

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Renata Tourinho Santos*

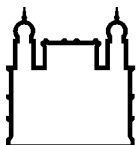
**Avaliação de diferentes coletores de fluido oral para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite A, e sua aplicação em áreas de difícil acesso.**

Dissertação apresentada à coordenação do programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia e Patogenia.

**Orientadora:** Dra. Vanessa Salete de Paula

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2011



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Renata Tourinho Santos*

Avaliação de diferentes coletores de fluido oral para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite A, e sua aplicação em áreas de difícil acesso.

**ORIENTADORA:** Dra. Vanessa Salete de Paula

**BANCA EXAMINADORA:**

Dr. Adilson José de Almeida (Revisor e Presidente)

Dr. Rafael Dhalia

Dra. Monick Lindenmyer Guimarães

**SUPLENTES:**

Dra. Flávia Barreto dos Santos

Dra. Débora Regina Lopes dos Santos

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

S237

Santos, Renata Tourinho.

Avaliação de diferentes coletores de fluido oral para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite A, e a sua aplicação em áreas de difícil acesso. / Renata Tourinho Santos. – Rio de Janeiro, 2011.  
xix, 85 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2011.  
Bibliografia: f. 65-83

1. Fluido oral. 2. Anti-HAV total. 3. Prevalência. I. Título.

CDD 616.3623

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro/RJ sob orientação da Dra. Vanessa Salete de Paula.

*“Ciência é assim: tropeçar, erguer e recomeçar.”*

*Autoria Própria*

Dedico este trabalho aos que estão e estarão eternamente ao meu lado, meus pais, minha irmã e meu noivo.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Primeiramente, gostaria de agradecer à coordenação do curso de Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro que auxiliou as incursões em campo, a participação em eventos científicos e a execução deste trabalho.

Gostaria de agradecer, também, a uma pessoa eternamente especial na minha vida que confiou no meu trabalho desde a iniciação científica e que me impulsionou e me incentivou na vida acadêmica, minha orientadora Dra. Vanessa Salete de Paula.

Um carinhoso agradecimento a duas pesquisadoras que, apesar de não me orientarem diretamente, sempre estiveram presentes me auxiliando, apoiando e estimulando, Dra. Lívia Melo Villar e Dra. Luciane Almeida Amado, minhas orientadoras de coração.

Aos pesquisadores Dr. Marcelo Alves Pinto, Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar, Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira e Dra. Cláudia Lamarca Vitral, muito obrigada pelo apoio científico e por me proporcionar um ambiente de trabalho convidativo.

Ao Dr. Adilson José de Almeida pela colaboração e pelo auxílio na execução da estatística deste trabalho. Muito obrigada pela atenção e paciência.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Amanda, Juliana, Gentil, Alexandre, Daniela, Aliny, Dra. Débora, Tamara, Carol e Paula que estiveram sempre ao meu lado trocando experiências e me auxiliando em todos os momentos, muito obrigada.



À Dra. Ana Rita Coimbra Motta Castro, as suas alunas de mestrado Paula G. Murat e Gina J. Mousquer, aos seus alunos de iniciação científica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), e ao biólogo André Luiz Siqueira da Organização Não Governamental (ONG) Ecoa agradeço pelo grande apoio na execução do estudo epidemiológico no Pantanal Sul Mato-Grossense. Amigos eternos !!!!

A minha maravilhosa turma de mestrado, um especial agradecimento pelos momentos de alegria, união e carinho. Futuros mestres, Daiana, Nathália (s), Vitor, Lilian, Renato, Raquel, André, Priscila, Elisângela, vocês sempre serão os melhores!!!!

A todos os profissionais de saúde do Instituto Oswaldo Cruz que voluntariamente contribuíram para este trabalho doando suas amostras de soro e fluido oral agradeço a ajuda de todos.

Gostaria, por fim, de agradecer especialmente aos meus amores que compreendem minhas dificuldades e que compartilham comigo a alegria de ter vivido uma das melhores fases da minha vida, meu pai Marcos, minha mãe Thelma, minha irmã Fernanda e meu noivo Bernardo.

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1.1	Concentração média de imunoglobulina (mg/L) no plasma e em diferentes componentes salivares (Roir e Lehner, 1983).....	17
Tabela 1.2	Revisão bibliográfica sobre estudos relacionados à fluídos orais como espécime clínico para o diagnóstico da hepatite A, identificados em bases de dados nacionais e internacionais (LILACS, Scielo, Medline, PubMed) (adaptado de Amado, 2010).....	18
Tabela 5.1	Análise dos valores da escala colorimétrica dos indivíduos vacinados e naturalmente infectados segundo o dispositivo de coleta.....	43
Tabela 5.2	Parâmetros de avaliação dos três dispositivos de coleta de fluido oral com o ensaio Immunocomb II HAV Ab, em relação aos resultados das amostras de soro correspondente.....	44
Tabela 5.3	Características sociodemográficas dos indivíduos do estudo ( $n = 224$ ).....	46

Tabela 5.4	Resultados de anti-HAV das amostras pareadas de soro e fluido oral (ChemBio®) do Pantanal Sul-Matogrossense, testadas com o ImmunoComb II HAV Ab ( $n = 224$ ).....	47
Tabela 5.5	Fatores associados com a positividade de anticorpos anti-HAV em amostras de soro e fluido oral (ChemBio®), de indivíduos do Pantanal Sul Mato-Grossense ( $n = 224$ ).....	49
Tabela 6.1	Comparação dos resultados do painel de otimização do presente trabalho com resultados encontrados em outros estudos.....	58

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1.1 Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A (Fonte: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), 1998)..... 02
- Figura 1.2 Esquema do RNA do HAV e o processamento da proteína primária, mostrando as principais proteínas codificadas (Fonte: Pereira e Gonçalves, 2003)..... 03
- Figura 1.3 Cinética da infecção pelo vírus da hepatite A no soro (Fonte: Martin e Lemon, 2006)..... 08
- Figura 1.4 Distribuição geográfica da infecção pelo HAV (Fonte: Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis A to E- an overview, CDC 2006)..... 11
- Figura 1.5 Prevalência de anti-HAV total em crianças até 10 anos de idade nas diferentes regiões brasileiras, onde foram realizadas investigações epidemiológicas. Os retângulos em branco indicam crianças de baixo nível socioeconômico e os

	retângulos em cinza, crianças de padrão socioeconômico mais elevado (Fonte: Pereira e Gonçalves, 2003).....	12
Figura 1.6	Alguns coletores comerciais de fluido oral (A) Salivette; (B) Orapette; (C) Omni-SAL; (D) OraSure (Fonte: Hodinka <i>et al.</i> , 1998).....	20
Figura 4.1	(A) Pente e placa reveladora do ImmunoComb II HAV Ab. (B) Princípio do teste ImmunoComb II HAV Ab (Organics, Israel).....	29
Figura 4.2	Escala colorimétrica (CombScale) para determinação do título de anticorpos anti-HAV.....	30
Figura 4.3	Sub-regiões do Pantanal brasileiro (Fonte: Globo Rural-Edição 288- Outubro de 2009).....	31
Figura 4.4	Sub-região da bacia do rio Paraguai (A) Casas de pau-a-pique da comunidade de São Lourenço. (B) Palafitas das comunidades de Porto da Manga, região alagável.....	32
Figura 4.5	Sub-região da bacia do rio Paraguai (A) Mulheres da comunidade de Paraguai-Mirim lavando utensílios no rio Paraguai. (B) Padrão sanitário da comunidade do Passo do Lontra.....	33
Figura 4.6	Localização geográfica das comunidades ribeirinhas do Pantanal Sul Mato-Grossense, foco do presente estudo	

	(Fonte: Agência Nacional das Águas, 2007).....	34
Figura 4.7	Sub-região da bacia do rio Paraguai (A) Comunidade de São Lourenço/Serra do Amolar. (B) Comunidade de Paraguai-Mirim próximo a unidade escolar.....	35
Figura 4.8	Sub-região da bacia do rio Paraguai (A) Comunidade de Porto da Manga. (B) Comunidade de Passo do Lontra.....	35
Figura 4.9	Sub-região da bacia do rio Paraguai. Coleta soro (A) e fluido oral (B) em pacientes das comunidades do Pantanal Sul Mato-Grossense.....	36
Figura 4.10	Transporte e armazenamento das amostras em áreas de difícil acesso do Pantanal Sul Mato-Grossense.....	37
Figura 5.1	Teste de titulação das amostras de fluido oral pertencentes ao grupo dos indivíduos não-reagentes (NR), vacinados (VA) e com imunidade natural (IN), coletadas com os diferentes dispositivos comerciais ChemBio® (A), OraSure® (B) e Salivette® (C). A linha horizontal contínua em vermelho representa o ponto de corte do teste (valor igual a 1). Para a amostras de soro a diluição ideal é 1/50.....	41
Figura 5.2	Prevalência de anti-HAV total no soro e no fluido oral (ChemBio®), segundo a faixa etária, em 224 indivíduos do Pantanal Sul Mato-Grossense.....	51

Figura 5.3	Prevalência de anti-HAV total no soro e no fluido oral (ChemBio®), segundo a comunidade, em 224 indivíduos do Pantanal Sul Mato-Grossense.....	52
Figura 5.4	Estabilidade do fluido oral, coletado com o dispositivo ChemBio®, durante 210 dias em temperatura de 4-8° C.....	53

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1.1	Grupos expostos ao risco de infecção pelo HAV (Adaptado de Nguyen e Tran, 2009).....	05
Quadro 1.2	Dosagem recomendada da vacina contra hepatite A e esquema de vacinação por faixa etária (Fonte: Fiore <i>et al.</i> , 2006).....	15
Quadro 4.1	Princípio do teste ImmunoComb II HAV Ab (Orgenics, Israel).....	27
Quadro 6.1	Efeito da exposição ao tempo e à temperatura sobre a detecção de anticorpos anti-HAV em fluidos orais.....	61

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

ALT –Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

Anti-HAV IgA - Imunoglobulina do tipo A contra o vírus da hepatite A

Anti-HAV IgG - Imunoglobulina do tipo G contra o vírus da hepatite A

Anti-HAV IgM - Imunoglobulina do tipo M contra o vírus da hepatite A

Anti-HAV total - Imunoglobulina do tipo M e G contra o vírus da hepatite A, detectadas juntamente.

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês “*Center for Disease Control and Prevention*”.



ELISA – Ensaio Imunoenzimático, do inglês “*Enzymed Linked Imunosorbent assay*”.

EUA – Estados Unidos da América

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

HAV – Vírus da hepatite A, do inglês “hepatitis A vírus”

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

Kb – Quilo-bases (1000 bases)

LADTV – Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia

ONG – Organização Não-Governamental

PBS - Tampão fosfato salino, do inglês “*Phosphate Buffer Saline*”

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês “*Polimerase Chain Reaction*”.

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA – ácido ribonucléico

TMB – Tetra-metil-benzidina

UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

WHO/OMS - Organização Mundial da Saúde, do inglês “*World Health Organization*”.

°C - Grau Celsius ou centígrados (medida de temperatura).

## **SUMÁRIO**

---

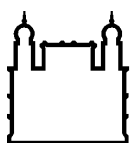
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XVIII</b>

<b>ABSTRACT</b> .....	XIX
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 - Hepatite A: Contexto histórico.....	01
1.2 - O vírus da hepatite A (HAV).....	02
1.3 - Infecção pelo HAV.....	04
1.4 - Diagnóstico da Hepatite A.....	09
1.5 – Epidemiologia.....	10
1.6 - Prevenção e controle da Hepatite A.....	13
1.7 - Fluido oral.....	16
<b>2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO</b> .....	21
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	24
3.1 – Objetivo geral.....	24
3.2 – Objetivos específicos.....	24
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	25
4.1 – Comitê de ética em pesquisa.....	25
4.2 - Painel de otimização das amostras de fluido oral.....	25
4.3 - Coleta e processamento das amostras.....	26
4.4 - Triagem das amostras.....	28
4.5 - Aplicabilidade do melhor do coletor salivar no cenário epidemiológico... 30	
4.5.1 - Área e amostra populacional estudada.....	31
4.5.2 - Desenho amostral e casuística.....	33
4.6 - Efeito da exposição ao tempo e temperatura na detecção de anticorpos anti-HAV nos fluídos orais.....	37
4.7 - Análise estatística.....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	40

5.1 - Painel de otimização das amostras de fluido oral.....	40
5.1.1 - Diluição ideal das amostras de fluido oral para detecção de anticorpos anti-HAV.....	40
5.1.2 - Avaliação de desempenho dos coletores de fluido oral na detecção de anticorpos anti-HAV totais.....	42
5.2 - Avaliação do fluido oral no estudo epidemiológico.....	44
5.2.1 - Características sóciodemográficas da população de estudo.....	45
5.2.2 - Detecção de anticorpos anti-HAV no soro e no fluido oral (ChemBio®).....	47
5.2.3 - Fatores associados à positividade de anticorpos anti-HAV totais.....	48
5.3 - Efeito da exposição ao tempo e à temperatura na detecção de anticorpos anti-HAV no fluido oral.....	52
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
6.1. Avaliação de coletores de fluido oral.....	54
6.2 Estudo epidemiológico em áreas de difícil acesso do Pantanal Sul Mato-Grossense utilizando fluido oral.....	58
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>

## RESUMO

---



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

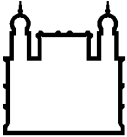
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

TOURINHO, R. S. **Avaliação de diferentes coletores de fluido oral para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite A, e sua aplicação em áreas de difícil acesso.** 104 f. Dissertação de Mestrado – Pós-graduação *strictu sensu* em Biologia Parasitária. 2011.

Uma estratégia adotada por diferentes países para a redução no número de casos novos de hepatite A é a vacinação. No entanto, o mosaico no perfil epidemiológico da doença no Brasil tem dificultado o estabelecimento de um programa nacional de vacinação unificado. Para determinação de políticas nacionais de vacinação, os resultados de estudos epidemiológicos precisam ser cuidadosamente considerados. E para este monitoramento epidemiológico, a utilização do fluido oral é de grande relevância devido à característica indolor e não-invasiva da coleta. Atualmente, existem vários métodos disponíveis para coleta de fluido oral. Contudo, poucos estudos investigam qual o coletor ideal para detecção de baixos títulos de anticorpos e seu uso em áreas de difícil acesso. Por tais razões, o presente estudo teve como objetivo a avaliação de diferentes coletores de fluido oral para detecção da resposta imune humoral contra o vírus da hepatite A e sua aplicação em estudo epidemiológico em áreas de difícil acesso. Para isto, 90 amostras pareadas de soro e fluido oral foram coletadas de voluntários com diferente estado imunitário em condições ideais de coleta (painel de otimização); e 224 amostras pareadas coletadas em áreas de difícil acesso (estudo epidemiológico). O soro foi coletado por punção venosa e o fluido oral foi obtido utilizando 3 dispositivos comerciais: Salivette<sup>®</sup>, OraSure<sup>®</sup> e ChemBio<sup>®</sup>. Soro e fluido oral foram submetidos a um imunoblot comercial (ImmunoComb<sup>®</sup> II HAVAb) para detecção de anticorpos anti-HAV totais. O painel de otimização demonstrou que o coletor de fluido oral com melhor desempenho foi o ChemBio<sup>®</sup> (100% de concordância), seguido pelo OraSure<sup>®</sup> (95,4%) e pelo Salivette<sup>®</sup> (90,8%). Posteriormente, o coletor com melhor desempenho, ChemBio<sup>®</sup>, foi avaliado sob condições precárias de armazenagem. A prevalência geral para amostras de soro e fluido oral foi semelhante, 80,8% e 79%, respectivamente. Os dados por faixa etária demonstraram uma forte tendência do aumento da infecção pelo HAV de acordo com o aumento da idade e revelou, tanto no soro quanto no fluido oral, que 50% dos indivíduos entre 0-10 anos estão susceptíveis à infecção. Um acompanhamento dessas amostras foi realizado para avaliar a estabilidade do fluido oral, e foi observado que 210 dias após a coleta foi possível detectar anticorpos anti-HAV. Com isso, podemos concluir que tal método pode ser utilizado na avaliação do estado imunitário de indivíduos em áreas isoladas ou em populações urbanas, orientando a realização de estudos epidemiológicos e auxiliando no estabelecimento de um programa de controle da doença, bem como a seleção dos grupos etários candidatos a receber a vacina contra hepatite A.

**ABSTRACT**

---



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TOURINHO, R. S. **Evaluation of different oral fluid collection devices to detect antibodies against hepatitis A virus infection and its application in difficult-to-access areas.** 104 f. Dissertação de Mestrado – Pós-graduação *strictu sensu* em Biologia Parasitária. 2011.

A strategy adopted by different countries to reduce the number of new cases of hepatitis A is the vaccination. However, the mosaic of the disease epidemiological profile in Brazil has hampered the establishment of a unified national vaccination program. For the determination of national vaccination policies, the results of epidemiological studies need to be carefully considered. And for this epidemiological monitoring, the use of oral fluid is very important due to the characteristic painless and non invasive collection. Currently, there are several methods available to collect oral fluid. However, there are few studies investigating what is the optimal device to detect low antibody levels and its use in difficult access areas. For these reasons, the present study aimed to evaluate different oral fluid collection devices to detect humoral immune response against hepatitis A virus and its application in epidemiological studies in difficult-access areas. Therefore, 90 paired serum and oral fluid samples were collected from volunteers with different immune status, under ideal conditions of collection (optimization panel); and 224 paired samples collected in difficult access areas (epidemiological study). Serum was collected by venipuncture and the oral fluid was obtained using three commercial devices: Salivette®, OraSure® and Chembio®. Serum and oral fluid were submitted to a commercial immunoblot (ImmunoComb® II HAVAb) to detect total anti-HAV antibodies. The optimization panel demonstrated that the oral fluid collection device Chembio® (100% agreement) had the best performance, followed by OraSure® (95.4%) and Salivette® (90.8%). Then, the best collection device, Chembio®, was evaluated under precarious conditions of collection. The overall prevalence of serum and oral fluid were similar, 80.8% and 79% respectively. The data by age group showed a trend of HAV infection according to age and revealed that 50% of individuals aged between 0-10 years are susceptible to HAV infection in both serum and oral fluid samples. A follow-up of these samples was performed to evaluate the stability of oral fluid, and it was observed that 210 days after the collection it was possible to detect anti-HAV antibodies. Thus, we conclude that this method can be used in assessing the immune status of individuals in isolated areas or in urban populations, guiding the conduct of epidemiological studies and assisting in establishing a program to control the disease as well as the selection of age groups condidate to receive the hepatitis A vaccine.

# 1-INTRODUÇÃO

## 1.1 – Hepatite A: Contexto histórico

A hepatite A era conhecida como uma forma de “Icterícia” nas antigas civilizações grega, romana e chinesa. Esta doença, cuja etiologia viral era ainda desconhecida nesta época, foi considerada como a causa de uma epidemia na ilha de Minorca, no Mar Mediterrâneo, por volta de 1744, sendo este o primeiro relato escrito da doença (Cockayne, 1912). Foi durante as duas grandes guerras do século XX, onde havia uma grande concentração de pessoas, que a doença foi disseminada, levando a pandemias (Paul e Gardner, 1950). Desde então, foi reconhecida como um importante problema de saúde pública.

Por muito tempo, a hepatite A foi denominada de “icterícia catarral”, devido às obstruções biliares causada pela doença. Apenas em 1931, admitiu-se que o agente causador da enfermidade era um vírus (Krugman *et. al.*, 1959).

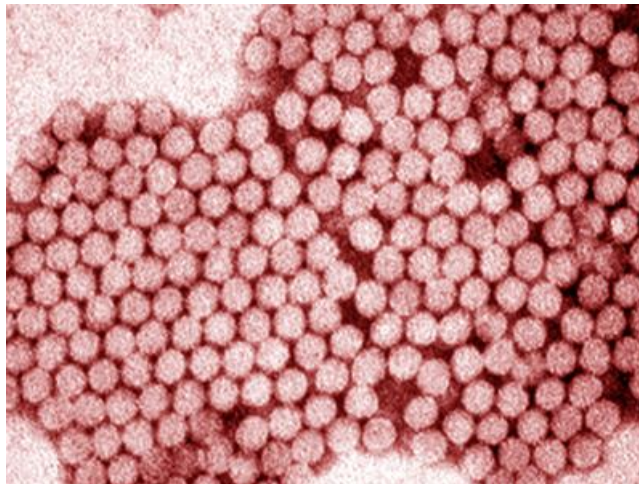
Em 1946, foi estabelecida a existência de duas formas de hepatite: a “hepatite infecciosa”, hoje conhecida como hepatite A, e a “icterícia sérica”, como hepatite B (Krugman *et. al.*, 1959). No entanto, o termo “hepatite A” só foi introduzido, em 1967, por Krugman e colaboradores.

Em 1973, o vírus da hepatite A (*Hepatitis A Virus* - HAV) foi primeiramente visualizado por microscopia eletrônica por Feistone e colaboradores. Alguns anos após, em 1979, Provost e Hilleman conseguiram propagar o vírus em cultura celular, o que possibilitou o desenvolvimento de testes para o diagnóstico da doença e da vacina. Atualmente, sabe-se que a doença causada pelo HAV é uma das cinco viroses nas quais o primeiro sítio de replicação é o fígado (Nainan *et. al.*, 2006), sendo responsável por grande morbidade e mortalidade em todo o mundo.

## 1.2 - O vírus da hepatite A (HAV)

O HAV, membro da família *Picornaviridae*, foi durante algum tempo classificado dentro do gênero *Enterovirus* (Melnick, 1982). No entanto, tendo em vista inúmeras diferenças com outros representantes deste gênero (estabilidade do vírion a 60°C, baixa porcentagem de homologia de nucleotídeos e a falta de reatividade com anticorpos monoclonais gênero enterovírus-específicos), o HAV foi reclassificado em um gênero separado, denominado *Hepatovirus* (Minor *et al.*, 1991).

O vírion é não-envelopado, possui morfologia icosaédrica, 27 a 32 nm de diâmetro (Feinstone *et al.*, 1973) (Figura 1.1) e é composto de 60 cópias de cada uma das três maiores proteínas estruturais, VP1, VP2, VP3 (Siegl *et al.*, 1981).

