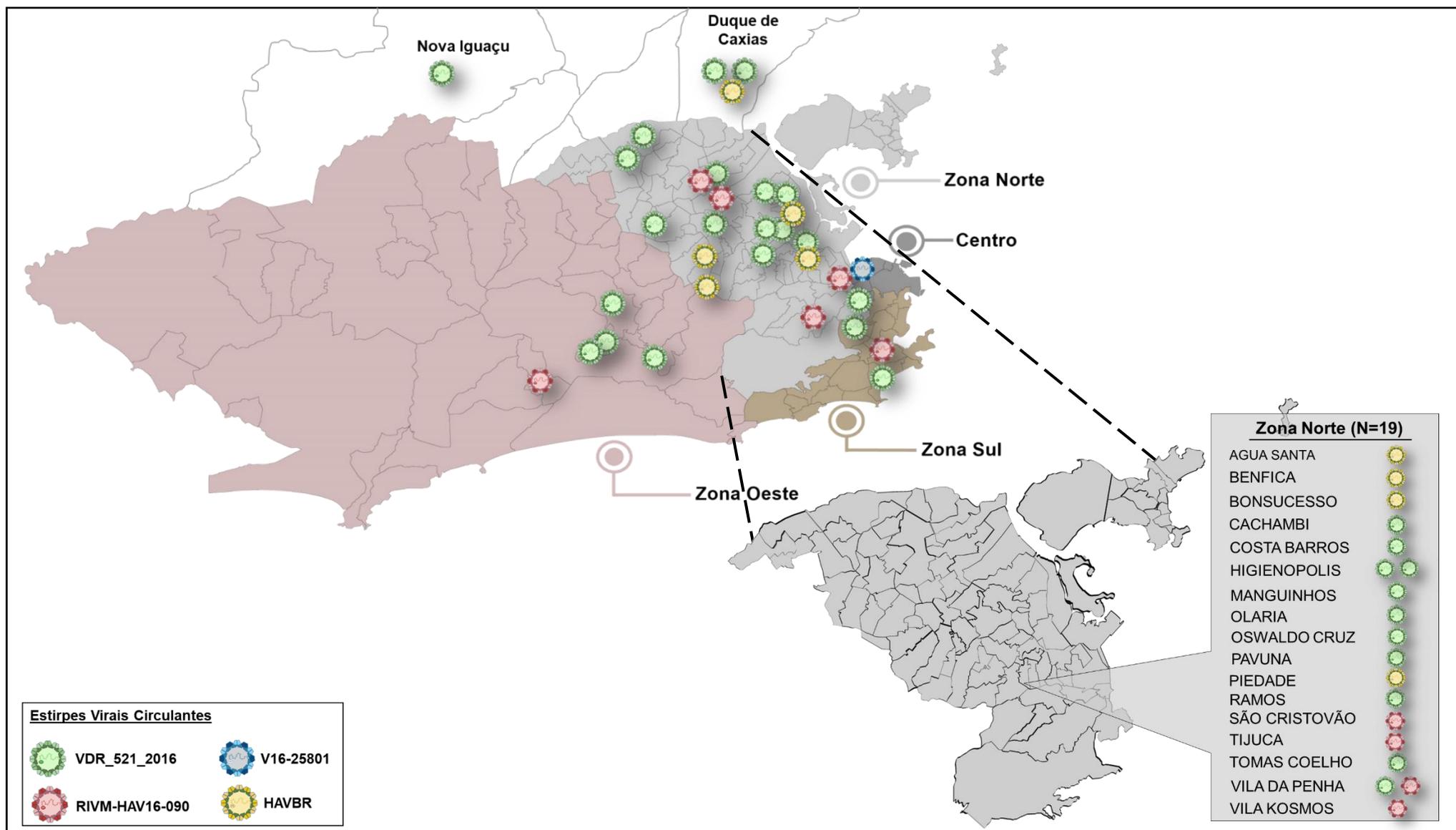


Figura 4.4. Mapa da Cidade do Rio de Janeiro com distribuição das estirpes virais encontradas no estudo segundo bairro/zona geográfica da Cidade do Rio de Janeiro. Em destaque a Zona Norte (no lado inferior direito), região onde foram encontrados a maiorias das estirpes detectadas.

4.4.4 Análise Filogeográfica por Inferência Bayesiana

A partir de um banco composto por 90 sequências do genótipo IA, foi possível estimar que o melhor modelo utilizado para calcular os nós internos, foi o modelo de relógio molecular relaxado lognormal não correlacionado (com maior valor de estimativa de máxima verossimilhança (MLE). A partir disso, foi possível estimar a taxa média de substituição de nucleotídeos, que foi de $1,05 \times 10^{-5}$ substituições/sítio/ano (95% HPD, $4,88 \times 10^{-4}$ a $1,55 \times 10^{-3}$). Mesmo com o pouco tempo desde o início dos surtos europeus/asiático, foi possível inferir o tempo de introdução das estirpes relacionadas a esses surtos (VDR_521_2016; RIVM-HAV16-090_Sept.EUE e RIVM-HAV16-090.JPN; V16-25801) no Brasil e sua possível rota de dispersão.

De acordo com a análise Bayesiana a rota mais plausível do VRD_521_2016 para o Brasil foi através da Europa ocidental, tendo uma probabilidade posterior (*pp* do Inglês “*posterior probability*”) de 0,99. Apesar da incerteza sobre o país de origem de introdução das sequências brasileiras (*pp*: 0,52), nossa análise sugere que os isolados dessa estirpe viral podem ter sido introduzidos no Brasil através da Espanha entre o final de 2016 e o início de 2017. Além disso, conseguimos estimar a raiz do clado, com possível origem no ano de 2013 na Itália (*pp*: 0,99).

Quanto às demais estirpes RIVM-HAV16-090 Europeia e a Asiática e V16-25801, nossas análises sugerem que ambas possam ter sido introduzidas no Brasil por meio da Alemanha com *pp*: 1,00 e *pp*: 0,88, respectivamente. Para as estirpes RIVM-HAV16-090 Europeia e a Asiática, os prováveis anos de introdução no país foram o segundo semestre de 2014 e início de 2015, com provável origem em 2011. Já a estirpe V16-25801, foi possivelmente introduzida em nosso país no segundo semestre de 2015 e início de 2016, com sua provável origem no ano de 2000 (*pp*: 0,97). Pelas nossas análises, não foi possível elucidar a origem dos estirpes endemicamente circulantes no Brasil (**Figura 4.5**).

