

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUCIANE ALMEIDA AMADO

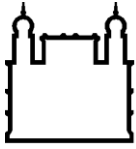
Saliva como espécime clínico para o estudo da hepatite A: aplicações no diagnóstico, na epidemiologia molecular e na patogênese.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - Área de Concentração: Biologia Parasitária.

Orientadores: Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar
Dr. Marcelo Alves Pinto

RIO DE JANEIRO

2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUCIANE ALMEIDA AMADO

Saliva como espécime clínico para o estudo da hepatite A: aplicações no diagnóstico, na epidemiologia molecular e na patogênese.

ORIENTADORES: Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar
Dr. Marcelo Alves Pinto

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira – IOC/Fiocruz - RJ

Profa. Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso – Universidade Federal de Goiânia - GO

Profa. Dra. Claire Fernandes Kubelka – IOC/Fiocruz -RJ

SUPLENTE:

Prof. Dr. Adilson José de Almeida – UNIRIO - RJ

Profa. Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto – IOC/Fiocruz - RJ

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz sob orientação da Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar e Dr. Marcelo Alves Pinto.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Angelo e Rosane. Obrigada pelo imenso amor, força e incentivo constante! *Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro dos estudos desenvolvidos.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Aos doutores Rita Maria Nogueira, Divina das Dôres Cardoso, Claire Kubelka, Adilson José de Almeida e Luzia Oliveira Pinto, por aceitarem participar da banca examinadora.

À Dra. Ana Maria Gaspar, pela dedicação e apoio, a quem agradeço pela orientação desde a Iniciação Científica, que me propiciou grande crescimento profissional.

Ao Dr. Marcelo Alves Pinto, pela orientação, pela confiança depositada em meu trabalho e incentivo à minha carreira profissional.

À pesquisadora Dra. Vanessa Salete de Paula, meu especial agradecimento pela amizade e imprescindível participação e dedicação na elaboração desta tese. Obrigada pela força e estímulo que sempre me ajudaram a superar desafios. Você será sempre um exemplo a seguir!

À pesquisadora Dra. Livia Melo Villar, o meu mais afetuoso agradecimento pela amizade, constante apoio e estímulo na realização deste trabalho. Sempre serei grata por toda sua atenção e por sempre estar disposta a me ajudar em qualquer situação.

Aos amigos Dr. Adilson José de Almeida e Msc. Marcia Paschoal, pela amizade, extensa paciência, pelo auxílio e grande atenção dispensada a mim. A ajuda de vocês foi valiosa para o desenvolvimento desta tese.

À Dra. Débora Regina Lopes dos Santos por toda ajuda, pelos momentos de alegria e companheirismo vividos dentro e fora do Laboratório que eu espero que se prolonguem por muito tempo.

Ao Dr. Renato Sérgio Marchevsky (Bio-Manguinhos / FIOCRUZ), por contribuir com a qualidade dos trabalhos realizados.

Às colegas Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira e Dra. Cláudia Lamarca Vitral, pela contribuição técnico-científica.

À todos os amigos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Renata, Daniela, Aliny, Carol, Tamara, Amanda, Juliana, Gentil, Alexandre e Paula, pelo carinho, atenção e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À equipe e alunos do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, em especial, ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pelo apoio e estímulo.

A todos do Laboratório de Hepatites Virais, pela disponibilidade constante em me ajudar nas coletas de amostras clínicas e pela amizade de vocês.

Agradeço também às pessoas que compartilharam comigo os meus ideais e assim contribuíram para meu êxito: meu irmão Thiago, meu namorado Ricardo, minhas avós, tias, tios e primas. Agradeço o grande amor recebido em forma de carinho, paciência e orações. Obrigada por estarem sempre ao meu lado me incentivando, apoiando e torcendo por mim. Amo muito todos vocês!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Concentrações de imunoglobulinas (mg/L) no plasma e em diferentes componentes da saliva.....	31
Tabela 1.2	Revisão bibliográfica sobre estudos utilizando saliva como espécime diagnóstico para hepatite A, identificados em bases de dados nacionais e internacionais (LILACS, Scielo, Medline e PubMed).....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A.....	3
Figura 1.2.	Imagem da estrutura da partícula do HAV obtida por criomicroscopia eletrônica.....	3
Figura 1.3.	Representação esquemática do genoma do HAV.....	7
Figura 1.4.	Esquema de um hepatócito durante a biossíntese e replicação do HAV.....	9
Figura 1.5.	Microscopia ótica de Hepatite viral aguda.....	13
Figura 1.6.	Distribuição geográfica da infecção pelo HAV.....	16
Figura 1.7.	Dendrograma demonstrando a relação genética entre os diferentes genótipos das cepas humanas e símias.....	20
Figura 1.8.	Cinética da infecção pelo vírus da hepatite A.....	25
Figura 1.9.	Coletor de saliva Orasure	29
Figura 1.10.	Dispositivos utilizados para coleta de fluido oral para detecção de anticorpos virais.....	30
Figura 1.11.	Transporte de substâncias do sangue para a saliva.....	31

LISTA DE QUADROS

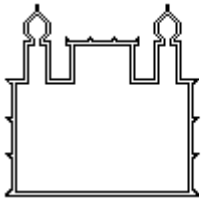
Quadro 1.1. Vantagens potenciais da saliva como meio diagnóstico para as hepatites virais em relação ao sangue.....	32
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

anti-HAV IgM – imunoglobulina tipo M contra o vírus da hepatite A
CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês “Center for Disease Control and Prevention”
cDNA – fita de DNA complementar, do inglês “complementary DNA”
EIA – ensaio imunoenzimático, do inglês “Enzyme immunoassay”
ET-NANB – entericamente transmitida não-A e não-B
EUA – Estados Unidos da América
HAV – vírus da hepatite A, do inglês “hepatitis A virus”
HBV – vírus da hepatite B, do inglês “hepatitis B virus”
HEV – vírus da hepatite E, do inglês “hepatitis E virus”
IEM – imunoeletromicroscopia
IgM – imunoglobulina tipo M
NC – não codificante, do inglês “non-coding”
nsP – Proteína não estrutural, do inglês “non structural protein”
ORF – Fase de leitura aberta, do inglês “open reading frame”
pi – pós infecção
RdRp – RNA polimerase RNA dependente
RNA – ácido ribonucleico
Real time PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa
°C – graus celsius

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1.INTRODUÇÃO	1
1.1. A hepatite A.....	1
1.2. Classificação e morfologia do vírus da hepatite A (HAV).....	2
1.3. Estrutura genômica e protéica do HAV.....	4
1.3.1 Regiões não-codificantes.....	4
1.3.2 Regiões codificantes.....	5
1.4. Biossíntese e Replicação viral.....	7
1.5. Patogênese e manifestações clínicas.....	10
1.6. Infecção experimental em animais.....	13
1.7. Epidemiologia	14
1.8. Variabilidade genética e distribuição dos genótipos do HAV	18
1.9. Prevenção e controle	21
1.10. Abordagem diagnóstica.....	23
1.11. Saliva como meio diagnóstico de infecções virais.....	27
1.11.1 Anticorpos na saliva.....	30
1.11.2 Por que utilizar a saliva?.....	32
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	34
3. OBJETIVOS	36
3.1. OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. METODOLOGIAS E RESULTADOS	37
4.1. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA.....	38
4.2. Mixed infection of hepatitis A virus subgenotypes in children exposed of an outbreak using paired serum and saliva specimens.....	46
4.3. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>): evidence of active extrahepatic site of HAV replication.....	70
4.4. Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR.....	82
5. DISCUSSÃO	93
6. CONCLUSÕES	106
7. PERSPECTIVAS	108
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

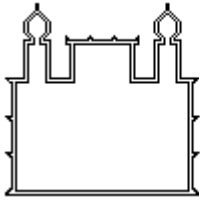
RESUMO

Saliva como espécime clínico para o estudo da hepatite A: aplicações no diagnóstico, na epidemiologia molecular e na patogênese.

TESE DE DOUTORADO

LUCIANE ALMEIDA AMADO

No Brasil, surtos de hepatite A em comunidades fechadas, principalmente em creches e escolas, constituem um importante problema para saúde pública, que requerem investigação epidemiológica e rápida intervenção de controle, devido ao risco de propagação “silenciosa” para as comunidades próximas. Entretanto, a coleta de sangue é invasiva e dolorosa o que dificulta o acesso à população infantil para realização do diagnóstico, muitas vezes inviabiliza o estudo epidemiológico quando este envolve um número grande de indivíduos. A coleta de amostras de saliva como uma alternativa, oferece potenciais vantagens, pois se trata de uma coleta não-invasiva, indolor e rápida. A fim de avaliar a utilização da saliva como espécime clínico para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da hepatite A, estudos foram conduzidos a partir de amostras pareadas de saliva/soro de pacientes envolvidos em um surto de hepatite A. No primeiro estudo, otimizamos métodos para detecção de anticorpos anti-HAV e do HAV-RNA em amostras de saliva. Neste estudo, observamos sensibilidade e especificidade do teste de detecção de anti-HAV IgM na saliva de 96% e 98%, respectivamente. Após estabelecer os protocolos para detecção do HAV RNA, verificamos uma alta frequência de detecção de HAV RNA em amostras de saliva tanto de pacientes em fase aguda como em pacientes em período de “janela imunológica” (37,2%). O estudo da epidemiologia molecular conduzido durante o surto revelou co-circulação dos subgenótipos IA e IB do HAV e a ocorrência de casos de co-infecção por subgenótipos diferentes do HAV entre as amostras pareadas de soro e saliva. Este resultado nos levou a investigação de uma possível replicação extrahepática do HAV em glândulas salivares, através de um estudo de infecção experimental em cinomolgos. Neste estudo constatamos a presença do antígeno viral nos hepatócitos e nas glândulas submandibulares dos animais infectados. Através da detecção do replicativo intermediário do HAV, observou-se uma replicação ativa do HAV nas glândulas submandibulares dos animais infectados experimentalmente. Este trabalho demonstrou a aplicabilidade das amostras de saliva para o diagnóstico da hepatite A e sua importância para estudos de epidemiologia molecular. Os dados deste presente estudo esclareceram alguns aspectos da patogênese do HAV como a ocorrência de replicação extrahepática em glândulas salivares, sugerindo a possibilidade de transmissão do HAV através da saliva.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

Saliva as clinical specimen for the study of hepatitis A: usefulness for diagnosis, molecular epidemiology and pathogenesis.

TESE DE DOUTORADO

LUCIANE ALMEIDA AMADO

The occurrence of hepatitis A outbreaks in communities as child care centers and schools constitutes an important public health issue. A reliable epidemiological investigation and immediate action are fundamental to apply control measures due to the risk of “silent” dissemination to surrounding communities. Nevertheless, the collection of blood samples is invasive and unpleasant which limits the access to infants. Consequently, the conduction of the diagnosis and the development of a feasible epidemiological study is an obstacle when it involves a large number of individuals. Saliva collection as an alternative to the blood collection, offers potential advantages because the collection is non-invasive, painless and fast. In order to evaluate the use of saliva as clinical samples for diagnosis and epidemiological studies of hepatitis A, studies were conducted from paired samples of saliva and serum of patients involved in an outbreak of hepatitis A. In the first study, we optimized methods for detection of anti-HAV and HAV-RNA in saliva samples. This study showed sensitivity and specificity of testing for IgM anti-HAV in saliva of 96% and 98%, respectively. After establish protocols for detection of HAV RNA, we found high frequency of detection of HAV RNA in samples saliva of both acute-phase patients and patients in window period of infection (37.2%). The molecular epidemiology study conducted during the outbreak revealed a co-circulation of sugenotypes IA and IB, besides the occurrence of co-infection with different HAV subgenotypes among the paired samples of serum and saliva in six patients. These findings prompted us to investigate a possible extrahepatic replication of HAV in salivary glands, through a study of experimental infection in cynomolgus. In this study we verified the presence of viral antigen in the hepatocytes and in salivary glands of the infected animals. Through detection of HAV intermediate replicative, we observed an active replication of HAV in submandibular glands of these animals. These studies showed the feasibility of saliva samples for hepatitis A diagnosis and its importance to molecular epidemiology studies. Our data showed some aspects of HAV pathogenesis as the occurrence of extrahepatic replication in salivary glands, suggesting the possibility of HAV transmission through saliva samples from infected subjects.

1- INTRODUÇÃO

1.1 A Hepatite A

Os agentes etiológicos das hepatites virais são responsáveis pela alta incidência, morbidade e mortalidade e representam um grave problema de saúde pública. As hepatites virais são causadas por cinco vírus hepatotrópicos atualmente conhecidos como vírus da hepatite A, B, C, D e E, que levam a alterações hepáticas de gravidade variável (Hollinger e Emmerson, 2007).

A hepatite A é uma doença infecciosa aguda e, embora seja auto-limitada e raramente associada à falência hepática fulminante, ainda é uma significativa causa de morbidade e perdas socioeconômicas em muitas partes do mundo (Martin e Lemon et al., 2006).

Historicamente, a hepatite A é conhecida de longas datas. Relatos da ocorrência de icterícia epidêmica foram descritos inicialmente por Hipócrates 400 a.C. No entanto, o primeiro relato escrito de hepatite A, segundo revisão feita por Cockayne em 1912 (Apud Hollinger e Emerson, 2007), foi a descrição de uma epidemia na ilha de Minorca, no século 18, na qual a via de disseminação da doença foi erroneamente descrita como sendo por aerossóis. Em 1923, Blumer e colaboradores, ao analisarem surtos ocorridos nos Estados Unidos da América (EUA) entre 1912 e 1922, sugeriram a transmissão através do contato de pessoa a pessoa. No século XX, durante as grandes guerras, onde havia grande concentração de pessoas, a doença foi disseminada levando a pandemias (Paul e Gardner, 1950). Desde então, a hepatite A foi reconhecida como um importante problema de saúde pública.

Logo após a segunda guerra mundial, pesquisas em voluntários humanos demonstraram a transmissão da doença de pessoa a pessoa (MacCallum e Bradley, 1944). Em um estudo de infecção experimental realizado em uma instituição de crianças especiais foi conhecida a principal via de disseminação da doença (Krugman et al., 1967). Neste estudo, foram estabelecidos dois tipos de hepatites, a infecciosa e a icterícia sérica, com períodos de incubação bem distintos e modos de transmissão diferentes.

Em 1947, MacCallum introduziu os termos hepatite A para a hepatite infecciosa e hepatite B para a icterícia sérica. Um dos agentes de hepatite, designado MS-1, era transmitido pela via fecal-oral. A doença era altamente infecciosa e tinha um período de incubação relativamente curto, de aproximadamente 6 semanas. A fim de reproduzir a doença, a cepa MS-1 do vírus da hepatite A foi utilizada para infectar adultos voluntários (Boggs et al., 1970). A partir de amostras de fezes e soro destes voluntários, Feinstone e colaboradores, em 1973, conseguiram, pela primeira vez, através de imunomicroscopia eletrônica, identificar o vírus nas fezes destes pacientes. Quase uma década depois, Provost e Hilleman (1979) obtiveram sucesso na propagação do vírus em cultura celular, possibilitando o desenvolvimento de imunobiológicos, tais como kits para diagnóstico e vacina.

1.2 Classificação e morfologia do vírus da hepatite A (HAV)

O HAV está classificado na família *Picornaviridae* (Melnick, 1982; Gust et al., 1983) e é o único representante do gênero *Hepatovirus* (Minor et al., 1991). Em contraste com outros vírus da família *Picornaviridae*, o HAV se replica mais lentamente em alguns sistemas de cultura celular, sem interferência na síntese de macromoléculas da célula hospedeira e, conseqüentemente, sem efeito citopático aparente. Diferente de outros picornavírus, o HAV requer o fator eucariótico de iniciação 4G (eIF4G) da célula hospedeira para iniciar o processo de tradução, (Pintó et al., 2007). Por conseguinte, o HAV compete de forma ineficiente com a maquinaria celular de tradução, o que pode explicar sua lenta replicação em cultura celular. Estudos bioquímicos também demonstraram outras diferenças em relação a outros picornavírus, tais como: maior resistência a temperaturas elevadas (56°C por 30 min) e a algumas substâncias químicas como éter (20%) e clorofórmio (de Chastonay et al., 1988); estabilidade em pH 1,0 (Scholz et al., 1989); e não apresenta reatividade com anticorpos monoclonais contra enterovírus (Hollinger e Emerson, 2007). Além disso, o HAV possui um único sorotipo identificado e um número limitado de epítomos antigênicos intimamente agrupados na superfície viral (Stapleton e Lemon, 1987; Ping et al., 1988; Ping e Lemon, 1992). Os únicos variantes antigênicos conhecidos são de cepas do HAV isoladas de macacos do velho mundo (Nainan et al., 1991; Tsarev et al., 1991).