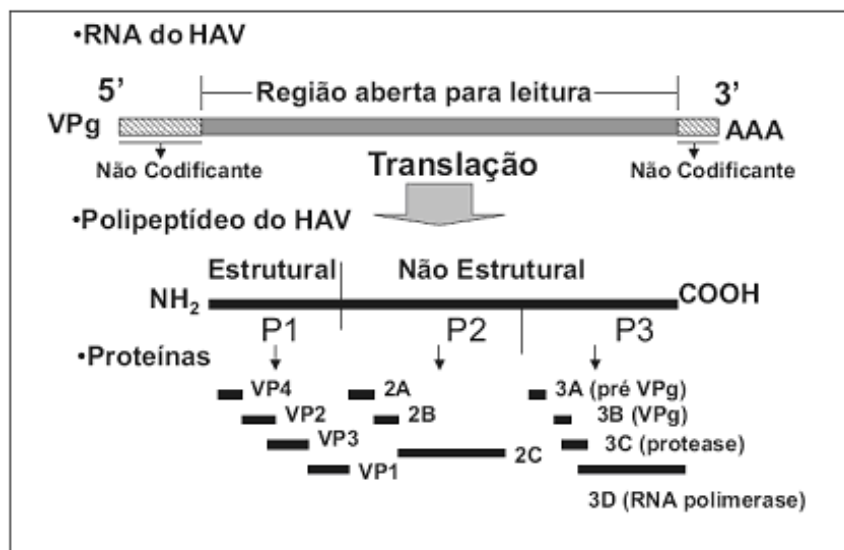


**Figura 1.1:** Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A (Fonte: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), 1998).

Seu genoma é constituído por uma molécula de RNA linear de fita simples, de polaridade positiva, com 7,5 Kb, seguido por uma cauda poli (A) de 40 a 80 nucleotídeos (Provost *et al.*, 1975; Bradley *et al.*, 1978; Koff, 1998). A cadeia de RNA consiste de três regiões: uma região não-codificante na extremidade 5', de 732 a 740 nucleotídeos, que corresponde a 10% do genoma; uma região intermediária, codificante de proteínas virais estruturais e não-estruturais, com

2.225 a 2.227 nucleotídeos; e uma região não-codificante na extremidade 3' com 40 a 80 nucleotídeos. O RNA genômico está associado covalentemente à proteína VPg (ou 3B) na extremidade 5' não-codificante, tendo esta um papel importante na iniciação da tradução, pois forma o sítio de entrada do ribossomo (Pereira e Gonçalves, 2003) (Figura 1.2).

As proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4, formam o conjunto das principais proteínas estruturais do HAV. Essas proteínas são originadas por clivagem da proteína primária pela protease 3C, codificada a partir região P3, que também codifica a VPg (ou 3B), associada ao RNA (Siegl *et al.*, 1981). As proteínas não-estruturais têm funções diferenciadas: a proteína 2A atua como precursora do capsídeo e na morfogênese viral (Cohen *et al.*, 1987); as proteínas 2B e 2C acredita-se que participem da replicação do RNA viral, provavelmente com atividade de helicase (Dolja e Carrington, 1992); a proteína 3A (ou pré-VPg) ancora a proteína 3B no RNA, enquanto que a proteína 3C tem atividade de protease viral, sendo a maior responsável pelo processamento proteolítico do vírus (Gauss-Muller *et al.*, 1991); e a proteína 3D é considerada uma RNA polimerase RNA-dependente (Martin e Lemon, 2006) (Figura 1.2).



**Figura 1.2:** Esquema do RNA do HAV e o processamento da proteína primária, mostrando as principais proteínas codificadas (Fonte: Pereira e Gonçalves, 2003).



O HAV exibe um alto grau de conservação antigênica (Cohen *et. al.*, 1987). No entanto, existe uma diversidade genética suficiente para definir alguns genótipos e subgenótipos. Algumas regiões genômicas são comumente usadas para tal fim. Variações na sequência nucleotídica ocorridas na junção VP1/2A são usadas para definir genótipos e subgenótipos: os genótipos têm 15% de variação de nucleotídeos entre os isolados e os subgenótipos têm de 7 a 7,5% de variações de nucleotídeos. Existem seis genótipos do HAV já identificados: três genótipos (I, II, III) são de origem humana, sendo I e III classificados em subgenótipos A e B; e três (IV, V, VI) são originados de símios (Robertson *et. al.*, 1992). Anteriormente, foram relatados sete genótipos, porém, um estudo permitiu a reclassificação do genótipo VII como um subgenótipo do genótipo II (Lu *et. al.*, 2004). Os genótipos mais frequentes nas infecções humanas são os genótipos I e III (Costa-Mattioli *et. al.*, 2002). No mundo, o genótipo I é o mais abundante, principalmente o subgenótipo IA. No Brasil, já foi relatada a circulação concomitante dos subgenótipos IA e IB (De Paula *et. al.*, 2002).

### **1.3 - Infecção pelo HAV**

A transmissão do HAV ocorre, usualmente, pela via fecal-oral, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com o vírus. A transmissão via contato pessoa-pessoa representa, também, uma das formas mais comuns de infecção. A aglomeração de indivíduos susceptíveis associada aos maus hábitos higiênicos favorece, neste caso, a disseminação da doença (De Paula *et al.*, 2002; Villar *et al.*, 2002; Morais *et al.*, 2006). A transmissão sanguínea é rara e, quando ocorre, está mais frequentemente associada a transfusões de sangue (Cástková e Benes, 2009). Já o risco de transmissão parenteral é mais alto entre os usuários de drogas injetáveis (Diel e Schneider, 2001) e vem aumentando em indivíduos com este comportamento de risco (Cástková *et al.*, 2009). No quadro 1.1 estão demonstrados os grupos com risco de infecção para a hepatite A.

**Quadro 1.1:** Grupos expostos ao risco de infecção pelo HAV (Adaptado de Nguyen e Tran, 2009).

<b>Categoria de exposição ao risco</b>	<b>Comportamento de exposição ao risco</b>
Viajantes	Viajantes de países desenvolvidos que se deslocam para países subdesenvolvidos e podem ser infectados pelo HAV
Homossexuais	Sexo anal-oral
Usuários de drogas injetáveis e não injetáveis	Utilização de drogas e seringas contaminadas com HAV
Indivíduos com distúrbio da coagulação sanguínea	Fator VII do plasma de doadores com hepatite A
Indivíduos que trabalham manuseando alimentos	Contaminação com HAV da comida e bebida durante sua preparação
Indivíduos que trabalham com crianças (creche, escola)	Esses indivíduos são infectados ao entrar em contato com crianças com infecção assintomática ou branda
Trabalhadores da área de saúde	Transmissão do paciente para o profissional de saúde
Tratadores de primatas não-humanos	Transmissão de primatas suscetíveis ao HAV para o trabalhador

Durante a infecção, o vírus ultrapassa a barreira do trato digestório e adere-se aos hepatócitos via receptor HAVCR1 onde inicia sua replicação (Tami *et al.*, 2007). Em seguida, ocorre a liberação de partículas virais para o sangue (viremia), que pode estar presente por um longo período de tempo durante a fase convalescente da hepatite A (Yotsuyanagi *et al.*, 1993). A detecção do vírus nas tonsilas e saliva, logo após o aparecimento do vírus no sangue, sugere que um evento anterior de replicação pode ocorrer na orofaringe ou nas glândulas salivares (Cohen *et al.*, 1989).

Posteriormente, ocorre a excreção na bile e eliminação do HAV nas fezes de pessoas infectadas. A extensiva eliminação do vírus nas fezes ocorre durante a 3ª a 6ª semana do período de incubação e estende-se pelos primeiros dias da enfermidade. O pico de excreção fecal e, conseqüentemente o aumento da

infectividade, ocorrem antes do início dos sintomas ou da elevação do nível sérico das aminotransferases/transaminases e declina após o aparecimento dos sintomas (Skinhoj *et al.*, 1981). Poucas evidências indicam uma relação citotóxica entre o HAV e os hepatócitos. O ciclo enterohepático do HAV se mantém até que anticorpos neutralizantes o interrompam (Frosner *et al.*, 1977).

Tal ciclo explica a alta prevalência da infecção em regiões onde o baixo padrão sanitário propicia a transmissão do HAV. O HAV é excepcionalmente estável em temperatura ambiente e pH baixo. Essas características do vírus demonstram sua capacidade de persistir no meio ambiente e ser transmitido por fezes e água contaminadas. A resistência ao pH ácido e a detergentes permite ao vírus transitar através do estômago e ser eliminado pelo trato biliar do hospedeiro (Martin e Lemon, 2006).

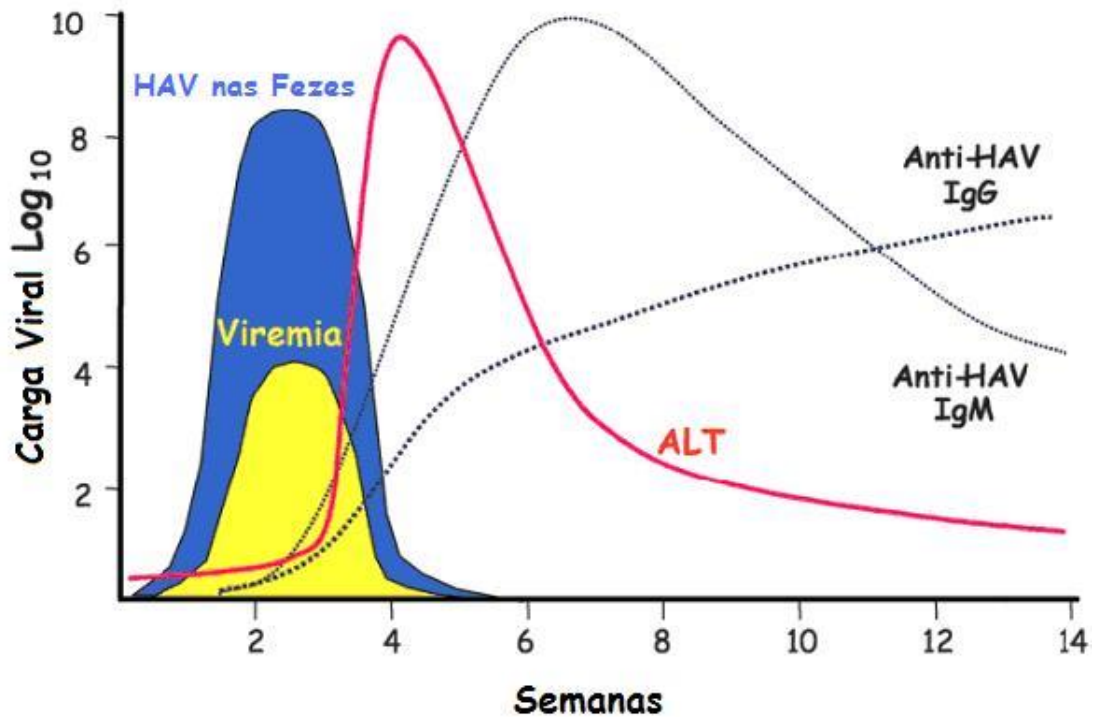
As concentrações virais no soro são de 2 a 3 unidades de log menores do que nas fezes ( $10^9$  virions/g) (Cohen *et al.*, 1989; Sanchez *et al.*, 2006). O vírus também pode ser encontrado em fluidos orais na maioria dos pacientes com hepatite A e sua carga viral parece ser de 1 a 3 unidades de log menores do que aquelas encontradas no soro (Purcell *et al.*, 1984).

O curso da infecção pelo HAV é dividido em quatro fases: período de incubação, fase pré-ictérica, fase de icterícia e fase convalescente. O período de incubação da doença varia de 15 a 50 dias (Paul *et al.*, 1945; Nainan *et al.*, 2006). Durante esta fase, o indivíduo infectado permanece assintomático, apesar da replicação viral estar ocorrendo. Por este motivo, este é o período de maior risco de transmissão, já que resulta em grande quantidade de vírus eliminada nas fezes. Na fase pré-ictérica, ocorre o aparecimento dos primeiros sintomas de icterícia. Em seguida, ocorre uma deposição de pigmentos na pele e mucosas que assumem uma coloração amarelada, o que caracteriza a fase ictérica. A fase convalescente representa a fase de recuperação do indivíduo (O'Grady, 1992; Nainan *et al.*, 2006).

Clinicamente, a hepatite A segue um curso anictérico e assintomático em 95% das pessoas quando infectadas até cinco anos de idade (Ross *et al.*, 1991). Por esta razão, em áreas de alta endemicidade, a maioria dos indivíduos torna-se infectado no início da infância, apesar do número de casos diagnosticados ser baixo (Ferreira e Pretto, 1999). Nos adultos, a doença é mais grave e prolongada (Lednar *et al.*, 1985), mas não leva a um estado crônico (Battegay *et al.*, 1995). A hepatite fulminante é uma rara complicação da hepatite A. O risco de falência aguda do fígado é de 0,015 a 0,5%, e a maioria dos casos ocorre entre jovens crianças e adultos mais velhos com doença hepática crônica (Akriviadis e Redeker, 1989). Em 15 a 20% dos pacientes pode ocorrer reincidência ou prolongamento da doença por até seis meses (Sjogren *et al.*, 1987), sendo o HAV detectado no soro por seis a doze meses após a infecção (Bower *et al.*, 2000).

Devido às suas proteínas estruturais, o HAV induz uma resposta imunitária celular e humoral, o que ocorre antes do início dos sintomas. Ambas as respostas são importantes nos mecanismos de defesa, especialmente, a celular, na patogênese das lesões (Vallbracht *et al.*, 1986), uma vez que a ocorrência de lesão hepática parece ser consequência da citotoxicidade mediada pelas células do sistema imune sobre as células hepáticas infectadas, e não da ação lítica do vírus (Fleischer *et al.*, 1990; Siegl e Weitz, 1993).

Anticorpos IgM específicos contra o HAV (anti-HAV IgM) são detectados antes das primeiras manifestações clínicas da doença, declinam em cerca de 3 a 6 meses (Kao *et al.*, 1984) e tornam-se indetectáveis pela maioria dos testes de diagnóstico, comercialmente disponíveis, após este período. Sua detecção é, portanto, um indicativo de infecção recente pelo HAV (Koff, 1992). Títulos de anticorpos IgG específicos contra o HAV (anti-HAV IgG) aumentam gradualmente, atingindo altos níveis durante a fase convalescente e permanecem por toda vida, conferindo imunidade contra reinfecção. A presença de anti-HAV total (anticorpos anti-HAV IgM e IgG) é um indicativo de infecção recente ou imunidade, não permitindo distinção entre as fases da infecção (Stapleton *et al.*, 1991) (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Cinética da infecção pelo vírus da hepatite A no soro (Fonte: Martin e Lemon, 2006).

Anticorpos IgA específicos contra o HAV (anti-HAV IgA) também são produzidos, por um tempo limitado, durante a infecção (Angarano *et al.*, 1985). O papel dos anticorpos IgA na resposta contra o HAV ainda é desconhecido. Diferente de outros membros da família *Picornaviridae*, o HAV não parece obter uma resposta imune intestinal efetiva (Stapleton *et al.*, 1991).

Anticorpos contra as proteínas estruturais do HAV são produzidos também após imunização com a vacina contra hepatite A. Uma proporção de pessoas vacinadas (8 a 20%) tem uma resposta transitória de anti-HAV IgM. Anticorpos anti-HAV IgG são produzidos por pessoas imunizadas com sucesso (91-100% após a primeira dose da vacina) (Sjogren *et al.*, 1987).

Anticorpos anti-HAV IgM e IgG são neutralizantes, pois reconhecem epítomos conformacionais formados pelas proteínas estruturais do capsídeo viral. Os antígenos estruturais isoladamente, apesar de imunogênicos, induzem

respostas do tipo IgM ou IgG que não são protetores (não-neutralizantes), o que dificulta a obtenção de vacinas a partir de proteínas recombinantes do vírus (Pereira e Gonçalves, 2003).

#### **1.4 – Diagnóstico da Hepatite A**

As anormalidades bioquímicas da hepatite A são detectadas pela dosagem dos níveis séricos das enzimas ALT e AST e a etiologia é dada pela detecção de anticorpos anti-HAV IgM, indicativos de fase aguda da infecção (Hollinger e Emerson, 2007).

O diagnóstico clínico da hepatite A aguda não permite diferenciá-la de outras formas de hepatites virais. Portanto, é necessário um diagnóstico específico que é confirmado por meio da detecção de anticorpos anti-HAV IgM, geralmente feito por ensaio imunoenzimático (ELISA) (Poddar *et. al.*, 2002). A presença de anti-HAV total e a ausência do anti-HAV IgM, pode ser usada para diferenciar a infecção passada da recente. Embora existam seis genótipos do HAV, estes constituem apenas um sorotipo, não interferindo no diagnóstico sorológico. Os testes para detecção de anticorpos anti-HAV totais são utilizados, fundamentalmente, para determinar o estado imune de indivíduos após vacinação ou infecção (Hess *et. al.*, 1995; Oba *et. al.*, 2000).

O uso da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) tem importante papel no auxílio do diagnóstico precoce em casos agudos de etiologia desconhecida e em surtos epidêmicos, ou em pacientes com sintomas e sem marcadores sorológicos para hepatites A, B e C. Entretanto, a disponibilidade de testes sorológicos sensíveis para o diagnóstico da hepatite A, em amostras de soro, torna menos necessária a implementação da técnica de PCR para detecção do RNA do HAV na rotina laboratorial (De Paula *et al.*, 2004).

Testes utilizando amostras de fluidos orais têm sido apresentados como uma forma alternativa aos testes convencionais para a detecção de anticorpos anti-HAV total no soro, devido a sua simplicidade e facilidade na coleta das amostras. Apesar da sensibilidade da detecção do anti-HAV em fluidos orais ser de 1 a 3 unidades de log menor do que no soro, muitos estudos têm demonstrado os benefícios da implementação de testes utilizando tal espécime como uma ferramenta de triagem em investigações de surtos e estudos epidemiológicos (Amado *et al.*, 2006; Jacobson *et al.*, 1995; Oba *et al.*, 2000; Ochnio *et al.*, 1997).

## **1.5 - Epidemiologia**

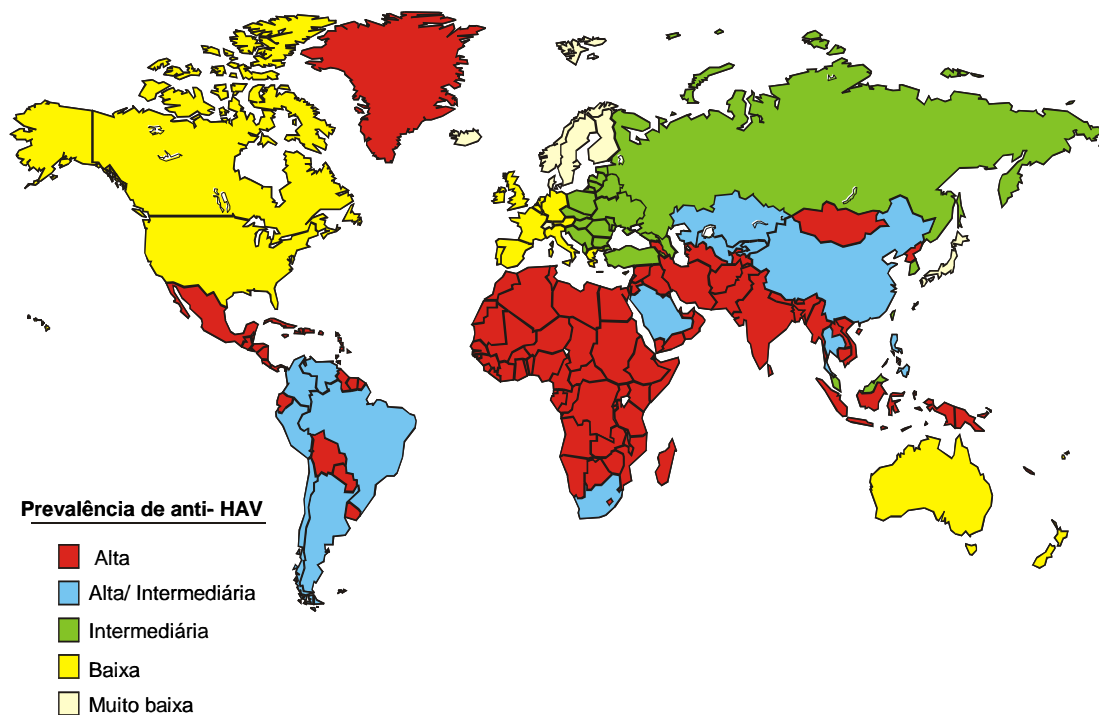
Mundialmente, a endemicidade da infecção pelo HAV varia de acordo com padrões de higiene, condição sanitária e fatores sócio-econômicos (WHO, 2000). Estima-se a ocorrência de, aproximadamente, 1,5 milhões de novos casos de infecção pelo HAV em todo o mundo a cada ano (Martin e Lemon, 2006), representando a causa mais comum de hepatite viral aguda (Vital *et al.*, 2006).

A maior prevalência de infecções causadas pelo HAV ocorre em regiões com baixos níveis sócio-econômicos, como em países em desenvolvimento, onde o baixo padrão sanitário permite a transmissão do vírus (Hadler, 1991).

Nas áreas de alta endemicidade, o HAV é transmitido primariamente pelo contato pessoa-a-pessoa. Apesar de 90% das crianças tornam-se infectadas antes de completar os 10 anos de idade, a hepatite A não representa um grave problema clínico, e os surtos são relativamente incomuns. Em áreas de endemicidade moderada, a infecção ocorre mais frequentemente em adolescentes ou jovens. Em tais áreas, os surtos são comuns, e a transmissão ocorre de pessoa-a-pessoa ou através do consumo de alimentos e água contaminados (Tanaka, 2000). Já nas áreas de baixa endemicidade, a taxa da doença é muito baixa, e a infecção ocorre tipicamente em adultos. Casos de infecção são

esporádicos e os indivíduos são, geralmente, contaminados durante viagens a áreas endêmicas, nestas áreas, os surtos são comuns (Pham *et al.*, 2005).

No Brasil, a hepatite A representa mais de 60% dos casos reportados de hepatite aguda (Gaspar *et al.*, 1996), sendo um grande problema de saúde pública. Há duas décadas, o Brasil era considerado uma área de alta endemicidade para a hepatite A. A exposição ao vírus no início da infância era maior nas regiões Norte e Nordeste do que nas cidades das regiões Sul e Sudeste do país. Tal discrepância era mais significativa quando se consideravam crianças abaixo dos cinco anos de idade. No entanto, um estudo mostra que a soroprevalência de anti-HAV nestas regiões tem diminuído nos últimos 20 anos, em decorrência da melhoria das condições sanitárias. Desta forma, o Brasil deixou de ser uma área de alta endemicidade, tornando-se uma área de endemicidade intermediária (Clemens *et al.*, 2000) (Figura 1.4).