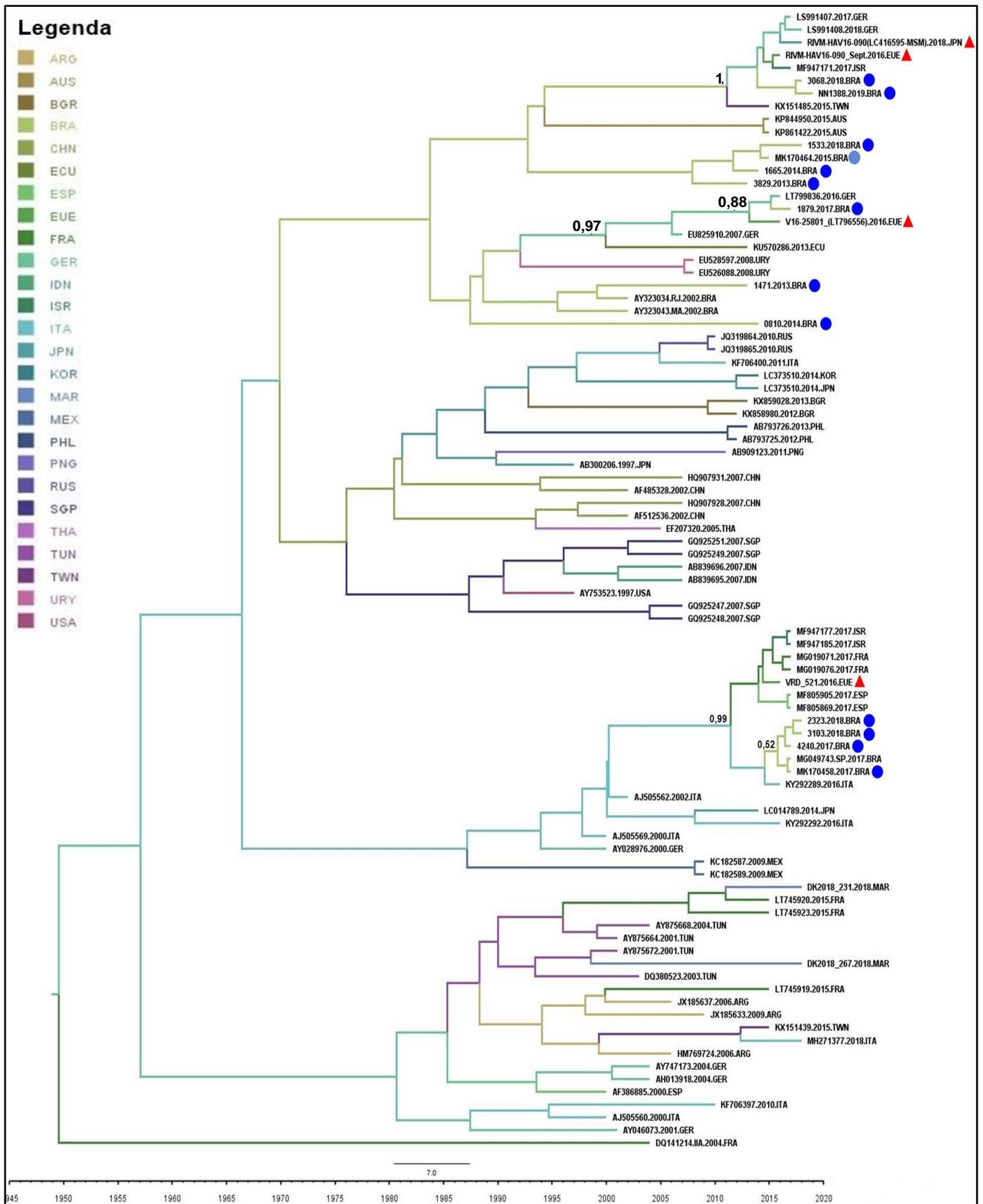


Figura 4.5. Árvore Bayesiana espaço-temporal do vírus da hepatite A. Os ramos são coloridos de acordo com a localização mais provável de seus nós descendentes (países). As estirpes virais relacionadas aos Europeus/Asiáticos estão marcadas com (▲). As sequências do estudo (●). O código de cor é indicado na legenda superior esquerda. ARG=Argentina; AUS=Austrália; BGR=Bulgária; BRA=Brasil; CHN=China; ECU=Equador; ESP=Espanha; EUA= União Europeia; FRA=França; GER=Alemanha; IDN=Índia; ISR=Israel; ITA=Itália; JPN=Japão; KOR=Coréia do Sul; MAR=Marrocos; MEX=México; PHL= Filipinas; PNG=Papua Nova Guina; RUS=Rússia; SGP=Singapura; THA=Tailândia; TUN=Tunísia; TWN=Taiwan; URY=Uruguai; USA=Estados Unidos da América.

5 DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, diversos estudos têm mostrado a mudança do perfil, epidemiológico da infecção pelo HAV, de modo que, atualmente, vemos em diversos países indivíduos jovens/adultos como o grupo mais acometido pela doença ^(104, 140-143). Essa mudança pode estar diretamente relacionada ao aumento do investimento nos programas de vacinação infantil ^(104, 141, 144, 145), bem como a melhorias nas condições socioeconômicas e sanitárias em alguns desses países, como no Brasil ^(105, 106, 143, 145).

No Brasil, apesar do declínio observado na última década, foi observado nos últimos três anos um aumento do número de casos notificados de infecção por HAV ^(102, 107), onde a prática sexual é apontada como possível mecanismo de transmissão e relacionada a esse aumento. Para isso, o presente estudo tenta elucidar esta via de transmissão que pode estar relacionada ao aumento no número de casos de HAV na cidade do Rio de Janeiro.

Por meio dos dados, foi possível observar a distribuição geográfica dos casos segundo zona geográfica e bairros e nota-se que tiveram casos de HAV nas quatro principais regiões da cidade do Rio (Norte, Sul, Oeste e Central), notando-se também casos em São Gonçalo (Metropolitana), Duque de Caxias e Nova Iguaçu (Baixada). Entretanto, destaca-se a Zona Norte da Cidade, que por sua vez, deteve a maioria dos casos/pacientes infectados com HAV. Isso pode ser efeito desta zona geográfica ser área mais populosa da capital, tendo a maior densidade demográfica (10.189 habitantes/km²) da cidade do Rio de Janeiro ⁽¹⁴⁶⁾. Essa densidade populacional pode ter sido um fator relevante para a disseminação do HAV nessa região da cidade. Sabe-se segundo a literatura, que grandes aglomerações podem facilitar a disseminação de patógenos ^(36, 143, 147). Entretanto, o fato da Fiocruz estar localizada na mesma região pode ter contribuído para o maior número de casos atendidos da Zona Norte.

Os resultados obtidos mostraram que a maioria dos indivíduos da população estudada que apresentaram infecção pelo HAV foram do sexo masculino (78,9%; 41/52), onde os anos de 2017 e 2018 apresentaram a maior proporção de homens. A proporção dos casos de HAV reportados nos boletins de notificação do Ministério da Saúde entre o sexo masculino e sexo feminino até 2016 não ultrapassou de 1.3 homens. Porém, em 2017 e 2018 esta proporção aumentou chegando a 2,7 ⁽¹⁰²⁾.

Entretanto, as razões para este aumento ainda não estão muito claras. Todavia, pode estar associada a práticas sexuais eventualmente mais comuns entre homens, entre outros fatores.

Quanto à faixa etária de infecção, foi possível observar uma concentração maior de número de casos nas faixas etárias de 20 a 29 anos (46%; 24/52) e 30 a 39 anos (38%; 20/52). Esse resultado é semelhante ao observado nos dois últimos boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde ⁽¹⁰²⁾. Essa faixa etária de exposição também vem sendo mostrada nos surtos em HSH que acometeram a Europa e Estados Unidos ^(75, 78, 101). Ortega e colaboradores em um estudo epidemiológico realizado entre 2007 e 2017 em Andaluzia, Espanha, também mostram dados semelhantes ao encontrado em nosso estudo. Ortega observou que as faixas etárias acometidas pelo HAV foram principalmente adultos jovens de 20 a 49 anos ⁽¹⁴⁸⁾. É possível que as faixas etárias mais acometidas em nosso estudo (adultos jovens de 20 a 39 anos), estejam relacionadas a suscetibilidade desses indivíduos, uma vez que os mesmos não apresentam imunidade natural ou vacinal, tanto por não terem sido contemplados pela vacinação, incluída somente em 2014 no calendário infantil, quanto por não terem tido contato com o vírus durante a infância, principalmente pela melhoria das condições sanitárias do Brasil.

Sabe-se que a transmissão por meios hídricos e alimentares são fatores principais para a aquisição da infecção pelo HAV ⁽³⁶⁾. Entretanto, quando se observa os dados obtidos, a maioria dos indivíduos declarou não ter nenhum tipo de exposição a fatores hídricos (57,6% dos casos) e alimentares (53,8% dos casos), reforçando a presença de outros mecanismos de transmissão. Outros trabalhos já mostram que o contato interpessoal (pessoa-a-pessoa) pode ser um fator determinante em ambientes intradomiciliares em alguns surtos ^(69, 78) do que relacionados a fatores hídricos. Nossos achados sugerem que o fator hídrico não foi determinante para infecção dos indivíduos do nosso estudo, sendo, possivelmente, o contato interpessoal mais relevante na aquisição nesta população estudada.

Quanto ao fator parenteral, podemos observar uma frequência maior de indivíduos que não se expuseram a esse fator em nossa população (65,3%). Estudos relatam que a transmissão de HAV pode ocorrer pela via parenteral, principalmente pela transfusão de sangue e uso de drogas injetáveis, contudo ocorre de forma mais rara ^(36, 68, 81).

Em contrapartida, é importante destacar que 92,3% declararam possuir algum tipo de exposição sexual de risco. Quando observamos de maneira estratificada, verificamos que as categorias dentro do fator sexual, representaram uma elevada frequência de declarações positivas principalmente para o sexo oral (75%) e o sexo anal (65,3%). Um estudo realizado por Rodríguez-Tajes e colaboradores em 2017, mostrou que o sexo oral foi um fator importante na aquisição da infecção por hepatite A em indivíduos em Barcelona ⁽¹⁴⁹⁾. Em outro estudo realizado em 1995 por Henning e colaboradores em Nova Iorque, foi demonstrado também que além do sexo oral, o sexo anal foi um fator para infecção dos indivíduos estudados ⁽¹⁵⁰⁾. Possivelmente, os indivíduos tiveram contato direto com regiões com fezes infectadas no momento do ato sexual, levando ao contato direto com o vírus. Esse fato sugere que essas duas práticas possam ter tido um papel relevante na aquisição da infecção nos indivíduos estudados, mostrando que os fatores sexuais podem ser importantes vias de transmissão.

Por meio da coleta de dados dos prontuários, observou-se que a grande maioria (63,5%) desses indivíduos eram HSH/MSM. É importante destacar que 73% (30/41) dos indivíduos do sexo masculino relataram ser HSH, esse mesmo perfil foi observado nos surtos que ocorreram na cidade de São Paulo e em surtos em países europeus ^(75, 109). Apesar da orientação sexual ser um fator relevante no aumento de casos de hepatite A na população estudada, é importante enfatizar que a transmissão por práticas sexuais está mais relacionada com contato oral-anal (sexo oroanal) do que com a orientação sexual propriamente dita, uma vez que essas práticas são também realizadas por indivíduos heterossexuais ⁽⁸⁾. Apesar de ambos os sexos e orientações sexuais relatarem as mesmas práticas sexuais, estudos realizados Breyer e colaboradores em 2010 e por Goethe e colaboradores em 2018, mostram que algumas práticas sexuais (como sexo oral e anal receptivas e insercionais) são mais comuns em indivíduos HSH do que em heterossexuais e MSM ^(151, 152). Isso reforça que a orientação sexual pode ter sido um fator importante na aquisição da infecção nos indivíduos do nosso estudo.