O vírion não é envelopado, apresenta um capsídeo icosaédrico composto por três proteínas principais: VP1, VP2 e VP3 e possui um diâmetro de 27 a 32 nm (figura 1.1) (Feinstone et al., 1973).

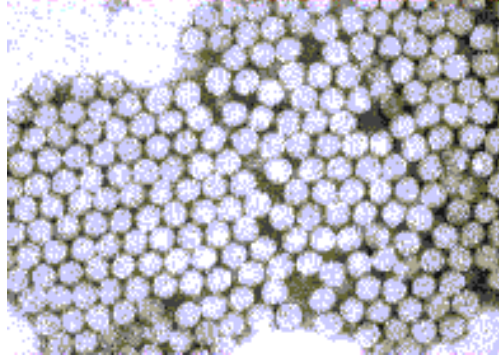


Figura 1.1: Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A (fonte: CDC, 1998)

A partícula viral madura contém 12 pentâmeros, ou seja, 60 cópias de cada proteína do capsídeo. Recentemente, imagens da partícula viral obtidas por criomicroscopia eletrônica demonstraram características significativas da sua superfície, tal como a ausência de uma depressão ao redor do eixo de simetria dos pentâmeros, a qual em outros picornavírus é necessária para que ocorra a ligação do vírus aos receptores celulares e conseqüente desnudamento do capsídeo viral (figura 1.2) (Rossmann et al., 2002).

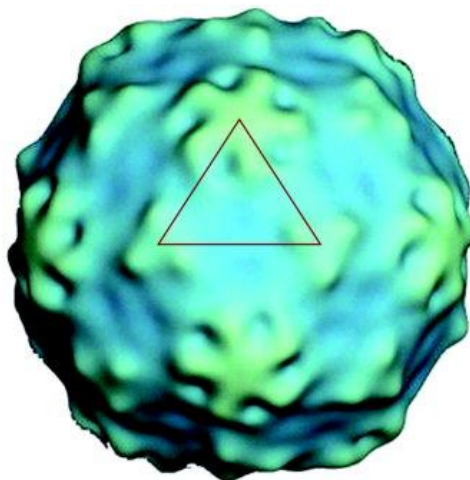


Figura 1.2: Imagem da estrutura da partícula do HAV obtida por criomicroscopia eletrônica (Martin e Lemon, 2006). O triângulo define um eixo de simetria delimitado por um pentâmero (topo) e dois pequenos triângulos (vértices inferiores esquerdo e direito) (fonte: Martin e Lemon, 2006, autorizado por Dr. Holland Cheng, University of California at Davis).

1.3 Estrutura genômica e proteica

O genoma do HAV é formado por um RNA linear de polaridade positiva, constituído por aproximadamente 7.478 nucleotídeos, seguido por uma cauda poli (A) de 40 a 80 nucleotídeos (Provost et al., 1975; Bradley et al., 1978; Paul et al., 1987; Koff, 1998). Como todos os picornavírus, seu genoma pode ser dividido em três regiões distintas (figura 1.3): uma região 5' não-codificante (5' NC) de 734 a 740 nucleotídeos, compreendendo aproximadamente 10% do genoma, que possui uma proteína covalentemente ligada (VPg); uma região codificante de 6680 a 6726 nucleotídeos, com uma única fase de leitura aberta (ORF), que codifica as proteínas virais estruturais e não-estruturais; e uma região 3' não-codificante (3' NC), com aproximadamente 60 nucleotídeos, que possui uma cauda poliadenilada (Cohen et al., 1987; Koff, 1998).

1.3.1 Regiões não-codificantes

A região 5' não-codificante representa a porção mais conservada do genoma, com mais de 85% de identidade nucleotídica entre as cepas dos genótipos I, II e III, possui 734 nucleotídeos, precede a única ORF e a região 3' não-codificante (Bradley et al., 1984). Uma pequena proteína viral, 3B (VPg) está covalentemente ligada a esta região. Apresenta estruturas secundárias e terciárias, sendo organizada em seis domínios de estruturas secundárias, dentre eles uma estrutura em forma de grampo, duas estruturas helicoidais e um trato de polipirimidina (Cohen et al., 1987). Os dois primeiros domínios estão localizados entre os nucleotídeos 1-95 e parecem atuar no controle da iniciação da síntese da fita positiva de RNA (Andino et al., 1993). Os outros quatro domínios estão localizados entre os nucleotídeos 155-734 (Totsuka et al., 1999). O terceiro domínio é um pequeno segmento de fita simples e parece participar na replicação do RNA viral, uma vez que mutações neste domínio conferem um fenótipo de replicação viral sensível à temperatura (Andino et al., 1993). Os últimos domínios da região 5'NC formam o sítio de entrada interna de ribossomos (IRES), o qual direciona a tradução da ORF (Totsuka et al., 1999).

A região 3' não-codificante contém 60 nucleotídeos, é poliadenilada na extremidade 3' e possui mais de 20% de heterogeneidade nucleotídica entre as cepas de HAV analisadas, dessa forma, apresentando maior variabilidade que a

região 5' NC. Apresenta estruturas secundárias helicoidais e, possivelmente, um pseudo-nó, provavelmente responsáveis pela interação entre as proteínas virais e celulares específicas. As estruturas secundárias das regiões não-codificantes (domínios I e II e o trato de polipirimidina) são importantes na síntese do RNA viral (Totsuka et al., 1999).

1.3.2 Região codificante

A região codificante possui uma única fase de leitura aberta (6681 bases) que codifica uma poliproteína de 2227 aminoácidos, compreendendo três regiões: a região P1, que codifica proteínas estruturais 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) e 1D (VP1); a região P2, que codifica as proteínas 2A, 2B e 2C; e a região P3, que codifica as proteínas 3A, 3B, 3C e 3D (figura 1.3). Cada proteína do capsídeo é formada a partir de clivagens da poliproteína mediada pela protease viral (3C).

A região 1A dá origem à proteína VP4, um polipeptídeo de 23 aminoácidos e peso molecular de 2,5 KDa (Tesar et al., 1992), que é indetectável na partícula viral madura (Totsuka et al., 1999) e essencial para formação do vírion (Probst et al., 1999). Através de cristalografia de Raio-X, demonstrou-se a localização da proteína VP4 na superfície interior do capsídeo de outros picornavírus (Totsuka et al., 1999). Entretanto, esta localização ainda não foi conclusivamente demonstrada no HAV.

A região 1B dá origem ao precursor VP0 que sofre processamento autocatalítico para formar VP2, uma das principais proteínas estruturais do vírus. A região 1C forma a proteína VP3, que possui 246 aminoácidos e tem peso molecular de 28 KDa. Finalmente, a região 1D é responsável pela proteína VP1, que é formada por 300 aminoácidos e tem peso molecular de 33 KDa. A proteína VP1 é a mais abundante do capsídeo e é responsável pela formação dos epítomos conformacionais junto com a proteína VP3 (Lemon et al., 1992).

A região P2 codifica as proteínas 2A, 2B e 2C, que possuem 189, 107 e 335 aminoácidos, respectivamente. Embora a proteína 2A de outros picornavírus possua atividade de proteinase, não existe evidência dessa atividade nesta proteína do HAV (Yokosuka, 2000). Cohen e colaboradores (2002) demonstraram que o papel desta proteína é, primeiramente, atuar como proteína precursora do capsídeo. Além disso, alguns estudos revelaram que a proteína 2A atua como um sinal de montagem das partículas virais e, portanto, possui um papel importante na morfogênese viral (Cohen et al., 2002; Kusov et al., 2007). As proteínas 2B e 2C possuem um

importante papel na replicação do RNA viral, com atividades de helicase e NTPase e são consideradas importantes na adaptação do vírus à célula hospedeira, já que inúmeras mutações foram detectadas em ambas as regiões de vírus adaptados (Emerson et al., 1992; Totsuka et al., 1999). Além disso, as proteínas 2B e 2C possuem a propriedade de se associar às membranas intracelulares e induzir um rearranjo estrutural dessas membranas (Teterina et al., 1997).

A região P3 codifica as proteínas 3A, 3B, 3C e 3D. A proteína 3B, com 23 aminoácidos, é denominada VPg (Virion Protein, Genome linked) e está covalentemente ligada ao RNA do HAV, representando um *primer* para a síntese do RNA intermediário, de polaridade negativa, e subsequentemente, das moléculas de RNA de polaridade positiva da progênie viral (Martin e Lemon, 2006). A proteína 3A é denominada pré-VPg, contém 74 aminoácidos e ancora a proteína 3B no RNA. A proteína 3C tem atividade de protease viral, sendo a maior responsável pelo processamento proteolítico do vírus (Gauss-Muller et al., 1991). Em adição à sua atividade proteolítica, a proteína 3C se liga ao RNA viral e, portanto, influencia na replicação do genoma viral (Peters et al., 2005). Estudos recentes demonstram que a clivagem da proteína ligada ao trato de polipirimidina pode estar envolvida na regulação negativa da tradução viral, dando lugar a subsequente replicação do genoma viral (Kanda et al., 2009). A proteína 3D, contendo 489 aminoácidos, é considerada uma RNA polimerase RNA-dependente e sua seqüência nucleotídica possui alta similaridade com as seqüências correspondentes de outros picornavírus (Martin e Lemon, 2006). Recentes estudos identificaram determinantes na seqüência de aminoácidos da 3D (pol) que são necessários para controlar a cinética de crescimento do HAV em cultura celular (Konduru et al., 2010). Portanto, as proteínas P2 e P3 demonstram um importante papel funcional na replicação viral.

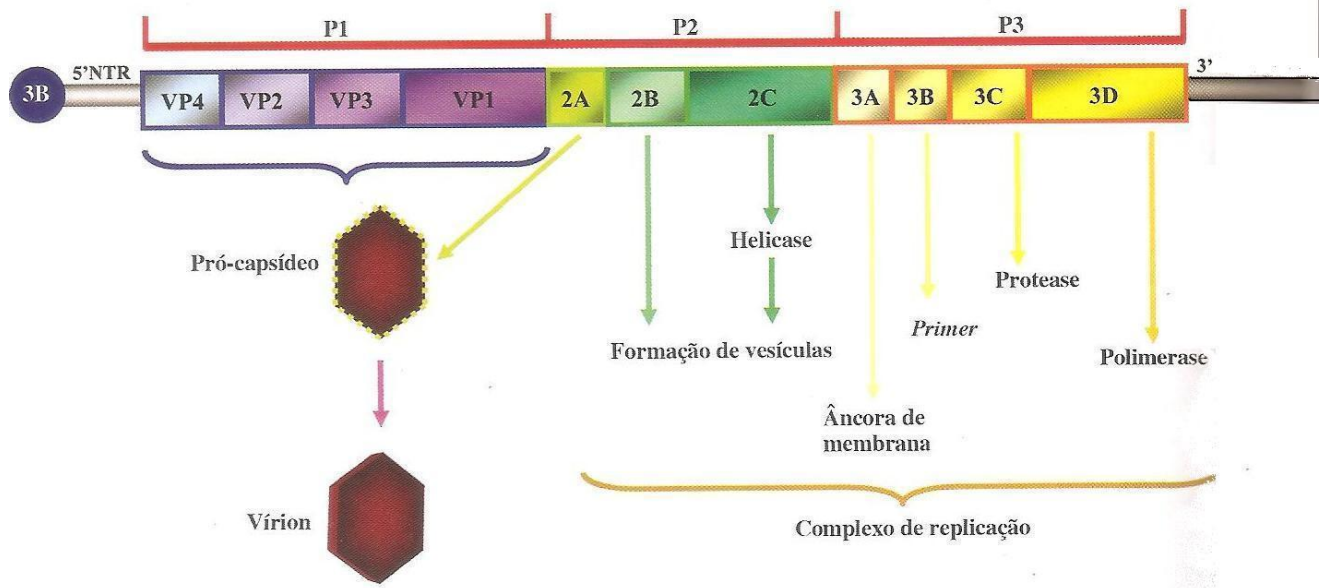


Figura 1.3: Representação esquemática do genoma do HAV (Fonte: Santos, NS. Introdução a Virologia humana -2ed –Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2008)

1.4 Biossíntese e Replicação Viral

Após a infecção via trato gastrointestinal, o HAV se replica lentamente nos hepatócitos por várias semanas e, mais intensamente, durante o seu período de incubação. O processo de replicação se inicia com a adsorção do vírus à membrana celular por meio de sua interação a receptores celulares. O receptor celular do vírus da hepatite A é um tipo de glicoproteína integral de classe I (HAVCR1/TIM1) (Tami et al., 2007). Embora o receptor HAVCR1/TIM1 seja suficiente para que ocorra a interação vírus-célula e as alterações das partículas do HAV, que são necessárias para a entrada do vírus na célula (Silberstein et al., 2001, 2003), foi sugerido que a imunoglobulina A anti-HAV exerça um importante papel na infecção *in vivo*, via receptor asialoglicoproteína (ASGPR), que é uma glicoproteína localizada na superfície basolateral dos hepatócitos humanos (Dotzauer et al., 2000) modulando a interação do vírus com o receptor em condições não favoráveis de infecção, como os níveis baixos de receptores (Tami et al., 2007).

Após a adsorção do vírus ao hepatócito, ocorre o desnudamento da partícula viral e posterior liberação do genoma de RNA fita-positiva dentro da célula hospedeira, que passa a funcionar como RNA mensageiro (RNAm) para a tradução da poliproteína viral. Todo o processo de replicação ocorre no citoplasma da célula

infectada. A primeira etapa da replicação após a descapsidação do RNA viral é a síntese da poliproteína, que é direcionada pela região denominada sítio de entrada interna de ribossomos (IRES), presente na região 5' NC. As regiões terminais do genoma viral 5'NC e 3'NC são identificadas como elementos importantes para replicação, sendo necessárias para iniciação da síntese das fitas positiva e negativa de RNA (Kusov et al., 2005). A síntese das fitas positivas ocorre dentro do retículo endoplasmático liso e é um processo catalisado pelas proteínas não-estruturais recém-formadas (2B-3D^{pol}), que atuam como RNA replicase e se ligam à extremidade 3' do RNA genômico, iniciando a síntese de uma cópia de RNA complementar, de polaridade negativa (replicativo intermediário). Esta cópia servirá de molde para a síntese de novas e múltiplas fitas de RNA de polaridade positiva. Muitas dessas novas fitas de RNA de polaridade positiva podem ser reutilizadas, servindo de molde para síntese de outras moléculas de polaridade negativa ou podem ser traduzidas para síntese de novas proteínas virais. Outras moléculas de RNA de fita positiva são empacotadas para formação de novas partículas virais, seguida de uma clivagem final do precursor da junção VP1/2A e uma clivagem de "maturação" da junção VP4/VP2. A última etapa do ciclo replicativo consiste na montagem da partícula viral. Admite-se que os três polipeptídeos do capsídeo do HAV sejam montados em uma estrutura de icosaedro contendo 60 cópias de cada um. As novas partículas de HAV são liberadas pela membrana apical dos hepatócitos, nos canalículos biliares (figura 1.4). O mecanismo de liberação e secreção das partículas virais é desconhecido, mas sugere-se que não é dependente de lise celular, já que altos títulos virais são detectados nas fezes antes de qualquer evidência de necrose nos hepatócitos (Cuthbert, 2001).