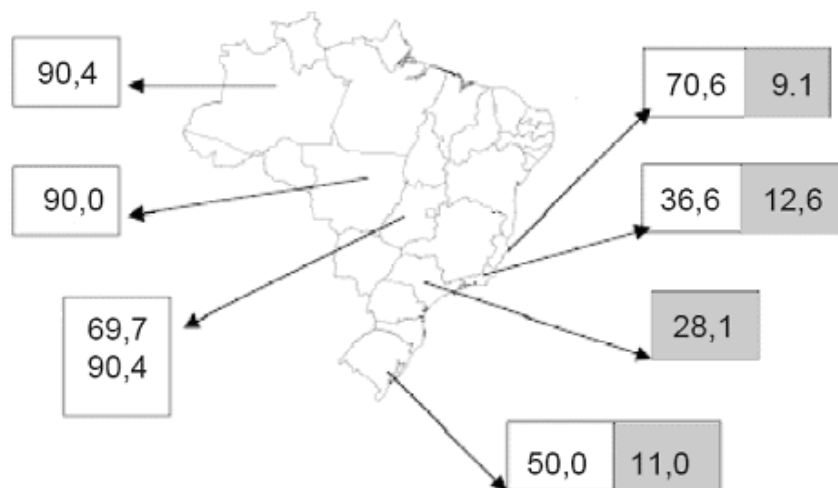


**Figura 1.4:** Distribuição geográfica da infecção pelo HAV (Fonte: Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis A to E- an overview, CDC 2006).



Essa mudança no padrão epidemiológico da hepatite A vem ocorrendo em várias outras regiões do mundo, aumentando o número de jovens susceptíveis e o número de casos da doença nessa faixa etária (Pereira e Gonçalves, 2003).

As cinco regiões brasileiras apresentam padrões variáveis em relação à prevalência do HAV. As regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste do país ainda apresentam alguns padrões semelhantes às regiões subdesenvolvidas, com alta prevalência da infecção pelo vírus. Apesar disso, estudos mais recentes conduzidos em indivíduos menores de 10 anos, já demonstram que a soroprevalência do anti-HAV nestas regiões tem diminuído. Braga e colaboradores (2009) observaram uma prevalência de 60% entre crianças da região amazônica brasileira. Uma prevalência de 32% e 34% foi observada por De Alencar Ximenes e colaboradores (2008) nas capitais do Nordeste e Centro-Oeste brasileiro, respectivamente. Já nas outras regiões, há uma tendência de decréscimo na prevalência (Carrilho *et. al.*, 2005) dentre todas as faixas etárias (Figura 1.5).



**Figura 1.5:** Prevalência de anti-HAV total em crianças até 10 anos de idade nas diferentes regiões brasileiras onde foram realizadas investigações epidemiológicas. Os retângulos em branco indicam crianças de baixo nível socioeconômico e os retângulos cinza, crianças de padrão socioeconômico mais elevado (Fonte: Pereira e Gonçalves, 2003).

Embora venha ocorrendo uma redução da exposição ao HAV durante a infância (Jacobsen e Koopman, 2004), a persistência do vírus circulando no ambiente potencializa as chances de ocorrência de surtos epidêmicos (Vital *et. al.*, 2006). Por tal razão, os dados sobre a proporção da população que é imune ou tem sido infectada com um vírus específico, têm muitas aplicações epidemiológicas. Estas incluem a identificação de grupos susceptíveis em uma determinada população, a avaliação de programas de saúde (vacinação) e o uso destes dados em modelos matemáticos para prever surtos (Gayotto *et. al.*, 1991).

## **1.6 – Prevenção e controle da hepatite A**

A medida de prevenção mais simples contra a infecção pelo HAV é a utilização de métodos que previnem a contaminação das mãos, comida, água, ou outras fontes por fezes contaminadas de indivíduos infectados antes da doença clínica torna-se aparente. Lavar bem as mãos, assim como evitar práticas de trabalho que facilitam a contaminação das mesmas ao entrar em contato com crianças menores de dois anos, também são medidas importantes para o controle da hepatite A (Hollinger, 1992).

A administração de imunoglobulinas, utilizada até 1995 como único método de imunização, ainda é recomendada na prevenção contra a doença em casos de viajantes que frequentarão áreas de alta endemicidade (CDC, 2009). No entanto, seu uso como profilaxia pré-exposição tem sido substituído pelas vacinas inativadas contra o HAV (Martin e Lemon, 2006).

Estão disponíveis no mercado diversas vacinas consideradas seguras e eficazes contra a infecção pelo HAV. As duas mais comumente usadas são compostas por vírus inativados por formalina: a HAVRIX (Smith – Kline Beecham) e a VAQTA (Merck Sharpe & Dohme). Ambas possuem taxa de soroconversão de 91-100% após a administração da primeira dose vacinal, em indivíduos anteriormente soronegativos. Esses imunobiológicos são indicados, atualmente,

pelo Ministério da Saúde Brasileiro, em casos especiais, para indivíduos portadores de: hepatopatias crônicas de qualquer etiologia, inclusive portadores do vírus da hepatite C; portadores crônicos do vírus da hepatite B; coagulopatias; crianças menores de 13 anos com HIV/AIDS; adultos com HIV/AIDS que sejam portadores do vírus da hepatite B ou C; doenças de depósito; fibrose cística; trissomias; imunodepressão terapêutica ou por doença imunodepressora; candidatos a transplante, transplantados ou doadores de órgão sólido cadastrados em programas de transplantes; e portadores de hemoglobinopatias (Ministério da Saúde, 2011).

Em 1988, foram avaliadas algumas cepas mutantes do HAV que foram diretamente isoladas da cultura celular de fezes humanas e propagadas em células certificadas para produção de vacinas (Provost *et al.*, 1988). Ao utilizar uma dessas vacinas experimentais atenuadas, anticorpos neutralizantes foram detectados a partir do terceiro até o sexto mês após a vacinação em todos os espécimes de voluntários soronegativos (Midthun *et al.*, 1991). A vacina foi bem tolerada e o HAV não foi recuperado das fezes ou sangue dos indivíduos. No entanto, vacinas com vírus vivos e atenuados têm sido utilizadas somente em países asiáticos, principalmente China e Índia (Zhuang *et al.*, 2005; Faridi *et al.*, 2009).

Vacinas seguras e eficazes contra o HAV têm sido licenciadas desde 1992, mas são significativamente subutilizadas. As vacinas são altamente imunogênicas, induzindo a produção de anticorpos anti-HAV que persistem por pelo menos 15 anos. Há, ainda, indicações de que tais vacinas conferem proteção a longo prazo. Baseado em evidências científicas atuais, a proteção vacinal é considerada de longo prazo após a aplicação de duas doses da vacina (FitzSimons *et al.*, 2010; Mongillo *et al.*, 2010) (Quadro 1.2).

**Quadro 1.2:** Dosagem recomendada da vacina contra hepatite A e esquema de vacinação por faixa etária (Fonte: Fiore *et al.*, 2006).

Vacina	Idade	Concentração por dose	Volume (mL)	Doses	Reforço (meses)
HAVRIX	1-18	720 (EL.U.)*	0.5 mL	2	6 a 12 meses
	> 18	1440 (EL.U.)*	1.0 mL	2	6 a 12 meses
VAQTA	1-18	25 U**	0.5 mL	2	6 a 18 meses
	> 18	50 U**	1.0 mL	2	6 a 18 meses

\* Unidades do ensaio imunoenzimático (ELISA)

\*\* Unidades

As políticas de vacinação são variadas em todo o mundo, e vão desde a inclusão da vacina contra hepatite A em programa nacional universal de imunização para crianças; à imunizações dirigidas a categorias de exposição ao risco. Programas nacionais de imunização têm sido bem sucedidos, com boas taxas de cobertura e diminuição da incidência em até 90% (CDC, 1999). Países ou regiões que implementaram a imunização universal, como Israel (Mor *et al.*, 2010), Itália (Romanò *et al.*, 2009), Espanha (Dominguez *et al.*, 2008) e os Estados Unidos da América (EUA) (Wasley *et al.*, 2005) demonstraram um impacto positivo sobre a incidência da hepatite A.

Em países altamente endêmicos, programas de vacinação em larga escala contra a hepatite A não são recomendados. Já em países de endemicidade intermediária, onde uma proporção relativamente grande da população adulta é suscetível ao HAV e onde a hepatite A representa um ônus significativo para a saúde pública, a OMS recomenda que a vacinação infantil em grande escala possa ser considerada como um complemento à educação em saúde e ao saneamento básico. Em regiões de baixa endemicidade, a vacinação é indicada para indivíduos com maior risco de infecção, como os viajantes para áreas de endemicidade alta ou intermediária (FitzSimons *et al.*, 2010). No Brasil, nenhuma política nacional de vacinação foi ainda adotada pelas autoridades públicas. Em

novembro de 2010, o Senado Federal aprovou a inclusão contra vacina da hepatite A no calendário infantil. Contudo, o projeto que incluía cinco novas vacinas no calendário nacional de imunização foi vetado. As razões do veto do projeto de lei nº 5 de 2009 (nº 1.273/07 na Câmara dos Deputados) estão relacionados ao não cumprimento dos critérios técnicos exigidos para a inclusão de vacinas no calendário básico como, número de hospitalizações, consultas médicas e óbitos decorrentes da doença; e pelas vacinas estarem disponíveis para as categorias de exposição ao risco.

### **1.7 – Fluido oral**

Convencionalmente, o diagnóstico da hepatite A é realizado em amostras de soro ou plasma. No entanto, a coleta deste espécime clínico por punção venosa é invasiva e dolorosa (De Cock *et al.*, 2004). Com isso, há uma busca por fluidos alternativos cuja obtenção seja possível por métodos não-invasivos e mais fáceis, como os fluidos orais. As vantagens da utilização de fluidos orais para a avaliação da resposta imune humoral induzida pela infecção pelo HAV são a segurança, facilidade e característica indolor da coleta, tornando esta uma alternativa mais satisfatória e conveniente em relação à análise de sangue (Parry *et al.*, 1989). Para estudos epidemiológicos de vigilância, a coleta de fluido oral permite fácil acesso a populações fora do ambiente clínico (Parry *et al.*, 1993).

Fluidos orais contêm saliva pura, proveniente das glândulas salivares, e fluido crevicular, que é um transudado do plasma derivado do leito capilar abaixo da margem dente-gengiva (Roitt e Lehner, 1983). As imunoglobulinas presentes no fluido oral entram na cavidade oral através das glândulas salivares e pela transudação dos capilares sanguíneos abaixo da fenda gengival. Apesar de uma quantidade substancial de IgA derivar de ambas as fontes, os anticorpos IgM e IgG provêm primordialmente do fluido gengival crevicular (Parry *et al.*, 1993). Por tal razão, este fluido contribui para a detecção de anticorpos anti-HAV IgM e IgG derivados do plasma, uma vez que estes estão em maior concentração em comparação com outros componentes salivares (Roitt e Lehner, 1983) (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1:** Concentração média de imunoglobulina (mg/L) no plasma e em diferentes componentes salivares (Roir e Lehner, 1983).

<b>Espécime</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>	<b>IgA</b>
Plasma	14.730	1.280	2.860
Saliva das parótidas	0,36	0,43	39,5
Fluido crevicular	3.500	250	1.110
Saliva total	14,4	2,1	194

A detecção dos anticorpos em fluidos orais foi inicialmente demonstrada por Archibald e colaboradores, em 1986, para anticorpos anti-HIV. A partir deste, vários estudos foram desenvolvidos, utilizando amostras de fluidos orais não apenas para o diagnóstico de infecções recentes e passadas, mas também para o acompanhamento da resposta à vacina contra hepatite A (Parry *et al.*, 1989; Thieme *et al.*, 1992; Parry, 1993). O HAV foi um dos primeiros patógenos para o qual testes baseados na detecção de anticorpos em fluidos orais foram estabelecidos (Parry *et al.*, 1989) (Table 1.2).

**Tabela 1.2:** Revisão bibliográfica sobre estudos relacionados aos fluidos orais como espécime clínico para o diagnóstico da hepatite A, identificados em bases de dados nacionais e internacionais (SciELO, LILACS, Medline, PubMed) (atualizado de Amado, 2010).

Autor	Ano	População de estudo	Local	Objetivo	Anticorpos detectados	Técnica
Parry <i>et al.</i>	1987	Geral	Londres	Padronização	IgM e IgG	RIA
Parry <i>et al.</i>	1988	Viajantes	Londres	Prevalência	IgG	RIA
Parry	1989	Geral	Londres	Padronização	IgG	RIA
Parry <i>et al.</i>	1989	Agudos Hep A	Inglaterra	Diagnóstico	IgM e IgG	RIA
Thieme <i>et al.</i>	1992	Geral	EUA	Padronização	IgM	ELISA
Stuart <i>et al.</i>	1992	Cranças	Londres	Surto	IgM e IgG	ELISA
Parry <i>et al.</i>	1993	Geral	Londres	Surto	IgM e IgG	RIA
Humi <i>et al.</i>	1993	Geral	EUA	Padronização	IgG	ELISA
Piacentini <i>et al.</i>	1993	Geral	EUA	Padronização	IgM e IgG	ELISA
Más Lago <i>et al.</i>	1994	Agudos Hep A	Espanha	Padronização	IgA	ELISA
Jacobsen <i>et al.</i>	1995	Cranças	Londres	Surto	IgM e IgG	RIA
Laufer <i>et al.</i>	1995	Vacinados	EUA	Padronização	IgG	ELISA
Ochinio <i>et al.</i>	1997	Voluntários	Canadá	Padronização	IgG	ELISA
O'Farrell <i>et al.</i>	1997	Geral	Irlanda	Padronização	IgG	ELISA
Ochnio <i>et al.</i>	1997	Crianças	Canadá	Prevalência	IgG	ELISA
Asratian <i>et al.</i>	1997	Agudos Hep A	Rússia	Diagnóstico	IgM e IgG	ELISA
Trout <i>et al.</i>	2000	Trabalhadores	EUA	Prevalência	IgG	ELISA
Aszkenasy	2000	Religiosos	Índia	Surto	IgM e IgG	ELISA
Oba <i>et al.</i>	2000	Geral	Brasil	Diagnóstico	IgM, IgG e IgA	ELISA
Omar <i>et al.</i>	2000	Crianças	Alexandria	Prevalência	IgG	ELISA
Ochnio <i>et al.</i>	2001	Usuários de drogas	Canadá	Prevalência	IgG	ELISA
Marks <i>et al.</i>	2001	Crianças	Londres	Surto	IgM	ELISA
Skidmore <i>et al.</i>	2001	Prisioneiros	Londres	Surto	IgM e IgG	ELISA
Madar <i>et al.</i>	2002	Geral	Eslováquia	Prevalência	IgG	ELISA
Morris-Cunnington <i>et al.</i>	2004	Geral	Inglaterra	Prevalência	IgG	ELISA
Morris-Cunnington <i>et al.</i>	2004	Adolescentes	Inglaterra	Prevalência	IgG	ELISA
Duval <i>et al.</i>	2005	Crianças	Canadá	Prevalência	IgG	ELISA
Amado <i>et al.</i>	2006	Voluntários	Brasil	Diagnóstico	IgM e IgG	ELISA
Ochinio <i>et al.</i>	2007	Voluntários	Canadá	Prevalência	IgG	ELISA
Quoilin <i>et al.</i>	2007	Geral	Bélgica	Prevalência	IgG	ELISA
Tourinho <i>et al.</i>	2011	Voluntários	Brasil	Padronização	IgM e IgG	ELISA
Ahmed <i>et al.</i>	2011	Vacinados	Índia	Padronização	IgM e IgG	ELISA

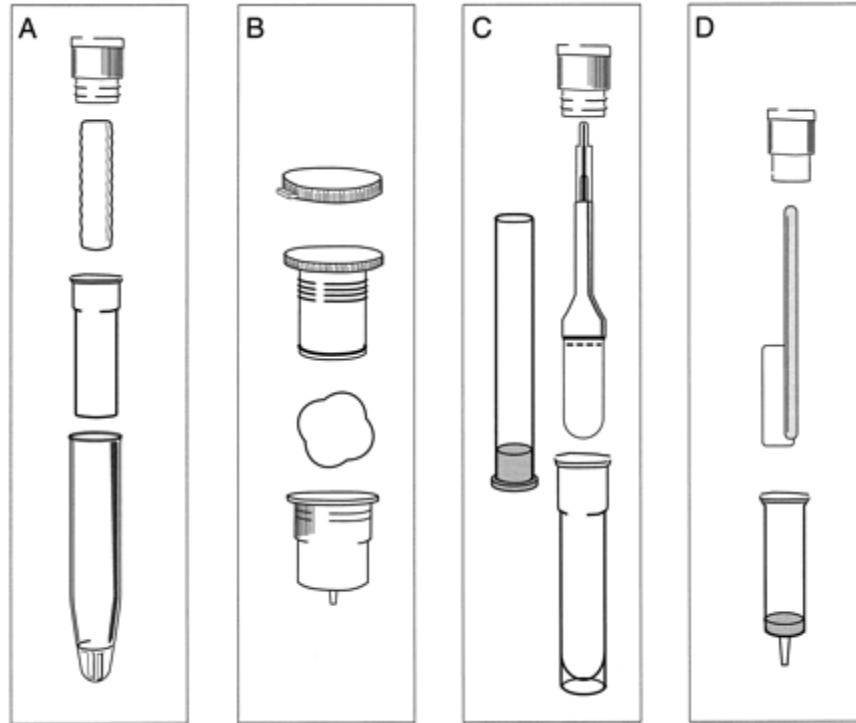
Os primeiros estudos relacionados à detecção de anticorpos em amostras de fluidos orais utilizavam como espécime clínico a saliva total, coletada sem estímulo (Parry *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1988). No entanto, devido a uma série de fatores que contribuíram para a não padronização da técnica, a possíveis contaminações e insatisfação dos pacientes, diversos coletores salivares foram desenvolvidos e adotados na prática laboratorial.

Esses coletores foram desenvolvidos não só para aumentar o nível de anticorpos, particularmente IgG, no espécime coletado e o volume de amostra, mas também, para prevenir o crescimento bacteriano e evitar a degradação

proteolítica dos anticorpos. De maneira geral, isto tem sido feito através da coleta de fluidos orais enriquecidos com fluido gengival crevicular que possui um aumento nos níveis de IgG em relação à saliva, como descrito anteriormente (Roit e Lehner, 1983). O desenvolvimento destes novos sistemas de coleta foi um importante avanço na utilização dos fluidos orais para o diagnóstico das hepatites virais, assim como a adaptação de testes sorológicos já comercialmente disponíveis para análise destas amostras (Thieme *et al.*, 1992).

Atualmente, diversos coletores com metodologias de coleta diferenciadas estão disponíveis no mercado (Figura 1.6). No entanto, não há garantia de que esses dispositivos colem o tipo apropriado de fluido e a concentração mínima necessária de anticorpos. Tem sido sugerido que os níveis de IgG devem ser determinados para cada espécime a ser testado e que apenas os espécimes com pelo menos 0,5 mg de IgG por litro sejam utilizados (Mortimer e Parry, 1994). No entanto, métodos atuais para a quantificação de IgG em fluidos creviculares são pouco sensíveis, caros e demandam tempo para qualquer sistema de triagem de anticorpos anti-HAV, tornando-se ainda menos necessários com o desenvolvimento de imunoenaios mais sensíveis (Hodinka *et al.*, 1998) .





**Figura 1.6:** Alguns coletores comerciais de fluido oral (A) Salivette; (B) Orapette; (C) Omni-SAL; (D) OraSure (Fonte: Hodinka *et al.*, 1998).

## 2 – RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A hepatite A é uma doença endêmica no Brasil e afeta principalmente crianças. No entanto, nos últimos anos, a epidemiologia da doença tem sofrido mudanças devido a melhorias nas condições sanitárias, principalmente nos grandes centros urbanos. Assim, a doença deslocou-se para idades mais avançadas, aumentando com isso o risco de morbidade e mortalidade (Tanaka, 2000). Em países com taxas baixas ou intermediárias da doença (EUA e Israel), a vacinação pediátrica de rotina tem sido apontada como a melhor estratégia, pois as crianças desempenham um papel crítico na transmissão da doença (Vital *et al.*, 2006). Porém, em vista da alta soroprevalência entre adolescentes e adultos em áreas com taxas intermediárias a altas de hepatite A, a vacinação dos indivíduos nessa faixa etária implicaria um investimento considerável, com pequeno retorno em efetividade (Arankalle e Chadha, 2003). Portanto, para estabelecer um programa de vacinação para o controle da doença no Brasil, é necessário realizar estudos epidemiológicos para selecionar os indivíduos e os grupos etários a serem vacinados, visando prevenir a ocorrência de surtos de hepatite A.

Uma estratégia que pode ser aplicada à compreensão e definição da epidemiologia do HAV é a investigação da imunidade por meio da detecção de anticorpos anti-HAV, em grupos populacionais específicos (Vital *et al.*, 1998). Embora esses estudos sejam convencionalmente realizados com a utilização de amostras de soro, a coleta de sangue por punção venosa é considerada invasiva e dolorosa (De Cock *et al.*, 2004). Além disso, o seu posterior processamento (centrifugação), armazenamento (controle térmico) e transporte (para evitar a hemólise das amostras), que exigem condições específicas, não estão, sempre, disponíveis no cenário epidemiológico. Consequentemente, há uma busca por alternativas que sejam não-invasivas e de coleta mais fácil, como os fluidos orais.

As vantagens do uso de fluidos orais para avaliar a imunidade humoral induzida pela infecção pelo HAV são a facilidade, segurança e característica

indolor da coleta, tornando esta uma alternativa satisfatória e conveniente em relação à testagem do sangue (Parry *et al.*, 1989), especialmente se considerarmos as crianças ou outros grupos com dificuldades na coleta de sangue (Ochnio *et al.*, 1997) e as comunidades que vivem em áreas de difícil acesso.

Inúmeros estudos já atestaram a adequação do fluido oral na substituição do soro na detecção de anticorpos específicos (vide tabela 1.2, p.18). No entanto, em alguns casos, a sensibilidade inadequada observada com o uso de alguns testes os tornaram inutilizáveis na prática. A padronização de testes com amostras de fluidos orais provenientes de surtos, também, inviabiliza a utilização do teste na avaliação de indivíduos naturalmente imunizados e vacinados, pois nestes casos os títulos de anti-HAV IgG são menores. Este fato está intrinsecamente relacionado com a infecção pelo HAV, que é determinante para avaliar a resposta de anticorpos, principalmente associada à vacina. A imunidade induzida pela vacina contra o vírus é pelo menos 10 vezes menor do que a resultante de uma infecção natural (Zaaijer *et al.*, 1993), e isto é agravado quando se utilizam os fluidos orais nos quais as concentrações de anticorpos são cerca de 800 a 1.000 vezes menor do que no soro (Challacombe *et al.*, 1978; Parry, 1993; Roitt e Lehner, 1983). Por tais razões, grupos com diferentes estado imunológico foram incluídos no presente estudo.