Existem algumas limitações deste trabalho, uma delas é a ausência de dados sociodemográficos de um grupo controle para avaliar a associação dos fatores de risco de infecção ao HAV, impossibilitando a realização de análises estatísticas mais acuradas. Outra limitação foi decorrente da falta de preenchimento ou omissão de informação por parte do paciente, uma vez que vemos uma proporção muito maior de

dados não informados na categoria de exposição sexual quando comparadas às demais categorias. Contudo, vale destacar que apesar destas limitações, as informações aqui obtidas, através de descrição de frequências, podem contribuir para um melhor entendimento dos fatores relacionados aos recentes surtos de HAV em adultos no Brasil e no mundo.

Outro dado relevante a ser levado em consideração foram as co-deteccões/coinfecções com outras ISTs como HBV, HCV, HIV e/ou Sífilis. Destaca-se que a 36,5% dos indivíduos possuíam pelo menos um co-deteccão/coinfecção com outros patógenos sexualmente transmissíveis. Esse fato pode estar relacionado a alta taxa de sexo desprotegido em nossa população (69,2%), reforçando ainda mais que as práticas sexuais podem estar relacionadas a transmissão do HAV em nossa população. Diversos estudos, como feito por Rivas e colaboradores em 2017 e por Rodríguez-Tajes e colaboradores em 2017, relataram em seus resultados a coinfecção de HAV com HBV, HCV, HIV e ou Sífilis ^(77, 149). A deteção de coinfecções com outras ISTs, sugere alta incidência de sexo desprotegido, evidenciando a exposição dos participantes por esta via. Além disso, sabe-se que, a coinfecção por HIV pode exacerbar a lesão hepática associada ao HAV e prolongar seu período de excreção fecal ^(153, 154), aumentando o período de infecciosidade e conseqüentemente o risco de transmissão ^(75, 141).

O RNA do HAV foi detectado com sucesso em 75% das amostras. A análise filogenética, realizada para as 43/62 amostras sequenciadas, mostrou que todas pertencem ao genótipo IA. Esse dado corrobora com estudos já realizados em nosso país, que mostra que o principal genótipo circulante no território brasileiro e nas Américas são de estirpes virais do genótipo IA ^(48, 124, 155).

Foi demonstrado também três cladogramas monofiléticos onde nossas sequências se agruparam com as dos surtos de HSH na Europa/Ásia, demonstrando a circulação dessas estirpes epidêmicas (VRD_521_2016; RIMV-HAV16-090_Sept-2016 Europeia e RIMV-HAV16-090 Japonesa; e V16-25801) no Rio de Janeiro. As análises também mostraram que a estirpe viral mais encontrada em nossas amostras foi a VRD_521_2016 (44,2%), seguida da RIMV-HAV16-090_Sept-2016 Europeia e RIMV-HAV16-090 (11,5%) Japonesa e com menor frequência, o aparecimento da V16-25801 (1,9%). Isso também foi observado durante os surtos no continente europeu, onde as sequências predominantemente encontradas foram VRD_521_2016 (56,2%

dos casos sequenciados), seguida da RIMV-HAV16-090_Sept-2016_Europeia (35,4% dos casos sequenciados) e em menos frequência a V16-25801 (8,2% dos casos sequenciados) ^(75, 101). Isso nos indica uma elevada circulação dessas estirpes virais em nossa população, principalmente VRD_521_2016. É importante destacar aqui, que foi observado também a co-circulação de estirpes já identificadas (endêmicas) antes no Brasil por de Paula et al, 2006, que entretanto, em menor número. Isso reforça ainda mais que a introdução e disseminação de estirpes virais importadas possam estar relacionadas com o aumento do número de casos na cidade do Rio de Janeiro e no Brasil como um todo.

Apesar de estarem classificadas no subgenótipo IA, as estirpes virais encontradas possuem divergências genéticas e histórias evolutivas distintas. Nossas análises evidenciaram essas diferenças de maneira clara, uma vez que nossas amostras se agruparam com essas estirpes virais em clados distintos, amparados por altos valores de *bootstrap* (Clado I = 98; Clado II = 94; Clado III = 51 e 42; Clado IV = 88). Apesar disso, para se estudar a história evolutiva viral, obtendo-se padrões de divergência mais acurados, seria ideal o sequenciamento do genoma viral completo dessas variantes.

Quando observa-se cada clado de forma individualizada, foi possível observar que, dentro dos Clado I e II, as sequências são 99,99% similares, podendo ser consideradas expansões clonais de um único ancestral. Para o clado III essa identidade permeia 99,96%, onde pode-se observar que quatro sequências formam um sutil sub-clado, indicando o início de uma possível diferenciação das atuais estirpes epidêmicas. Esse fato, se verdadeiro, possivelmente poderá ser observado em uma diferenciação a longo prazo.

Estudos descrevem que as estirpes virais endêmicas, que já circulam comumente em uma determinada região/local estão relacionadas principalmente a casos esporádicos e infecções comunitárias. Esses mesmos estudos também ressaltam que novas variantes virais introduzidas nesses locais, podem ser responsáveis por novos surtos em populações específicas e associadas a determinados modos de transmissão ^(36, 125, 156). Isso pode ter ocorrido em nossa cidade, após a introdução novas estirpes na comunidade HSH.

A taxa média de substituição de nucleotídeos foi estimada em $1,05 \times 10^{-5}$ substituições/sítio/ano (95% HPD, $4,88 \times 10^{-4}$ a $1,55 \times 10^{-3}$). Essa taxa é consistente com

outros estudos sobre o genótipo IA do HAV, para a região VP1-2A, com taxas de substituição de $1,21 \times 10^{-3}$ substituições/sítio/ano ⁽¹²⁵⁾ e 1.56×10^{-3} respectivamente ⁽¹¹⁰⁾, sendo consistente também com um estudo realizado por Wang e colaboradores em 2015 para a região VP3-VP1-2A ($5,56 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano) do genótipo IA ⁽³⁸⁾.

Com a Inferência Bayesiana, foi possível inferir o ancestral comum mais recente das estirpes virais relacionadas aos surtos europeus/asiáticos, além determinar os possíveis anos de surgimento e suas possíveis datas de introdução no Brasil. A VRD_521_2016, foi identificada pela primeira vez em julho de 2016 em um HSH do Reino Unido que retornou de uma viagem da Espanha ⁽¹⁵⁷⁾, em seguida, foi detectada em vários surtos entre HSH em países europeus ⁽¹⁰¹⁾. A Inferência Bayesiana mostrou que essa estirpe viral provavelmente teve sua origem no ano de 2013 na Itália. Quanto a sua introdução no Brasil, ela possivelmente ocorreu entre o segundo semestre de 2016 e início de 2017, tendo sido importada para o nosso país através da Espanha, mesmo local onde foi identificada pela primeira vez. Essa introdução também foi evidenciada no presente estudo previamente publicado ⁽¹¹⁰⁾.

Quanto as estirpes RIVM-HAV16-090 Europeia e a Asiática, sabe-se que a RIVM-HAV16-090.EUE foi detectada no Reino Unido em um viajante que retornava de Hong Kong, China em 2017 ⁽⁷⁵⁾. A RIVM-HAV16-090.JPN foi identificada em pacientes japoneses em 2016, que por sua vez teve 100% de identidade com estirpes relacionadas a surtos em HSH em Taiwan ⁽¹⁵⁸⁾. Nossas análises mostraram que essas estirpes tiveram provável origem em 2011 na Europa, sem um país de origem definido, tendo provável introdução em nosso país durante o segundo semestre de 2014 e início de 2015 através da Alemanha.

Já a V16-25801, foi identificada pela primeira vez na Itália, em duas pacientes equatorianas que haviam voltado recentemente de uma viagem ao Equador em 2014 ⁽⁷⁵⁾. Sua origem foi estimada por meio das análises, no ano de 2000 com provável surgimento na Europa, também sem definição clara de qual país de origem. Sua introdução no Brasil se deu possivelmente durante o segundo semestre de 2015 e início de 2016. De que tenhamos conhecimento, essas três últimas estirpes virais tiveram suas datas e origens estimadas pela primeira vez no presente estudo.

Conforme esperado para isolados circulantes endemicamente em uma localidade, não foi possível através das análises inferir a data e local de origem das estirpes já circulantes no Brasil (endêmicas).

Com relação à entrada das estirpes virais importadas no Brasil, nossas análises sugerem que as datas de introdução se relacionam a datas de grandes eventos mundiais que ocorreram em nosso país, como a Copa das Confederações (2013), a Copa do Mundo (2014) e Jogos Olímpicos e Paralímpicos (2016). Esses eventos levaram a um fluxo intenso de pessoas de vários continentes no país. Um reporte do Governo Federal mostrou que aproximadamente 500.000 turistas visitaram o Brasil devido aos Jogos Olímpicos e Paralímpicos que ocorreram entre agosto e outubro de 2016 no Rio de Janeiro ⁽¹⁵⁹⁾. Assim, é possível que a essas estirpes tenham sido introduzidas no Brasil durante esses eventos, sendo possivelmente responsáveis pelo aumento no número de casos de HAV em homens adultos em 2017.