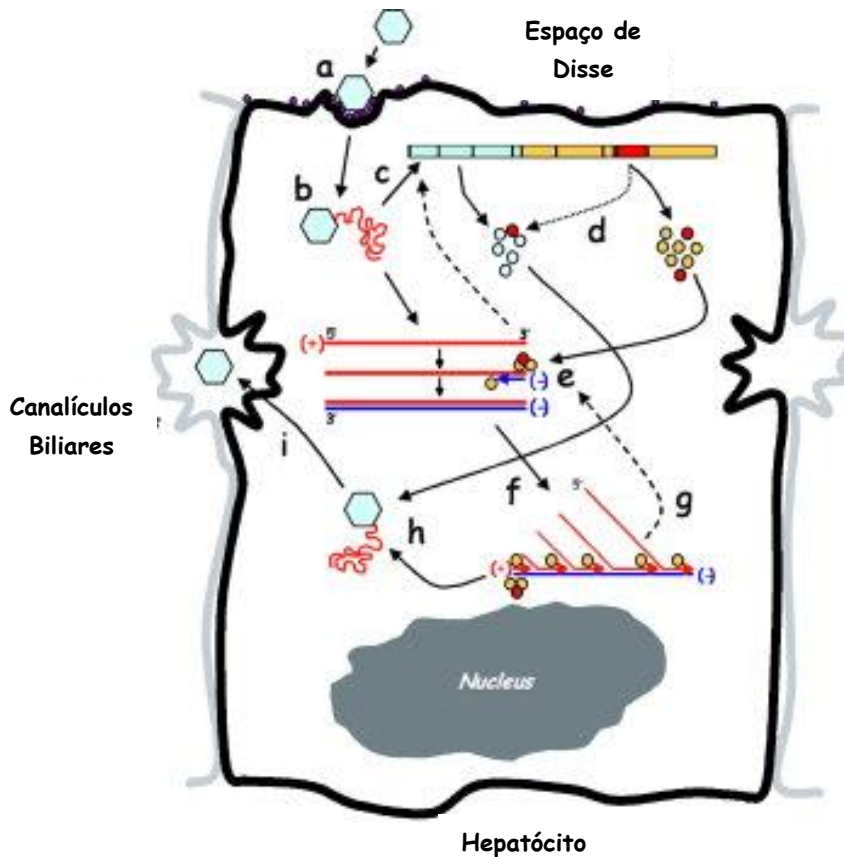


Figura 1.4 Esquema de um hepatócito durante a replicação do HAV. (a) adsorção do vírus ao receptor celular. (b) Desnudamento e liberação do RNA genômico. (c) Tradução da poliproteína viral. (d) Processamento proteolítico. (e) Síntese da fita de RNA de polaridade negativa. (f) Síntese de novas cópias de RNA genômico de polaridade positiva. (g) Tradução das novas fitas de RNA de polaridade positiva para síntese de proteínas virais. (h) Empacotamento do RNA e montagem de novas partículas virais. (i) Liberação das novas partículas virais, para os canalículos biliares. Fonte: Martin e Lemon, 2006.

A replicação do HAV em cultura celular tem sido descrita desde 1979, em células de primatas não-humanos e em células humanas, de linhagem hepatocitária ou outra linhagem. O isolamento primário de HAV geralmente apresenta um lento processo de replicação, sem aparente efeito citopático em cultivo celular (Yokosuka, 2000). No entanto, algumas cepas de HAV, altamente adaptadas a determinados sistemas de cultivo celular apresentam replicação mais rápida e até mesmo efeito citopático, além de aparentemente poderem causar morte celular por apoptose (Brack et al., 1998; Gosert et al., 2000). As principais mutações responsáveis por esse fenótipo de adaptação estão localizadas nas regiões P2 e 5' NC (Day et al., 1992; Emerson et al., 1993; Zhang et al., 1995). Entretanto, mutações específicas nas proteínas 2B e 2C foram descritas como as mais importantes mutações

associadas com a adaptação viral para crescimento em cultura celular (Yi e Lemon, 2002).

1.5 Patogênese e Manifestações clínicas

A transmissão do HAV geralmente ocorre pela via fecal-oral, após a ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes contendo o HAV. Após a ingestão oral, o exato destino dos vírions ainda é desconhecido. Contudo, estudos de infecção experimental em macacos coruja (*Owl Monkeys*) demonstraram a detecção do antígeno viral no estômago, intestino delgado e intestino grosso logo após a inoculação oral do HAV e durante todo o curso da infecção (Asher et al., 1995), sugerindo replicação viral nesses sítios. Provavelmente, após ultrapassar a barreira epitelial do trato digestório, o HAV alcança o parênquima hepático através da circulação portal (ou após a circulação sistêmica), sendo capturado pelos hepatócitos através de receptores específicos (Cuthbert, 2001). O vírus se replica no hepatócito e é eliminado nas fezes através da bile. O ciclo enterohepático do HAV se mantém até que anticorpos neutralizantes o interrompam.

Algumas evidências indicam que o HAV não é diretamente citotóxico aos hepatócitos e, portanto, a citopatologia induzida pelo HAV, não deve ser responsável pelas alterações patológicas que ocorrem na infecção e que a injúria hepática resulta primariamente de mecanismos imunes (Siegl et al., 1993).

O vírus é intensamente eliminado junto com as fezes e pode ser detectado durante o período de incubação, que dura cerca de 2 a 7 semanas. No entanto, por meio da técnica de Reação em cadeia de polimerase (PCR) demonstrou-se a excreção viral nas fezes por um período médio de 81 dias (títulos de 2×10^6 - 2×10^8 cópias/ml de suspensão fecal), podendo se estender por mais de três meses após o início da doença, mesmo depois da normalização dos níveis séricos de transaminases (Tjon et al., 2006).

A duração da viremia foi estimada em um período médio de 42 dias (Tjon et al., 2006), podendo variar de 5 a 59 dias, segundo Kwon e cols (2000) e de 36 a 391 dias, segundo Bower e cols (2000) após o início dos sintomas. A concentração do vírus no soro é de 2 a 3 \log_{10} unidades menor que a concentração nas fezes (Cohen et al., 1989; Bower et al., 2000) e em média varia de 10^3 a 10^5 cópias/mL (Costa-Mattioli et al., 2002a; Hussain et al., 2006).

Cohen e colaboradores (1989), após a inoculação oral de chimpanzés com cepa selvagem de HAV, detectaram o antígeno viral por radioimunoensaio nas tonsilas durante o período de viremia. Um estudo recente demonstra que o vírus também pode ser eliminado na saliva de pacientes com hepatite A, sendo a carga viral neste fluido de 1 a 3 \log_{10} unidades menor que a concentração no soro (Mackiewicz et al., 2004). Entretanto, os dados epidemiológicos existentes ainda não são suficientes para o estabelecimento da saliva como uma importante fonte de transmissão do HAV.

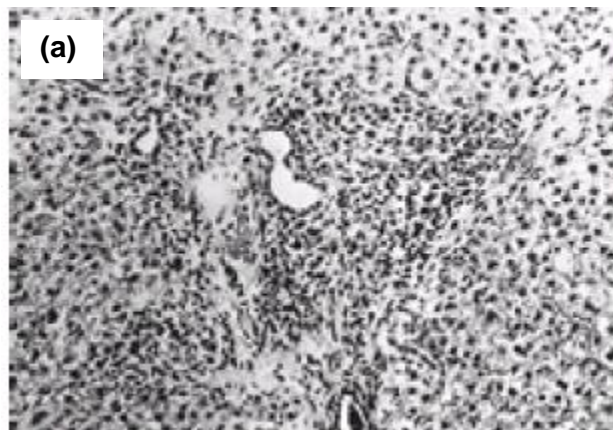
O curso clínico da infecção pelo HAV pode variar de uma infecção assintomática a formas graves, como a hepatite fulminante. As manifestações clínicas da infecção pelo HAV são geralmente brandas ou assintomáticas em crianças menores de 10 anos e a partir desta idade observa-se que a doença se manifesta de forma mais grave, principalmente em adultos e idosos (Lemon, 1997; Cuthbert, 2001). O curso da infecção pode ser dividido em quatro fases clínicas: (a) período de incubação, que varia de 15 a 50 dias, com média de 30 dias (Paul et al., 1945). Durante esta fase, o indivíduo permanece assintomático, apesar da intensa replicação viral; (b) fase pré-ictérica ou período prodrômico, quando aparecem os primeiros sintomas inespecíficos, tais como: febre, náusea, vômito, dor abdominal, anorexia e fadiga. Geralmente, ocorrem 5 a 7 dias antes do início da icterícia; (c) fase ictérica, caracterizada pela deposição de bilirrubina na pele e mucosa, que assumem coloração amarelada e geralmente, também ocorre colúria e hipocolia nesta fase. Sua duração é bastante variável podendo ser de 4 a 29 dias (Havens, 1947); (d) fase de convalescência. Em geral, o paciente se recupera completamente dentro de dois meses. Na literatura, não existem registros de formas crônicas da doença.

Nas formas agudas anictéricas ou ictéricas consideradas benignas ou brandas (a grande maioria dos casos), os exames histológicos demonstram lesões nos espaços porta e no interior dos lóbulos, que se caracterizam por degeneração e necrose de hepatócitos, com exsudato inflamatório predominante de mononucleares, porém, neutrófilos e eosinófilos podem ser observados (figura 1.5a). Além disso, células apoptóticas podem ser observadas.

Manifestações atípicas de hepatite A podem ocorrer em alguns indivíduos, tais como: hepatite colestásica, recorrente, prolongada ou até manifestações

extrahepáticas. Pacientes com hepatite colestática geralmente apresentam níveis de bilirrubina sérica acima de 10mg/dL por mais de 12 semanas, com acúmulo de bile no interior dos hepatócitos. Embora a resolução da doença seja lenta, a recuperação é completa. A hepatite recorrente ocorre em cerca de 3 a 20 % dos casos agudos e surge entre 4 e 15 semanas após o desaparecimento dos sintomas iniciais (Glikson et al., 1992). Neste caso, títulos de anti-HAV IgM reaparecem ou aumentam e o vírus pode ser detectado nas fezes e no soro (Tong et al., 1995). Na forma prolongada de hepatite A pode ser observada a persistência de anti-HAV IgM por até 55 semanas (Krkić-Dautović, 2006).

Ocasionalmente pode ocorrer necrose extensa do fígado durante a hepatite viral aguda, levando ao comprometimento da função hepática e caracterizando uma hepatite fulminante. Nas formas fulminantes (formas que se acompanham de insuficiência hepática aguda), a necrose é confluyente, comprometendo grande parte ou todo o lóbulo hepático (necrose submáçica ou máçica) (figura 1.5b). O infiltrado inflamatório é predominantemente mononuclear, mas pode ser escasso ou desproporcional à extensão da necrose. A taxa de letalidade por hepatite A geralmente é menor que 1,5% entre os casos hospitalizados, aumentando de 0,4% nos pacientes com menos de 40 anos de idade para 12,5% nos pacientes acima de 65 anos (Canuel et al., 2007).



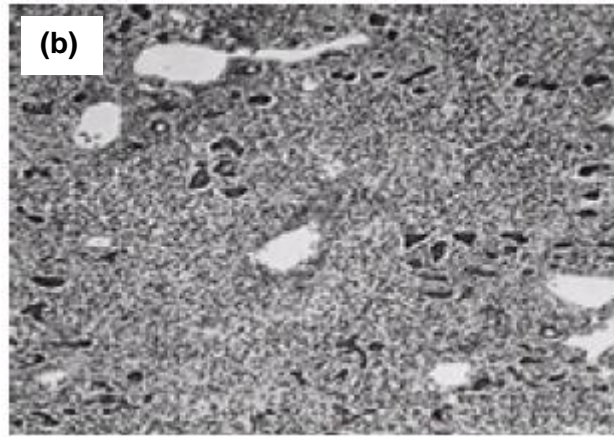


Fig. 1.5 Microscopia óptica de hepatite viral aguda. (a) Infiltrado inflamatório na área portal (H&E $\times 140$). (b) necrose maciça, com infiltração do estroma e áreas portais com células inflamatórias (coloração de Hematoxilina-Eosina, aumento de 140x). Fonte: Ishak KG. Light microscopic morphology of viral hepatitis. *Am J Clin Pathol* 1976; 65: 787–827.

1.6 Infecção experimental em animais

No início da década de 60, foram iniciadas as tentativas de transmissão do vírus da hepatite A em animais experimentais (Deinhardt et al., 1962). Contudo, somente em 1969 foi confirmada a transmissão do HAV em sagüis inoculados com soro de pacientes agudos (Holmes et al., 1969). Logo surgiram subseqüentes trabalhos evidenciando a transmissão de cepas humanas de HAV em chimpanzés (Dienstag et al., 1975; Maynard et al., 1975). Atualmente, sabe-se que, além de chimpanzés (Dienstag et al., 1975; Cohen et al., 1989; Balayan, 1992; Purcel et al., 1992), diversas espécies de primatas não-humanos são suscetíveis à infecção com HAV humano, tais como: macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (Lapin e Shevtsova, 1990), macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (Balayan et al., 1992), macacos coruja (*Aotus trivirgatus*) (Traham et al., 1987; Asher et al., 1995), macaco de rabo curto (*Macaca speciosa*) (Mao et al., 1981) e várias espécies do novo mundo como sagui (*Callithrix jacchus*) (Gaspar et al., 1992; Baptista et al., 1993; Vitral et al., 1995), Tamarin (*Saguinus sp*) (Krawczynski et al., 1981; Emerson et al., 1996) e macaco-esquilo (*Saimiri sciureus*) (Prevot et al., 1992). A infecção experimental em primatas não-humanos assemelha-se com a de humanos, entretanto, frequentemente é subclínica e moderada (Pinto et al., 2002). Após a infecção desses animais, o vírus ou o antígeno viral pode ser detectado nos

hepatócitos, depois no soro, bile e fezes. Estes eventos precedem a lesão hepática, que aparece concomitantemente com a soroconversão (Vital et al., 1998a).

Algumas espécies de primatas suscetíveis à infecção natural pelo HAV, como *Macaca fascicularis* e *Macaca arctoides*, não desenvolvem a doença quando inoculados com cepas humanas de HAV (Andzhaparidze et al., 1987; Balayan, 1992). No entanto, Shevtsova e colaboradores (1988) demonstraram a transmissão em cinomolgus (*Macaca fascicularis*) inoculados com cepas isoladas de humanos, porém, com resultados inconclusivos a respeito desta espécie como modelo animal para o estudo da hepatite A. Alguns estudos sugerem que certas espécies de primatas selecionam variantes virais espécie-específicas, já que cepas símias isoladas de macaco verde causam hepatite grave em *Macaca fascicularis*, mas não em *P. troglodytes* (Emerson et al., 1996) e, após 20 passagens em marmotas, a cepa símia se torna mais virulenta em marmotas e atenuada em chimpanzés (Bradley et al., 1984).

1.7 Epidemiologia

A infecção pelo HAV ocorre em todo o mundo, representando a causa mais comum de hepatite viral aguda (CDC, 2006). Anualmente, são reportados cerca de 1,5 milhões de casos novos (CDC, 2006), um número na verdade muito abaixo da real incidência da infecção em virtude da subnotificação e dos casos assintomáticos. A via de transmissão fecal-oral por contato pessoa a pessoa é a forma mais comum de infecção, principalmente em instituições fechadas como creches e escolas, nas quais a aglomeração aliada às condições inadequadas de higiene e à alta proporção de indivíduos suscetíveis à doença são fatores que facilitam a transmissão da doença. Isto ocorre, principalmente entre crianças, que portanto constituem uma importante fonte de disseminação da doença para a comunidade (de Paula et al., 2002; Villar et al., 2002, 2004; Morais et al., 2006). A transmissão do HAV através do sangue é rara, porém pode ser uma causa potencial de hepatite pós-transfusional (Solodovnikov et al., 2003; Cástková e Benes, 2009). O risco de transmissão parenteral é maior entre usuários de drogas injetáveis (Diel et al., 2001) e, de acordo com o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), a incidência de hepatite A vem aumentando neste grupo (Cástková e Benes, 2009).

Os padrões de infecção do HAV variam em relação ao nível de desenvolvimento sócio-econômico (Jacobsen e Koopman, 2004) (figura 1.6). Em áreas de alta endemicidade, o HAV é transmitido primariamente pelo contato pessoa a pessoa. Embora 90% das crianças tenham contato com o vírus antes dos 10 anos de idade, nestas áreas a hepatite A não representa um problema clínico e os surtos são eventos incomuns. Este padrão epidemiológico é típico da África e Oriente médio, assim como em vários países da América Latina e Ásia.