Atualmente, existem vários métodos disponíveis para coleta de fluido oral. No entanto, há poucos estudos investigando qual o coletor ideal para a detecção de anticorpos anti-HAV e seu uso em comunidades de difícil acesso, e em grupos fora da faixa etária pediátrica. Tal método poderia ser utilizado na rápida avaliação do estado imunitário de indivíduos em áreas isoladas ou em populações urbanas, orientando medidas de vacinação (Nokes *et al.*, 1998).

Ecossistemas alagados, como o Pantanal brasileiro, que é caracterizado pelas constantes flutuações nos níveis dos rios, apresentam condições favoráveis para a circulação de vírus entéricos de transmissão hídrica, como o HAV. No entanto, não há dados sobre a prevalência da hepatite A nem sobre a circulação do vírus na região do Pantanal Sul Mato-Grossense. Por tal razão, o objetivo

principal nesta fase do presente estudo foi realizar um levantamento para detecção de anticorpos contra o HAV nas comunidades da subregião da bacia do rio Paraguai, utilizando amostras de fluido oral; validando o melhor coletor salivar no cenário epidemiológico e fornecendo dados sobre a população susceptível desta região.

A avaliação de diferentes coletores de fluido oral permitirá selecionar indivíduos suscetíveis e imunes, com maior sensibilidade, facilitando a realização de estudos epidemiológicos e auxiliando no estabelecimento de um programa de controle da doença, bem como a seleção dos grupos etários candidatos a vacinação contra hepatite A.

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo geral:**

- Avaliar o desempenho de diferentes coletores de fluido oral para detecção de anticorpos em indivíduos vacinados e em indivíduos naturalmente imunizados com o vírus da hepatite A. Assim como, verificar a utilização do fluido oral para estudos epidemiológicos em áreas de difícil acesso.

#### **3.2 - Objetivos específicos:**

- Avaliar os parâmetros ideais que permitam maior eficiência dos diferentes coletores de fluido oral no teste de detecção de anticorpos anti-HAV (ImmunoComb II HAV Ab, Orgenics).
- Determinar o melhor coletor salivar para detecção de anticorpos anti-HAV em amostras de indivíduos vacinados e naturalmente imunizados com o vírus da hepatite A.
- Determinar a prevalência da hepatite A em uma área de difícil acesso do Pantanal Sul Matogrossense, e avaliar o desempenho do melhor coletor salivar no cenário epidemiológico

- Avaliar a possibilidade da aplicabilidade da coleta do fluido oral como substituto à coleta de sangue em pesquisas de campo em áreas de difícil acesso do Pantanal Sul Mato-grossense, na região Centro-Oeste do Brasil.

## **4 – METODOLOGIA**

### **4.1. Comitê de ética em pesquisa**

A aprovação da permissão para a coleta e testagem das amostras biológicas para a realização do estudo foi obtida do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fiocruz, sob o protocolo 536/09 (Anexo I). Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participação no estudo (Anexo II).

### **4.2 - Paineis de otimização com amostras de fluido oral**

O painel de otimização foi composto por amostras pareadas de soro e fluido oral coletadas de 90 profissionais de saúde do Instituto Oswaldo Cruz/RJ, os quais foram estratificados em 3 grupos: indivíduos não-reagentes para anti-HAV total (anti-HAV IgM e IgG) (NR); os que apresentavam histórico de vacinação por pertencerem ao grupo de risco dos profissionais de saúde (VA) e os que foram naturalmente imunizados durante o curso da infecção pelo HAV (IN). O painel de otimização teve como objetivo a determinação do melhor coletor salivar e dos parâmetros mais favoráveis (diluição da amostra, tempo de incubação, temperatura, etc.) para a detecção de baixos títulos de anticorpos anti-HAV. Para tanto, foi utilizado um imunoensaio comercial (ImmunoComb II HAV Ab, Orgenics, Israel), com 97,3% de sensibilidade e 98,3% de especificidade para amostras de soro, que foram utilizadas como padrão-ouro<sup>1</sup>. Os resultados das amostras de fluido oral, submetidas ao mesmo ensaio, foram comparados com os resultados

---

<sup>1</sup> Teste padrão que serve de comparação com outros testes, com a finalidade de avaliar a exatidão dos mesmos, em resultados que assegurem o máximo de acertos, de forma a estabelecer o diagnóstico real.

das amostras de soro correspondentes a fim de avaliar a sensibilidade, a especificidade e valores preditivos.

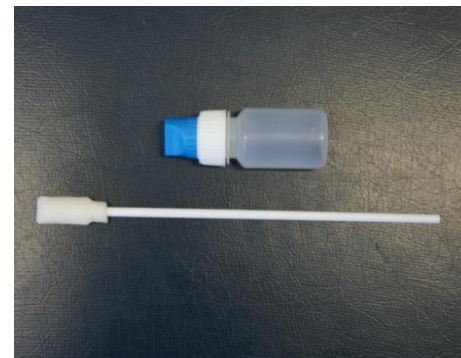
### **4.3 - Coleta e processamento das amostras**

As amostras pareadas de soro e fluido oral foram coletadas de cada indivíduo dos 3 grupos. Cinco mililitros de sangue periférico foram coletados por profissionais especializados por meio de punção venosa periférica, utilizando agulhas hipodérmicas e tubos estéreis do tipo vacutainer (sem anticoagulante). Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 1800g a 25°C por 5 minutos e o soro foi estocado a -20°C. As amostras de fluido oral foram obtidas utilizando-se três dispositivos comerciais: ChemBio® (ChemBio [Diagnostic Systems Inc.](#), Nova Iorque, EUA), OraSure® (Epitope Inc., Beaverton, EUA) e Salivette® (Sarsdedt, Alemanha). A coleta e processamento das amostras de fluido oral estão demonstrados em detalhes no quadro 4.1. Após a coleta, cada amostra de soro ou fluido oral recebeu seu respectivo número de identificação.

**Quadro 4.1:** Métodos de coleta de fluido oral de acordo com cada dispositivo disponível comercialmente.

**ChemBio®**

- Descrição Uma haste plástica com uma esponja absorvente no ápice a qual é colocada em um recipiente plástico contendo 500µL de uma solução preservativa.
- Coleta O cotonete é esfregado ao longo da margem dente/gengiva por aproximadamente 1 minuto, após o cotonete retorna para o recipiente plástico.
- Extração O fluido oral é concentrado na parte inferior de um tubo plástico por centrifugação a 1300/g a 25°C por 10 minutos e estocado a 4-8°C.



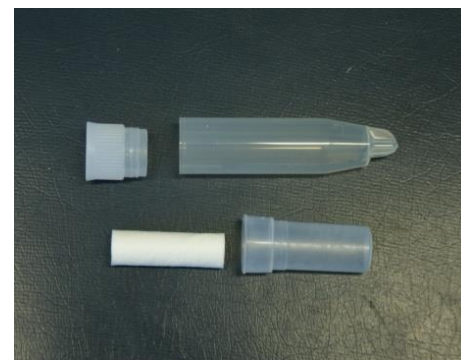
**OraSure®**

- Descrição Um algodão absorvente plano pré-tratado, apoiado em uma haste plástica, e um recipiente contendo 800µL de reagentes preservativos e estabilizantes
- Coleta O algodão é colocado contra a gengiva inferior, em um dos lados e assim mantido por 2 minutos.
- Extração Como anteriormente descrito para o ChemBio® e estocado a -20°C.



**Salivette®**

- Descrição Um tubo de polipropileno com uma perfuração contendo um chumaço de algodão absorvente.
- Coleta Como anteriormente descrito para o OraSure®. Após, é aplicado ao algodão 1 mL de tampão fosfato salino (PBS).
- Extração Como anteriormente descrito para o ChemBio® e estocado a -20°C.

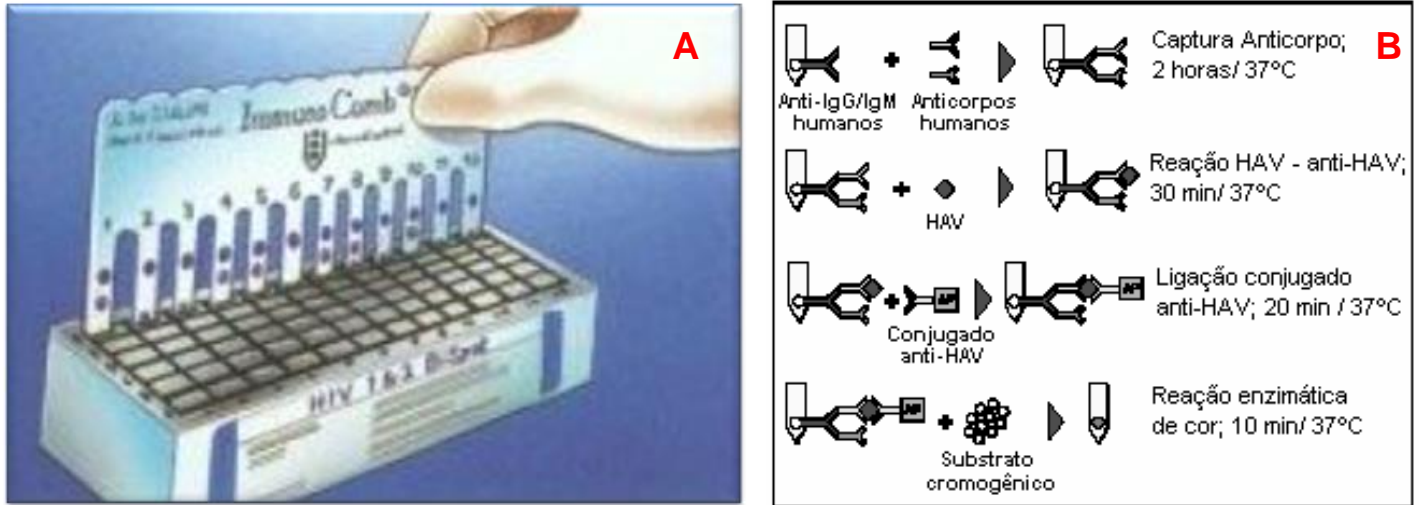




#### 4.4 - Triagem das amostras

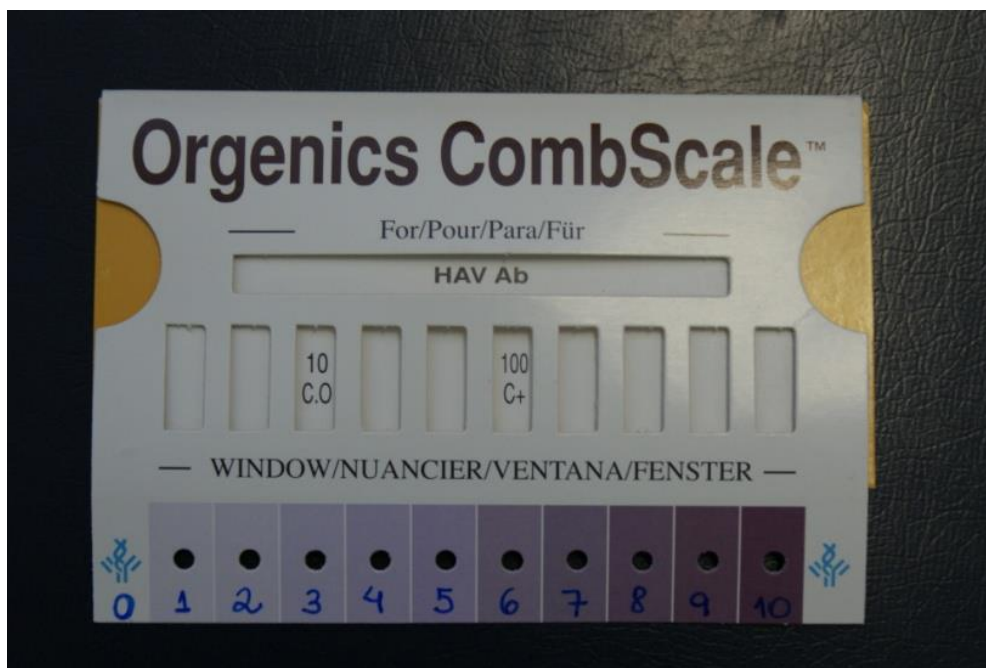
O teste imunoenzimático comercial ImmunoComb II HAV Ab (Orgenics, Israel), para o qual as amostras de fluido oral foram adaptadas, é um dot-blot com detecção direta de anticorpos. É um ensaio imunoenzimático (EIA) em fase sólida, baseado no princípio da imunocaptura. A fase sólida é representada por um pente com doze projeções. Cada projeção é sensibilizada em duas posições: ponto superior – anticorpo monoclonal anti-HAV (controle interno); e ponto inferior – anticorpos de coelho anti-IgM e IgG humanos. A placa reveladora possui 6 fileiras (A-F) de 12 cavidades, cada fileira contendo reagentes prontos para uso. O teste é realizado em 6 etapas, movendo-se o pente de fileira a fileira após incubação em cada etapa (Figura 4.1A).

As amostras de soro ou plasma (25  $\mu$ L), pré-diluídas a 1:50, foram adicionadas ao diluente nas cavidades da fileira A da placa reveladora. O pente foi, então, colocado nas cavidades da fileira A onde anticorpos IgM e IgG anti-HAV foram capturados pelos anticorpos anti-IgM e anti-IgG humanos dos pontos inferiores das projeções do pente. Os componentes não aderidos foram removidos por lavagem na fileira B. Na fileira C, os anticorpos anti-HAV IgM e IgG capturados nas projeções do pente reagiram com antígenos do HAV. Simultaneamente, os antígenos HAV também ligaram-se aos anticorpos anti-HAV no ponto superior (controle interno). Os antígenos do HAV ligados reagiram, na fileira D, com os anticorpos monoclonais anti-HAV marcados com fosfatase alcalina. Os componentes não ligados foram removidos por lavagem na fileira E. Ao final, a fosfatase alcalina ligada reagiu com os componentes cromogênicos na fileira F (Figura 4.1B).



**Figura 4.1:** (A) Pente e placa reveladora do ImmunoComb II HAV Ab. (B) Princípio do teste ImmunoComb II HAV Ab (Organics, Israel).

O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, sendo adaptado para fluido oral, de tal forma que 25  $\mu$ L de cada amostra foi adicionado sem a pré-diluição requerida para o soro. Os resultados, visíveis como pontos cinza-azulados na superfície de cada projeção, foram interpretados por leitura visual de acordo com uma escala colorimétrica (0-10; CombScale) fornecida pelo fabricante (Figura 4.2). Primeiramente, o ponto inferior referente ao controle positivo foi posicionado sob a intensidade de cor mais semelhante à escala de cores. As amostras foram, então, classificadas segundo o critério do ponto de corte, que no presente ensaio foi igual a 1: um ponto com intensidade de cor igual ou acima do ponto de corte (10 UI/L) indicou a presença de um título de proteção anti-HAV; um ponto com intensidade de cor ligeiramente menor do que o ponto de corte foi considerado um resultado indeterminado e a amostra foi retestada (e confirmada); um ponto com intensidade de cor menor do que o ponto de corte foi considerado um resultado negativo. O ensaio ImmunoCombII HAVAb tem um limite de detecção de anticorpos anti-HAV de 10 UI/L, que é considerada como a concentração mínima necessária para imunização contra o vírus da hepatite A.



**Figura 4.2:** Escala colorimétrica (CombScale) para determinação do título de anticorpos anti-HAV.

As amostras do painel de otimização foram testadas no dia seguinte após a coleta, sob condições ótimas de processamento e estocagem. O teste foi reproduzido três vezes e foram obtidos os mesmos resultados, os quais foram interpretados por três diferentes pesquisadores.

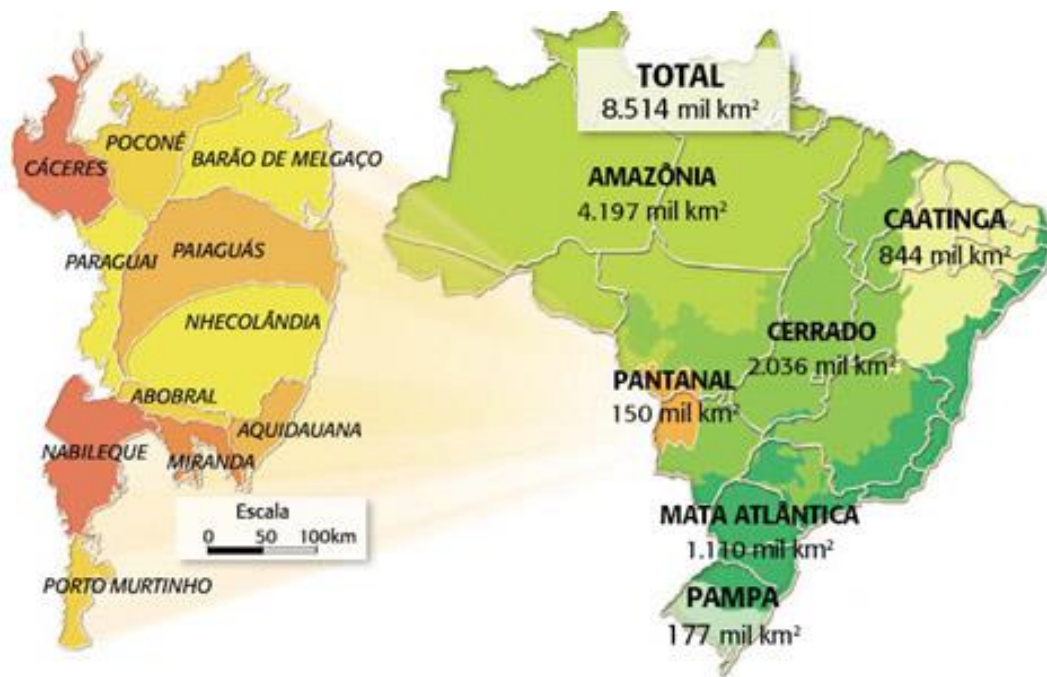
#### **4.5 - Aplicabilidade do melhor do coletor salivar no cenário epidemiológico**

Para avaliação do desempenho e da aplicabilidade do melhor coletor salivar no cenário epidemiológico, um estudo foi realizado no Pantanal Sul Mato-Grossense, Brasil.

##### **4.5.1 - Área e População estudada**

Abrangendo cerca de 150.000 km<sup>2</sup> em territórios do Brasil, Bolívia e Paraguai, o Pantanal é um dos maiores ecossistemas de água doce do mundo (Lopes, 2006). No

Brasil, onde 85% da área total está localizada, 65,5% está situada no estado de Mato Grosso do Sul (MS), conhecido como Pantanal Sul e os outros 34,5% no estado de Mato Grosso (Alho *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 2001). A região é ecologicamente classificada em Sub-regiões que diferem no grau de inundação, vegetação e fisiografia (Adámoli, 1987) (Figura 4.3).



**Figura 4.3:** Sub-regiões do Pantanal brasileiro (Fonte: Globo Rural - Edição 288 - Outubro de 2009).

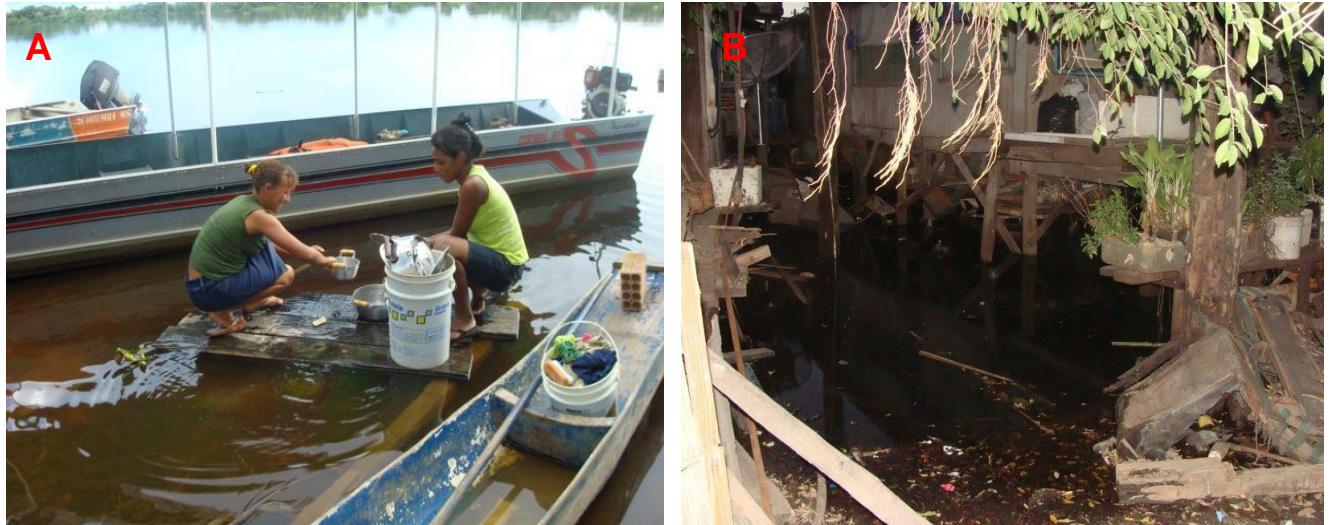
A sub-região da bacia do rio Paraguai, localizada no oeste do Pantanal Sul, agrega áreas dos municípios de Poconé, Corumbá e Ladário, ocupando 5,9% da área total do Pantanal (Silva e Abdon, 1998). Esta sub-região é caracterizada por baixa densidade populacional e vastas áreas alagáveis de mata nativa com estações bem definidas do ano: a seca e a chuvosa (Magalhães, 1992).

A região é constituída por construções bem características, as casas de pau-a-pique e as palafitas, com arquitetura delineada para períodos de inundações (Figuras 4.4 A e B, respectivamente).



**Figura 4.4:** Sub-região da bacia do rio Paraguai (A) Casas de pau-a-pique da comunidade de São Lourenço. (B) Palafitas das comunidades de Porto da Manga, região alagável.