De acordo com a nota “Saúde pública para reuniões de massa: considerações importantes” da Organização Mundial da Saúde de 2015, eventos esportivos envolvem um grande fluxo de pessoas de diferentes continentes, com diversos antecedentes imunológicos. Esses eventos são frequentemente associados ao aumento do risco da disseminação de doenças transmissíveis e à introdução de patógenos ⁽¹⁴⁷⁾. Estudos vêm demonstrando de maneira precisa, que alterações demográficas são frequentemente associadas à introdução de novos patógenos, como evidenciado pela introdução do vírus ZIKA em 2014/2015 no Brasil ⁽¹⁶⁰⁾.

Nosso estudo reforça a necessidade do esforço de autoridades locais das saúde para melhorar o acesso à vacina contra o HAV a grupos adultos de alto risco e reforça a necessidade do monitoramento da entrada de novos patógenos no Brasil. Além disso, a implementação de medidas educativas são úteis para impedir a disseminação do HAV em populações-chave como os HSH.

6 PERSPECTIVAS

O estudo tem como perspectivas futuras a realização do sequenciamento do genoma viral completo ou na impossibilidade deste, o sequenciamento de um fragmento maior da região VP1-2A do HAV. Esse sequenciamento mais amplo, nos possibilitará entender as diferenças e similaridades das estirpes introduzidas no país e as estirpes endêmicas no Brasil. Além disso, realizar também colaborações, afim de obter amostras do ano de 2016, que foi o ano no qual não realizamos sequenciamento e análises por não possuímos amostras deste período. As análises de amostras deste ano seriam importantes, uma vez que foi o provável período de entrada das novas estirpes virais no país. Adicionalmente, também realizar análises filogenéticas e filogeográficas em amostras de períodos anteriores ao do estudo, para compreender melhor o perfil migratório e surgimento das estirpes virais do HAV já circulantes no Brasil.

Temos também como outras perspectivas, a elaboração de um questionário epidemiológico para ser aplicado a todos os futuros pacientes que derem entrada no ambulatório de hepatites virais. Por meio deste, será possível investigar e associar quais fatores de risco estão relacionados a aquisição da infecção pelo vírus da hepatite A. Também, visamos a realização do diagnóstico molecular do vírus da Hepatite E nessas amostras, para avaliar possíveis coinfeções HAV/HEV como observado em outros estudos.

7 CONCLUSÕES

- A.** Os fatores comportamentais de risco encontrados foram os hídricos, alimentares, parenterais e sexuais, tendo o fator sexual uma maior frequência nos casos estudados. Os indivíduos mais acometidos pela infecção, foram do sexo masculino, nas faixas etárias 20 a 39, sendo a maioria deles HSH/MSM, dos quais majoritariamente residentes da região norte da Cidade do Rio de Janeiro;
- B.** Foi identificado através das análises filogenéticas que todas as sequências de 2013 a 2019 são do subgenótipo IA do HAV;
- C.** Foi possível observar também, que foram formados quadro grandes clados, sendo três deles denominados epidêmicos, com os estipes virais provenientes dos surtos Europeus/Asiáticos (VDR_521_2016; RIVM-HAV16-090_Sept.EUE e RIVM-HAV16-090.JPN; V16-25801) e um clado denominado endêmico.
- D.** Foi possível também estabelecer a origem e introdução de novas estipes virais no Brasil, sendo introduzidas possivelmente através da Europa, sendo a VRD_521_2016 pela Espanha, a RIVM-HAV16-090_Sept.EUE, RIVM-HAV16-090.JPN e a V16-25801 possivelmente pela Alemanha, com ano de introduções no segundo semestre de 2016 início de 2017, segundo semestre de 2014 início de 2015 e segundo semestre de 2015 e início de 2016, respectivamente. Essas estirpes tiveram provável origem em 2013, 2011 e 2000, respectivamente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global policy report on the prevention and control of viral hepatitis. 2013. Acesso em 10 de novembro de 2019. Disponível em: https://www.who.int/hepatitis/publications/global_report/en/.
2. Hollinger FB, Emerson SU. Vírus da hepatite A 5 ed ed. Knipe D, Howley PO, editors: Filadélfia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
3. World Health Organization. Hepatitis. 2019. Acesso em 10 de novembro de 2019. Acesso em 15 de novembro de 2019. Disponível em: <https://www.who.int/hepatitis/en/>.
4. International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomic Information. 2019. Acesso em 15 de novembro de 2019. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
5. Reuben A. The thin red line. *Hepatology*. 2002;36(3):770-3.
6. Fonseca JCFd. Histórico das hepatites virais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010;43(3):322-30.
7. Koff RS. Hepatitis A. *Lancet*. 1998;351(9116):1643-9.
8. Pereira FE, Gonçalves CS. [Hepatitis A]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(3):387-400.
9. Silva LC. Conceito, tipos de hepatitis por vírus e evolução dos conhecimentos. 2 ed. Silva LC, editor1995. 1-8 p.
10. Wong DT, Mihm MC, Boyer JL, Jain aD. Historical Path of Discovery of Viral Hepatitis: *Harvard Medical Student Review*; 2015. Acesso em 18 de novembro de 2019. Disponível em: <https://www.hmsreview.org/issue-3/2016/9/historical-path-viral-hepatitis>.
11. MacCallum FO, Bradley, W.H. Transmission of infective hepatitis to human volunteers *Lancet*; 1944. p. 222:8.

12. Krugman S, Ward R, Giles JP, et al. Infectious hepatitis: detection of virus during the incubation period and in clinically inapparent infection. *N Engl J Med.* 1959;261:729-34.
13. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science.* 1973;182(4116):1026-8.
14. Magnus LO, Espmark A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.* 1972;80(2):335-7.
15. Maynard JE, Krushak DH, Bradley DW, Berquist KR. Infectivity studies of hepatitis A and B in non-human primates. *Dev Biol Stand.* 1975;30:229-35.
16. Krugman S, Friedman H, Lattimer C. Viral hepatitis, type A. Identification by specific complement fixation and immune adherence tests. *N Engl J Med.* 1975;292(22):1141-3.
17. Ticehurst JR, Racaniello VR, Baroudy BM, et al. Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(19):5885-9.
18. Santos MV, Lopes MH. Vacina inativada contra a hepatite A: revisão da literatura e considerações sobre seu uso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1997;30:145-57.
19. Ministério da Saúde do Brasil. Vacina de Hepatite A. Secretaria de Ciência Tecnologia. 2013. p. 123. Acesso em 15 de fevereiro de 2020. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Incorporados/VacinaHepatite-final.pdf>.
20. Vizzotti C, Pippo T, Urueña A, Altuna J, et al. Economic analysis of the single-dose immunization strategy against hepatitis A in Argentina. *Vaccine.* 2015;33 Suppl 1:A227-32.
21. Ministério da Saúde do Brasil. PORTARIA Nº 2, DE 18 DE JANEIRO DE 2013. Secretaria de Ciência Tecnológica, editor. Diário Oficial da União. 2013.

Acesso em 18 de novembro de 2019. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2013/prt0002_18_01_2013.html

22. Cohen JI, Rosenblum B, Ticehurst JR, et al. Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(8):2497-501.

23. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol*. 2017;98(10):2421-2.

24. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Genus: Hepatovirus*. 2019. Acesso em 15 de novembro de 2019. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/709/genus-hepatovirus.

25. Melnick JL. Classification of hepatitis A virus as enterovirus type 72 and of hepatitis B virus as hepadnavirus type 1. *Intervirology*. 1982;18(3):105-6.

26. Scholz E, Heinrich U, Flehmig B. Acid stability of hepatitis A virus. *J Gen Virol*. 1989;70 (Pt 9):2481-5.

27. Minor P. Picornaviridae. In: Francki RIB, Fauquet CM, KNUDSON DL, BROWN FO, editors. *Wien: Springer-Verlag*1991. 320-6 p.

28. Center of Disease Control. Summary of Notifiable Diseases, United States, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999;47(53):ii-92.

29. Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S164-72.

30. Anthony SJ, St Leger JA, Liang E, Hicks AL, et al. Discovery of a Novel Hepatovirus (Phopivirus of Seals) Related to Human Hepatitis A Virus. *MBio*. 2015;6(4).

31. Drexler JF, Corman VM, Lukashev AN, et al. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(49):15190-5.

32. Smith DB, Simmonds P. Classification and Genomic Diversity of Enterically Transmitted Hepatitis Viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(9).
33. McCaustland KA, Bond WW, Bradley DW, et al. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *J Clin Microbiol.* 1982;16(5):957-8.
34. Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):63-79.
35. Catton M.G. LSA. Hepatitis A: epidemiology. 2 ed. In: Zuckerman AJ TH, editor 1998.
36. Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, de Paula VS, et al. Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect Genet Evol.* 2014;21:227-43.
37. Cohen L, Bénichou D, Martin A. Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J Virol.* 2002;76(15):7495-505.
38. Wang H, Wang XY, Zheng HH, Cao JY, et al. Evolution and genetic characterization of hepatitis A virus isolates in China. *Int J Infect Dis.* 2015;33:156-8.
39. Bondarenko Tlu, Ternovoï VA, Netesov SV. [The hepatitis A virus: structural and functional organization of the genome, its molecular diagnostic value and cultivation]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 2013(3):12-21.
40. ViralZone. Hepatovirus. 2008. Acesso em 18 de novembro de 2019. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/94>.
41. Stuart DI, Ren J, Wang X, Rao Z, et al. Hepatitis A Virus Capsid Structure. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018.
42. Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferré V, Billaudel S, et al. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 12):3191-201.