Em áreas de moderada endemicidade a incidência da infecção é alta e a infecção ocorre mais freqüentemente na adolescência e em adultos jovens. Surtos são comuns em algumas destas áreas e a transmissão ocorre por contato pessoa-pessoa ou através de água ou alimentos contaminados. Este padrão de transmissão tem ocorrido em regiões previamente endêmicas da América Latina, Ásia e Oriente médio, cuja taxa de soroprevalência vem declinando nos últimos 10 anos (Tanaka, 2000; Kang et al., 2004).

Em países desenvolvidos, a endemicidade do HAV é baixa e as taxas de infecção são mais altas em adultos jovens (Pham et al., 2005). O vírus é transmitido principalmente através do consumo de água ou alimentos contaminados, embora alguns casos de transmissão pessoa-pessoa sejam descritos. Nestas áreas, surtos também são comuns. Finalmente, em áreas de endemicidade muito baixa, casos de infecção são esporádicos e ocorre tipicamente em adultos. Os indivíduos são geralmente contaminados em viagens para áreas endêmicas. Este padrão pode ser visto na Escandinávia, que é o país com uma das menores taxas de prevalência da hepatite A no mundo (CDC, 1999).

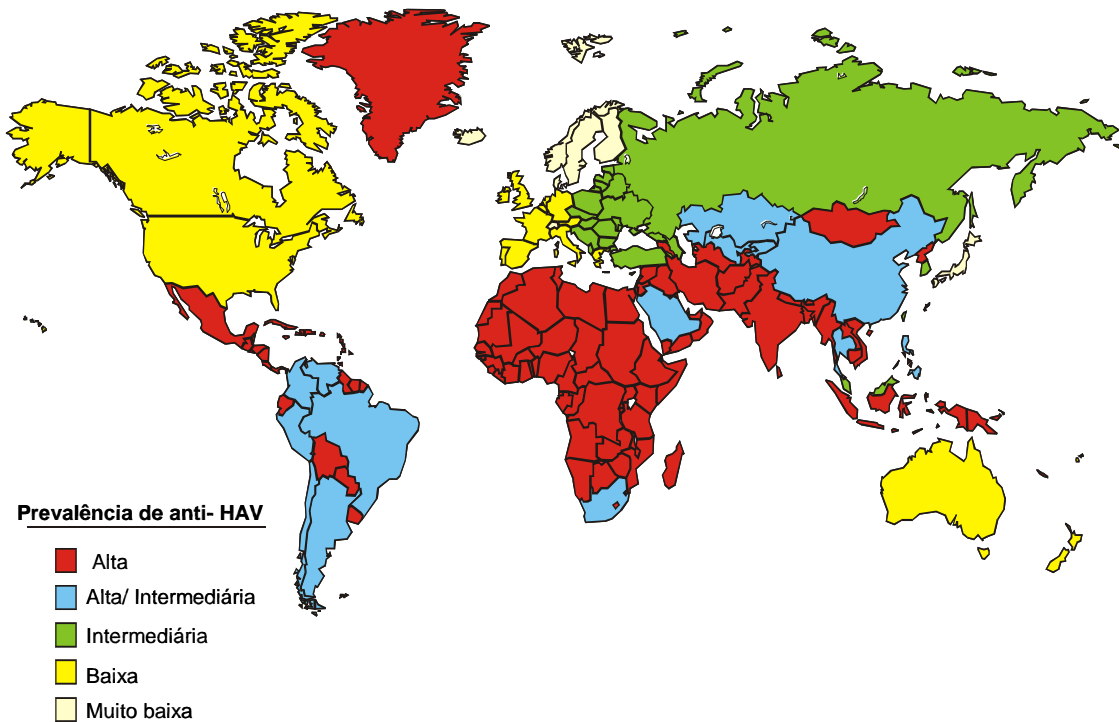


Figura 1.6. Distribuição geográfica da infecção pelo HAV (fonte: CDC, 2006).

A infecção pelo HAV é fortemente associada à pobreza e saneamento inadequado. Nas últimas décadas, em muitos países, como os da América Latina e do sudeste Asiático vem ocorrendo melhorias nas condições socioeconômicas. Como consequência, tem sido observado um significativo declínio da prevalência da infecção pelo HAV em indivíduos jovens (Tapia-Conyer et al., 1999; Manfredi et al., 2005; Fitzsimons et al., 2010). No passado, estas áreas eram consideradas de alta endemicidade para infecção pelo HAV, nas quais a maior parte da população se infectava ainda na infância. No entanto, diversos estudos na América Latina, têm demonstrado uma mudança no padrão de endemicidade de alta para moderada (Tapia-Conyer et al., 1999; Clemens et al., 2000; Tanaka, 2000, Vitral et al., 2008).

Estudos recentes demonstraram que o Brasil apresenta diferentes padrões de endemicidade, sendo que a exposição ao HAV na infância é maior nas Regiões Norte e Nordeste quando comparadas as Regiões Sul e Sudeste (Clemens et al., 2000; Carrilho et al., 2005). Estudos conduzidos na Região Amazônica e no Nordeste do Brasil, incluindo indivíduos com idades entre 1 e 83 anos, demonstraram altas taxas de prevalência de hepatite A nessas regiões (95% e 77%, respectivamente) (Clemens et al., 2000). Entretanto, estudos recentes conduzidos

em Lábrea (Região Amazônica brasileira), em todas as capitais do nordeste e no centro-oeste brasileiro, incluindo apenas crianças menores de 10 anos, demonstraram uma prevalência de hepatite A de 60% (Braga et al., 2009), 42 e 34%, respectivamente (de Alencar Ximenes et al., 2008). Esses dados indicam uma provável mudança para um padrão de endemicidade moderada, apesar das precárias condições sanitárias ainda observadas nessas regiões.

Estudos soroepidemiológicos em crianças menores de 10 anos de idade demonstraram prevalência de hepatite A de cerca de 60% na Região Sudeste (Rio de Janeiro) (Almeida et al., 2001) e de 42% na Região Sul (Porto Alegre) (Clemens et al., 2000). Mudanças no perfil epidemiológico da infecção pelo HAV no Brasil foram observadas de forma mais acentuada nos grandes centros urbanos da região sudeste. Segundo Vitral e colaboradores (1998b), durante um período de 17 anos (1978-1995) a prevalência de hepatite A no Estado do Rio de Janeiro reduziu de 98,1 para 7,8% em crianças abaixo de cinco anos. 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 (Wheeler et al., 2005; Vitral et al., 2006). A alta eliminação de vírus nas fezes de pessoas infectadas facilita sua disseminação e contribui para difusão de surtos de hepatite A, principalmente através do contato domiciliar com uma pessoa infectada. Como os sintomas clínicos são pouco comuns em crianças, o aparecimento da doença entre seus contactantes adultos é que muitas vezes chama a atenção para o problema em creches e nas Unidades de Terapia Intensiva neonatal.

Em contraste com a disseminação pessoa a pessoa, epidemias súbitas e explosivas de hepatite A em comunidades ou populações confinadas geralmente resultam da contaminação viral de uma única fonte, como água potável e alimentos que são ingeridos crus, como ostra, marisco e mexilhão (Villar et al., 2004; Vale et al., 2005; Chancellor et al., 2006; Yoon *et al.*, 2008; Waterman et al., 2009). No município do Rio de Janeiro, de acordo com o Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) (Silva et al., 2007), entre 1999 e 2001, foram registrados e confirmados 1.553 casos de hepatite A. A análise da distribuição dos casos de hepatite A durante esse período mostrou um pequeno deslocamento da ocorrência da doença para faixas etárias mais elevadas, com pico de incidência acumulada entre os 6 e 10 anos (41,7 casos por 100 mil habitantes). Segundo dados da

Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, cerca de 50% da população até dez anos apresentaram soropositividade para anti-HAV. Ainda segundo estudos de Villar et al. (2002), 75% dos indivíduos até 18 anos já haviam se tornado soropositivos, indicando claramente que a circulação do vírus continua a ocorrer em ambientes freqüentados por pessoas de faixas etárias mais elevadas. Do total de casos notificados e confirmados, cerca de 25% estavam envolvidos em surtos, tendo grande parte ocorrido em creches e orfanatos; conseqüentemente, o maior percentual de casos envolvidos em surtos ocorreu até a idade de cinco anos.

1.8 Variabilidade genética e distribuição dos genótipos do HAV

Os estudos de variabilidade genética do HAV, em geral, são baseados em regiões parciais do genoma, como a região VP3 C-terminal (Jansen et al., 1990), VP1 N-terminal (Robertson et al., 1991) ou a região de junção VP1/2A (Jansen et al., 1990; Robertson et al., 1992).

Os genótipos do HAV foram caracterizados pela primeira vez por Jansen e colaboradores, em 1990, utilizando-se a região de junção entre a porção C-terminal da proteína VP1 e a N-terminal da proteína 2A (região VP1/2A) para comparar as seqüências analisadas, segundo os mesmos critérios desenvolvidos por Rico-Hesse e colaboradores (1987) para analisar isolados de poliovírus. Essa região genômica despertou interesse porque entre outros picornavírus, como o poliovírus, inclui seqüências características de sorotipos. Além disso, a região VP1 codifica a maior proteína do capsídeo e possui sítios de ligação para anticorpos neutralizantes (Hogle et al., 1985). Neste estudo, foi encontrada uma variabilidade genética superior a 20%, entre as 247 bases analisadas do genoma. Assim, as cepas do HAV foram inicialmente classificadas em 4 genótipos: I, II, III e IV.

Utilizando-se da mesma abordagem descrita por Jansen e colaboradores (1990), Robertson e colaboradores, em 1992, compararam seqüências de 152 isolados do HAV de diferentes partes do mundo. Neste estudo, foram analisados 168 nucleotídeos da região VP1/2A, resultando na caracterização de sete genótipos do HAV (I-VII). Um genótipo foi definido como um grupo de vírus com mais de 85% de identidade na seqüência nucleotídica (Robertson et al., 1992). Os genótipos I e III foram subdivididos em dois grupos distintos (subgenótipos A e B), que diferem em até 7,5% na seqüência nucleotídica. Isolados de três genótipos (I, II e VII)

agrupavam somente cepas de HAV humanas. O genótipo III incluía cepas de HAV humanas e uma cepa (PA 21) isolada de macaco-coruja (*Aotus sp*) (Brown et al., 1989). Enquanto que isolados designados como genótipos IV, V e VI continham apenas cepas símias (Nainan et al., 1991; Robertson et al., 1992). Este importante estudo influenciou os estudos de variabilidade genética do HAV. No entanto, Costa-Mattioli e colaboradores, em 2002, demonstraram que este método não diferenciava variantes antigênicas. Alternativamente, foi proposta a utilização da região VP1 completa (900 nucleotídeos) para a construção da árvore filogenética ao invés do pequeno fragmento de 168 nucleotídeos utilizado anteriormente (Costa-Mattioli et al., 2002b). A análise filogenética da região VP1 completa de 86 cepas de HAV isoladas de várias partes do mundo sugeriu a existência de apenas seis grupos geneticamente distintos (Costa-Mattioli et al., 2002b). Baseado neste estudo uma nova classificação dos genótipos do HAV foi proposta, sugerindo que os genótipos II e VII definidos anteriormente seriam apenas um ou dois subgenótipos do mesmo tipo (Costa-Mattioli et al., 2003). Em 2004, Lu e colaboradores determinaram a sequência genômica completa do único isolado representante do genótipo II (CF53). Dados deste estudo indicaram que os genótipos II e VII deveriam ser considerados um único genótipo e baseando-se na análise da sequência completa de VP1, a cepa CF53 (anteriormente classificada como genótipo II) seria classificada como genótipo IIA e a cepa SLF88 (anteriormente classificada como genótipo VII) como genótipo IIB (figura 1.7), confirmando a existência de apenas seis genótipos do HAV. Até o momento, as diferentes cepas de HAV humano apresentam características em comum, tais como: um único sorotipo e reatividade similar frente aos anticorpos monoclonais contra o HAV, o que favorece a eficácia de uma vacinação em massa, contribuindo para que, no futuro, seja possível a erradicação da doença.

Entretanto, apesar da estabilidade antigênica do HAV, recentes estudos demonstram que tanto *in vivo* quanto *in vitro* existem variantes do HAV geneticamente muito próximas, não-idênticas, conhecidas como quasiespecies (Sanchez et al., 2003). A dinâmica de quasiespecies é caracterizada pela geração contínua de variantes do genoma viral, competição entre eles e seleção dos mutantes mais adaptados para determinados ambientes (Costa-Mattioli et al., 2006). A compreensão dos princípios que moldam a evolução de quasiespecies esta se tornando cada vez mais importante para o acompanhamento da progressão da doença e o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas para controlar a doença (Domingo et al., 2001).

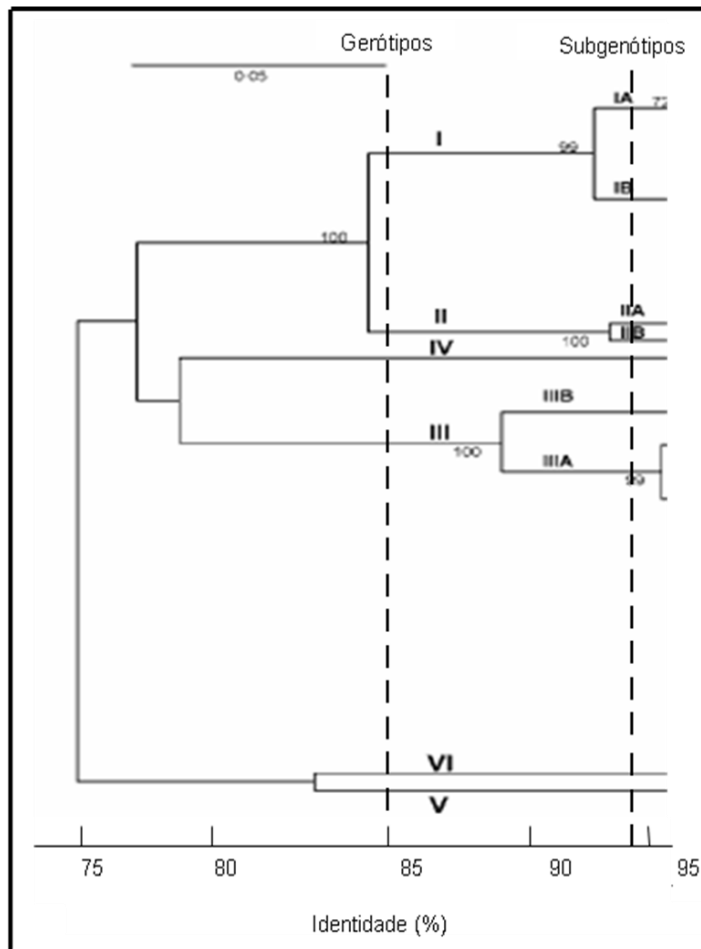


Figura 1.7. Dendrograma demonstrando a relação genética entre os diferentes genótipos das cepas de HAV humanas e símias. Os limites entre os genótipos e subgenótipos estão delimitados por linhas verticais (Lu et al., 2004).

Estudos de epidemiologia molecular demonstraram que o genótipo I é o mais abundante em todo o mundo, particularmente o subgenótipo IA, que inclui cepas encontradas na América do Norte, China, no Japão e Tailândia (Robertson et al., 1992; Costa-Mattioli et al., 2002b; Nainan et al., 2005). Isolados de HAV humano na América Latina foram classificados quase que exclusivamente como genótipo IA, sugerindo que há uma circulação endêmica nesses países (Diaz et al., 2001; Costa-Mattioli et al., 2002b; Mbayed et al., 2002). Entretanto, vários estudos demonstraram a circulação concomitante dos subgenótipos IA e IB no Brasil (de Paula et al., 2002, 2004; Fiaccadori et al., 2006; Villar et al., 2006).

O genótipo IB contém cepas isoladas na Jordânia, África do Norte, Austrália, Europa e do Japão (Robertson et al., 1992). A maioria das cepas restantes foi

classificada como sendo do genótipo III. Cepas desse genótipo foram isoladas em amostras da Índia, do Sri Lanka, Nepal, da Malásia e dos EUA (Heitmann et al., 2005; Hussain et al., 2006; Kulkarni et al., 2009). Na Europa é observado um padrão mais complexo de circulação de genótipos, encontrando-se além do genótipo I, o genótipo III, observado em análises genéticas de amostras ambientais como de ostras associadas a surtos na França, Espanha e Itália provavelmente representando vírus de outras regiões (Robertson et al., 1992; Costa-Mattioli et al., 2001; Pina et al., 2001; Sanchez et al., 2002; Chironna et al., 2003).