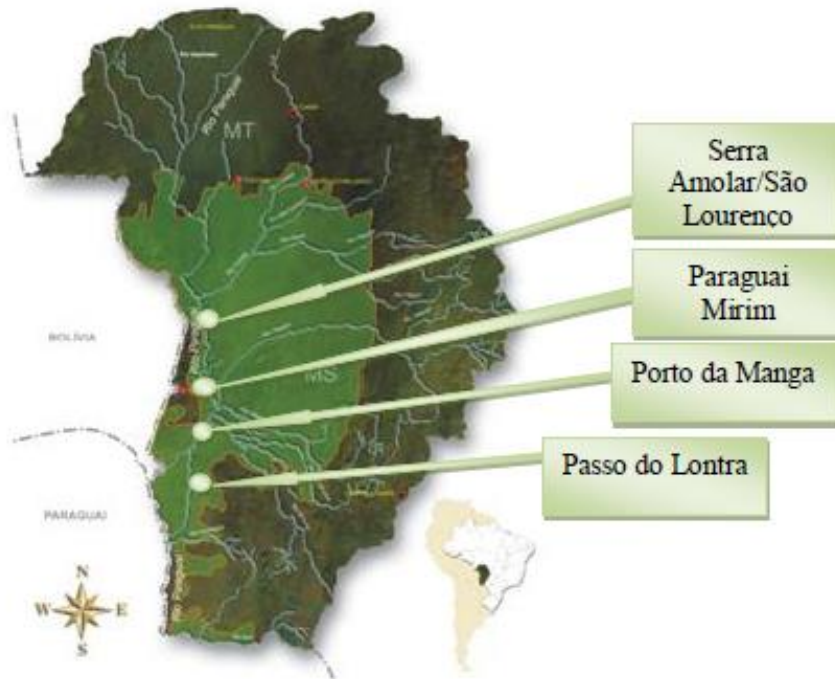
A população é constituída, em quase toda a sua totalidade, de pescadores que utilizam o rio como fonte de subsistência. No entanto, são realizadas algumas atividades agrícolas como plantações de mandioca, arroz e feijão, e a criação de animais domésticos no entorno das casas, em períodos de seca ou em regiões não alagáveis (Farias *et al.*, 2007). Muitas comunidades, localizadas em áreas distantes e de difícil acesso, não possuem fornecimento de energia elétrica ou saneamento básico (Figura 4.5 A e B). A taxa de natalidade é considerada alta, o que justifica o predomínio de crianças.



**Figura 4.5:** Sub-região da bacia do rio Paraguai (A) Mulheres da comunidade de Paraguai-Mirim lavando utensílios no rio Paraguai. (B) Padrão sanitário da comunidade do Passo do Lontra.

#### 4.5.2 Desenho amostral e casuística

O presente estudo é um inquérito soropidemiológico de base populacional (transversal) e foi desenvolvido em quatro comunidades isoladas que vivem em áreas de difícil acesso nas margens da bacia do Rio Paraguai, situadas no Pantanal Sul Mato-grossense, Brasil: Serra do Amolar/São Lourenço, Paraguai Mirim, Porto da Manga e Passo do Lontra (Figura 4.6).



**Figura 4.6:** Localização geográfica das comunidades ribeirinhas do Pantanal Sul-Matogrossense, foco do presente estudo (Fonte: Agência Nacional das Águas, 2007).

A comunidade da Serra do Amolar/São Lourenço, localizada a 217 km de Corumbá por via fluvial, é constituída por 121 moradores e é considerada a comunidade mais distante e de difícil acesso, o que contribuiu para o seu isolamento (Figura 4.7 A). A comunidade Paraguai Mirim, localizada a 170 km de Corumbá por via fluvial, é formada por 190 pessoas, distribuídas em, aproximadamente, 24 famílias (Figura 4.7 B). A comunidade do Porto da Manga está localizada na estrada Parque do Pantanal Sul Mato-Grossense, a 385 km da capital Campo Grande. É constituída por, aproximadamente, 230 moradores (Figura 4.8 A). A comunidade do Passo do Lontra também está localizada na estrada Parque do Pantanal, a 300 km de Campo Grande. É composta por 150 pessoas, distribuídas em, aproximadamente, 23 famílias (Figura 4.8 B). É a comunidade mais urbanizada e mais próxima à capital. Nesta região, está localizada a Base de Estudos do Pantanal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), que oferece atendimento médico e odontológico periódico.



**Figura 4.7:** Sub-região da bacia do rio Paraguai (A) Comunidade de Serra do Amolar/São Lourenço. (B) Comunidade de Paraguai-Mirim próximo a unidade escolar.



**Figura 4.8:** Sub-região da bacia do rio Paraguai (A) Comunidade de Porto da Manga. (B) Comunidade de Passo do Lontra.

A pesquisa foi conduzida entre abril de 2010 e junho de 2010 e um total de 224 amostras pareadas de soro e fluido oral (Figuras 4.9 A e B, respectivamente) foi coletado de todos os habitantes disponíveis e consensuais, pós-informação, das famílias ribeirinhas.





**Figura 4.9:** Sub-região da bacia do rio Paraguai. Coleta soro (A) e fluido oral (B) em pacientes das comunidades do Pantanal Sul Mato-Grossense.

As coletas foram realizadas juntamente com uma equipe de saúde da UFMS. As amostras coletadas foram acondicionadas em caixas refrigeradas com blocos de gelo e foram levadas ao Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTEV) do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ para a triagem de anticorpos anti-HAV, utilizando o ensaio ImmunoComb II HAV Ab 15 dias após a coleta (Figura 4.10). Por meio de questionários foram obtidas informações sobre as características sociodemográficas (gênero, idade, etc) de cada membro do estudo. É importante salientar que nenhum indivíduo das comunidades estudadas possuía histórico de vacinação contra a hepatite A.



**Figura 4.10:** Transporte e armazenamento das amostras em áreas de difícil acesso do Pantanal Sul Mato-Grossense.

#### **4.6 - Efeito da exposição ao tempo e temperatura na detecção de anticorpos anti-HAV nos fluidos orais**

Comumente, um tempo prolongado de armazenamento das amostras e a variação da temperatura têm efeito significativo sobre a detecção de anticorpos, principalmente, no fluido oral. Esses efeitos são avaliados quando amostras de referência são coletadas simultaneamente e testadas em uma escala temporal. Para avaliar a adequabilidade das amostras de fluido oral, neste cenário epidemiológico, foi investigada a influência da exposição ao tempo e à temperatura sobre a detecção de anticorpos anti-HAV nestas amostras biológicas. Uma vez que a estabilidade dos anticorpos coletados com os dispositivos OraSure® e Salivette® está amplamente descrita na literatura (Parry, 1993; Stark *et al.*, 1993), no presente estudo foi avaliado o efeito desses parâmetros somente nas amostras de fluidos orais coletadas com o dispositivo ChemBio®. Os parâmetros foram definidos com base nas instruções de armazenamento fornecidas pelo fabricante de cada dispositivo.

Por quatorze dias, as amostras de fluido oral permaneceram em temperatura ambiente ou em condições refrigeradas (4-8°C). Ao final desta exposição, as amostras foram centrifugadas e refrigeradas a 4-8°C até a primeira análise (15 dias após a coleta). As amostras permaneceram por 210 dias armazenadas a temperatura de 4-8°C e a cada 30 dias durante este período foram testadas para detecção de anticorpos anti-HAV.

#### **4.7 - Análise estatística**

As variáveis categóricas foram codificadas por meio de números e, juntamente com as variáveis quantitativas, armazenadas em um banco de dados criado no Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, EUA). Com base na análise estatística descritiva, foram determinados os valores de frequência e seus intervalos de 95% de confiança (IC 95%); e mediana com faixa de variação (valores mínimo e máximo) para variáveis quantitativas que não apresentam distribuição normal. Para determinar a significância das diferenças observadas entre os dados dos grupos estudados, foram consideradas as hipóteses nula ou  $H_0$  (ausência de diferença entre os dois grupos) e alternativa ou  $H_1$  (presença de diferença entre os dois grupos). Na análise bivariada, foi utilizado o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com correção de Yates ou para tendência e, quando apropriado, o teste exato de Fisher para comparar proporções; e o teste  $U$  de Mann-Whitney para as variáveis quantitativas que não apresentam distribuição normal. O relacionamento (correlação) entre as variáveis contínuas foi realizado utilizando-se análise por postos (prova de Spearman). Na avaliação da validade simultânea do teste diagnóstico em fluido oral foram determinados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, e seus IC 95%. Para avaliar o grau de concordância entre os resultados da testagem anti-HAV no soro e no fluido oral foi utilizado o índice de concordância kappa ( $k$ ), interpretado de acordo com os seguintes valores:  $k < 20\%$  = ruim;  $k 21 - 40\%$  = razoável;  $k 41 - 60\%$  = moderada;  $k 61 - 80\%$  = boa; e  $k 81 - 100\%$  = muito boa (Altman, 1991). Um valor de  $p < 0,05$  (teste bicaudal) será considerado

estatisticamente significativa. Para análise estatística foram utilizados os programas MedCalc for Windows, versão 7.6.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica) e GraphPad InStat versão 3.05 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA.

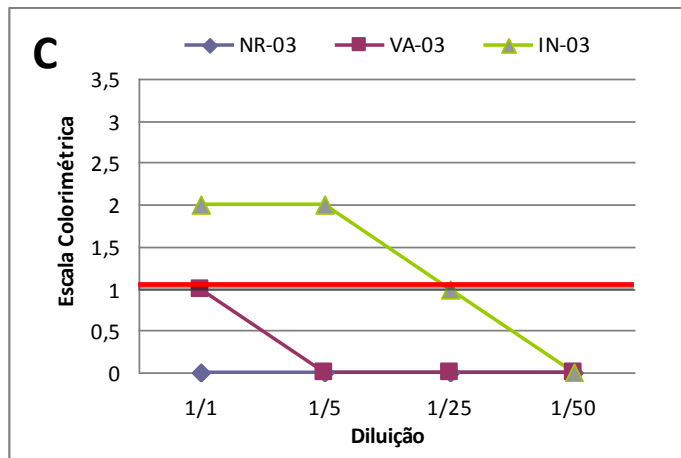
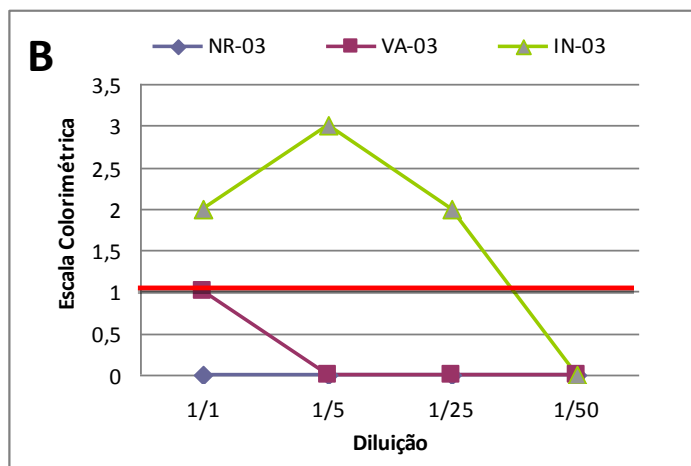
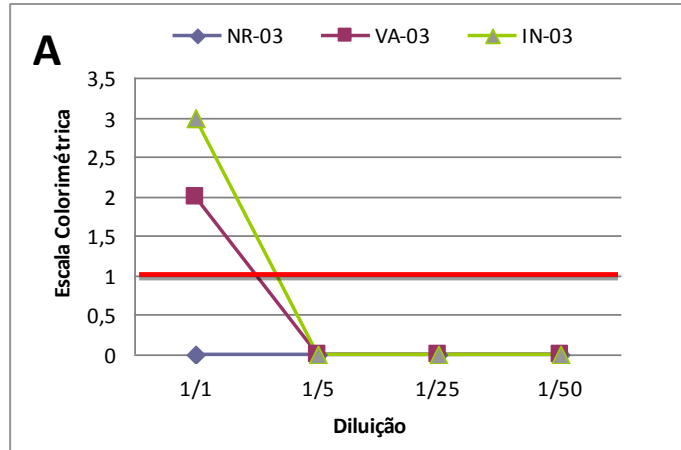
## **5 – RESULTADOS**

### **5.1 - Painel de otimização das amostras de fluido oral**

#### **5.1.1 - Diluição ideal das amostras de fluido oral para detecção de anticorpos anti-HAV**

Os testes iniciais de titulação foram realizados para determinar a diluição ideal das amostras de fluido oral no ensaio imunoenzimático Immunocomb II HAV Ab (Organics, Israel) de indivíduos pertencentes aos diferentes grupos do estudo.

Dentre os indivíduos com imunidade naturalmente adquirida (n=30), as amostras coletadas com os dispositivos OraSure® e Salivette® apresentaram resultados concordantes, com os respectivos resultados no soro, até a diluição de 1/25 (Figuras 5.1 B e C). No entanto, resultados falso-negativos ocorreram para as amostras coletadas com o dispositivo ChemBio® (Figura 5.1 A) a partir da diluição 1/5. No grupo dos indivíduos vacinados (n=25), foram observados resultados falso-negativos para todos os coletores em todas as diluições, com exceção das amostras não diluídas (Figuras 5.1 A, B e C). Dentre as amostras pertencentes ao grupo dos indivíduos não-reagentes (n=35), não foram encontrados resultados falso-positivos (Figuras 5.1 A, B e C). Por tais razões, o melhor desempenho do teste para os três dispositivos de coleta foi obtido utilizando as amostras puras. Com isso, as amostras de fluido oral foram usadas sem qualquer diluição em todos os imunoenaios realizados.



**Figura 5.1:** Teste de titulação das amostras de fluido oral pertencentes ao grupo dos indivíduos não-reagentes (NR), vacinados (VA) e com imunidade natural (IN) coletadas com os diferentes dispositivos comerciais ChemBio® (A), OraSure® (B) e Salivette® (C). A linha horizontal contínua em vermelho representa o ponto de corte do teste (valor igual a 1). Para a amostras de soro a diluição ideal é 1/50.

A avaliação de outros parâmetros (temperatura, tempo de incubação do teste, etc.) não foi realizada, pois, a modificação na diluição das amostras foi suficiente para a otimização do fluido oral no imunoenensaio utilizado, como demonstrado a seguir.

### **5.1.2 - Avaliação de desempenho dos coletores de fluido oral na detecção de anticorpos anti-HAV totais**

Dentre as 90 amostras dos profissionais de saúde que foram coletadas, 35 pertenciam ao grupo dos não-reagentes (NR); 30 ao grupo dos indivíduos com imunidade natural (IN); e 25 ao grupo dos vacinados (VA), dos quais 21 indivíduos receberam as duas doses recomendadas no esquema de vacinação e 4 indivíduos receberam apenas a primeira dose da vacina (Havrix, SmithKlineBeecham ou Vaqta, Merck Sharp Dohme). Essas amostras foram avaliadas quanto à detecção de anticorpos anti-HAV totais e os resultados foram comparados às amostras de soro correspondentes.

Os resultados do painel de otimização demonstraram que as amostras de fluido oral obtidas pelos três dispositivos de coleta foram concordantes com todas as amostras de soro dos indivíduos não-reagentes e dos indivíduos com imunidade natural. No entanto, no grupo dos vacinados, duas amostras apresentaram resultados falso-negativos quando coletadas com o dispositivo OraSure<sup>®</sup>, um não-responder<sup>2</sup> que havia recebido apenas a 1<sup>a</sup> dose e o outro que recebeu as duas doses da vacina; e quatro amostras falso-negativas com o Salivette<sup>®</sup>, dois não-respondedores após a 1<sup>a</sup> dose e dois após a 2<sup>a</sup> dose da vacina.

Foi observada uma variação na escala colorimétrica entre as amostras pertencentes ao grupo dos indivíduos vacinados e dos indivíduos com imunidade natural, coletadas com os diferentes dispositivos. Essa variação evidenciou que a mediana e a distribuição das frequências dos valores da escala dos indivíduos

---

<sup>2</sup> A definição de não-responsividade caracteriza-se pela ausência de soroconversão (negatividade para detecção de anticorpos anti-HAV, não conferindo imunidade) dos indivíduos vacinados.

vacinados tendem a serem menores do que nos naturalmente imunizados, sendo estatisticamente diferente e significativa. Dentre os dispositivos de coleta, o ChemBio® demonstrou valores mais próximos aos valores da escala colorimétrica do soro em relação ao grupo dos indivíduos vacinados ( $P=0,5979$ ) e ao grupo dos vacinados juntamente com indivíduos de imunidade natural ( $P=0,7404$ ) (Tabela 5.1). O grupo dos indivíduos não-reagentes não apresentou variação na escala colorimétrica.

**Tabela 5.1:** Análise dos valores da escala colorimétrica dos indivíduos vacinados e naturalmente imunizados segundo o dispositivo de coleta.

Coortes	Amostra			
	Soro	ChemBio®	Orasure®	Salivette®
<b>Vacinados</b>				
Mediana (Mínimo-Máximo)	2,0 (1,0-5,0)	2,0 (1,0-5,0)	1,0 (0,0-5,0)	1,0 (0,0-4,0)
<b>Imunidade Natural</b>				
Mediana (Mínimo-Máximo)	4,0 (1,0-5,0)	3,0 (1,0-5,0)	3,0 (1,0-5,0)	3,0 (1,0-5,0)
<i>P</i> valor (Mann-Whitney)	0.003	0.0054	0.0008	0.0002
<i>P</i> valor ( $\chi^2$ para tendência - vacinados versus imunidade natural)	0.0022	0.0054	0.0008	0.0003

A análise das metodologias de coleta demonstrou um alto grau de concordância entre soro e fluido oral (coeficiente Kappa). O desempenho comparativo desses dispositivos está demonstrado na tabela 5.2. Esses dados sugerem que há uma pequena discriminação entre os três coletores de fluido oral, quando comparamos os resultados qualitativos de anticorpos anti-HAV entre os espécimes clínicos.

A análise do coeficiente de Spearman foi utilizada para correlacionar os resultados das amostras pareadas de soro e fluido oral, coletadas com cada dispositivo. Apesar do valor deste coeficiente variar entre os coletores utilizados, uma alta correlação positiva entre as espécimes foi observada (Tabela 5.2).



**Tabela 5.2:** Parâmetros de avaliação dos três dispositivos de coleta de fluido oral com o ensaio Immunocomb II HAV Ab em relação aos resultados qualitativos das amostras de soro correspondentes.

Comparação % (IC 95% <sup>a</sup> )	Dispositivo de Coleta		
	<b>ChemBio®</b>	<b>Orasure®</b>	<b>Salivette®</b>
Sensibilidade	100 (0,9351-1,000)	96,36 (0,8748-0,9956)	92,73 (0,8242- 0,9798)
Especificidade	100 (0,9001-1,000)	100 (0,9001-1,000)	100 (0,9001-1,000)
Valor preditivo positivo	100 (0,9351-1,000)	100 (0,9328-1,000)	100 (0,9302-1,000)
Valor preditivo Negativo	100 (0,9001-1,000)	94,59 (0,8179-0,9934)	89,74 (0,7577-0,9714)
Coeficiente de Spearman	98,7	96,9	94,8
Coeficiente Kappa	100	95,4	90,8

<sup>a</sup>IC: Intervalo de 95% de Confiança.

Utilizando as amostras do painel de otimização foi possível observar que os resultados das amostras coletadas com o dispositivo ChemBio® foram mais compatíveis com os resultados do padrão-ouro do que os outros dois dispositivos.

## 5.2 - Avaliação do fluido oral no estudo epidemiológico

Após a determinação do ChemBio® como sendo o coletor que apresentou os melhores resultados nos parâmetros de avaliação do teste, foi realizado um estudo epidemiológico para avaliar a aplicabilidade deste dispositivo em campo.

### 5.2.1 - Características sócio-demográficas da população de estudo

No estudo epidemiológico de prevalência da hepatite A, realizado no Pantanal Sul Mato-Grossense, foram coletadas 224 amostras pareadas de soro e fluido oral (ChemBio®) obtidas de voluntários, dos quais, 100 (43,9%) eram do sexo feminino e 124 (56,1%) masculino. A idade da população de estudo variou de 3 a 86 anos com média de idade de 26,91  $\pm$ 17,35 anos (Tabela 5.3).

Devido a inexistência de dados de soroprevalência de anti-HAV nas comunidades estudadas, procurou-se recrutar o maior número de indivíduos voluntários entre os residentes locais no presente estudo. Nas comunidades da Serra do Amolar/São Lourenço ( $n = 45/121$ ) e do Paraguai-Mirim ( $n = 60/190$ ) a proporção da população que participou do estudo foi semelhante, cerca de 37% e 32% respectivamente. Contudo, nas comunidades do Porto da Manga foram admitidas 10% dos habitantes locais ( $n = 23/230$ ) e na comunidade do Passo do Lontra 64% ( $n = 96/150$ ).

**Tabela 5.3:** Características sociodemográficas dos indivíduos do estudo ( $n = 224$ ).

<i>Variável</i>	<i>População de estudo (n)</i>	<i>População de estudo (%)</i>
<b><i>Faixa etária (anos)</i></b>		
0-10 anos	46	20,53%
11-20 anos	50	22,32%
21-30 anos	47	20,98%
31-40 anos	26	11,61%
41-50 anos	29	12,95%
> 51 anos	26	11,61%
<b><i>Gênero</i></b>		
Feminino	100	43,9%
Masculino	124	56,1%
<b><i>Nível Educacional</i></b>		
Nenhum	19	8,48%
Primário	156	69,6%
Secundário	32	14,29%
Graduado	14	6,25%
Não informaram	3	1,38%
<b><i>Renda Familiar</i></b>		
≤ 1 salário mínimo	107	47,8%
2 salários mínimos	95	42,4%
3 salários mínimos	19	8,5%
Não soube	3	1,3%
<b><i>Comunidade</i></b>		
Serra do Amolar/São Lourenço	45	20,09%
Paraguai-Mirim	60	26,78%
Porto da Manga	23	10,27%
Paso do Lontra	96	42,86%

### 5.2.2 - Detecção de anticorpos anti-HAV no soro e no fluido oral (ChemBio®)

Os anticorpos anti-HAV totais foram detectados em 181 soros pelo imunoensaio comercial ImmunoComb II HAV Ab (Orgenics, Israel), demonstrando uma soroprevalência para hepatite A de 80,8%. A prevalência de anti-HAV total em fluidos orais coletados com o dispositivo ChemBio® foi de 79,01%, correspondendo a 177 amostras reativas das 224 testadas. A tabela 5.4 demonstra os resultados concordantes e os discordantes, das amostras pareadas de soro e de fluido oral. Esses dados evidenciaram valores de sensibilidade de 97,24% (IC 95%: 0,936-0,991), especificidade de 97,67% (IC 95%: 0,877-0,999), valor preditivo positivo de 99,44% (IC 95%: 0,968-0,999), valor preditivo negativo de 89,36% (IC 95%: 0,768-0,964) e coeficiente Kappa de 91,7% (IC 95%: 0,851-0,982).