43. Shen Y, Cheng A, Wang M, Chen S, et al. Development of an indirect ELISA method based on the VP3 protein of duck hepatitis A virus type 1 (DHAV-1) for dual detection of DHAV-1 and DHAV-3 antibodies. *J Virol Methods*. 2015;225:30-4.
44. Emerson SU, Huang YK, Nguyen H, Brockington A, et al. Identification of VP1/2A and 2C as virulence genes of hepatitis A virus and demonstration of genetic instability of 2C. *J Virol*. 2002;76(17):8551-9.
45. Yang X, Cheng A, Wang M, Jia R, et al. Structures and Corresponding Functions of Five Types of Picornaviral 2A Proteins. *Front Microbiol*. 2017;8:1373.
46. Weitz M, Baroudy BM, Maloy WL, Ticehurst JR, et al. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J Virol*. 1986;60(1):124-30.
47. Gauss-Müller V, Jürgensen D, Deutzmann R. Autoproteolytic cleavage of recombinant 3C proteinase of hepatitis A virus. *Virology*. 1991;182(2):861-4.
48. de Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, et al. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol*. 2002;66(1):22-7.
49. Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Lite J, Sala R, et al. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005-2009: circulation of newly emerging strains. *J Clin Virol*. 2011;52(2):98-102.
50. Nainan OV, Armstrong GL, Han XH, Williams I, et al. Hepatitis a molecular epidemiology in the United States, 1996-1997: sources of infection and implications of vaccination policy. *J Infect Dis*. 2005;191(6):957-63.
51. Cao J, Bi S, Meng Q, Shen L, et al. Genotyping of acute hepatitis a virus isolates from China, 2003-2008. *J Med Virol*. 2011;83(7):1134-41.

52. Gharbi-Khelifi H, Ferre V, Sdiri K, Berthome M, et al. Hepatitis A in Tunisia: phylogenetic analysis of hepatitis A virus from 2001 to 2004. *J Virol Methods*. 2006;138(1-2):109-16.
53. Nejati A, Makvandi M, Samarbafzadeh A, Neisi N, et al. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in patients in the Ahwaz region of Iran. *J Med Virol*. 2012;84(4):582-6.
54. Normann A, Jung C, Vallbracht A, Flehmig B. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J Med Virol*. 2004;72(1):10-6.
55. Taylor MB. Molecular epidemiology of South African strains of hepatitis A virus: 1982-1996. *J Med Virol*. 1997;51(4):273-9.
56. Villar LM, Morais LM, Aloise R, Melo MM, et al. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(7):873-81.
57. Hernandez-Morga J, Leon-Felix J, Peraza-Garay F, Gil-Salas BG, et al. Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration--RT-PCR integrated methods. *J Appl Microbiol*. 2009;106(5):1579-90.
58. Desbois D, Couturier E, Mackiewicz V, Graube A, et al. Epidemiology and genetic characterization of hepatitis A virus genotype IIA. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3306-15.
59. Endo K, Takahashi M, Masuko K, Inoue K, et al. Full-length sequences of subgenotype IIIA and IIIB hepatitis A virus isolates: characterization of genotype III HAV genomes. *Virus Res*. 2007;126(1-2):116-27.
60. Yun H, Lee HJ, Jang JH, Kim JS, et al. Hepatitis A virus genotype and its correlation with the clinical outcome of acute hepatitis A in Korea: 2006-2008. *J Med Virol*. 2011;83(12):2073-81.

61. Mukomolov S, Kontio M, Zheleznova N, Jokinen S, et al. Increased circulation of hepatitis A virus genotype IIIA over the last decade in St Petersburg, Russia. *J Med Virol.* 2012;84(10):1528-34.
62. Tallo T, Norder H, Tefanova V, Ott K, et al. Sequential changes in hepatitis A virus genotype distribution in Estonia during 1994 to 2001. *J Med Virol.* 2003;70(2):187-93.
63. Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(1):38-58.
64. Tami C, Silberstein E, Manangeeswaran M, Freeman GJ, et al. Immunoglobulin A (IgA) is a natural ligand of hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1), and the association of IgA with HAVCR1 enhances virus-receptor interactions. *J Virol.* 2007;81(7):3437-46.
65. Borman AM, Kirchwegger R, Ziegler E, Rhoads RE, et al. eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA.* 1997;3(2):186-96.
66. Pintó RM, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, et al. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res.* 2007;127(2):158-63.
67. Lemon SM, Barclay W, Ferguson M, Murphy P, et al. Immunogenicity and antigenicity of chimeric picornaviruses which express hepatitis A virus (HAV) peptide sequences: evidence for a neutralization domain near the amino terminus of VP1 of HAV. *Virology.* 1992;188(1):285-95.
68. de Paula VS. Laboratory Diagnosis of Hepatitis A. *Future Virology: Future Medicine Ltd*; 2012. p. 461-72.
69. Lima LR, De Almeida AJ, Tourinho RoS, Hasselmann B, et al. Evidence of hepatitis A virus person-to-person transmission in household outbreaks. *PLoS One.* 2014;9(7):e102925.

70. Lemon SM. The natural history of hepatitis A: the potential for transmission by transfusion of blood or blood products. *Vox Sang.* 1994;67 Suppl 4:19-23; discussion 4-6.
71. Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol.* 1998;1(3):191-6.
72. Corey L, Holmes KK. Sexual transmission of hepatitis A in homosexual men: incidence and mechanism. *N Engl J Med.* 1980;302(8):435-8.
73. Høybye G, Skinhøj P, Hentzer B, Faber V, et al. An epidemic of acute viral hepatitis in male homosexuals. Etiology and clinical characteristics. *Scand J Infect Dis.* 1980;12(4):241-4.
74. Mindel A, Tedder R. Hepatitis A in homosexuals. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1981;282(6277):1666.
75. European Centre for Disease Prevention and Control. Epidemiological Update: Hepatitis a Outbreak in the EU/EEA Mostly Affecting Men Who Have Sex with Men, 29 September 2017; ECDC: Stockholm, Sweden, 2017. Disponível em Acesso em 20 de Novembro de 2018. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men>.
76. Department of Health of New York. Health Department Releases Health Alert On Increase in Hepatitis A Cases Among Unvaccinated Men Who Have Sex With Men. 2017. Acesso em 25 de Janeiro de 2019. Disponível em: <https://www1.nyc.gov/site/doh/about/press/pr2017/pr007-17.page>.
77. Rivas V, Barrera A, Pino K, Núñez R, Caceres CJ, et al. Hepatitis A outbreak since November 2016 affecting men who have sex with men (MSM) in Chile connected to the current outbreak in MSM in Europe, situation up to October 2017. *Euro Surveill.* 2018;23(9).
78. World Health Organization. Hepatitis A outbreaks mostly affecting men who have sex with men – European Region and the Americas. 2017. Acesso 25 em

Janeiro de 2019. Disponível em: <https://www.who.int/csr/don/07-june-2017-hepatitis-a/en/>.

79. Beebejaun K, Degala S, Balogun K, Simms I, et al. Outbreak of hepatitis A associated with men who have sex with men (MSM), England, July 2016 to January 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(5).

80. Werber D, Michaelis K, Hausner M, Sissolak D, et al. Ongoing outbreaks of hepatitis A among men who have sex with men (MSM), Berlin, November 2016 to January 2017 - linked to other German cities and European countries. *Euro Surveill.* 2017;22(5).

81. da Silva SG, Leon LA, Alves G, Brito SM, Sandes VeS, Lima MM, et al. A Rare Case of Transfusion Transmission of Hepatitis A Virus to Two Patients with Haematological Disease. *Transfus Med Hemother.* 2016;43(2):137-41.

82. Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Saisho H, et al. Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA: strains from fulminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions. *Gut.* 2002;51(1):82-8.

83. Sasbón JS, Buamscha D, Gianivelli S, Imventarza O, et al. Clinical implications of hepatitis A virus ribonucleic acid detection and genotyping in acute liver failure in children in Argentina. *Pediatr Crit Care Med.* 2010;11(3):385-9.

84. Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Nicand E, Aleman MH, et al. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J Viral Hepat.* 2002;9(2):101-6.

85. Tjon GM, Coutinho RA, van den Hoek A, Esman S, et al. High and persistent excretion of hepatitis A virus in immunocompetent patients. *J Med Virol.* 2006;78(11):1398-405.

86. Munné MS, Cañero-Velasco MC, Moreiro R, Vladimirovsky S, et al. [Duration of viremia and fecal shedding of the virus in hepatitis A infected children]. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2006;36(4):182-9.