1.9 Prevenção e controle

A hepatite A se tornou uma doença imunoprevenível em 1991 com o licenciamento da vacina inativada, pelo *Food and Drug Administration* (FDA), nos EUA. As vacinas atualmente licenciadas são todas inativadas e utilizam diferentes cepas de HAV. As vacinas inativadas são altamente imunogênicas (Werzberger et al., 1992; Innis et al., 1994) e conferem proteção por 20 anos ou mais na maioria dos vacinados (Van Damme et al., 1994; Wiens et al., 1996; Ashur et al., 1999). O esquema de vacinação varia de acordo com o fabricante e consiste em duas doses, sendo a segunda dose administrada entre 6 e 18 meses após a primeira para obtenção de uma imunidade prolongada.

Em 1996, as primeiras recomendações do Comitê consultivo sobre Práticas de Imunização (ACIP) dos EUA para prevenção da hepatite A, focava primariamente a vacinação de crianças a partir de dois anos de idade que residiam em comunidades com alta endemicidade e pessoas com alto risco de adquirir a doença, incluindo viajantes para regiões de alta endemicidade, usuários de drogas ilícitas, homens homossexuais, pacientes portadores de doenças crônicas do fígado e pessoas com risco de infecção ocupacional. Após uma década de implementação da vacina nos EUA, em 2005, a vacina se tornou disponível para crianças a partir de 12 meses de idade, sendo então incorporada ao calendário de vacinação infantil (CDC, 2006). Em 2009, o ACIP estendeu a recomendação da vacinação contra a hepatite A para membros de famílias e pessoas em contato pessoal próximo (ex: babás) de crianças adotadas recém-chegadas de países com alta endemicidade de hepatite A (CDC, 2009).

Em regiões de alta endemicidade a vacinação em larga escala não é recomendada. Entretanto, a Organização Mundial de Saúde recomenda que em países de endemicidade moderada seja considerada a vacinação em larga escala ainda na população infantil. Alguns países considerados de endemicidade intermediária como Israel (Mor et al., 2010), Espanha (Domínguez et al., 2008), Itália (Romanò et al., 2009), e mais recentemente, a Argentina (Vacchino, 2008) também relataram o impacto positivo da vacinação sobre a incidência de hepatite A. No Brasil, ainda não foi adotada uma estratégia de controle da hepatite A através da vacinação ampla da população, mas recomenda-se a aplicação da vacina aos grupos de risco, segundo os critérios do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde (2006), incluindo pessoas com hepatopatias crônicas, suscetíveis à hepatite A; portadores de HBV; crianças menores de 13 anos com AIDS; indivíduos com imunodepressão terapêutica; candidatos a transplante de órgão sólido e profissionais de saúde.

Recentemente a administração de imunoglobulinas (IG) também é recomendada em adição a vacina para profilaxia pré-exposição para viajantes para regiões de alta endemicidade (CDC, 2009). A administração em larga escala de imunoglobulinas como profilaxia na pós-exposição pode diminuir a transmissão da doença, porém não é capaz de controlar surtos (Connor, 2005). Entretanto, vários estudos demonstraram que a vacina contra a hepatite A é eficaz no controle de surtos (Kaic et al., 2001; Bonani et al., 2005). Prikazsky e colaboradores (1994) demonstraram a implementação da vacina em um surto de hepatite A ocorrido em uma escola, onde 404 crianças receberam a vacina e 19 receberam IG. Neste estudo, constatou-se que o número de novos casos de hepatite A foi maior entre os que receberam Ig do que no grupo que recebeu a vacina. O consenso para utilização de vacina contra a hepatite A no controle de surtos é baseado nas evidências de que esta é eficaz na prevenção da doença na pré-exposição (Werzberger et al., 1992) e na pós-exposição (Saggiocca et al., 1999). A alta imunogenicidade da vacina contra a hepatite A, sua habilidade de prevenir novos casos e seu potencial de redução da duração de um surto em uma comunidade, quando administrada a uma grande proporção da população de risco, indicam sua maior eficácia no controle de surtos de hepatite A, quando comparadas à administração de IG (Bonanni et al., 1998, 2005).

Vacinas atenuadas, cuja aplicação seria mais econômica, têm sido avaliadas em vários ensaios clínicos desde 1997 (Mao et al., 1997; Zhuang et al., 2005; Faridi et al., 2009). Em geral, estas vacinas são imunogênicas, seguras em crianças (Bhave et al., 2006) e vêm sendo apontadas como duradoura na prevenção e controle da doença (Faridi et al., 2009). Além disso, vacinas recombinantes têm sido pesquisadas como uma estratégia para o desenvolvimento de uma vacina baseada em peptídeos sintéticos do capsídeo do HAV (VP1 e VP3) (Haro et al., 2003).

1.10 Abordagem diagnóstica

Casos de hepatite aguda são definidos como casos de doença aguda com sintomas discretos e icterícia ou elevação dos níveis de transaminases (CDC, 1998). Em pacientes sintomáticos, são comuns elevações de aminotransferases ALT (Alanina aminotransferase) e AST (Aspartato aminotransferase), fosfatase alcalina e bilirrubina sérica (Tong, 1995). O diagnóstico laboratorial deve incluir hemograma completo, tempo e atividade de protrombina (TAP) e níveis séricos de transaminases.

Tipicamente, a bilirrubina sérica total permanece abaixo de 10 mg/dL, mas podem ser ocasionalmente observados níveis de 20mg/dL (Radha et al., 2009). As concentrações de ALT e AST fornecem uma avaliação quantitativa da lesão hepática durante a infecção aguda. A ALT é primariamente localizada no fígado, limitada ao citosol dos hepatócitos, enquanto que a AST é encontrada na mitocôndria (80%) e no citosol (20%). Esta compartimentalização de enzimas pode, parcialmente, explicar o padrão de aminotransferases observado em muitas formas de doenças hepáticas, já que durante a hepatite aguda “clássica” os níveis de ALT são significativamente maiores que os níveis de AST, resultando em uma alta relação de ALT/AST (>1,4) na maioria dos casos. Entretanto, exceções podem ocorrer em situações nas quais se desenvolve necrose tecidual grave, resultando em uma maior liberação de AST no sangue. A elevação das aminotransferases (transaminases) ocorre já na fase prodrômica, alcançando o limite máximo coincidente com os sintomas clínicos, sendo comuns concentrações acima de 1.000 UI/L. Os melhores indicadores de prognóstico são tempo e atividade de protrombina e os níveis de bilirrubina. Em dois meses, 60% dos pacientes já têm testes bioquímicos normais, chegando a quase 100% em seis meses. Como a albumina é a principal proteína de

secreção produzida pelo fígado e importante para regulação osmótica, sua concentração também é útil para o prognóstico da doença (Radha et al., 2009).

O diagnóstico clínico e bioquímico não permite diferenciar a hepatite A das outras formas de hepatite agudas (Cuthbert et al., 2001), de forma que os testes sorológicos são necessários para a identificação do agente etiológico. O diagnóstico sorológico específico é feito pela pesquisa dos anticorpos anti-HAV da classe IgM, que é o principal marcador de infecção aguda pelo HAV. Geralmente a detecção desses anticorpos é feita por ensaio imunoenzimático (teste competitivo), com vários conjuntos diagnósticos disponíveis no mercado (Poddar et al., 2002). A especificidade da detecção de anticorpos anti-HAV IgM para o diagnóstico da hepatite A é de aproximadamente 99%, a sensibilidade de 100% e o valor preditivo positivo de 88% (Wiedmann et al., 2003). Os títulos de anticorpos anti-HAV IgM geralmente aumentam rapidamente entre 4 e 6 semanas após a infecção e então declinam a níveis indetectáveis dentro de 4 meses, podendo chegar a 6 meses em 5% dos casos. Raramente, persiste por mais de 12 meses. Geralmente, as transaminases séricas normalizam-se antes da negatização de anticorpos anti-HAV IgM.

Anticorpos anti-HAV IgM e IgG podem ser detectados simultaneamente uma ou duas semanas após o início dos sintomas. Os títulos de anticorpos anti-HAV IgG se elevam gradualmente, alcançando altos níveis durante a fase convalescente (Stapleton et al., 1991) e permanece por toda a vida conferindo imunidade contra reinfeção (figura 1.8). A detecção de anticorpos anti-HAV total é usada, primariamente, para determinar o estado imunológico do indivíduo após vacinação ou infecção.

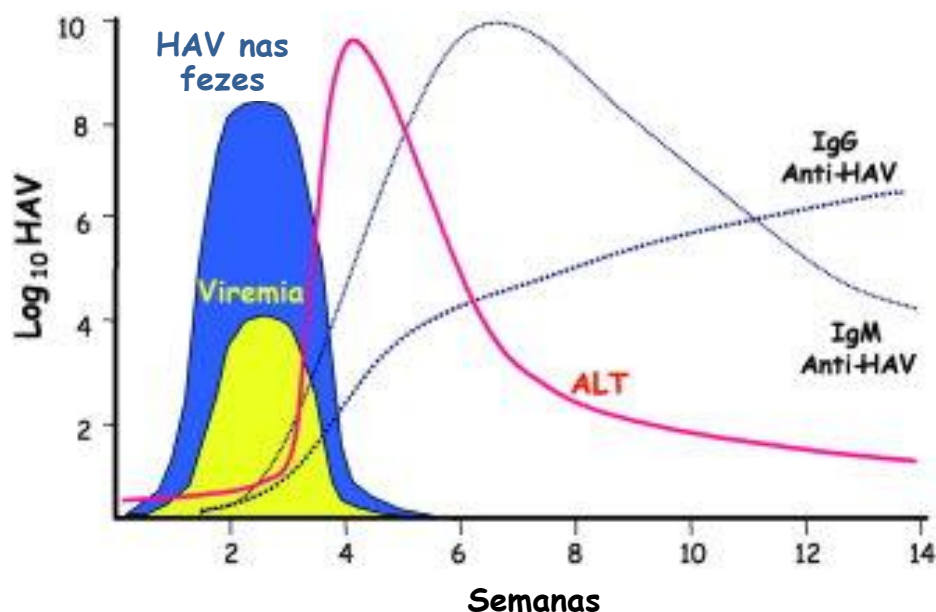


Figure 1.8. Cinética da infecção pelo vírus da hepatite A. A seqüência de eventos inclui o período de viremia (amarelo) e eliminação fecal (azul), seguido de aumento dos níveis de ALT (linha rosa) e aparecimento de anticorpos anti-HAV IgM e IgG (linhas azuis). Fonte: American Association for the Study of Liver Diseases.

Os anticorpos anti-HAV da classe IgA possuem um importante papel na “barreira intestinal” contra agentes infecciosos. Na infecção pelo HAV, estes anticorpos podem ser encontrados nas fezes durante a fase aguda após o pico de transaminases (Locarnini et al., 1980; Yoshizawa et al., 1980), persistindo alguns meses durante a fase de convalescença. No entanto, tais anticorpos não demonstram atividade neutralizante (Stapleton et al., 1987). Além disso, estes anticorpos não são encontrados em todos os pacientes e sua importância na recuperação clínica e na imunidade protetora é desconhecida (Yoshizawa, et al., 1980). Com o uso de radioimunoensaios, Stapleton (1991) demonstrou a presença de anti-HAV IgA em amostras de saliva obtidas de indivíduos 56 dias após o aparecimento de icterícia.

A detecção do antígeno viral (HAVAg) pode ser observada em fezes, soro, cultura celular e em amostras ambientais, geralmente por meio de testes imunoenzimáticos ou moleculares. Técnicas de imunohistoquímica de fluorescência direta ou indireta são em geral usadas para identificação do HAVAg em amostras de fígado, tonsilas, rins e intestino (Cohen et al., 1989; Asher et al., 1995, Pinto et al., 2002).

A amplificação do RNA viral por nested-PCR é, atualmente, o método mais sensível e amplamente usado para detecção do RNA do HAV em diferentes tipos de amostras (soro, plasma, suspensão fecal e amostras ambientais). Estudos demonstram que a detecção do RNA do HAV por PCR tem um importante papel no diagnóstico precoce da infecção, principalmente, no período de janela imunológica durante surtos e em casos agudos de hepatite com etiologia desconhecida (de Paula et al., 2004). Entretanto, o diagnóstico molecular da hepatite A não é empregado em laboratórios de análises clínicas e em bancos de sangue, como já acontece para as infecções pelo HIV e HCV. A PCR em tempo real é uma técnica aplicada mais recentemente para a detecção e quantificação do HAV (Bustin et al., 2005). A rapidez e alta sensibilidade desta técnica permitem uma rápida análise de amostras em larga escala como, por exemplo, em situações de surto. Entre os sistemas de PCR em tempo real mais utilizados, destacam-se o Taqman (Costa-Mattioli et al., 2002a), Syber Green (Morrison et al., 1998; Casas et al., 2007) e *Molecular beacons* (Mackay et al., 2002; Abd El Galil et al., 2004). Atualmente, a técnica de PCR em tempo real está sendo amplamente utilizada para detecção do HAV em diversos tipos de águas ambientais (De Paula et al., 2007; Villar et al., 2007; Rigotto et al., 2009; Silva et al., 2010) e em alimentos como ostras, mexilhões e mariscos (Chironna et al., 2002; Coelho et al., 2003; Pintó et al., 2009; Manso et al., 2010), constituindo uma importante ferramenta para investigação das fontes de contaminação e disseminação do vírus através de águas e alimentos.

A técnica de seqüenciamento de ácidos nucleicos é realizada em produtos de PCR para confirmar a sua especificidade e fornece o meio mais efetivo para identificação e genotipagem do vírus. O seqüenciamento de ácidos nucleicos de regiões selecionadas do genoma do HAV tem sido usado para determinar a relação genética entre os seus isolados (de Paula et al., 2004; Nainan et al., 2005; de Paula et al., 2006; Toyoda et al., 2009; Yoon et al., 2009). A metodologia de seqüenciamento de ácido nucleico originalmente descrita por Sanger e colaboradores (1977), que exigia a marcação independente de cada nucleotídeo e gel de eletroforese convencional, foi substituída por métodos de alto rendimento, incluindo as matrizes capilares para eletroforese, que aumentam a velocidade e precisão do seqüenciamento (Marziali et al., 2001; Randhawa et al., 1999).

Embora convencionalmente o diagnóstico da hepatite A seja realizado em amostras de soro, a coleta de sangue é um procedimento invasivo, doloroso e mais

oneroso, já que requer uma equipe especializada em flebotomia. Além disso, a dificuldade de coletar amostras de sangue, principalmente em crianças e o risco de transmissão de doenças por materiais perfuro-cortantes tornam esse procedimento pouco atraente. Estes problemas são agravados quando a pessoa a ser testada é criança, o que ocorre principalmente em surtos de hepatite A. Estes fatos estimularam o desenvolvimento de métodos ou adaptação de técnicas previamente existentes para detecção de anticorpos específicos na saliva (Parry et al., 1987; Ochnio et al., 1997; Amado et al., 2006) e, com isso, pesquisas envolvendo o uso de amostras de saliva têm se tornado cada vez mais freqüentes (Mackiewicz et al., 2004; Morris-Cunnington et al., 2004; Amado et al., 2006).

1.11 Saliva como meio diagnóstico para infecções virais

As amostras de saliva são consideradas como um fluido obtido na cavidade oral por expectoração, constituído pela mistura de secreção das glândulas salivares submandibulares, sublinguais e parótidas. Enquanto que o fluido oral é um fluido obtido na cavidade oral pela inserção de coletores absorventes, que contém uma mistura de saliva e fluido crevicular gengival. O fluido crevicular gengival consiste em fluido derivado do transporte passivo de componentes do soro, que ganha acesso a cavidade oral pelo sulco gengival (sulco entre a gengiva e o dente). É constituído por uma mistura de vários componentes, que refletem os constituintes da circulação plasmática, como as imunoglobulinas e outras proteínas plasmáticas (Malamud, 1993).