**Tabela 5.4:** Resultados de anti-HAV das amostras pareadas de soro e fluido oral (ChemBio®) do Pantanal Sul-Matogrossense testadas com o ImmunoComb II HAV Ab ( $n = 224$ )

	Soro +	Soro -	Total
Fluido Oral +	176 (78,6%)	1 (0,4%)	177 (79,0%)
Fluido Oral -	5 (2,2%)	42 (18,8%)	47 (21%)
Total	181 (80,8%)	43 (19,2%)	224 (100%)

A variação dos valores na escala colorimétrica das amostras reagentes foi similar entre soro e fluido oral (ChemBio®), resultando em uma mediana de 3,0 para ambas as espécimes. Novamente, as amostras não reagentes não demonstraram variação.

### **5.2.3 - Fatores associados à positividade de anticorpos anti-HAV totais**

Para analisar a relação entre os fatores sociodemográficos e a presença de anticorpos anti-HAV no soro e no fluido oral foi realizada a análise bivariada. De todas as variáveis estudadas, apenas idade ( $P < 0,0001$ ) foi um fator significativamente associado à positividade desses anticorpos específicos (Tabela 5.5).

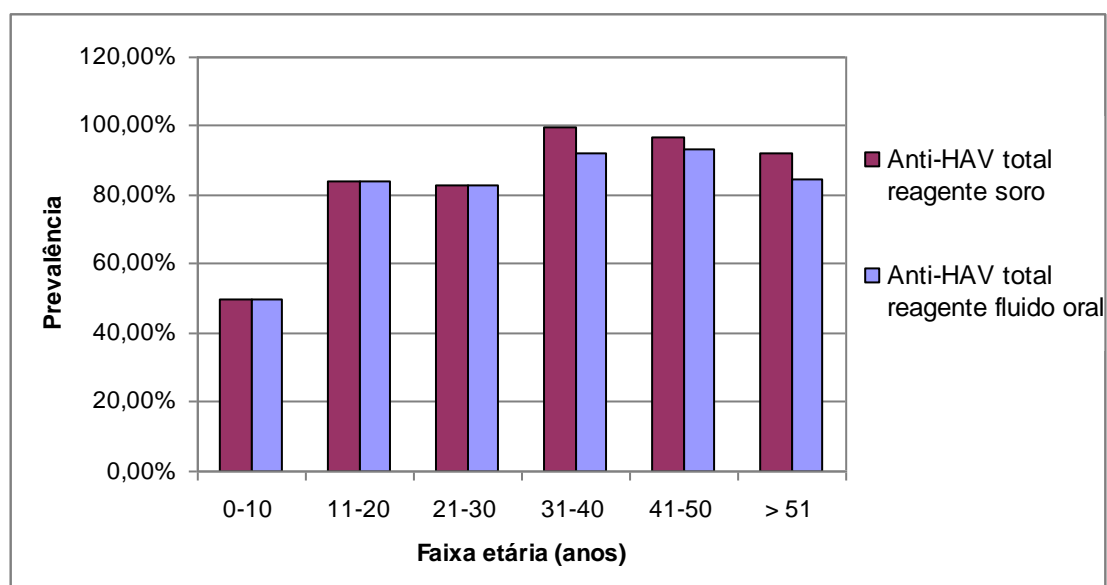
**Tabela 5.5:** Fatores associados com a positividade de anticorpos anti-HAV em amostras de soro e fluido oral (ChemBio®) de indivíduos do Pantanal Sul Mato-Grossense ( $n = 224$ ). Continuação na próxima página.

Variável	Soro			Fluído Oral (ChemBio®)		
	Positivo ( $n = 181$ )	Negativo ( $n = 43$ )	<i>P</i>	Positivo ( $n = 177$ )	Negativo ( $n = 47$ )	<i>P</i>
<b>Idade (anos), mediana (intervalo)</b>	27,0 (5,0 – 86,0)	10,0 (3,0 – 72,0)	<b>&lt; 0,0001</b>	26,0 (5,0 – 86,0)	11,0 (3,0 – 77,0)	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Gênero, <i>n</i> (%)</b>			0.9175			0.9953
Masculino	101 (55,8)	23 (53,4)		98 (53,3)	26 (55,3)	
Feminino	80 (44,2)	20 (46,6)		79 (46,7)	21 (44,7)	
<b>Residentes domésticos, <i>n</i> (%)</b>			0.1589			0.7919
0-1	17 (9,4)	5 (11,6)		16 (9,0)	6 (12,8)	
2-3	56 (30,9)	4 (9,3)		53 (29,9)	7 (14,9)	
4-5	41 (22,7)	14 (32,6)		40 (22,6)	15 (31,9)	
6-7	33 (18,2)	9 (20,9)		32 (18,1)	10 (21,3)	
>7	33 (18,2)	10 (23,3)		35 (19,8)	8 (17,0)	
NI	1 (0,6)	1 (2,3)		1 (0,6)	1 (2,1)	
<b>Nível educacional, <i>n</i> (%)</b>			0.8396			0.7248
Nenhum	14 (7,7)	5 (11,6)		14 (7,9)	5 (10,7)	
Primário	127 (70,2)	29 (67,5)		126 (71,2)	30 (63,8)	
Secundário	28 (15,5)	4 (9,3)		25 (14,1)	7 (14,9)	
Graduado	10 (5,5)	4 (9,3)		10 (5,6)	4 (8,5)	
NI	2 (1,1)	1 (2,3)		2 (1,2)	1 (2,1)	

<b>Renda familiar (salário mínimo), n (%)</b>			0.7331		0.8599
≤1	82 (45,3)	25 (58,1)		81 (45,7)	26 (55,3)
2	85 (47,0)	10 (23,3)		82 (46,3)	13 (27,7)
3	12 (6,6)	7 (16,3)		12 (6,8)	7 (14,9)
NI	2 (1,1)	1 (2,3)		2 (1,2)	1 (2,1)
<b>Água potável (fonte), n (%)</b>			0.2302		0.4174
Não tratada (rio)	56 (30,9)	11 (25,6)		56 (31,6)	11 (23,4)
Tratada (rio) <sup>b</sup>	107 (59,2)	30 (69,8)		104 (58,6)	33 (70,2)
Engarrafada (mineral)	16 (8,8)	1 (2,3)		5 (2,8)	2 (4,2)
NI	2 (1,1)	1 (2,3)		2 (1,2)	2 (4,2)
<b>Histórico de hepatite A, n (%)</b>			0.0903		0.2506
Não	161 (89,0)	42 (97,7)		159 (89,8)	44 (93,7)
Sim	16 (8,8)	0 (0,0)		15 (8,5)	1 (2,1)
NI	4 (2,2)	1 (2,3)		3 (1,7)	2 (4,2)
<b>Comunidade, n (%)</b>			0.0562		0.1157
Passo do Lontra	81 (44,8)	15 (34,9)		77 (43,5)	19 (40,4)
Porto da Manga	22(12,2)	1 (2,3)		22(12,4)	1 (2,1)
Paraguai-Mirim	43 (23,7)	17 (39,5)		43 (24,3)	17 (36,2)
Serra do Amolar/São Lourenço	35 (19,3)	10 (23,3)		35 (19,7)	10 (21,3)

<sup>a</sup> Não informado; <sup>b</sup> Incluindo água tratada por cloração, filtração e fervura.

A proporção de indivíduos sorologicamente positivos para hepatite A, segundo a faixa etária, foi estreitamente análoga ( $P < 0,0001$ ) à prevalência da doença no fluido oral (Figura 5.2), com diferença máxima de 7,7% na faixa etária de 31-40 anos. A soroprevalência aumentou progressivamente de 50%, em crianças de 0-10 anos, para até 100%, em indivíduos entre 31-40 anos de idade. Tendência semelhante foi observada para o fluido oral, onde a prevalência da doença variou de 50%, em crianças entre 0-10 anos, a 93,10% entre indivíduos de 41-50 anos de idade. Houve aumento expressivo na prevalência – cerca de 40% – entre as faixas etárias de 0-10 anos e 11-20 anos de idade para ambos os espécimes clínicos.

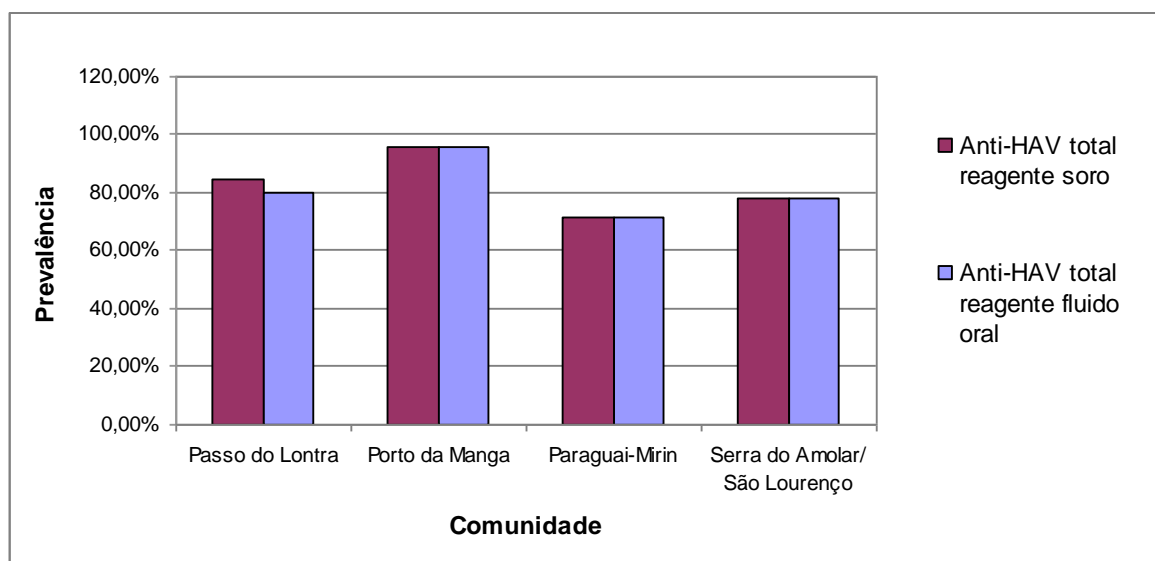


**Figura 5.2:** Prevalência de anti-HAV total no soro e no fluido oral (ChemBio®), segundo a faixa etária, em 224 indivíduos do Pantanal Sul Mato-Grossense.

A pesquisa demonstrou, ainda, variação na taxa de positividade de anticorpos anti-HAV entre as comunidades estudadas, que oscilou de 71,67% (43/60), na comunidade do Paraguai-Mirim, a 95,65% (22/23), na comunidade do Porto da Manga (Figura 5.3). A prevalência da infecção pelo HAV foi maior nas comunidades mais próximas aos centros urbanos, Passo do Lontra (84,38% -soro/80%- fluido oral) e Porto da Manga (95,65%), do que nas comunidades mais afastadas e de difícil acesso, Paraguai-Mirim (71,67%) e Serra do Amolar/São Lourenço (77,78%). Apesar dessa variação, a



positividade desses anticorpos não foi significativamente associada à determinada comunidade.



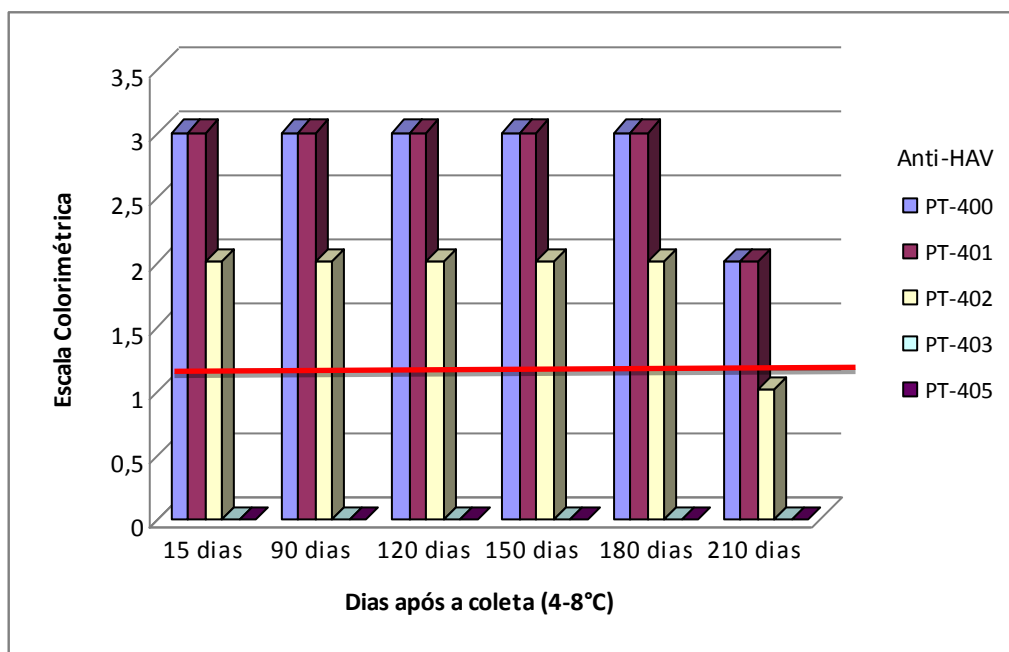
**Figura 5.3:** Prevalência de anti-HAV total no soro e no fluido oral (ChemBio®), segundo a comunidade, em 224 indivíduos do Pantanal Sul Mato-Grossense.

### 5.3 - Efeito da exposição ao tempo e à temperatura na detecção de anticorpos anti-HAV no fluido oral

Cinco amostras com diferentes títulos na escala colorimétrica (3 anti-HAV reagentes e 2 anti-HAV não reagentes) de fluido oral provenientes deste estudo de campo foram selecionadas para um monitoramento durante 210 dias à 4-8° C, a fim de avaliar a estabilidade dos anticorpos anti-HAV em amostras coletadas com o dispositivo ChemBio®.

Após 15 dias da coleta e com as condições precárias de armazenamento das amostras (variação de temperatura na armazenagem e no transporte das amostras, 4-25° C; e processamento tardio das amostras), foi possível detectar a presença de anticorpos anti-HAV nas amostras reagentes. Os anticorpos contra o vírus da hepatite A permaneceram estáveis nas amostras de fluido oral por mais de 210 dias. O armazenamento a temperatura de 4-8° C não provocou nenhuma mudança significativa durante os 180

primeiros dias após a coleta. No entanto, no 210º dia após a coleta houve uma alteração na detecção desses anticorpos, com diminuição de um nível na escala colorimétrica para as amostras reagentes (Figura 5.4).



**Figura 5.4:** Estabilidade do fluido oral, coletado com o dispositivo ChemBio®, durante 210 dias em temperatura de 4-8° C.

## 6 – DISCUSSÃO

### 6.1. Avaliação de coletores de fluido oral

A questão da implementação de um programa público nacional de vacinação contra a hepatite A, no Brasil, vem sendo amplamente discutida face

à dificuldade de se estabelecer um projeto unificado em um país de dimensões continentais, com macro-regiões distintas, e com perfil em mosaico em relação à epidemiologia da doença.

Atualmente, programas de vacinação infantil em larga escala não são indicados em áreas de alta endemicidade. No entanto, estudos realizados por Linder e colaboradores (1999) mostraram o declínio dos anticorpos anti-HAV (de origem materna) nos primeiros 7 meses de vida de recém natos e resposta à vacina contra hepatite A em lactentes com anticorpos maternos positivos, justificando a vacinação no primeiro ano de vida em regiões de alta prevalência do HAV. Admite-se que a melhor idade para vacinação é antes de entrar em contato com o vírus. Em países de endemicidade intermediária, como Israel e EUA, após rigorosa análise de custo-benefício, foi recomendada a vacinação infantil contra o HAV (Ginsberg *et al.*, 2001), o que ocasionou um grande impacto na redução do número de casos novos de hepatite A. A utilização da vacinação universal abre, evidentemente, a perspectiva de erradicação da hepatite A no mundo (Ferreira e Silveira, 2004).

No Brasil, a vacina, que é de custo elevado por não ser produzida pelo Ministério da Saúde, está sendo avaliada para sua futura incorporação no calendário de vacinação infantil. Para determinação de políticas nacionais de vacinação, os resultados de estudos epidemiológicos e de custo-benefício precisam ser cuidadosamente considerados e o impacto na saúde pública deve ser balanceado (FitzSimons *et al.*, 2010).

Para este monitoramento epidemiológico, a utilização do fluido oral é de grande relevância visto que, como comprovado por diferentes autores (Parry, 1993; McIntyre *et al.*, 1996; Ochnio *et al.*, 1997; Oba *et al.*, 2000; Chohan *et al.*, 2001; Judd *et al.*, 2003; Amado *et al.*, 2006), esse espécime clínico possui inúmeras vantagens e acurácia suficiente para sua utilização em tais situações. No entanto, muitos desses estudos propõem o uso do fluido oral como uma ferramenta alternativa à coleta de sangue. Uma vez que os benefícios de tal espécime clínico já foram demonstrados e sua eficiência nos testes imunoenzimáticos foi por vezes comprovada, por que não utilizá-lo como um substituto à coleta de sangue?

Em todos esses estudos, adaptações foram feitas para melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes utilizados, pois os fluidos orais contêm imunoglobulinas e outros componentes similares aos do plasma, porém, em concentrações mais baixas (Saville *et al.*, 1997). No entanto, em parte destes estudos (Parry *et al.*, 1989; Amado *et al.*, 2006) foram utilizadas amostras de pacientes coletadas durante surtos, que apresentam altos títulos de anticorpos contra o HAV.

Como demonstrado neste estudo, o fluido oral pode ser, de fato, um substituto à coleta de sangue. Contudo, é importante adaptar o dispositivo de coleta ao imunoensaio utilizado, uma vez que, diferentes níveis de sensibilidade foram observados. Isto evidencia que o coletor de fluido oral pode interferir na detecção de anticorpos anti-HAV, mas que a escolha do dispositivo apropriado pode permitir a coleta de amostras adequadas para as análises clínicas.

Cada um dos dispositivos testados neste estudo tem suas vantagens e desvantagens em relação à conveniência do processo de coleta e sua análise. No entanto, também é importante selecionar o dispositivo mais adequado ao paciente e a estudos de campo (Chang *et al.*, 2009), os quais fornecerão informações precisas para se determinar o perfil epidemiológico, a necessidade de imunização e estratégias de controle da doença (Robertson *et al.*, 1997).

Como descrito na literatura, níveis de IgG específica no soro são mais baixos em indivíduos vacinados dos que nos indivíduos imunizados com o vírus selvagem (Zaaijer *et al.*, 1993) e menores ainda no fluido oral. Com isso, a sensibilidade dos imunoensaios pode variar entre os vacinados e imunizados naturalmente, e de acordo com o grau de aumento da reexposição (Nokes *et al.*, 2001). A variação da sensibilidade, observada neste estudo, foi devida aos resultados falso-negativos obtidos no grupo dos indivíduos vacinados (2/25, Orasure® e 4/25, Salivette®). Contudo, não foram observadas variações na especificidade do ensaio.

Os resultados falso-negativos poderiam estar associados aos indivíduos não-respondedores que haviam recebido somente a primeira dose da vacina. Todavia, dentre essas amostras não-concordantes metade havia recebido as duas doses (1/2 Orasure® e 2/4 Salivette®). Portanto, a variação da

sensibilidade no grupo dos vacinados parece não estar relacionada ao número de doses da vacina administrada a cada voluntário.

O dispositivo de coleta Salivette® forneceu amostras com a menor sensibilidade (92,73%) no ensaio realizado, em comparação com os outros dois coletores. Nas amostras obtidas do grupo dos indivíduos vacinados, os anticorpos anti-HAV totais não puderam ser detectados em apenas 4 amostras (4/25). Este resultado está de acordo com publicações prévias que analisaram a confiabilidade deste dispositivo na detecção de anticorpos (Van den Akker *et al*, 1992; Parry, 1993; Judd *et al*, 2003). O efeito prejudicial do algodão no desempenho analítico do dispositivo foi devido, presumivelmente, as substâncias derivadas deste, que distorceram os resultados do imunoensaio pela interferência na detecção de anticorpos específicos (Gröschl *et al*, 2008).

O dispositivo de coleta Orasure® obteve bons resultados de sensibilidade (96,36%) quando o processamento das amostras foi realizado imediatamente, apesar de em duas amostras do grupo dos indivíduos vacinados (2/25) não terem sido detectados anticorpos anti-HAV. Provavelmente, a imediata centrifugação e congelamento das amostras contribuíram para a produção de resultados mais confiáveis, uma vez que a estabilidade dos anticorpos coletados com este dispositivo é menor em temperaturas mais altas e após tempo prolongado (de acordo com as instruções do fabricante).

A eficiência na eluição dos anticorpos a partir do material absorvente pode variar entre os dispositivos. Os resultados obtidos, provavelmente, refletiram as diferentes maneiras com que cada dispositivo é usado (Tabela 4.1). O fato do ChemBio® ser utilizado mais vigorosamente do que os outros dois dispositivos pode explicar a maior sensibilidade encontrada (100%), como observado por Nokes *et al*. (1998), utilizando um outro tipo de coletor esponjoso. O ChemBio® é projetado especificadamente para atingir a região das gengivas, a parte da cavidade oral com maior probabilidade de ser rica em fluido crevicular. Isto sugere que fluidos orais coletados com dispositivos que visam especificadamente o fluido crevicular contêm anticorpos em quantidades que refletem mais fielmente os resultados encontrados no soro (Vyse *et al*.,

2001). O posicionamento na cavidade oral dos outros dois dispositivos, adjacente a gengiva, sugere uma semelhança no tipo de coleta do fluido oral para Salivette® e Orasure®, como também demonstrado por Nokes *et al.* (1998) para outros dispositivos de coleta. No entanto, o Orasure® evidenciou resultados mais precisos em comparação ao Salivette®. Este fato pode estar relacionado a substâncias presentes no Orasure® que estimulam a transudação das imunoglobulinas do leito capilar para a cavidade oral (Parry, 1993).

Na análise comparativa das medianas, foi possível observar que as amostras do grupo dos indivíduos imunizados naturalmente apresentaram valores mais altos na escala colorimétrica do que as amostras do grupo dos indivíduos vacinados. Comparando estes parâmetros entre os dispositivos de coleta, foi observado que os valores de mediana das amostras coletadas com o ChemBio® foram os mais semelhantes aos do “padrão-ouro”, soro.

Os resultados apresentados no painel de otimização para o coletor ChemBio® demonstram a mais alta combinação dos valores de sensibilidade (100%) e especificidade (100%). Em comparação, esses parâmetros de avaliação foram superiores aos encontrados em outros estudos (Tabela 6.1).

**Tabela 6.1:** Comparação dos resultados do painel de otimização do presente trabalho com resultados encontrados em outros estudos.