87. Amado Leon LA, de Almeida AJ, de Paula VS, Tourinho RS, et al. Longitudinal Study of Hepatitis A Infection by Saliva Sampling: The Kinetics of HAV Markers in Saliva Revealed the Application of Saliva Tests for Hepatitis A Study. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145454.
88. Joshi MS, Bhalla S, Kalrao VR, Dhongade RK, et al. Exploring the concurrent presence of hepatitis A virus genome in serum, stool, saliva, and urine samples of hepatitis A patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(4):379-82.
89. López Ruiz R, Dotor García-Soto J, Eichau S. Guillain-Barré syndrome after viral hepatitis A. *Med Clin (Barc)*. 2019.
90. Guillaume M, Mouna L, Coustillères F, Lemée V, et al. Invasive meningoencephalitis as the first manifestation of hepatitis A. *J Viral Hepat*. 2019;26(11):1330-3.
91. Ferreira CT, Silveira TRd. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004;7:473-87.
92. Canuel M, De Serres G, Duval B, Gilca R, et al. Trends of hepatitis A hospitalization and risk factors in Quebec, Canada, between 1990 and 2003. *BMC Infect Dis*. 2007;7:31.
93. Santos DC, Martinho JM, Pacheco-Moreira LF, Araújo CC, et al. Fulminant hepatitis failure in adults and children from a Public Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2009;13(5):323-9.
94. Stapleton JT. Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis*. 1995;171 Suppl 1:S9-14.
95. Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, Hu MD, et al. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J Infect Dis*. 1991;164(5):852-9.
96. World Health Organization. Fact sheets - Hepatitis A. 2019. Acesso em 20 de fevereiro de 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a>.

97. World Health Organization. Global Hepatitis Report 2017. 2017. Acesso em 15 de fevereiro de 2019. Disponível em: <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
98. Aggarwal R, Goel A. Hepatitis A: epidemiology in resource-poor countries. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28(5):488-96.
99. Yong HT, Son, R. Hepatitis A virus – a general overview. *International Food Research Journal.* 2009;16.
100. Jacobsen KH, Wiersma ST. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine.* 2010;28(41):6653-7.
101. European Centre for Disease Prevention and Control. Epidemiological Update: Hepatitis a Outbreak in the EU/EEA Mostly Affecting Men Who Have Sex with Men, 2018; ECDC: Stockholm, Sweden, 2018. Acesso em 25 de agosto de 2019. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-2>
102. Ministério da Saúde do Brasil – Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV). Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais - 2019. 2019;50(Ano V - nº 17):76. Acesso em 27 de agosto de 2019. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2019>
103. KH. J. The global prevalence of hepatitis A virus infection and susceptibility: a systematic review Geneva, Switzerland: World Health Organization 2009. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70180/WHO_IVB_10.01_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
104. Ximenes RA, Martelli CM, Amaku M, Sartori AM, et al. Modelling the force of infection for hepatitis A in an urban population-based survey: a comparison of transmission patterns in Brazilian macro-regions. *PLoS One.* 2014;9(5):e94622

105. Souto FJD, de Brito WI, Fontes CJF. Impact of the single-dose universal mass vaccination strategy against hepatitis A in Brazil. *Vaccine*. 2019;37(6):771-5.
106. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Perfil dos municípios brasileiros: saneamento básico: aspectos gerais da gestão da política de saneamento básico 2017. IBGE 2018. p. 39. Acesso em 5 de junho de 2019. <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2101610>
107. Sistema de Notificação de agravos. Ministério da Saúde. 2019. Acesso em 13 de agosto de 2019. Disponível em: <http://indicadoreshepatites.aids.gov.br/>.
108. De Oliveira TM, Vieira NSG, Sepp TDS, Souto FJD. Recent trends in hepatitis A incidence in Brazil. *J Med Virol*. 2020.
109. Secretaria de Saúde de São Paulo. INFORME TÉCNICO SURTO DE HEPATITE A. 2017. Acesso em 17 de janeiro de 2019. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/2017/hepatitea17_informe_tecnico.pdf
110. Mello VM, Lago BV, Sousa PSF, Mello FCA, et al. Hepatitis A Strain Linked to the European Outbreaks During Gay Events between 2016 and 2017, Identified in a Brazilian Homosexual Couple in 2017. *Viruses*. 2019;11(3).
111. Ministério da Saúde do Brasil – Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV). Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais - 2018. 2018;49(Ano VI - nº 1):78. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018>.
112. Purcell RH, Wong DC, Moritsugu Y, Dienstag JL, et al. A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. *J Immunol*. 1976;116(2):349-56.

113. Huang SN, Lorenz D, Gerety RJ. Electron and immunoelectron microscopic study on liver tissues of marmosets infected with hepatitis A virus. *Lab Invest.* 1979;41(1):63-71.
114. Delem AD. Comparison of modified HAVAB and ELISA for determination of vaccine-induced anti-HAV response. *Biologicals.* 1992;20(4):289-91.
115. Askling HH, Rombo L, van Vollenhoven R, Hallén I, et al. Hepatitis A vaccine for immunosuppressed patients with rheumatoid arthritis: a prospective, open-label, multi-centre study. *Travel Med Infect Dis.* 2014;12(2):134-42.
116. Wang CH, Tschen SY, Flehmig B. Quantitative determination of immune response against hepatitis A virus capsids after natural infection. *Vaccine.* 1996;14(4):355-6.
117. de Almeida Ribeiro CR, Amado LA, Tourinho RS, Pinto Lima LR, et al. Accuracy of rapid test for diagnosis of hepatitis A with different infection rate settings and with predictive modeling. *Future Microbiol.* 2019;14:247-58.
118. Jacobsen KH, Koopman JS. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol Infect.* 2004;132(6):1005-22.
119. Bottero J, Boyd A, Gozlan J, Lemoine M, et al. Performance of rapid tests for detection of HBsAg and anti-HBsAb in a large cohort, France. *J Hepatol.* 2013;58(3):473-8.
120. Kim MH, Kang SY, Lee WI. Evaluation of a new rapid test kit to detect hepatitis C virus infection. *J Virol Methods.* 2013;193(2):379-82.
121. Lee HJ, Jeong HS, Cho BK, Ji MJ, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the detection of anti-hepatitis A virus IgM. *Virol J.* 2010;7:164.
122. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393(2):569-82.

123. Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, et al. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol*. 2002;76(18):9516-25.
124. de Paula VS, Lu L, Niel C, Gaspar AM, et al. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol*. 2004;73(3):378-83.
125. Cella E, Riva E, Angeletti S, Fogolari M, et al. Genotype I hepatitis A virus introduction in Italy: Bayesian phylogenetic analysis to date different epidemics. *J Med Virol*. 2018;90(9):1493-502.
126. Center of Disease Control. Hepatitis A Information. Division of Viral Hepatitis. 2017. Acesso em 6 de julho de 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hav/index.htm>
127. Raabe VN, Sautter C, Chesney M, Eckerle JK, et al. Hepatitis a screening for internationally adopted children from hepatitis A endemic countries. *Clin Pediatr (Phila)*. 2014;53(1):31-7.
128. Sartori AM, de Soárez PC, Novaes HM, Amaku M, et al. Cost-effectiveness analysis of universal childhood hepatitis A vaccination in Brazil: regional analyses according to the endemic context. *Vaccine*. 2012;30(52):7489-97.
129. Haro I, Pérez S, García M, Chan WC, et al. Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design. *FEBS Lett*. 2003;540(1-3):133-40.
130. Berlec A, Malovrh T, Zadavec P, Steyer A, et al. Expression of a hepatitis A virus antigen in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli* and evaluation of its immunogenicity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(10):4333-42.
131. Melgaço JG, Morgado LN, Santiago MA, Oliveira JM, et al. A single dose of inactivated hepatitis A vaccine promotes HAV-specific memory cellular response similar to that induced by a natural infection. *Vaccine*. 2015;33(32):3813-20.

132. Werzberger A, Mensch B, Kuter B, Brown L, et al. A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. *N Engl J Med.* 1992;327(7):453-7.
133. Ministério da Saúde. INFORME TÉCNICO DA INTRODUÇÃO DA VACINA ADSORVIDA HEPATITE A (INATIVADA). 2014. Acesso em 6 de julho de 2019. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/26/Informe-t--cnico-vacina-hepatite-A-junho-2014.pdf>.
134. Fiore AE, Wasley A, Bell BP, (ACIP) ACoIP. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2006;55(RR-7):1-23.
135. Ministério da Saúde. Calendário Nacional de Vacinação. 2019. Acesso em 9 de fevereiro de 2020. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/vacinacao/calendario-vacinacao>.
136. Ministério da Saúde. NOTA INFORMATIVA Nº 10/2018-COVIG/CGVP/DIAHV/SVS/MS. In: DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA PECDI, DO HIV/AIDS E DAS HEPATITES VIRAIS. COORDENAÇÃO DE VIGILÂNCIA DAS IST, AIDS E HEPATITES VIRAIS - COVIG. 2018. Acesso em 17 de novembro de 2019. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/legislacao/nota-informativa-no-102018-covigcgvpdiahvsvsms>.
137. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
138. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-4.
139. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, et al. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 2018;4(1):vey016.