O interesse em utilizar a saliva para diagnóstico de infecções virais surgiu na década de 80, com a descoberta do agente etiológico da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e os conhecimentos a respeito da transmissão do HIV através de sangue e objetos perfuro-cortantes. O potencial benefício de um método não-invasivo como meio diagnóstico e de vigilância da doença estimulou muitos pesquisadores a desenvolverem testes simples e rápidos, minimizando os riscos de transmissão da doença, utilizando amostras de saliva. Estudos de detecção de anticorpos anti-HTLV IgA (1986) e anti-HIV (1987) em saliva de pacientes com AIDS foram iniciados por Archibald e colaboradores, utilizando a técnica de radioimunoprecipitação. Em 1987, Parry e colaboradores demonstraram que anticorpos anti-HIV IgG eram marcadores salivares mais confiáveis para investigar a

infecção pelo HIV, comparando-se aos anticorpos anti-HIV IgA, e que esta classe de imunoglobulinas podia ser detectada de forma mais simples pela técnica de imunocaptura classe-específica.

Utilizando a mesma técnica, Parry e colaboradores (1987) descreveram pela primeira vez a detecção de anticorpos IgG contra as hepatites A e B (anti-HBc) em amostra de saliva total (fluido obtido da cavidade oral por expectoração), demonstrando em seus resultados preliminares uma acurácia similar a dos testes em soro. Alguns anos depois, foi demonstrado que infecções recentes de hepatite A e B podiam ser diagnosticadas através da detecção de anticorpos IgM específicos na saliva (Parry et al., 1989). Estes resultados sugeriram que este método poderia ser aplicado para facilitar a investigação de grandes surtos de hepatite em escolas e comunidades. A partir desses dados, alguns estudos foram realizados para investigação de surtos de hepatite em comunidades (Bull et al., 1989; Warburton et al., 1991; Stuart et al., 1992).

Um importante avanço na utilização de saliva para o diagnóstico das hepatites virais foi o desenvolvimento de um novo sistema para coleta de fluido oral e a adaptação de testes sorológicos comercialmente disponíveis para testar amostras orais (Thieme et al., 1992). O novo sistema de coleta baseava-se em um algodão absorvente preso a uma haste. O algodão era saturado com uma solução de cloreto de sódio (3.5% cloreto de sódio, 0.3% ácido cítrico, 0.1% sorbato de potássio, 0.1% benzoato de sódio, pH 7.2). A técnica de coleta consistia em introduzir o absorvente na cavidade oral entre a gengiva inferior e a bochecha por dois minutos. Após a coleta, o absorvente era colocado em um tubo contendo 1mL de solução bacteriostática e, em seguida, a amostra era retirada do algodão por centrifugação. Este sistema de coleta foi, posteriormente, designado como *OraSure Collection Device* (figura 1.9). Neste estudo, a detecção de anticorpos anti-HAV IgM e total em fluido oral (OraSure), através de testes imunoenzimáticos comerciais, demonstrou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98%, comparando com amostras de soro. Para a detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e anti-HCV o teste apresentou sensibilidades e especificidades de 100%.



Figura 1.9: Coletor de saliva OraSure® (Epitope Incorporated, Beaverton, Oregon (www.orasure.com)).

Muitos estudos anteriores sobre o desenvolvimento de testes para detecção de anticorpos virais na saliva utilizavam a saliva total expectorada sem estímulo (Parry et al., 1987; Johnson et al., 1988; Parry et al., 1988). Entretanto, a crescente preocupação na obtenção do espécime correto, associado ao fato da coleta ser desagradável, à frequência de amostras recebidas com volume insuficiente, possibilidade de contaminação da parte externa do recipiente usado para a coleta e dificuldade de pipetar amostras não tratadas de saliva levaram ao desenvolvimento e adoção de coletores apropriados para a coleta de saliva. Atualmente, existem diferentes sistemas de coleta de fluido oral disponíveis comercialmente (figura 1.10).

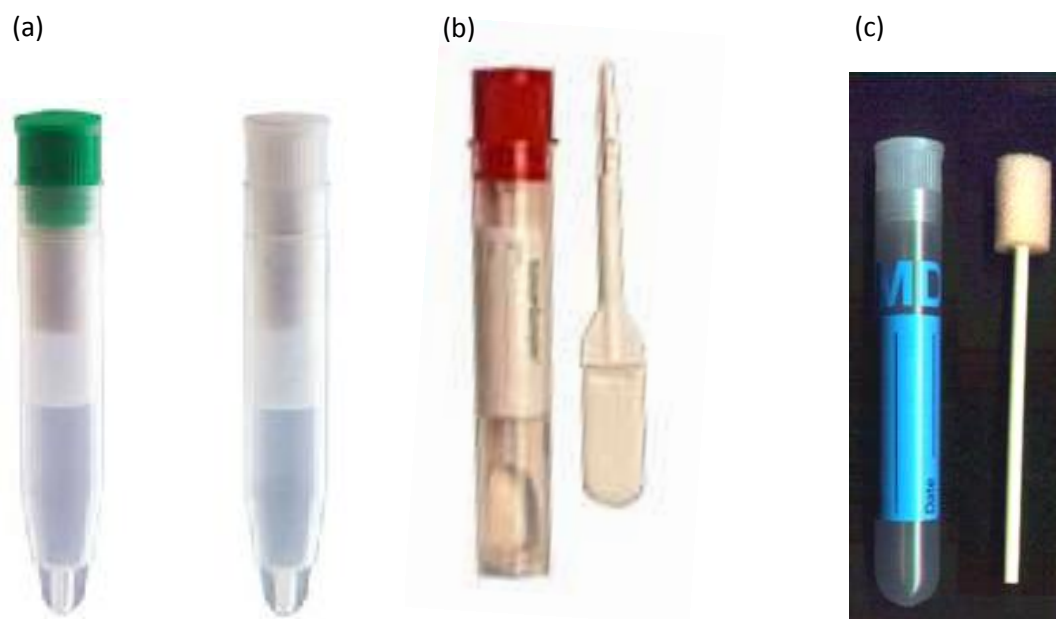


Figura 1.10: Dispositivos utilizados para coleta de fluido oral para detecção de anticorpos contra vírus. (a) Salivette™ (Sarsdet, Leicester, Alemanha), (b) Omnisal™ (Saliva Diagnostic Systems Incorporated, Beaverton, Oregon, EUA), (c) Oracol™ (Malvern Medical Developments Ltd, Worcester, Inglaterra).

1.11.1 Anticorpos na saliva

A saliva, além de ser composta por uma complexa mistura de secreções provenientes das glândulas salivares (parótidas, submandibulares e sublinguais), pode conter fluido gengivo-crevicular, sangue, leucócitos, células epiteliais, bactérias, placas dentárias, vírus e detritos alimentares, não sendo estéril e contém muitas enzimas degradantes. O transporte de moléculas do sangue para a saliva ocorre através da via transcelular, por difusão passiva ou transporte ativo, e pela via paracelular, por ultrafiltração, através das junções intercelulares (Haeckel., 1996) (figura 1.11).

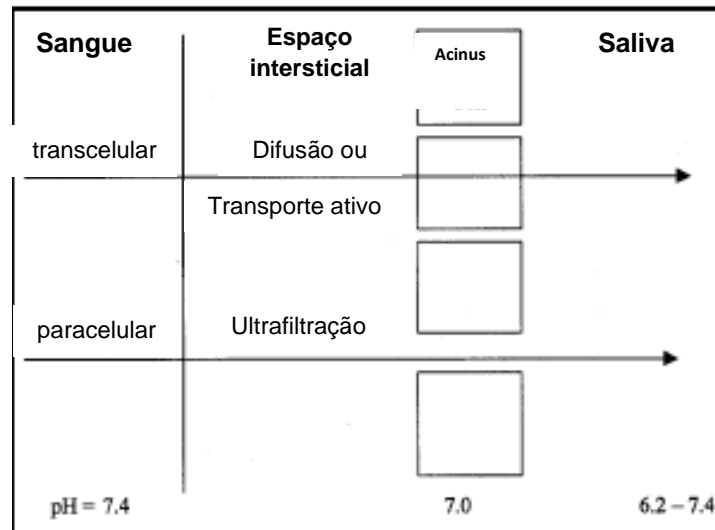


Figura 1.11: Transporte de substâncias do sangue para a saliva. Fonte: Haeckel et al., 1996.

As imunoglobulinas têm acesso a cavidade oral através da secreção das glândulas salivares e por transudação a partir de capilares sanguíneos localizados sob o material gengivo-crevicular. Embora a maior parte da imunoglobulina IgA seja derivada de ambas as fontes, grande parte do conteúdo de IgG e IgM é proveniente do fluido gengivo-crevicular. No entanto, anticorpos anti-HAV são detectáveis em indivíduos sem dentes e, portanto, com pouco ou sem fluido gengivo-crevicular (Bagg et al., 1991). Devido as imunoglobulinas IgG e IgM anti-HAV na saliva serem derivadas de transudado, para fins diagnóstico, estas são consideradas como uma diluição do plasma e, portanto, a saliva contém concentrações de anticorpos anti-HAV muito menores que o plasma sanguíneo (Parry et al., 1989) (tabela 1.1).

Tabela 1.1: Concentrações de imunoglobulinas (mg/L) no plasma e em diferentes componentes da saliva.

Espécime	IgG	IgM	IgA
Plasma	14730	1280	2860
Saliva parótida	0.36	0.43	39.5
Fluido crevicular	3500	250	1110
Saliva total	14.4	2.1	194

Fonte: Roit e Lehner, 1983

1.11.2 Por que utilizar a saliva?

Por ser facilmente acessível para coleta, a saliva demonstra muitas vantagens sobre amostras biológicas “clássicas”, como o sangue e as fezes (quadro 1.1).

Quadro 1.1. Vantagens potenciais da saliva como meio diagnóstico para as hepatites virais em relação ao sangue.

Menos dolorosa e estressante que a coleta de sangue
Melhor para crianças e idosos Útil para pacientes com acesso às veias comprometido devido ao uso de drogas
Segura
Elimina os riscos de acidentes pérfuro-cortantes
Melhor aceitação do paciente
Particularmente em crianças e idosos Pacientes não sintomáticos
Maior conveniência
Facilita estudos de grandes populações Pode ser usado em lugares onde a coleta de sangue é inconveniente, como em escolas, creches e prisões.
Melhor custo-eficiência
Os próprios pacientes podem coletar as amostras com coletor apropriado Não é necessária equipe especializada em flebotomia

A coleta de saliva como uma alternativa à coleta de sangue oferece potenciais vantagens para investigação de surtos e estudos epidemiológicos de hepatite A, pois permite uma investigação “não-invasiva” de todos os indivíduos, principalmente crianças; identifica casos subclínicos, que ocorrem com freqüência em crianças; e facilita o rastreamento de indivíduos candidatos a vacinação. Uma revisão na literatura científica disponível nas bases de dados PubMed, Medline, LILACS e Scielo demonstrou que diversos estudos foram realizados utilizando-se a saliva para detecção de anticorpos específicos contra a hepatite A, em geral com resultados promissores (tabela 1.2).

Tabela 1.2: Revisão bibliográfica sobre estudos utilizando saliva ou fluido oral como meio diagnóstico para hepatite A, identificados em bases de dados nacionais e internacionais (LILACS, Scielo, Medline e PubMed).

Autor	Ano	População de estudo	Local	Objetivo	Anticorpos detectados	Técnica*
Parry et al.	1987	Geral	Londres	Padronização	IgG, IgM	RIA
Parry et al.	1988	Viajantes	Londres	Prevalência	IgG	RIA
Parry et al.	1989	Geral	Londres	Padronização	IgG	RIA
Parry et al.	1989	Hepatite aguda	Inglaterra	Diagnóstico	IgG, IgM	RIA
Thieme et al.	1992	Geral	EUA	Padronização	IgM	ELISA
Stuart et al.	1992	Crianças	Londres	Surto	IgG, IgM	ELISA
Parry et al.	1993	Geral	Londres	Surto	IgG, IgM	RIA
Hurni et al.	1993	Geral	EUA	Padronização	IgG	ELISA
Piacentini et al.	1993	Geral	EUA	Padronização	IgG, IgM	ELISA
Más Lago et al.	1994	Hepatite aguda	Espanha	Padronização	IgA	ELISA
Jacobson et al.	1995	Crianças	Londres	Surto	IgG, IgM	RIA
Laufer et al.	1995	Vacinados	EUA	Padronização	IgG	ELISA
Ochnio et al.	1997	Voluntários	Canadá	Padronização	IgG	ELISA
O' Farrel et al.	1997	Geral	Irlanda	Padronização	IgG	ELISA
Ochnio et al.	1997	Crianças	Canadá	Prevalência	IgG	ELISA
Asratian et al.	1997	Hepatite aguda	Rússia	Diagnóstico	IgG, IgM	ELISA
Trout et al.	2000	Trabalhadores	EUA	Prevalência	IgG	ELISA
Aszkenasy et al.	2000	Religiosos	Índia	Surto	IgG, IgM	ELISA
Oba et al.	2000	Geral	Brasil	Diagnóstico	IgG, IgM, IgA	ELISA
Omar et al.	2000	Crianças	Alexandria	Prevalência	IgG	ELISA
Ochnio et al.	2001	Usuários drogas	Canadá	Prevalência	IgG	ELISA
Marks et al.	2001	Crianças	Londres	Surto	IgM	ELISA
Skidmore et al.	2001	Prisioneiros	Londres	Surto	IgG, IgM	ELISA
Madar et al.	2002	Geral	Eslováquia	Prevalência	IgG	ELISA
Morris-Cunningtom et al.	2004	Geral	Inglaterra	Prevalência	IgG	ELISA
Morris-Cunningtom et al.	2004	Adolescentes	Inglaterra	Prevalência	IgG	ELISA
Duval et al.	2005	Crianças	Canadá	Prevalência	IgG	ELISA
Amado et al.	2006	Voluntários	Brasil	Diagnóstico	IgM, IgG	ELISA
Ochnio et al.	2007	Voluntários	Canadá	Prevalência	IgG	ELISA
Quoilin et al.	2007	Geral	Bélgica	Prevalência	IgG	ELISA
Sayer et al.	2007	Deficientes	Irlanda	Prevalência	IgG	ELISA

*RIA: Radioimunoensaio; ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Atualmente, a saliva tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de uma grande variedade de doenças virais (Pink et al., 2009), tais como: hepatite B e C (Quoilin et al., 2007), sarampo (Goyal et al., 2009), cachumba, rubéola (Vainio et al., 2008), HIV (Stevens et al., 2009), Epstein-Barr, parvovirus B19, herpesvirus 6 humano (Madar et al., 2002), Ebola (Formenty et al., 2006) e Torque Teno vírus (Naganuma et al., 2008).

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Durante as últimas décadas, as mudanças ocorridas devido as melhorias no saneamento básico, principalmente nos grandes centros urbanos, mudaram o perfil epidemiológico da hepatite A no Brasil e levaram a uma menor exposição ao HAV durante a infância. Com isso, o número de crianças suscetíveis a doença se torna cada vez maior, facilitando a ocorrência de surtos de hepatite A, principalmente em creches e escolas (Vital et al., 2006).

Na década de 90, a equipe do nosso Laboratório participou do esclarecimento da etiologia de vários surtos epidêmicos de hepatite A e, com isso, tivemos a oportunidade de estudar a forma de disseminação do HAV em diferentes creches e em escolas do Rio de Janeiro, onde a maioria da população estudada era criança. Nestes estudos, foi possível constatar a dificuldade de coleta e manejo de amostras de sangue, principalmente em crianças. De acordo com os relatos promissores na literatura, a análise da saliva poderia ser uma ferramenta prática e segura para o diagnóstico da hepatite A, já que para facilitar a detecção, investigação e o acompanhamento de surtos de hepatite A seria extremamente útil a utilização de um fluido cuja coleta fosse mais fácil e menos invasiva que o sangue.