Autor	Ano	População de estudo	Objetivo	Anticorpos detectados por ELISA	Coletor	Sensibilidade	Especificidade
Ochinio <i>et al.</i>	1997	Voluntários	Padronização	IgG	Salivette®	98,70%	99,60%
Oba <i>et al.</i>	2000	Geral	Diagnóstico	IgM, IgG e IgA	Omni-SAL®	82,10%	100%
Amado <i>et al.</i>	2006	Voluntários	Diagnóstico	IgM e IgG	Orasure®	86,67%	100%
Quolin <i>et al.</i>	2007	Geral	Prevalência	IgG	Oracol®	84,70%	100%
Tourinho <sup>a</sup>	2011	Voluntários	Otimização	IgM e IgG	ChemBio®	100%	100%

<sup>a</sup> Presente estudo.

Melhorias na metodologia de coleta do fluido oral projetadas para a obtenção preferencial do fluido crevicular dos capilares sob a gengiva, a otimização dos procedimentos dos ensaios e os avanços na tecnologia têm levado ao aumento da sensibilidade dos testes imunoenzimáticos no fluido oral,

fato observado, também, em estudos anteriores por Tamashiro e Constantine (1994) e Nokes e colaboradores (1998).

## **6.2 Estudo epidemiológico em áreas de difícil acesso do Pantanal Sul Mato-Grossense utilizando fluido oral**

A fim de determinar a eficiência do dispositivo ChemBio® e sua aplicabilidade em pesquisa de campo como substituto ao soro, foi realizada a primeira investigação da infecção pelo HAV em comunidades isoladas e de difícil acesso do pantanal Sul Mato-Grossense.

Utilizando amostras coletadas de diferentes indivíduos pertencentes às comunidades, foi possível observar uma estreita relação entre a prevalência de anticorpos no fluido oral coletado com ChemBio® (79,01%) e a soroprevalência (80,8%) do HAV. A concordância entre os resultados do fluido oral e do “padrão-ouro” (soro) foi de 97,32% (sensibilidade= 97,24% e especificidade = 97,67%).

Uma alta taxa de prevalência geral (80,8%) foi encontrada, quando comparada com a observada na população em geral (55,7%) nas regiões Sul e Sudeste. No entanto, esta taxa foi menor do que a sua prevalência na região Norte (92,8%), e mais semelhante ao obtido na região Nordeste do Brasil (76,5%) (Clemens et al. 2000).

Embora alguns estudos tenham mostrado que as populações urbanas têm menores taxas de infecção pelo HAV do que as populações rurais (Barzaga, 2000; Tufenkeji, 2000; Arankalle *et al.* 2001), neste estudo as comunidades mais próximas aos centros urbanos tiveram maior índice de exposição ao HAV do que as comunidades rurais (91,65% e 84,38% *versus* 71,67% e 77,78%) . Do mesmo modo, Almeida e colaboradores (2006) encontraram uma maior prevalência do HAV em áreas urbanas (87,4%) quando comparada com áreas de assentamentos rurais de Cavunge (79,7%), região semi-árida do estado da Bahia, Nordeste do Brasil.

Além disso, no presente inquérito, as comunidades estudadas são de baixa renda. Apesar da positividade de anticorpos anti-HAV não estar significativamente associada à fonte de água, os habitantes dessas áreas rurais não possuem instalações adequadas de saneamento ambiental, usam a água dos rios para fins de lavagem e consumo, bem como para a sua higiene pessoal. As comunidades urbanas estão localizadas próximas ao setor hoteleiro e a fazendas da região, onde as condições de saneamento ainda são pobres, e o projeto de saneamento ambiental ainda não existe ou está em fase de construção. Além das instalações de saneamento e condições de higiene na população, suas casas estão localizadas próximas umas das outras e a alta densidade populacional de baixa renda em comunidades urbanas pode contribuir para a disseminação do HAV.

A soroprevalência de anticorpos anti-HAV foi significativamente associada à faixa etária. A estratificação por idade evidenciou que, apesar da prevalência geral ter sido de 80,8%, somente 50% dos indivíduos entre 0-10 anos estavam imunes à doença. Esta taxa é superior ao observado por De Alencar Ximenes e colaboradores (2008) nas capitais do Nordeste e no Centro-Oeste brasileiro, 32% e 34%, respectivamente. No entanto, é inferior à prevalência (60%) em indivíduos menores de 10 anos da região amazônica brasileira (Braga *et al.*, 2009). Os dados destes estudos demonstram uma baixa soroprevalência nestas regiões nesta faixa etária. Portanto, uma política pública de vacinação em massa no Brasil deveria ter, em certas regiões, como faixa etária alvo crianças de 0-10 anos para que sejam imunizadas antes do contato com o vírus.

A adequação do fluido oral ao cenário epidemiológico está intimamente relacionada à estabilidade das amostras. Foi possível observar que a estabilidade térmica das amostras, quando refrigeradas, foi considerada apropriada. Nenhuma mudança na detecção de anticorpos anti-HAV foi observada até o 180° dia. Somente após o 210° dia foi visualizada uma redução na escala colorimétrica das amostras, mas sem alteração no resultado qualitativo das mesmas. Estes dados demonstraram que a variação da temperatura durante o armazenamento em campo e o atraso no



processamento das amostras não interferiram, significativamente, nos resultados da detecção de anticorpos quando comparado ao “padrão-ouro”. Isto deve ser levado em conta em estudos de campo onde não há refrigeração disponível, em países em desenvolvimento que podem ter grandes variações na temperatura ambiente e dificuldade para controlá-la (Nokes *et al.*, 2001), ou quando as amostras são enviadas para o laboratório pelo serviço de correio (Quoilin *et al.*, 2007).

Um desempenho comparativo da estabilidade do fluido oral segundo a literatura e os resultados obtidos neste estudo estão resumidos na tabela 5.6. Foi possível observar que o dispositivo ChemBio® teve o melhor desempenho dentre os coletores, à temperatura ambiente e de 4-8° C, quando comparado ao que se tem sido observado em outros estudos.

**Quadro 6.1:** Efeito da exposição ao tempo e à temperatura sobre a detecção de anticorpos anti-HAV em fluidos orais.

Dispositivo de coleta	Temperatura de armazenamento	Duração da estabilidade
<b>ChemBio®</b>	Temperatura ambiente	2 anos <sup>a</sup>
	2-8°C	<b>acima de 210 dias<sup>d</sup></b>
	-20°C	não recomendado <sup>a</sup>
<b>OraSure®</b>	Temperatura ambiente	21 dias <sup>b</sup>
	2-8°C	21 dias <sup>a</sup>
	-20°C	45 dias <sup>a</sup>
<b>Salivette®</b>	Temperatura ambiente	5 dias <sup>b</sup>
	2-8°C	20 dias <sup>c</sup>
	-20°C	1 ano <sup>a</sup>

<sup>a</sup> De acordo com o fabricante para testes com anticorpos anti-HIV.

<sup>b</sup> De acordo com Parry, 1993.

<sup>c</sup> De acordo com Stark et al., 1993.

<sup>d</sup> Presente estudo.

A combinação da metodologia de coleta e preservação das amostras por estabilizantes, no dispositivo ChemBio®, foi considerada como uma importante estratégia para evitar problemas de rápida degradação de anticorpos durante o armazenamento, como reportado por Gröschl *et al* (2008) para outros

coletores. No presente estudo, foi observado que esta preservação foi suficiente para aumentar a estabilidade da amostra. Dessa forma, estes parâmetros demonstraram que as amostras coletadas com o dispositivo ChemBio® não requerem um ambiente clínico para a coleta do fluido oral a fim de assegurar a rápida preparação e congelamento das amostras. Com isso, podem ser armazenadas a temperatura ambiente.

As amostras de fluido oral coletadas com os dispositivos ChemBio®, Orasure® e Salivette® proporcionaram resultados qualitativos suficientes para a detecção de anticorpos totais contra o vírus da hepatite A, sob condições ótimas. No entanto, o melhor desempenho do ChemBio® no painel de otimização e a estabilidade das amostras coletadas com este dispositivo, demonstraram que este coletor foi adequado para o cenário de vigilância epidemiológica.

Por fim, o fluido oral pode ser utilizado para detecção de baixos níveis de anticorpos, contudo a escolha do coletor apropriado é fundamental para a avaliação dos anticorpos contra o HAV em áreas de difícil acesso. A utilização do fluido oral foi útil para o conhecimento da prevalência da hepatite A em uma área sem dados disponíveis na literatura e para demonstrar que é viável a coleta deste espécime clínico em áreas sem condições ideais de armazenamento.

## 7 – CONCLUSÕES

- O processo de adaptação do imunoensaio enzimático utilizado para detecção de anticorpos anti-HAV totais ao fluido oral demonstrou que somente a otimização da diluição da amostra foi necessária para a obtenção de maior eficiência do teste, para todos os coletores utilizados no estudo.
- O painel de otimização evidenciou que o dispositivo ChemBio® foi o coletor com melhor desempenho (100%) no imunoensaio utilizado quando comparado ao soro (“padrão-ouro”), sob condições ótimas.
- O inquérito epidemiológico realizado no Pantanal sul Mato-Grossense demonstrou prevalências de anti-HAV similares entre soro (80,8%) e fluido oral (79%) (ChemBio®).
- A região do Pantanal sul Mato-Grossense, apesar de apresentar alta prevalência de anticorpos anti-HAV, grande parte das crianças estão susceptíveis à infecção pelo HAV, evidenciando assim, a importância da vacinação nesta faixa-etária.

- A variação da temperatura durante o armazenamento das amostras em campo e o atraso no processamento das mesmas não interferiram, significativamente, nos resultados da detecção de anticorpos no fluido oral, quando comparado ao “padrão-ouro” (soro).
- O melhor desempenho do ChemBio® no painel de otimização e a estabilidade das amostras coletadas com este dispositivo demonstraram que este coletor é o mais adequado para o cenário de vigilância epidemiológica em áreas de difícil acesso, uma vez que não necessita do congelamento das amostras.
- O fluido oral pode ser utilizado como um substituto à coleta de sangue. Contudo, é importante adaptar o dispositivo de coleta ao imunoensaio utilizado, uma vez que o mesmo pode interferir na detecção de anticorpos anti-HAV.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Águas, 2007. Projeto GEF: Pantanal/ Alto Paraguai, Disponível em: <http://www.ana.gov.br/gef/graficos/mapaGEF.jpg>. Acesso em: 13 maio de 2009.
- Adámoli, J., 1987. Fisiografia do Pantanal. In: Allem, A. C., Valls, J. F. M. Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense, *Embrapa Cenargen*, Documento 8, Brasília, p. 15-22.
- Ahmed, M., Munshi, S. U., Andalib, S., Tabassum, S., Islam, M. N., 2011. Testing Hepatitis A virus antibody in oral fluid among the prospective vaccinees foster the need of new oral HAV rapid test. *Indian J Med Microbiol.* 29:72-3.
- Akriviadis, E. A., Redeker, A. G., 1989. Fulminant hepatitis A. in: intravenous drug users with chronic liver disease. *Ann. Intern. Med.*, 110: 838-839.
- Alho, C. J. R., Lacher, T. E., Conçales, H. C., 1988. Environmental degradation in the Pantanal ecosystem. *Bioscience* 38: 164-171.
- Altman, D. G., 1991. Practical statistics for medical research, Chapman & Hall/CRC, London, 611 p.
- Almeida D, Tavares-Neto J, Queiroz-Andrade M, Dias C, Ribeiro T, Silva F, Silva-Araújo J, Tatsch F, Paraná R, 2006. Aspectos sociodemográficos da sopervalência de marcadores do vírus da hepatite A no povoado de Cavunge, região do semi-árido do Estado da Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 76-78.
- Amado, L. A., Villar, L. M., De Paula, V. S., De Almeida, A. J., Gaspar, A. M. C., 2006. Detection of hepatitis A, B and C virus-specific antibodies using

oral fluid for epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 149-155.

Amado, L. A., 2010. Saliva como espécime clínico para o estudo da hepatite A: aplicações no diagnóstico, na epidemiologia molecular e na patogênese. Tese de Doutorado, pós-graduação *strictu sensu* em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 131 fls.

Angarano, G., Trotta F., Monno, L., Santantonio, T., Pastore, G., 1985. Serum IgA anti-hepatitis A virus as detected by enzyme-linked immunosorbent assay: diagnostic significant in patients with acute and protected hepatitis A. *Diagn Microbiol Infect Dis* 3:521-523.

Arankalle, V. A., Chandha, S., Chitambar, S. D., Walimbe, A. M., Chope, L. P., Gandhe, S. S., 2001. Changing epidemiology of hepatitis A and hepatitis E in urban and rural India (1982-98). *J Viral Hepat* 8: 293-303.

Arankalle, V. A., Chadha, M. S., 2003. [Who should receive hepatitis A vaccine?](#) *J Viral Hepat*. May;10(3):157-8.

Archibald, D.W., Zon, L.I., Groopman, J.E. *et al.*, 1986. Salivary antibodies as a means of detecting human T cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 24: 873-875.

Asratian, A. A., Pavlova, I. P., Reïzis, A. R., Drondina, A. N., Nikitina, T. S., Popova, O. V., Blokhina, N. P., Kazarian, S. M., Liubimova, A. I., Mikhaïlov, M. I. 1997. [Viral hepatitis markers in saliva specimens from patients with acute hepatitis A, B and C.](#) *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* (6):43-7.

Aszkenasy, O. M. 2000. [A community outbreak of hepatitis A in a religious community in Indiana: failure of immune serum globulin to prevent the spread of infection.](#) *Epidemiol Infect.* 124:309-13.

Barzaga, B. N., 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in South- East Asia and China. *Vaccine* 18: S61-S64.

- Battegay, M., Gust, I.D., Feinstone, S.M., Hepatitis A virus. In: Mandell, G.L., Bennett, J., Dolin, R., 1995. *Principles and practice of infectious diseases*. 4. Ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, P. 1636-1656.
- Bower, W. A., Nainan, O. V., Han, X., Margolis, H. S., 2000. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J. Infect. Dis.*182: 12–17.
- Bradley, D. W., Fields, H. A., Mccaustland, K. A., Cook, E. H., Gravelle, C. R., Maynard, J. E., 1978. Biochemical and biophysical characterization of light and heavy density hepatitis A virus particle: evidence HAV is a RNA virus. *J. Med. Virol.* 2: 175-187.
- Braga, W. S., Borges, F. G., Barros Junior, G. M., *et al.*, 2009. Prevalence of hepatitis A virus infection: the paradoxical example of isolated communities in the western Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(3):277-81.
- Carrilho, F. J., Mendes Clemente, C., Silva, L. C., 2005. Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. *Gastroenterol Hepatol*, 28: 118-125.
- Cástková, J., Benes, C., 2009. Increase in hepatitis A cases in Czech Republic in 2008 – un update. *Euro Surveil* 14(3) pii:19091.
- CDC (Centers For Disease Control And Prevation), disponível em: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), acessado em 1998.
- CDC (Centers For Disease Control And Prevention), 1999. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendation of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48(Rr-12): 1-37.
- CDC (Centers For Disease Control And Prevention), 2006. Epidemiology and prevention of viral hepatitis A to E- An Overview CDC. Disponível em: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), acessado em 2007.

- CDC (Centers For Disease Control And Prevention), 2009. Surveillance for acute viral hepatitis – United States, 2007. Surveillance Summaries. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 58(SS23)
- Challacombe, S. J., Russell, M. W., Hawkes, J., 1978. [Passage of intact IgG from plasma to the oral cavity via crevicular fluid.](#) *Clin Exp Immunol.*, 34(3):417-22.
- Chang, C.K., Cohen, M.E., Bienek, D.R., 2009. [Efficiency of oral fluid collection devices in extracting antibodies.](#) *Oral Microbiol Immunol.* 24(3):231-5.
- Chohan, B.H., Lavreys, L., Mandaliya, K.N., Kreiss, J.K., Bwayo, J.J., Ndinya-Achola, J.O., Martin, H.L. jr., 2001. Validation of a modified commercial enzyme-linked immunoassay for detection of human immunodeficiency virus type 1 immunoglobulin G antibodies in saliva. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 8: 346-348.
- Clemens, S. A., Da Fonseca, J. C., Azevedo, T., Cavalcanti, A., Silveira, T. R., Castilho, M. C., Clemens, R., 2000. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in 4 centers in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 33:1-10.
- Cockayne, E. A, 1912. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q. J. Med.* 6: 1–29.
- Cohen, J. I., Ticehurst, J.R., Feinstone, S. M., Rosenblum, B., Purcell, R. H., 1987. Hepatitis A virus cDNA and its RNA transcripts are infectious in cell culture. *J Virol* 61: 3035-3039.
- Cohen, J. I., Feinstone, S., Purcell, R. H., 1989. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J. Infect. Dis.* 160: 887–890.
- Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Perez-Bercof, R., Casane, D., Colina, R., Garcia, L., Vega, I., Glikman, G., Romanowsky, V., Castello, A., Nicand, E., Gassin, M., Billaudel, S., Ferre, V., 2002. Molecular



evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol.* 76: 9516-9525.

De Alencar Ximenes, R. A., Marteli, C. M., Merchán-hamann, E., Montarroyos, U. R., Braga, M. C., De Lima, M. L., Cardoso, M. R., Turchi, M. D., Costa, M. A., De Alencar, L. C., Moreira, R. C., Figueredo, G. M., Pereira, L. M., Hepatitis Study Group, 2008. Multilevel analysis of hepatitis A infection in children and adolescents: a household survey in the Northeast and Central-west regions of Brazil. *Int J Epidemiol* 37:852-81.

De Cock, L., Hutse, V., Verhaegen, E., Quoilin, S., Vandenberghe, H., Vranckx, R., 2004. Detection of HCV antibodies in oral fluid. *J. Virol. Methods.* 122: 179-183.

De Paula, V. S., Baptista, M. L., Lampe, E., Niel, C., Gaspar, A. M. C., , 2002. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 66: 22-27.

De Paula, V. S., Lu, L., Niel, C., Gaspar, A. M. C., Robertson, B. H., 2004. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med. Viro.* 73(3): 378-83.

Diel, R., Schneider, S., 2001. Transmission of hepatitis A in Hamburg, Germany, 1998-1999 – A prospective population based study. *Eur J Epidemiol* 17:175-182.

Dolja, V. V., Carrington, J. C., 1992. Evolution of positive-strand RNA viruses. *Semin Virol* 3:315-326.

Dominguéz, A., Oviedo, M., Carmona, G., Jansá, J. M., Borrás, E., Salleras, L., Plasència, A., 2008. Epidemiology of hepatitis A before and after the introduction of a universal vaccination program in Catalonia, Spain. *J Viral Hepat* 15:51-6.

- Duval, B., De Serres, G., Ochnio, J., Scheifele, D., Gílca, V., 2005. [Nationwide Canadian study of hepatitis a antibody prevalence among children eight to thirteen years old.](#) *Pediatr Infect Dis J.* 24:514-9.
- Farias, J. K. N. P., Cruz, L. C., Oliveira, M. E. A., 2007. Sustentabilidade ambiental de comunidades rurais ribeirinhas do Pantanal do Mato Grosso. In: *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007.* Caxambú, MG, p.1-2.
- Faridi, M. M., Shah, N., Ghosh, T. K., Sankaranarayanan, V. S., Arankalle, V., Agarwal, A., Sathiyasekaran, M., Bhattacharya, N., Vasnathi, T., Chatterjee, S., Choudhury, J, Mitra, M., 2009. Immunogenicity an safety of live attenuated hepatitis A vaccine: a multicentric study. *Indian Pediatr* 46:29-34.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 182: 1026-1028.
- Ferreira, C. T., Pretto, F. M., 1999. Hepatite pelo vírus A. In: Mattos & Dantas (Eds), *Compêndio de Hepatologia*, 2a Ed., Fundo Editorial Byk, São Paulo, P. 459-470.
- Ferreira, C. T., Silveira, T. R., 2004. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev. Bras. Epidemiol.*, 7(4): 473-487.
- Fiore, A. E., Wasley, A., Bell, B. P., 2006. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.*, May 19, 55(RR-7):1-23.
- FitzSimons D., *et al.* 2010. Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 28: 583-588.

- Fleischer, B., Fleischer, S., Maier, K., Wiedmann, K. H., Sacher, M., Thaler, H., et al., 1990. Clonal analysis of infiltrating T lymphocytes in liver tissue in viral hepatitis A. *Immunology* 69: 14-19.
- Frosner, G. G., Overby, L.R., Flehmig, B., et al. 1977. Seroepidemiological investigation of patients and family contacts in an epidemic of hepatitis A. *J Med Virol* 1(3):163-73.
- Gaspar, A. M. C., Oliveira, J. M., Silva, M. L. P., Yoshida, C. F. T., 1996. Orally transmitted acute hepatitis in Rio de Janeiro, Brasil (1989-1995). In: Buisson, Y., Coursaget, P., Kane, M. (Eds). Enterically-transmitted hepatitis viruses, La Simarre, *Joué-Lès-Tours*, France, P. 99-100.
- Gauss-Muller, V., Jurgensen, D., Deutzmann, R., 1991. Autoproteolytic cleavage of recombinant 3C proteinase of hepatitis A virus. *Virology* 182:861-864.
- Gayotto, L. C. C., Quarentei, A. A., Cabral, G. L., 1991. Soroepidemiologia das hepatites A e B nas regiões dos rios Bia e alto Juruá, Amazônia ocidental. *Gastroenterol Endosc Dig* 10:13-16.
- Ginsberg, G.M., Slater, P.E., Shouval, D., 2001. Cost-benefit analysis of a nationwide infant immunization programme against hepatitis A in an area of intermediate endemicity. *J Hepatol* 34: 92-9.
- Globo Rural, 2009. Sub-regiões do Pantanal brasileiro. Edição 288- Outubro.
- Gröschl, M., Köhler, H., Topf, H.G., Rupprecht, T., Rauh, M. 2008. [Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs.](#) *J Pharm Biomed Anal.* Jul 15;47(3):478-86.
- Hadler, S. C., 1991. Global impact of hepatitis A virus infection: changing patterns. In: Hollinger, F. B., Lemon, S. M., Margolis, H. S. (ed.), *Viral hepatitis and liver disease*, Williams & Wilkins, p. 14–20.