140. Sa-nguanmoo P, Posuwan N, Vichaiwattana P, Vuthitanachot V, et al. Declining Trend of Hepatitis A Seroepidemiology in Association with Improved Public Health and Economic Status of Thailand. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151304.
141. Gossner CM, Severi E, Danielsson N, Hutin Y, et al. Changing hepatitis A epidemiology in the European Union: new challenges and opportunities. *Euro Surveill*. 2015;20(16).
142. Medić S, Anastassopoulou C, Milošević V, Dragnić N, et al. Declining seroprevalence of hepatitis A in Vojvodina, Serbia. *PLoS One*. 2019;14(6):e0217176.
143. Jacobsen KH. Globalization and the Changing Epidemiology of Hepatitis A Virus. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(10).
144. Wasley A, Fiore A, Bell BP. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol Rev*. 2006;28:101-11.
145. Gripenberg M, Aloysia D'Cor N, L'Azou M, Marsh G, et al. Changing sero-epidemiology of hepatitis A in Asia Pacific countries: A systematic review. *Int J Infect Dis*. 2018;68:13-7.
146. SEBRAE. Painel Regional da Cidade do Rio de Janeiro. 2016. Acesso em 5 de março de 2020. Disponível em: https://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/RJ/Anexos/SebraePainel_CidadeRioDeJaneiro.pdf.
147. World Health Organization. Public Health for Mass Gatherings: Key Considerations. 2016. Acesso em 20 de novembro de 2018. Disponível em: https://www.who.int/ihr/publications/WHO_HSE_GCR_2015.5/en/.
148. Lorenzo Ortega R, O'Donnell, Cortés B, Ortiz González Serna R, et al. [Changes in Hepatitis A epidemiological pattern in Andalucía: 2007-2017]. *Rev Esp Salud Publica*. 2018;92.

149. Rodríguez-Tajes S, Perpiñán E, Caballol B, Lens S, et al. Hepatitis A outbreak in Barcelona among men who have sex with men (MSM), January-June 2017: A hospital perspective. *Liver Int.* 2018;38(4):588-93.
150. Henning KJ, Bell E, Braun J, Barker ND. A community-wide outbreak of hepatitis A: risk factors for infection among homosexual and bisexual men. *Am J Med.* 1995;99(2):132-6.
151. Breyer BN, Smith JF, Eisenberg ML, Ando KA, et al. The impact of sexual orientation on sexuality and sexual practices in North American medical students. *J Sex Med.* 2010;7(7):2391-400.
152. Goethe VE, Angerer H, Dinkel A, Arsov C, et al. Concordance and Discordance of Sexual Identity, Sexual Experience, and Current Sexual Behavior in 45-Year-Old Men: Results From the German Male Sex-Study. *Sex Med.* 2018;6(4):282-90.
153. Aloise R, de Almeida AJ, Sion FS, Morais-de-Sá CA, et al. Changes in hepatitis A virus seroepidemiology in HIV-infected Brazilian patients. *Int J STD AIDS.* 2008;19(5):321-6.
154. Bordi L, Rozera G, Scognamiglio P, Minosse C, et al. Monophyletic outbreak of Hepatitis A involving HIV-infected men who have sex with men, Rome, Italy 2008-2009. *J Clin Virol.* 2012;54(1):26-9.
155. Mbayed VA, Sookoian S, Alfonso V, Campos RH. Genetic characterization of hepatitis A virus isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Med Virol.* 2002;68(2):168-74.
156. Amon JJ, Devasia R, Xia G, Nainan OV, et al. Molecular epidemiology of foodborne hepatitis a outbreaks in the United States, 2003. *J Infect Dis.* 2005;192(8):1323-30.
157. Lanini S, Minosse C, Vairo F, Garbuglia A, et al. A large ongoing outbreak of hepatitis A predominantly affecting young males in Lazio, Italy; August 2016 - March 2017. *PLoS One.* 2017;12(11):e0185428.

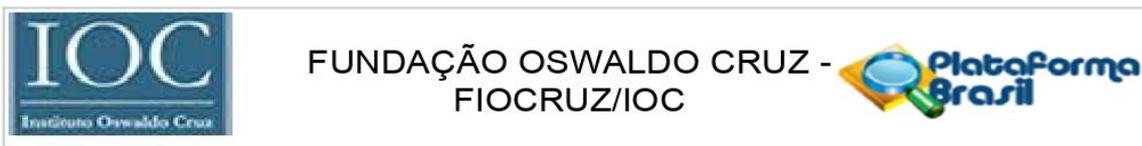
158. Watanabe S, Morimoto N, Miura K, Takaoka Y, et al. Full-genome characterization of the RIVM-HAV16-090-like hepatitis A virus strains recovered from Japanese men who have sex with men, with sporadic acute hepatitis A. *Hepatol Res.* 2019.

159. Federal Government of Brazil. Media Guide - Rio 2016 Olympic and Paralympic Games (English). 2016. Acesso em 20 de novembro de 2018. Disponível em: <http://www.rededoesporte.gov.br//en/news/federal-government-launches-journalist-guide-for-the-rio-2016-olympic-and-paralympic-games/media-guide-rio-2016-olympic>.

160. Faria NR, Azevedo RDSD, Kraemer MUG, Souza R, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science.* 2016;352(6283):345-9.

9 ANEXOS

9.1 Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil clínico, laboratorial e epidemiológico das hepatites agudas no Rio de Janeiro.

Pesquisador: LIA LAURA LEWIS-XIMENEZ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 50230015.0.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.358.971

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional descritivo retrospectivo, que utilizará somente dados secundários oriundos de prontuários médicos e livro de registro de resultados de exames laboratoriais de pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais (AHV/Fiocruz) de 1997 a 2015. As informações obtidas serão armazenadas em um banco de dados (Access 2007 - Microsoft Office) e separados em dois grandes grupos: hepatites agudas graves e hepatites agudas não graves. A frequência de determinados parâmetros clínicos, laboratoriais (data de surgimento da icterícia, comorbidades, resultados de exames bioquímicos, carga viral, medicamento utilizado, entre outros) e epidemiológicos (sexo, idade, escolaridade, profissão, possível via de infecção, entre outros) serão avaliados com o auxílio de ferramentas estatísticas para a construção do perfil das hepatites agudas no estado. Estas informações se encontram sob guarda da pesquisadora responsável pelo projeto, sendo garantido o sigilo e a confidencialidade dos dados. Não haverá, portanto, nenhuma intervenção ou qualquer risco físico aos participantes do estudo. Além disto, o grande número de pacientes (cerca de 2500) dificulta o contato e localização dos mesmos, tendo em vista que alguns destes atendimentos foram realizados há 18 anos, sendo grandes as chances de que as informações para contato estejam desatualizadas. Por fim, descartar estes dados seria uma grande perda, principalmente em relação às hepatites agudas

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.358.971

Objetivo Secundário:

1. Estabelecer a prevalência das diferentes etiologias das hepatites agudas.
2. Identificar fatores clínicos, laboratoriais e epidemiológicos associados às hepatites virais agudas nos pacientes atendidos no AHV.
3. Comparar o perfil destas infecções agudas com o perfil de outros países, descritos na literatura científica.
4. Comparar as hepatites agudas graves e não graves sob os aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos para os participantes da pesquisa são mínimos, uma vez que serão utilizados apenas dados secundários dos prontuários médicos e livro de registros de resultados de exames laboratoriais, mantendo sempre em sigilo a identidade dos pacientes.

Benefícios:

Este projeto auxilia na avaliação da eficácia das ações públicas de controle das hepatites virais no Rio de Janeiro ao longo das últimas duas décadas, amplia a disponibilidade de informações sobre as hepatites agudas graves aplicadas à realidade do estado (informação escassa em publicações sobre o tema), possui baixo custo de realização e poucos riscos aos participantes do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está muito bem fundamentado, claro em seus propósitos e a equipe é altamente qualificada.

A pesquisadora principal argumenta que: “os dados dos pacientes atendidos no AHV nos últimos 18 anos podem demonstrar alterações no perfil das hepatites agudas no Rio de Janeiro, especialmente as de etiologia viral, devido a mudanças de comportamento da população, ações governamentais, avanços científicos, entre outros fatores que ocorreram nas últimas duas décadas.”