Em 2004, a equipe do nosso Laboratório realizou estudos de detecção de anticorpos específicos contra as hepatites virais A, B e C em amostras de saliva, utilizando testes imunoenzimáticos comerciais, a fim de avaliar a possibilidade de utilização desta amostra para diagnóstico e estudos epidemiológicos. A determinação dos padrões de qualidade dos testes imunoenzimáticos, quando comparados com amostras de soro, demonstraram uma excelente concordância entre os resultados das amostras de saliva e soro na detecção de anticorpos específicos contra hepatite A, indicando a possibilidade de substituição de amostras de soro por amostras de saliva para o diagnóstico de infecção aguda assim como para estudos de prevalência de hepatite A (Amado et al., 2006).

Entretanto, sabe-se que durante surtos epidêmicos muitos pacientes se encontram no período de janela imunológica, na qual não é possível realizar o diagnóstico através da detecção de anticorpos. Portanto, a pesquisa do RNA do HAV em amostras de saliva permitiria a detecção precoce do HAV não apenas nos surtos, mas também em casos de pacientes com hepatite aguda sem marcadores sorológicos para as hepatites virais. Além disso, tendo em vista que a epidemiologia molecular se tornou importante na caracterização do HAV e investigações de surtos

e casos esporádicos de hepatite A, a realização destes estudos utilizando-se espécimes clínicos, como a saliva, poderia facilitar e contribuir para a ampla compreensão das formas de transmissão, fontes de contaminação e padrão de circulação do vírus durante surtos. A investigação dos isolados de HAV é importante visto que informações sobre a variabilidade genética do vírus podem relacionar casos esporádicos ou surtos aparentemente distintos.

Embora a detecção do HAV em amostras de saliva de casos esporádicos de hepatite A tenha sido descrita por Mackiewicz e colaboradores (2004), não existem relatos da detecção do HAV durante surtos epidêmicos. Estudos de infecção experimental demonstraram a presença do antígeno viral em saliva e tonsilas (Karayiannis et al., 1986, Cohen et al., 1989; Pinto et al., 2002), entretanto, ainda não existem dados epidemiológicos suficientes indicando que a saliva seja uma importante fonte de transmissão do HAV. Embora o sítio de replicação do HAV seja o hepatócito, o fator que determina este tropismo ainda não foi elucidado. A detecção do vírus nas tonsilas e na saliva, logo após o aparecimento do vírus no sangue, sugere que eventos replicativos precoces podem ocorrer na orofaringe e nas glândulas salivares (Cohen et al., 1989).

A partir desses resultados, constatamos a necessidade de estudos mais detalhados sobre a possibilidade de detecção do HAV na saliva e sua aplicação em estudos de epidemiologia molecular durante surtos epidêmicos. Além disso, esses relatos reforçam a necessidade de se investigar alguns aspectos da patogênese do HAV. Desta forma, visamos avaliar os mecanismos responsáveis pela presença do HAV na saliva a aspectos histológicos, bioquímicos, sorológicos e moleculares, assim como investigar alguns fatores que podem contribuir para a infectividade deste fluido, tais como: a presença de partículas virais, o título viral, a presença do antígeno viral em células-alvo na área de exposição e a presença do replicativo intermediário em tecidos da cavidade oral.

3- OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar a saliva como espécime clínico para o diagnóstico da hepatite A, estudos de epidemiologia molecular e patogênese do HAV.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Otimizar métodos moleculares de nested-PCR e PCR em tempo real para a detecção e quantificação do HAV em amostras de saliva, comparando-as às amostras pareadas de soro;
2. Avaliar a saliva como espécime clínico para detecção e caracterização molecular do HAV em indivíduos expostos a um surto de hepatite A;
3. Determinar as seqüências nucleotídicas de HAV provenientes de amostras de soro e de saliva, para identificar os genótipos do HAV e relacioná-los entre si e com outras cepas isoladas do Rio de Janeiro;
4. Investigar as fontes de transmissão do HAV durante um surto epidêmico de hepatite A.
5. Acompanhar o curso da infecção pelo HAV, através da detecção do antígeno viral, HAV-RNA e do replicativo intermediário, em primatas não-humanos (*Macaca fascicularis*) infectados experimentalmente com HAV;
6. Estabelecer métodos moleculares para detecção e quantificação do replicativo intermediário do HAV (RNA de fita negativa) para monitorar a replicação do HAV *in vitro* e *in vivo*;
7. Investigar a presença de sítios extrahepáticos de replicação do HAV na cavidade oral (glândulas salivares) de primatas não-humanos (*Macaca fascicularis*) infectados experimentalmente com HAV.

4- METODOLOGIAS E RESULTADOS:

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

- 4.1. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. **Amado LA**, Villar LM, de Paula VS, Gaspar AM. J Virol Methods, 2008; 148: 74-80.
- 4.2. Mixed infection of hepatitis a virus subgenotypes in children exposed of an outbreak using paired serum and saliva specimens. **Luciane Almeida Amado**, Livia Melo Villar, Vanessa Salete de Paula, Marcelo Alves Pinto and Ana Maria Coimbra Gaspar. J Med Virol. *Submetido*.
- 4.3. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication. **Luciane A. Amado**, Renato S. Marchevsky, Vanessa S. de Paula, Cleber Hooper, Marcos da S. Freire§, Ana Maria C. Gaspar and Marcelo A. Pinto. Int. J. Exp. Path, 2010; 91: 87–97.
- 4.4. Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR. De Paula VS, Perse AS, **Amado LA**, de Moraes LM, de Lima SM, Tourinho RS, Gaspar AM, Pinto MA. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009; 28: 1167-1176.

4.1. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. **Amado LA**, Villar LM, de Paula VS, Gaspar AM. J Virol Methods, 2008;148: 74-80.



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Virological Methods 148 (2008) 74–80



www.elsevier.com/locate/jviromet

Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA

Luciane A. Amado^{a,*}, Livia M. Villar^b,
Vanessa S. de Paula^a, Ana Maria C. Gaspar^a

^a *Laboratory of Technological Development, Department of Virology, Oswaldo Cruz Institute Foundation (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900, Brazil*

^b *Laboratory of Viral Hepatitis, Department of Virology, Oswaldo Cruz Institute Foundation (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900, Brazil*

Received 24 May 2007; received in revised form 23 October 2007; accepted 26 October 2007

Available online 21 December 2007

Objetivos: Otimizar métodos moleculares para detecção e quantificação do HAV em amostras de saliva de indivíduos expostos a um surto de hepatite A. Avaliar a utilização da saliva como espécime clínico para detecção e caracterização molecular do HAV em indivíduos expostos a um surto de hepatite A;

4.2. Mixed infection of hepatitis a virus subgenotypes in children exposed of an outbreak using paired serum and saliva specimens. **Luciane Almeida Amado**, Livia Melo Villar, Vanessa Salete de Paula, Marcelo Alves Pinto and Ana Maria Coimbra Gaspar. J Med Virol. *Submetido*.

Journal of Medical Virology



Journal of Medical Virology

**MIXED INFECTION OF HEPATITIS A VIRUS SUBGENOTYPES
IN CHILDREN EXPOSED OF AN OUTBREAK USING PAIRED
SERUM AND SALIVA SPECIMENS**

Journal:	Journal of Medical Virology
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Amado, Luciane; Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz Villar, Livia; Instituto Oswaldo Cruz de Paula, Vanessa; Instituto Oswaldo Cruz Pinto, Marcelo; Instituto Oswaldo Cruz Gaspar, Ana Maria; Instituto Oswaldo Cruz
Keywords:	molecular epidemiology, saliva, hepatitis A, outbreak



Objetivo: Avaliar a utilização de amostras de saliva em estudos de epidemiologia molecular do HAV durante um surto epidêmico. Caracterizar os genótipos dos isolados de HAV provenientes de amostras de soro e de saliva dos indivíduos infectados e correlacioná-los entre si e com outras cepas isoladas do Rio de Janeiro.

4.3. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication. **Luciane A. Amado**, Renato S. Marchevsky, Vanessa S. de Paula, Cleber Hooper, Marcos da S. Freire[§], Ana Maria C. Gaspar and Marcelo A. Pinto. *Int. J. Exp. Path.*, 2010; 91: 87–97.

Int. J. Exp. Path. (2010), 91, 87–97
doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00699.x

ORIGINAL ARTICLE

Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication

Luciane A. Amado*, Renato S. Marchevsky[†], Vanessa S. de Paula*, Cleber Hooper[‡], Marcos da S. Freire[§], Ana Maria C. Gaspar* and Marcelo A. Pinto*

*Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, [†]Laboratório de Neurovirulência, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Biomanguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, [‡]Serviço de Controle de Qualidade Animal, CECAL/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil and [§]Laboratório de Tecnologia Viral, Biomanguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Objetivo: Demonstrar a suscetibilidade da espécie *Macaca fascicularis* à infecção experimental pelo vírus da hepatite A (cepa HAF-203). Acompanhar o curso da infecção pelo HAV, através da detecção de marcadores moleculares utilizando amostras de saliva, nos animais infectados experimentalmente. Avaliar a existência de sítios de replicação extrahepáticos do HAV na cavidade oral (glândulas salivares) dos primatas infectados experimentalmente.

4. 4. Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR. De Paula VS, Perse AS, **Amado LA**, de Moraes LM, de Lima SM, Tourinho RS, Gaspar AM, Pinto MA. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009; 28:1167-1176.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis
DOI 10.1007/s10096-009-0759-8

ARTICLE

Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR

V. S. de Paula • A. S. Perse • L. A. Amado •
L. M. de Moraes • S. M. B. de Lima • R. S. Tourinho •
A. M. C. Gaspar • M. A. Pinto

Objetivo: Estabelecer métodos moleculares para detecção e quantificação do replicativo intermediário do HAV (RNA de fita negativa) para monitorar a replicação do HAV *in vitro* e *in vivo*.

5- DISCUSSÃO

Diversos estudos soroepidemiológicos vêm demonstrando uma redução na prevalência de anticorpos anti-HAV na população brasileira. Dados do Ministério da Saúde mostram uma redução no número de casos notificados nesta última década (Ministério da Saúde/SVS-SINAM, 2009). Embora todas as formas de hepatite sejam de notificação compulsória, os casos de hepatite A não são devidamente notificados porque a maioria dos indivíduos infectados é assintomático.

A redução do número de pessoas imunizadas naturalmente durante a infância tem como conseqüência o aumento do risco de ocorrência de surtos, principalmente em creches e escolas. Surtos de hepatite A em comunidades fechadas constituem um importante problema para saúde pública, que requer uma investigação das causas e uma rápida intervenção de controle, já que em geral a infecção entre crianças é assintomática e, portanto há o risco de propagação “silenciosa” através do contato pessoa a pessoa para as comunidades próximas.

Nos últimos anos tivemos a oportunidade de participar de estudos em vários surtos de hepatite A ocorridos no estado do Rio de Janeiro, em comunidades fechadas como escolas e orfanatos, na qual a idade média das populações envolvidas foi de 5 anos (Villar et al., 2002; Santos et al., 2008). Nesses estudos foi constatada a dificuldade de coleta de sangue de crianças e em grandes comunidades envolvidas. A coleta de sangue, por ser invasiva, além de dificultar o acesso à população infantil para realização do diagnóstico, muitas vezes inviabiliza o estudo epidemiológico quando este envolve um número grande de indivíduos. Estes fatos levaram a busca de um método mais fácil e não-invasivo para realizar o diagnóstico da hepatite A. Desde o final da década de 80, muitos estudos vêm demonstrando a utilização de amostras de saliva para o diagnóstico de hepatite A, como um método alternativo para o diagnóstico da doença (Parry et al., 1987,1989; Stuart et al., 1992). Baseando-se nesses resultados promissores previamente relatados, foi realizado em 2006 um estudo de avaliação da detecção de anticorpos específicos contra a hepatite A utilizando amostras de saliva. Neste estudo prévio foi observado um excelente desempenho do teste, indicando que a coleta de saliva poderia ser uma importante ferramenta para o estudo da hepatite A (Amado et al., 2006). Este estudo foi o ponto de partida para iniciarmos uma investigação mais

detalhada sobre diversos aspectos relacionados à utilização desse espécime clínico para o estudo da hepatite A.

O desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos presentes na saliva poderia facilitar a identificação de indivíduos com infecção aguda e os suscetíveis, principalmente durante surtos epidêmicos. Entretanto, durante esses estudos a utilização de técnicas moleculares para detecção do RNA do HAV tem-se mostrado importante para conduzir estudos de epidemiologia molecular, permitindo auxiliar na determinação do padrão de circulação do vírus e possibilitando a detecção precoce do HAV durante períodos de “janela imunológica”.

Em 2007, a fim de avaliar a possibilidade de detecção do RNA do HAV em amostras de saliva, foi conduzido um estudo em um surto de hepatite A ocorrido em uma creche municipal no Rio de Janeiro. Esse estudo teve como objetivo principal otimizar métodos moleculares de RT-nested-PCR e PCR em tempo real para a detecção e quantificação do HAV em amostras de saliva, comparando-as às amostras pareadas de soro (**artigo 1**). A princípio a baixa concentração de RNA viral e a presença de substâncias inibitórias ou de interferência em amostras de saliva poderiam ser os maiores fatores limitantes do estudo. Até então, uma única publicação demonstrava a utilização da técnica de PCR para detecção do HAV em amostras de saliva em poucos casos esporádicos de hepatite A (Mackiewicz et al., 2004). Estudos experimentais em animais demonstravam que a partícula do HAV era eliminado na saliva durante o período de incubação e no início da fase aguda (Asher et al., 1995) e que o RNA do HAV podia ser detectado na saliva de animais inoculados a partir de 6 horas após infecção, permanecendo detectável até algumas semanas após o início dos sintomas (Pinto et al., 2002). Portanto, visávamos inicialmente adequar a técnica de RT-nested-PCR previamente descrita para detecção do HAV-RNA em amostras de soro (de Paula et al., 2002), para as amostras de saliva. Inicialmente foram avaliados três métodos de extração do RNA (Trizol, sílica e kit comercial QIAamp), utilizando diluições seriadas de amostras de saliva controles positivos e negativos de HAV. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o kit comercial QIAamp (Qiagen, Maryland, EUA), que além da rapidez e simplicidade, apresentou maior sensibilidade. Para a reação de PCR, foram testadas diferentes concentrações de reagentes e volumes de amostra, o que resultou em um teste com limite mínimo de detecção de 6×10^3 cópias/mL. Comparando os resultados entre as amostras de saliva com os de amostras de água

RNA/DNAse free inoculadas com vírus, foi verificada a amplificação do genoma viral nas mesmas diluições em ambos os espécimes, demonstrando que não houve resultados falso-negativos causados por inibição ou interferência de componentes presentes na saliva.

A técnica de PCR em tempo real havia sido recentemente desenvolvida em nosso Laboratório para quantificação do HAV em amostras de soro (de Paula et al., 2007). Para avaliar a aplicação desta técnica em amostras de saliva, a princípio foi avaliada a presença de substâncias inibidoras do PCR em tempo real nessas amostras, utilizando controles positivos internos de um DNA alvo exógeno de vírus não-humano. Foi observado que em todas as amostras de saliva-controle negativos, o sinal de fluorescência foi negativo para sequência-alvo do HAV e positivo para o DNA exógeno de vírus não-humano, indicando que a sequência-alvo de HAV não estava presente nestas amostras e que não ocorreu inibição do PCR. A sensibilidade desta técnica foi de 140 cópias/mL, o que representa um limite mínimo de detecção menor que o descrito anteriormente por Mackiewicz e colaboradores (2004), que descreveu uma sensibilidade de 600 cópias/mL. A variabilidade inter e intra-ensaio não foram estatisticamente significativas, o que demonstra a reprodutibilidade desta técnica.

Após estabelecer os protocolos para detecção do HAV RNA, um total de 78 amostras de soro e saliva de pacientes envolvidos no surto de hepatite A, foram testadas inicialmente quanto a presença de anti-HAV IgM e total. Observou-se 52 (67%) casos agudos de hepatite A, anti-HAV IgM positivos no soro, e 26 (34%) indivíduos suscetíveis (anti-HAV total e IgM negativos). Ao comparar os resultados dos ensaios imunoenzimáticos para detecção de anti-HAV IgM entre as amostras de soro e saliva, observou-se uma sensibilidade e especificidade do teste de 96% e 98%, respectivamente (dados não publicados), confirmando a aplicabilidade das amostras de saliva para o diagnóstico da doença. Em ambos os testes analisados, RT-nested-PCR e PCR em tempo real, verificou-se uma maior frequência de detecção do HAV RNA em amostras de saliva de pacientes anti-HAV IgM positivos do que nas amostras pareadas de soro. Este estudo foi o primeiro relato de detecção do HAV RNA em amostras de saliva de pacientes envolvidos em um surto. Em um surto de hepatite A envolvendo 112 crianças na Tailândia o HAV RNA não foi detectado em nenhuma das amostras de saliva testadas (Poovorawan et al., 2005). Entretanto, Mackiewicz e colaboradores (2004) demonstraram a detecção do HAV

RNA em 83% (5/6) das amostras de saliva provenientes de casos esporádicos de hepatite A.