- Hess, G., Faatz, E., Melchior, W., Bayer, H., 1995. Analysis of immunoassays to detect antibodies to hepatitis A virus (anti-HAV) and anti-HAV immunoglobulin M. *J. Virol. Methods* 51: 221-228
- Hodinka, R. L., Nagashunmugam, T., Malamud, D., 1998. Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids. *Clin and Diagn Lab immunol* 5(4): 419-426.
- Hollinger, F.B., 1992. International symposium on active immunization against hepatitis A. Vienna, 27-29 January 1992. *Vaccine* 10 Suppl 1:S6-7.
- Hollinger, F. B., Emerson, S. U, 2007. Hepatitis A Virus. *Fields Virology*, 5 ed., 911-40.
- Hurni, W.M., Laufer, D., Miller, W.J., Ryan, J., Watson, B., 1993. [Anti-hepatitis A in the general population and in hepatitis A vaccinees using saliva and serum as diagnostic media.](#) *Ann N Y Acad Sci.*, 694:289-92.
- Jacobson, S. K., Buttery, R., Parry, J. V., Perry, K. R., Wreghitt, T. G., 1995. Investigation of a hepatitis A outbreak in a primary school by sequential saliva sampling. *Clin. Diagn. Virol.* 3: 173–180.
- Jacobsen, K. H., Koopman, J. S., 2004. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol Infect* 132:105-1022.
- Johnson, A. M., Parry, J. V., Best, S. J., Smith, A. M., De Silva, M., Motimer, P.P., 1988. HIV surveillance by testing saliva. *AIDS* 5:369-371.
- Judd, A., Parry, J., Hickman, M., McDonald, T., Jordan, L., Lewis, K., Contreas, M., Dusheiko, G., Foster, G., Gill, N., Kemp, K., Main, J., Murray-Lyon, I., Nelson, M., 2003. Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots. *J. Med. Virol.* 71: 49-55.
- Kao, H. W., Ashcavai, M., Redeker, A. G., 1984. The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. *Hepatology* 4: 933–936.

- Koff, R.S., 1992. Clinical manifestation and diagnosis of hepatitis A virus infection. *Vaccine* 10: S15-S17.
- Koff, R.S., 1998. Hepatitis A. *Lancet* 351: 1643-1649.
- Krugman, S., Ward, R., Giles, J. P., Bodansky, D., Jacobs, A. M., 1959. Infectious hepatitis: detection of virus during the incubation period and in clinically inapparent infection. *N. Engl. J. Med.* 261: 729–734.
- Krugman, S., Giles, P., Hammond, J., 1967. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 200: 365–373.
- [Laufer, D.S.](#), [Hurni, W.](#), [Watson, B.](#), [Miller, W.](#), [Ryan, J.](#), [Nalin, D.](#), [Brown, L.](#) 1995. Saliva and serum as diagnostic media for antibody to hepatitis A virus in adults and in individuals who have received an inactivated hepatitis A vaccine. [Clin Infect Dis.](#), 20:868-71.
- Lednar, M.W., Lemon, M.S., Kirkpatrick, W.J., 1985. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Amer. J. Epidemiol.* 122: 226-233.
- Linder, N., Karenyi, Y., Gidony, Y., Dagan, R., Ohel, G., Levin, E., et al., 1999. Decline of hepatitis A antibodies during the first 7 months full-term and preterm infants. *Infection* 27: 128-31.
- Lopes, M. H., 2006. Prevenção da hepatite B e Delta. *The Braz J of Infect Dis* 10 (1) s72-s78.
- Lu, L., Ching, K. Z., De Paula, V. S., Nakano, T., Siegl, G., Weitz, M., Robertson, B. H., 2004. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (Cf53/Berne Isolate). *J. Gen. Virol.* 85: 2943– 2952.
- [Madar, R.](#), [Straka, S.](#), [Baska, T.](#), 2002. Detection of antibodies in saliva--an effective auxiliary method in surveillance of infectious diseases. [Bratisl Lek Listy.](#) 103:38-41.

- Magalhães, N. W., 1992. O Pantanal: aspectos gerais. In: Magalhães, N. W. *Conheça o Pantanal*, 1. ed, São Paulo: Terragraph, Cap 1, p.7-12.
- Marks, P. J., Fey, R. E., Parry, J. V., Deakin, D., Carlisle, D., Neal, K.R., 2001. [Use of hygiene advice and active immunisation to control an outbreak of hepatitis A.](#) *Commun Dis Public Health* 4:158-62.
- Martin, A., Lemon, S. M., 2006. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* 43: S64-S172.
- Más Lago, P., Balmaseda, A., Galván, E., Rodríguez, L., Castillo, A., 1994. [Detection of immunoglobulin A in serum and saliva of patients with hepatitis A.](#) *Rev Cubana Med Trop.*, 46:16-9.
- McIntyre, P.G., Laszlo, J., Appleyard, K., Ogden, G.R., 1996. Modified enzyme immunoassay to detect hepatitis C virus antibodies in oral fluid. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 882-884.
- Melnick, J. L., 1982. Classification of hepatitis A virus as enterovirus type 72 and hepatitis B as hepadnavirus type. *Intervirology* 8: 105-106.
- Midthun, K., Ellerbeck, E., Gershman, K., *et al.*, 1991. Safety and immunogenicity of a live attenuated hepatitis A virus vaccine in seronegative volunteers. *J Infect Dis* 163(4):735-9.
- Ministério da Saúde, 2011. Imunobiológicos especiais e suas indicações. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/crie\\_indicacoes\\_271106.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/crie_indicacoes_271106.pdf), acessado em 22 de fevereiro de 2011.
- Minor, P. Picornaviridae. In: Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., *et al.*, 1991. Classification and nomenclature of viruses. *Arch Virol*, 2:320-326.
- Mongillo, M., Chiara, F., Ranzato, M., Trevisan, A., 2010. Strategy for hepatitis A seroprevalence survey in a population of young people. *Vaccine* 28(43): 6985-8.

- Mor, Z., Srur, S., Dagan, R. Rishpon, S., 2010. Hepatitis A disease following the implementation of universal vaccination: Who is at risk? *J Viral Hepat* 17:293-297.
- Moraes, A. S., Resende, E. K., Rodrigues, C. A. G., Mauro, R. A., Galdino, S., Oliveira, M. D., Crispim, S. M. A., Vieira, L. M., Soriano, B. M. A., Abreu, U. G. P., Mourão, G., 2001. Embrapa Pantanal: 25 anos de pesquisas em prol da conservação do Pantanal, os desafios do novo milênio. In: *III Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal: o desafio do novo milênio*, Embrapa Pantanal, Corumbá, 55 pp.
- Morais, L. M., De Paula, V.S., Arantes, M.R., *et al.*, 2006. Early infection and asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care center in Rio de Janeiro, Brazil: should attending children under two years of age be vaccinated? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:401-5.
- Morris-Cunnington, M. C., Edmunds, W. J., Miller, E., Brown, D. W. G., 2004. A population-based seroprevalence study of hepatitis A virus using oral fluid in England and Wales. *Am J Epidemiol* 159: 786-794.
- Morris-Cunnington, M., Edmunds, W. J., Miller, E., 2004. [Immunity and exposure to hepatitis A virus in pre-adolescent children from a multi-ethnic inner city area.](#) *Commun Dis Public Health*. 7:134-7.
- Mortimer, P. P., Parry, J. V., 1994. Non-invasive virological diagnosis: are saliva and urine specimens adequate substitutes for blood? *Rev Med Virol* 1:73–78.
- Nainan, O. V., Xia, G., Vaughan, G., Margolis, H. S., 2006. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(1):63-79.
- Nguyen, C. T., Tran, T.T., 2009 Hepatitis vaccination and prophylaxis. *Clin Liver Dis* 13(2):317-29.

- Nokes, D. J., Enquesslassie, F., Vyse, A., Nigatu, W., Cutts, F. T., Brown, D. W., 1998. [An evaluation of oral-fluid collection devices for the determination of rubella antibody status in a rural Ethiopian community.](#) *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Nov-Dec 92(6):679-85.
- Nokes, D.J., Enquesslassie, F., Nigatu, W., Vyse, A. J., Cohen, B. J., Brown, D.W., Cutts, F. T., 2001. [Has oral fluid the potential to replace serum for the evaluation of population immunity levels? A study of measles, rubella and hepatitis B in rural Ethiopia.](#) *Bull World Health Organ* 79(7):588-95.
- Oba, I. T., Spina A. M. M., Saraceni, C. P., Lemos, M. F., Senhoras R. C. F. A., Moreira, R. C., Granato, C. F. H., 2000. Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 42(4) 197-200.
- Ochnio, J. J., Scheifele, D. H., Ho, M., Mitchell, L. A., 1997. New, ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine and disease-induced hepatitis A virus-specific immunoglobulin G in saliva. *J Clin Microbiol* 35(1): 98–101.
- [Ochnio, J. J., Patrick, D., Ho, M., Talling, D. N., Dobson, S. R.](#) 2001. Past infection with hepatitis A virus among Vancouver street youth, injection drug users and men who have sex with men: implications for vaccination programs. *CMAJ.* 165:293-7.
- Ochnio, J. J., Scheifele, D. W., Marion, S. A., Bigham, M., Patrick, D. M., Ho, M., Mozel, M., 2007. [Participant-collected, mail-delivered oral fluid specimens can replace traditional serosurveys: a demonstration-of-feasibility survey of hepatitis A virus-specific antibodies in adults.](#) *Can J Public Health.* 98:37-40.
- O'Farrell, B. J., Rajan, E., Albloushi, S. S., Courtney, M. G., Fielding, J., Shattock, A. G., 1997. [The reliability of saliva as a sample for the detection of hepatitis A immunoglobulins under various sampling conditions.](#) *Clin Diagn Virol.* 7:153-7.



- O'Grady, J., 1992. Management of acute and fulminant hepatitis A. *Vaccine* 10(1): S21-S23.
- [Omar, A. A., Hashish, M. H.](#) 2000. Screening for hepatitis A virus antibodies among a disadvantaged group of preschool children in Alexandria. [J Egypt Public Health Assoc.](#)75:529-39.
- Parry, J.V., Perry, K.R. & Mortimer, P.P., 1987. Sensitive assays for viral antibodies in saliva: an alternative to tests on serum. *Lancet* 2: 72-75.
- Parry, J. V., Farrington, C.P., Perry, K. R., Waight, P. A., Mortimer, P. P., Miller, E., 1988. [Rational programme for screening travellers for antibodies to hepatitis A virus.](#) *Lancet* 25;1(8600):1447-9.
- Parry, J.V., Perry, K.R., Panday, S., Mortimer, P.P., 1989. Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva. *J. Med. Virol.* 28: 255-260.
- Parry, J.V., 1989. Detection of viral antibodies in saliva specimens as an alternative to serum. Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva. [J Clin Chem Clin Biochem.](#) 27:245-6.
- Parry, J.V., 1993. Simple and reliable salivary test for HIV and hepatitis A and B virus diagnosis and surveillance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 694: 216-233.
- Paul, J. R., Havens, W. P. Jr, Sabin, A. B., Philip, C. B., 1945. Transmission experiments in serum jaundice and infectious hepatitis. *J Am Med Assoc* 128: 911-915.
- Paul, J. R., Gardner, H. T., 1950. Endemiologic aspects of hepatitis in U. S. troops in Germany 1946-1950. *Am J Med* 8(5): 565-80.
- Pereira, F. E. L., Gonçalves C. S., 2003. Hepatitis A. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 387-400.
- Pham, B., Duval, B., De Serres, G., Gilca, V., Tricco, A. C., Ochnio, J., Scheifele, D. W., 2005. Seroprevalence of hepatitis a infection in a low endemicity country: a systematic review. *BMC Infect Dis* 5: 56.

- [Piacentini, S.C.](#), [Thieme, T.R.](#), [Beller, M.](#), [Davidson, S.L.](#). 1993. Diagnosis of hepatitis A, B, and C using oral samples. [Ann N Y Acad Sci](#). 694:334-6.
- Poddar, U., Thapa, B. R., Prasad, A., Singh, K., 2002. Changing spectrum of sporadic acute viral hepatitis in Indian children. *J. Trop. Pediatr* 48: 210–213.
- Provost, P.J., Wolanski, B. S., Miler, W. J., Ittensohn, O. L., McAleer, W. J. Hilleman, M. R., 1975. Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326 (38578). *Proc Soc Exp Biol Med* 148:532-539.
- Provost, P.J., Hilleman, M. R., 1979. Propagation of human hepatitis A in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 160:213-221.
- Provost PJ, Emini EA, Lewis JA, *et al.* Progress toward the development of hepatitis A virus particles. In: Zuckerman AJ, ed., 1988. Viral hepatitis and liver disease. *New York: Alan R. Liss*: 83-6.
- Purcell, R. H., Feinstone, S. M., Ticehurst, J. R., Daemer, R. J., Baroudy, B. M. Hepatitis A Virus, P. 9–22, 1984. In: Vyas, G. N, Dienstag, J. L., Hoofnagle, J. H. (Ed.), *Viral Hepatitis And Liver Disease*. Grune & Stratton, Orlando, Fla.
- [Quoilin, S.](#), [Hutse, V.](#), [Vandenberghe, H.](#), [Claeys, F.](#), [Verhaegen, E.](#), [De Cock, L.](#), [Van Loock, F.](#), [Top, G.](#), [Van Damme, P.](#), [Vranckx, R.](#), [Van Oyen, H.](#), 2007. A population-based prevalence study of hepatitis A, B and C virus using oral fluid in Flanders, Belgium. [Eur J Epidemiol](#). 22(3):195-202.
- Robertson, B. H., Jansen, R. W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O. V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H. S., Isomura, S., Ito, K., et al., 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 73:1365–1377.
- Robertson, S.E., Cutts, F. T., Samuel, R., Diaz-Ortega, J. L., 1997. Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries,

Part II: Vaccination against Rubella. *Bull of World Health Organ* 75: 69-80.

Roitt, I., Lehner, T., 1983. Oral immunity of oral disease. Second Edition. P279-304. *Blackwell*. Oxford.

Romanò, L., Paladini, S., Tagliacarne, C., Zappa, A., Zanetti, A. R., 2009. The changing face of the epidemiology of type A, B and D viral hepatitis in Italy, following the implementation of vaccination. *Vaccine* 27:3439-3442.

Ross, B.C., Anderson, D.A., Gust, I.D., 1991. Hepatitis A virus and hepatitis A infection. *Advanc. Virus Res.* 39: 209-253.

Sanchez, G., Populaire, S., Butot, S., *et al.*, 2006. Detection and differentiation of human hepatitis A strains by commercial quantitative real-time RT-PCR tests. *J Virol Methods* 132(1-2):160-5.

Siegl, G, Frösner, G. G., Gauss-Muller, Tratschin, J. D., Deinhardt, F., 1981. The physicochemical properties of infection hepatitis A virion. *J. Gen. Virol* 57: 331-341.

Siegl, G., Weitz, M., 1993. [Pathogenesis of hepatitis A: persistent viral infection as basis of an acute disease?](#) *Microb Pathog.* 14(1):1-8.

Silva, J. V., Abdon, M. M., 1998. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesq Agrop Bras* 33: 1703-1711.

Sjogren, M. H., Tanno, H., Fay, O., Sileoni, S., Cohen, B. D., Burke, D. S., Feighny, R. J., 1987. Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann. Intern. Med.* 106: 221–226.

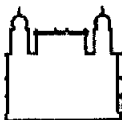
Skidmore, S., Parry, J. V., Nottage, P., 2001. [An investigation of the potential risk of an HAV outbreak in a prison population following the introduction of cases from a community outbreak.](#) *Commun Dis Public Health.* 4:133-5.

- Skinhoj, P., Mathiesen, L. R., Kiryger, P., Moller, A. M., 1981. Fecal excretion of hepatitis A virus in patients with symptomatic hepatitis A infection. *Scand. J. Gastroenterol.* 16: 1057-1059.
- Stapleton, J. T., Lange, D. K., Leduc, J. W., Binn, L. N., Jansen, R. W., Lemon, S. M., 1991. The role of secretory immunity in hepatitis A virus infection. *J. Infect. Dis.* 163: 7–11.
- Stark, K., Warnecke, C., Brinkmann, V., Gelderblom, H. R., Bienzle, U., Pauli, G., 1993. Sensitivity of HIV antibody detection in saliva. *Med Microbiol Immunol.* 182(3):147-51.
- Stuart J.M., Majeed, F.A., Cartwright, K.A., Room, R., Parry, J.V., Perry, K.R., Begg, N.T., 1992. Salivary antibody testing in a school outbreak of hepatitis A. *Epidemiol. Infect.*, 109:161-6.
- Tamashiro, H., Constantine, N. T., 1994. [Serological diagnosis of HIV infection using oral fluid samples](#). *Bull World Health Organ.* 72(1):135-43.
- Tami, C., Silberstein, E., Manangeeswaran, M. Freeman, G. J., Umetsu, S.E., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T., Kaplan, G. G., 2007. 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* 81:3437-3446.
- Tanaka, J., 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in latin America. *Vaccine* 18: 57-60.
- Thieme, T., Yoshihara, P., Piacentini, S., Beller, M., 1992. Clinical evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1076-1079.
- [Tourinho, R. S.](#), [Amado, L. A.](#), [Villar, L. M.](#), [Sampaio, D. V.](#), [Moraes, A. C.](#), [Rodrigues do Ó, K. M.](#), [Gaspar, A. M.](#), [de Paula, V. S.](#), 2011. Importance of the cutoff ratio for detecting antibodies against hepatitis A virus in oral fluids by enzyme immunoassay. [J Virol Methods](#). 173:169-74.

- Trout, D., Mueller, C., Venczel, L., Krake, A. 2000. [Evaluation of occupational transmission of hepatitis A virus among wastewater workers.](#) *J Occup Environ Med.* 42:83-7.
- Tufenkeji, H., 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in the Middle East and Africa. *Vaccine* 18: S65-S67.
- Vallbracht, A., Gabriel, P., Maier, K., Hartmann, F., Steinhardt, H. J., Muller, C., et al., 1986. Cell-mediated cytotoxicity in hepatitis A virus infection. *Hepatology* 6: 1308-1314.
- van den Akker, R., van den Hoek, J. A., van den Akker, W. M., Kooy , H., Vijge, E., Roosendaal, G., Coutinho, R. A., van Loon, A. M. 1992. [Detection of HIV antibodies in saliva as a tool for epidemiological studies.](#) *AIDS.* Sep;6(9):953-7.
- Villar, L. M., Esteves da Costa, M. D. O. C, De Paula, V. S., et al, 2002. Hepatitis A outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(3):301-5.
- Vital, C. L., Yoshida, C. F. T., Lemos, E. R., Teixeira, C. S., Gaspar A. M. C., 1998. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 1-5.
- Vital, C. L., Gaspar, A. M. C., Souto, F. J. D., 2006. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002 - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(2): 119-127.
- Vyse, A.J., Chen, B.J., Ramsay, M.E., 2001 A comparison of oral fluid collection devices for use in the surveillance of virus diseases in children. *Pub. Health* 115: 201-207.
- Wasley, A., Samandari, T., Bell, B. P., 2005. [Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination.](#) *JAMA* 294(2):194-201.

- Who. 2000. Hepatitis A. Who/Cds/Csr/Edc,7. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsredc2007/en/index.html>. Acessado em: 2008.
- Yotsuyanagi, H., Lino, S., Koike, K., Yosuda, K., Hino, K., Kurokawa, K., 1993. Duration of viremia in human hepatitis A viral infection as determined by polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 40: 35-38.
- Zaaijer, H.L., Leentwaar-Kuijpers, A., Rotman, H., Lelie, P.N., 1993. Hepatitis A antibody titers after infection and immunization: implication for passive and active immunization. *J. Med. Virol.* 40: 22–27.
- Zhuang, F. C., Qian, W., Mao, Z. A., Gong, Y. P., Jian, Q. Jian, L. M., Chen, N. L., Chai. S. A., Mao, J. S., 2005. Persistent efficacy of live attenuated hepatitis A vaccine (H2-strain) after a mass vaccination program. *Chin Med J (Engl)* 118:1851-1856.

**ANEXO I**



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 03 de junho de 2010.

Carta: 026/10

De: CEP/FIOCRUZ


Para: - Dra. Renata Tourinho Santos e  
- Dr. Christian Gabriel Niel

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **536/09** intitulado **“Avaliação da saliva para detecção da resposta imune humoral contra o vírus da Hepatite A”** que foi **APROVADO**.

Conforme ofício (anexo ao e-mail) encaminhado ao CEP pela CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa precisamos de uma cópia em cd com toda documentação, inclusive as respostas às pendências do seu protocolo, para encaminhá-lo aqui ele órgão para ap reciação por se tratar de protocolo pertencente ao Grupo I.

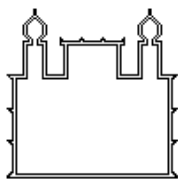
Atenciosamente

  
Carla Dias Netto  
Secretária Geral  
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos  
Fundação Oswaldo Cruz  
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705  
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360  
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815  
e-mail: [etica@fiocruz.br](mailto:etica@fiocruz.br)



## ANEXO II



**Ministério da Saúde**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Lab. Desenvolvimento Tecnológico em Virologia

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Projeto: *Avaliação da resposta imune humoral no fluido oral de indivíduos vacinados e de naturalmente imunizados com o vírus da hepatite A, utilizando diferentes coletores.*

Eu \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_ fui convidado a participar de um estudo que irá avaliar anticorpos específicos contra o vírus que causa a hepatite A em amostras de fluido oral.

**Objetivo da pesquisa:** O objetivo deste trabalho será investigar o melhor coletor fluido oral para detecção de infecção passada pelo vírus da hepatite A.

**Exames e procedimentos.** Será realizada a coleta de sangue venoso. Também será coletada uma amostra de fluido oral com auxílio de coletores apropriados. As coletas serão realizadas por técnicos especializados de laboratórios em seguida será feita a pesquisa de detecção dos anticorpos anti-HAV IgM e anti-HAV IgG.

**Riscos:** Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou rouidão no local. A coleta de fluido oral não leva nenhum risco ou desconforto.

**Benefícios:** Pelos testes que serão realizados, o Sr(a) poderá obter o benefício pessoal de ser informado se está protegido ou não contra o vírus da hepatite A e receber orientações sobre a necessidade de vacinação. Além de estar contribuindo para o progresso da pesquisa científica sobre a hepatite A. Autorizo, portanto, os profissionais do Instituto Oswaldo Cruz a utilizar uma amostra do meu sangue e de fluido oral para a realização dos exames para hepatite A e para fins de pesquisa científica. Os resultados desta pesquisa poderão ser utilizados para publicação científica, de maneira confidencial e notificação destes às Instituições de Saúde Pública a nível de Ministério da Saúde e Secretarias de Saúde Estadual e Municipal.

Caso tenha alguma dúvida ou necessidade de qualquer esclarecimento sobre o estudo, você pode entrar em contato com as pesquisadoras: Renata Tourinho Santos, Vanessa de Paula, Luciane A. Amado ou Ana Maria C. Gaspar. **Pavilhão Helio Peggy Pereira, sala B219. Tel: 2562-1876.**

Assinatura

\_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_