A pesquisadora principal solicita ao comitê de ética a dispensa de termo de consentimento livre

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.358.971

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP_Set_2015.doc	15/10/2015 12:38:32	LIA LAURA LEWIS- XIMENEZ	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_CEP.PDF	15/10/2015 12:36:59	LIA LAURA LEWIS- XIMENEZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 09 de Dezembro de 2015

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

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

Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360

UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

9.2 Protocolo One-Step RT-PCR e Semi-nested PCR (REGIÃO VP1/2A – HAV)



PROTÓCOLO One-Step RT – semi-nested PCR (REGIÃO VP1/2A – HAV)

EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL:

Data:

Realizado por:

Kit Qiagen () Roche () Abbott ()

RT-PCR

Data:

Realizado por:

Água destilada DNase RNase free	4,5 µL	X	=	Distribuir 20 µL do mix em cada tubo + 5 µL do RNA . Termociclador: Programa: RT-PCR 1 50 °C – 30' 94 °C – 2' 94 °C – 30" 50 °C – 30" 68 °C – 1' } 5x 94 °C – 30" 50 °C – 30" (com drop de -0,3 °C por ciclo) } 35x 68 °C – 1' 68 °C – 5' 4 °C - pause
Reaction Mix 2x	12,5 µL	X	=	
F6 10 pmol	0,5 µL	X	=	
F7 10 pmol	0,5 µL	X	=	
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor 40 U/µL	1,0 µL	X	=	
SuperScript III One-Step RT / Platinum® Taq Mix	1,0 µL	X	=	

SEMI-NESTED PCR

Data:

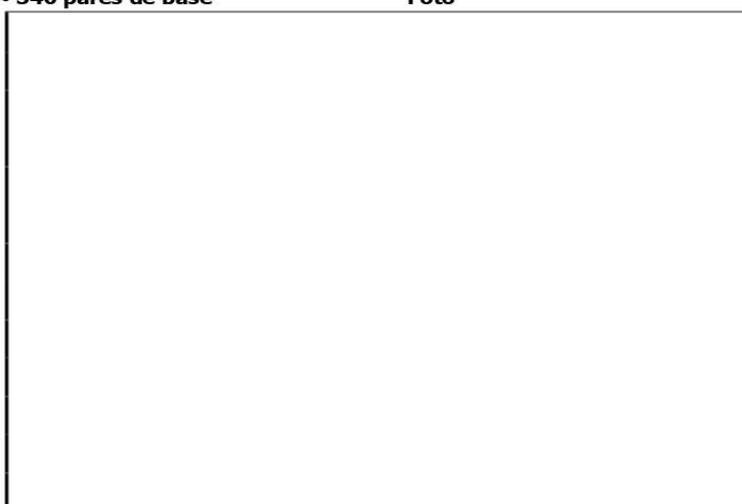
Realizado por:

Água destilada DNase RNase free	37,8 µL	X	=	Distribuir 48 µL do mix em cada tubo + 2 µL do produto da RT-PCR . Termociclador: Programa: PCR 2 94 °C – 2' 94 °C – 30" 56 °C – 30" 72 °C – 1' } 35x 72 °C – 5' 4 °C - pause
dNTPs 10 mM	1,0 µL	X	=	
Buffer 10x	5,0 µL	X	=	
MgCl ₂ 50 mM	2,0 µL	X	=	
F8 10 pmol	1,0 µL	X	=	
F7 10 pmol	1,0 µL	X	=	
Platinum® Taq DNA Polymerase	0,2 µL	X	=	

Gel agarose a 1,5%; Tamanho do fragmento: ~ 340 pares de base

Foto

Nº amostra		Resultado
1)	16)	
2)	17)	
3)	18)	
4)	19)	
5)	20)	
6)	21)	
7)	22)	
8)	23)	
9)	24)	
10)	25)	
11)	26)	
12)	27)	
13)	28)	
14)	29)	
15)	30)	



9.3 Sequências de referência utilizadas no estudo

Nº DE ACESSO	PAÍS	ANO	SUBGENÓTIPOS
AY028976	Alemanha	2000	IA
AY046073	Alemanha	2001	IA
AH013918	Alemanha	2004	IA
EU825910	Alemanha	2007	IA
LT799836	Alemanha	2016	IA
LS991407	Alemanha	2017	IA
LS991408	Alemanha	2018	IA
HM769724	Argentina	2006	IA
JX185637	Argentina	2006	IA
JX185633	Argentina	2009	IA
AY322956	Brasil	2002	IA
AY322961	Brasil	2002	IA
AY322981	Brasil	2002	IA
AY323018	Brasil	2002	IA
AY323034	Brasil	2002	IA
AY323045	Brasil	2002	IA
MG049743	Brasil	2017	IA
KX859028	Vulgaria	2013	IA
AF485328	China	2002	IA
AF512536	China	2002	IA
HQ907928	China	2007	IA
LC373510	Coreia do Sul	2014	IA
KU570286	Equador	2013	IA
AF386885	Espanha	2000	IA
MF805869	Espanha	2017	IA
MF805905	Espanha	2017	IA
LT796556	Europa	2016	IA
AB793725	Filipinas	2012	IA
LT745919	França	2015	IA
LT745920	França	2015	IA
MG019071	França	2017	IA
MG019076	França	2017	IA
AB839669	Índia	2007	IA
AB839695	Índia	2007	IA
MF947171	Israel	2017	IA
MF947177	Israel	2017	IA
MF947185	Israel	2017	IA
AJ505560	Itália	2000	IA
AJ505569	Itália	2000	IA

AJ505562	Itália	2002	IA
KF706400	Itália	2011	IA
KY292289	Itália	2016	IA
KY292292	Itália	2016	IA
MH271377	Itália	2018	IA
AB300206	Japão	1997	IA
LC014789	Japão	2014	IA
LC373510	Japão	2014	IA
LC416595	Japão	2018	IA
DK2018231	Marrocos	2018	IA
DK2018267	Marrocos	2018	IA
KC182588	México	2009	IA
AB909123	Papua-Nova Guiné	2011	IA
JQ319865	Rússia	2010	IA
GQ925247	Singapura	2007	IA
GQ925249	Singapura	2007	IA
EF207320	Tailândia	2005	IA
KX151439	Taiwan	2015	IA
KX151485	Taiwan	2915	IA
DQ380523	Tunísia	2003	IA
AY875668	Tunísia	2004	IA
AY875668	Tunísia	2004	IA
EU526088	Uruguai	2008	IA
MK829707	EUA	2013	IB
MF621614	Etiópia	2016	IB
AY644676	França	2004	IIA
DQ141214	França	2004	IIA
GU390576	França	2004	IIA
GU390576	França	2009	IIA
AY644670	Serra Leoa	1988	IIB
AB279734	Japão	1995	IIIA
AB300205	Japão	1977	IIIB
AB425339	Japão	1970	IIIB



Communication

Hepatitis A Strain Linked to the European Outbreaks During Gay Events between 2016 and 2017, Identified in a Brazilian Homosexual Couple in 2017

Vinicius M. Mello ^{1,*}, Barbara V. Lago ^{1,2,*}, Paulo S. F. Sousa ¹, Francisco C. A. Mello ¹, Caroline B. Souza ¹, Laura C. M. Pinto ¹, Cleber F. Ginuino ¹, Carlos A. S. Fernandes ³, Shirlei F. Aguiar ³, Lívia M. Villar ¹, Elisabeth Lampe ¹, Juliana G. Melgaço ¹ and Lia L. Lewis-Ximenez ¹

¹ Viral Hepatitis Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro RJ 21040-900, Brazil; paulosfsousa@gmail.com (P.S.F.S.); fcanello@gmail.com (F.C.A.M.); carolinebaldin@uol.com.br (C.B.S.); lauracmpinto@gmail.com (L.C.M.P.); cleber@ioc.fiocruz.br (C.F.G.); liviafiocruz@gmail.com (L.M.V.); elisabeth.fiocruz@gmail.com (E.L.); juliana.melgaco@gmail.com (J.G.M.); lialewis.fiocruz@gmail.com (L.L.L.-X.)

² Institute of Technology in Immunobiologics–Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro RJ 21040-900, Brazil

³ Hepatitis Division, Central Public Health Laboratory Noel Nutels, Rio de Janeiro RJ 20231-092, Brazil; cas.fernandes@gmail.com (C.A.S.F.); shirleideaguiar@gmail.com (S.F.A.)

* Correspondence: vinicius.mello@ioc.fiocruz.br (V.M.M.); barbaravago@gmail.com (B.V.L.); Tel.: +55-21-2562-1946 (V.M.M.); +55-21-2562-1799 (B.V.L.)

† These authors contributed equally.

Received: 28 December 2018; Accepted: 13 March 2019; Published: 20 March 2019



Abstract: Hepatitis A virus (HAV) outbreaks among men who have sex with men (MSM) have been reported worldwide and associated primarily with sexual transmission through oral-anal sex. Here, we provide the molecular and evolutionary description of a European strain, linked to HAV outbreaks among MSM, detected in a Brazilian homosexual couple. Bayesian analysis provided evidence that the viral isolates were introduced in Brazil from Spain between the end of 2016 and the beginning of 2017.

Keywords: Hepatitis A virus (HAV); European strain; HAV in Brazilian MSM

1. Introduction

Hepatitis A virus (HAV) infection, transmitted by the fecal-oral route, occurs mainly through person-to-person contact or ingestion of contaminated water or food [1]. Household members and close contact with children were identified, for many years, as the most common risk factor, being the latter responsible for several HAV outbreaks. However, in the early 1980s sexual transmission of HAV was reported [2], showing an increase in incidence over time [3] among men who have sex with men (MSM) and accounting for isolated outbreaks in different countries [4,5]. Risk factors associated with HAV infection among MSM were oral-anal intercourse and group sex [5,6]. As of 2016, an increase in incidence of HAV infection among MSM was observed in many countries, with many outbreaks occurring following social events such as gay festivals, where distinct strains of genotype IA, as VRD_521_2016 and RIVM-HAV16-090 were identified in more than 3000 cases in European Union [7–12]. In Brazil, an increase of 128% in the incidence of HAV infection among males, 20–39 years/old, reporting oral-anal sex was described by the Ministry of Health in their 2017 annual Epidemiological Bulletin [13]. Despite these considerations, there are scarce studies in Brazil on HAV