O RNA do HAV quando pesquisado nas crianças com sorologia negativa para hepatite A mostrou que dentre 26 crianças, 12% (3/26) apresentavam o RNA do HAV na saliva, através do RT-PCR e 58% (15/26), através do PCR em tempo real. Em concordância com o descrito por De Paula e colaboradores (2004) utilizando amostras de soro, estes resultados sugerem uma detecção precoce do vírus, durante o período de janela imunológica, quando ainda não há síntese de anticorpos específicos. Estes dados demonstram que a detecção do RNA do HAV por PCR em amostras de saliva além de facilitar o diagnóstico da infecção em crianças, pode também permitir uma avaliação mais precisa da extensão de um surto e conseqüentemente controlar a infecção de forma maior eficiente.

Ao avaliar a correlação entre a detecção do RNA do HAV na saliva e a presença de sangue nestas amostras, nossos resultados, em concordância com estudos prévios envolvendo a detecção do HCV em amostras de saliva (Liou et al., 1992; Hermida et al., 2002), não revelaram nenhuma associação entre a presença de eritrócitos na saliva e a detecção de HAV RNA. Embora em alguns estudos seja sugerida a ocorrência de transferência de partículas virais da circulação sanguínea para saliva através de um gradiente de concentração ou através de contaminação com sangue (Belec et al., 2003), nossos resultados indicam que a presença de sangue em amostra de saliva não é um fator preditivo para a positividade do HAV-RNA, sugerindo, portanto que este não é o mecanismo pelo qual o vírus está presente na saliva.

A quantificação da carga viral das amostras de saliva não revelou diferenças significantes ($p > 0,05$) da carga viral das amostras pareadas de soro, já que a carga viral média detectada no soro e na saliva foi de $2,8 \times 10^3 \pm 6,4$ cópias/mL e $1,7 \times 10^3 \pm 3,2$ cópias/mL, respectivamente. Entretanto, Mackiewicz e cols (2004), utilizando a técnica de PCR em tempo real, observou uma diferença de 2 log entre as amostras de soro e de saliva. Provavelmente esses dados discordantes sejam devido à maior sensibilidade do PCR em tempo real aplicado em nosso estudo. Não se observou relação entre a detecção do HAV RNA na saliva e a carga viral no soro, sugerindo, portanto que a carga viral no soro não é um fator preditivo para detecção do HAV na saliva, ou seja, o nível de viremia não influencia na detecção do HAV em espécimes

de saliva, ao contrário do que tem sido sugerido por outros autores em estudos com o vírus da hepatite C (Fabris et al., 1999; Hermida et al., 2002, Wang et al., 2006).

Ao comparar as duas técnicas de detecção do RNA do HAV utilizadas neste estudo (RT-PCR e PCR em tempo real), observou-se uma maior frequência de detecção do vírus na saliva através do PCR em tempo real (61% vs 37%) ($p < 0,01$). Entre as amostras positivas no PCR em tempo real, 33% eram negativas no RT-PCR. Os resultados deste presente estudo confirmam que o PCR em tempo real se mostrou como o método mais sensível e apropriado para determinar a carga viral do HAV tanto em amostras de soro quanto de saliva.

Neste estudo, os resultados de detecção de anticorpos anti-HAV e HAV-RNA na saliva, demonstraram a viabilidade deste espécime clínico tanto para o diagnóstico como para estudos de epidemiologia molecular do HAV. Nos estudos de epidemiologia molecular, a análise da seqüência nucleotídica do vírus é um método que fornece informações precisas sobre o genoma viral, podendo esclarecer possíveis fontes de contaminação em surtos epidêmicos (Robertson et al., 1992, 2000; Normann et al., 1995). A partir dos resultados, obtidos neste estudo, de padronização dos testes de detecção do HAV RNA em amostras de saliva, técnicas de seqüenciamento nucleotídico e de análise filogenética foram empregadas para determinar os genótipos circulantes do HAV em amostras de soro e de saliva durante o surto de hepatite A (**artigo 2**). Além disso, também foram conduzidas investigações epidemiológicas a fim de verificar os fatores de risco associados à infecção e as possíveis fontes de transmissão do HAV durante o surto.

Em concordância com estudos anteriores, foi observado que a alta frequência de crianças suscetíveis com idades abaixo de 5 anos em comunidades fechadas configurou um fator de risco significativo ($p < 0,05$) para a disseminação do HAV durante o surto de hepatite A (Robertson et al., 2000; Smith et al., 1997). A investigação epidemiológica não revelou nenhum fator de risco estatisticamente significativo. Possivelmente, os dados referentes a estas variáveis podem estar distorcidos por viés de falsa-resposta (tipo de viés de informação, onde por questões embaraçosas ou “invasivas” os indivíduos tendem a negar sua condição em relação a algumas variáveis) (Medronho e Perez, 2005), já que os indivíduos ficaram constrangidos de falar a verdade ao responder ao questionário, em relação aos seus hábitos de higiene. Além disso, estas variáveis são de difícil caracterização, já que

toda a população vive em condições semelhantes de saneamento, sendo em geral as condições sanitárias e de higiene precárias. Embora toda a população possua um sistema de abastecimento de água encanada e tratada pela CEDAE (Companhia Estadual de Águas e Esgotos), a maioria das residências está situada próxima ao rio Jacarezinho, onde são lançados o esgoto e dejetos dos moradores do bairro.

Neste estudo também foram realizadas coletas de amostras de água de diferentes fontes da creche, a fim de avaliar a possível associação entre o consumo de água e a transmissão do HAV. O RNA do HAV foi detectado em uma amostra de água proveniente de um dos bebedouros da creche, entretanto nas amostras de água das fontes abastecedoras do bebedouro (caixa d'água) não foi possível detectar o vírus. A análise genética do isolado do HAV proveniente do bebedouro revelou um alto grau de identidade (99,3%) com o HAV isolado de uma criança envolvida no surto (amostra se37). Estes resultados sugerem que o bebedouro em questão pode ter sido contaminado pelo contato das mãos das crianças contendo fezes infectadas com o vírus ou através de saliva contendo o HAV. Esta hipótese é reforçada ao observar a análise microbiológica da água da creche (dados não mostrados), onde verificou-se que nenhum dos pontos de água estava com índices de coliformes fecais acima do recomendado. Esses resultados indicam que durante o surto estudado, a principal via de transmissão tenha sido o contato pessoa-a-pessoa e que o bebedouro tenha sido apenas um veículo de transmissão. A hipótese de transmissão do vírus pelos manipuladores de alimentos como relatado por outros autores (Cliver, 1985; Sobsey et al., 1988; Dalton et al., 1996; Bidawid et al., 2000, Morais et al., 2006) foi descartada neste surto pois não foi detectada a presença da infecção pelo HAV por PCR ou ELISA nas amostras coletadas das cozinheiras da escola.

Neste estudo foi observada a co-circulação dos subgenótipos IA e IB do HAV. Este fato mostrou que no mesmo surto estavam circulando diferentes cepas do HAV, provavelmente vindas de diferentes fontes de infecção. Embora estudos iniciais demonstrem a presença somente de cepas do subgenótipo IA na América do Sul (Arauz-Ruiz et al., 2001; Costa-Matiolli et al., 2001), estudos mais recentes conduzidos no Rio de Janeiro também relatam a co-circulação dos subgenótipos IA e IB em surtos de hepatite A (de Paula et al., 2002, 2004; Villar et al., 2004). A co-circulação dos subgenótipos IA e IB também tem sido descrita em outras regiões do

mundo como na África do Sul (Taylor et al., 1997), França (Apaire-Marchais et al., 1995; Costa-Mattioli et al., 2001) e Holanda (Bruisten et al., 2001).

Em geral, as amostras de HAV deste estudo apresentaram alta identidade genética (99,4 -100%) com cepas isoladas de outros surtos ocorridos no Rio de Janeiro e de outros estados do Brasil, como Bahia (BA 300) e Minas Gerais (MG 350). Entretanto, amostras de HAV de outros países da América do Sul como Uruguai, Argentina e Chile, formaram *clusters* distintos entre si. Este dado sugere um padrão de circulação endêmica de cepas brasileiras de HAV durante surtos epidêmicos.

Este estudo foi o primeiro relato demonstrando a variabilidade genética de isolados de HAV provenientes de amostras de saliva comparando-os aos do soro. Entre as 12 seqüências de HAV isolados de amostras pareadas de soro e saliva, observou-se um grupo de amostras (n=6) no qual todas as seqüências pareadas apresentavam o mesmo genótipo entre si, entretanto, surpreendentemente em outro grupo, as amostras de saliva apresentaram genótipos diferentes das amostras de soro correspondentes. Para excluir a possibilidade de contaminação dessas amostras durante os testes, as etapas de extração do RNA viral, amplificação e seqüenciamento foram repetidas. Uma possível explicação para este resultado seria que, devido à presença de dois subgenótipos diferentes no mesmo indivíduo, durante o seqüenciamento o subgenótipo predominante na amostra específica (soro ou saliva) tenha prevalecido. No entanto, duas condições parecem ter sido necessárias para que este fato ocorresse; primeiro seria a co-circulação de cepas diferentes na mesma área geográfica, e segundo, o contato do indivíduo suscetível com pelo menos duas fontes de infecção em um curto período de tempo. Todos os pacientes que apresentavam os dois subgenótipos IA e IB eram alunos da creche, indicando a existência de mais de uma fonte de infecção no local o que facilitou a contaminação seguida dessas crianças em um curto intervalo de tempo.

A co-infecção por duas cepas de HAV em um mesmo indivíduo já foi descrita por De Paula e colaboradores (2003) em uma amostra de soro de um paciente funcionário de uma creche localizada no Rio de Janeiro, onde ocorria um surto de hepatite A. Em concordância com os achados deste presente estudo, genótipos discrepantes de HCV em amostras pareadas de soro e saliva já foram relatados por Roy e colaboradores (1998) em pacientes usuários de drogas injetáveis. Para que

ocorra a recombinação é necessário que haja uma dupla infecção em uma mesma célula. Apesar das possíveis implicações patogênicas da recombinação do HAV não terem sido esclarecidas até o momento, acredita-se que a co-infecção seja o primeiro requisito para que ocorra a recombinação entre dois genótipos.

Para realizar uma melhor investigação sobre a suspeita de dupla infecção desses indivíduos, as seqüências nucleotídicas provenientes das amostras de soro e saliva de pacientes que apresentaram os dois subgenótipos, foram clonadas em bactérias *E. coli*. Cerca de cinco clones de cada amostra, selecionados aleatoriamente, foram seqüenciados. Observou-se que todos os clones isolados de uma mesma amostra apresentavam o mesmo genótipo, indicando a presença de um único subgenótipo do HAV na amostra. Sanchez e colaboradores (2003) descreveram a primeira evidência de distribuição de *quasiespecies* do HAV, mostrando que apesar da conservação antigênica, podem ocorrer mutações durante a replicação e que pressões seletivas geram um espectro de mutantes virais em determinados sítios. A coexistência de diferentes subpopulações virais tem sido extensivamente documentada em estudos envolvendo HIV tipo I (Papathanasopoulos et al., 2003; Shapshak et al., 1999) e HCV (Chen et al., 2003; Laskus et al., 2000), sugerindo que esse comportamento pode permitir uma rápida adaptação do vírus a mudanças adversas (Cristina J. & Costa-Mattioli, 2007). Segundo Laskus e cols (2000) e Ferreira e cols (2005), a distribuição de diferentes subpopulações virais no sangue e outros tecidos sugere a ocorrência de uma replicação extrahepática independente.

Uma possível replicação primária extrahepática do HAV foi demonstrada por estudos com infecção experimental em primatas não humanos, onde o antígeno viral e o material genômico do HAV foram observados em células epiteliais das críptas intestinais, células da lâmina própria, baço, rins, tonsilas e saliva (Karayiannis et al., 1988, Cohen et al., 1989; Asher et al., 1995; Pinto et al., 2002), entretanto, não foi demonstrada a replicação do RNA viral. Alguns estudos sugerem que a presença de vírus na saliva pode ocorrer devido a um sítio de replicação intraglandular do HAV (Laskus et al., 2000). Embora a presença do antígeno do HAV em determinados sítios não comprove uma replicação viral, a localização deste antígeno no citoplasma sugere a infecção viral destas células (Cohen et al., 1989).

Deste modo, com o propósito de esclarecer alguns questionamentos relacionados a replicação e patogênese do HAV, foi realizado um estudo de infecção experimental pelo HAV em cynomolgos (*Macaca fascicularis*) (**artigo 3**). Apesar de diversos estudos demonstrarem esta espécie como modelo animal para o estudo da hepatite E (Tsarev et al., 1994; Tam et al., 1997; Kamili et al., 2002, 2004), estudos prévios desenvolvidos por grupos russos, demonstram a utilização desse modelo experimental para transmissão do HAV com resultados inconclusivos (Shevtsova et al., 1988; Doroshenko et al., 1990). Neste presente estudo, a espécie *Macaca fascicularis* foi utilizada devido principalmente à disponibilidade deste animal no Centro de Criação de Animais de Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz (CECAL/IOC) e ao seu maior porte, o que permitiria a realização da coleta de saliva utilizando o coletor comercial apropriado e facilitaria os procedimentos cirúrgicos.

Neste estudo, quatro animais foram inoculados pela via intravenosa com suspensão fecal contendo o HAV (cepa HAF-203 com título viral de 1:320 TCID₅₀) e um animal permaneceu como controle da infecção. Esses animais foram monitorados durante 60 dias, através de coletas de fezes, sangue e saliva para acompanhar os parâmetros bioquímicos, virológicos e imunológicos durante a infecção. Após a necrópsia, amostras de fígado, glandula salivar, tonsilas e linfonodo intestinal foram coletadas para análise histológica e posterior detecção e quantificação da partícula viral.

Este estudo mostrou que os animais infectados desenvolveram uma patologia hepática moderada, com lesões típicas de infecção pelo vírus da hepatite A. Entretanto, nenhum animal inoculado apresentou manifestação clínica relacionada à infecção pelo HAV, assim como tem sido descrito em estudos anteriores (Shevtsova et al., 1988; Asher et al., 1995; Pinto et al., 2002). Ao avaliar o curso da infecção, anticorpos anti-HAV se tornaram detectáveis a partir do sétimo dia após inoculação, atingindo níveis máximos cerca de 20 dias depois, coincidindo com os picos de ALT. No sétimo dia de infecção, foi possível detectar o HAV RNA nas fezes de todos os animais infectados, permanecendo detectável durante todo o estudo (60 dias), com carga viral entre 10² a 10⁵ cópias/mL. Observou-se uma viremia persistente por aproximadamente 30 dias, com carga viral média de 10³ cópias/mL. Estes achados estão de acordo com o curso da infecção pelo HAV observada em infecções naturais em humanos (Costa-Mattioli et al., 2002a; Normann et al., 2004). Em geral, o HAV-RNA foi detectado na saliva dos animais infectados durante os quinze primeiros dias

de infecção, entretanto em um animal (cy3) o HAV foi detectado na saliva por até 45 dias de forma intermitente. Estudos experimentais anteriores demonstraram que a partícula do HAV é eliminada na saliva durante o período de incubação e no começo da fase da aguda (Cohen et al., 1989; Asher et al., 1995) e que o RNA do HAV pode ser detectado na saliva a partir de seis horas após inoculação (Pinto et al., 2002), permanecendo detectável por várias semanas. Entretanto, neste estudo anterior a via de inoculação foi oral, o que sugere que a detecção precoce do HAV na saliva pode ser devido a resquícios do inóculo (Pinto et al., 2002). A carga viral na saliva foi similar à observada no soro e variou de 10^2 a 10^4 cópias/mL, atingindo níveis máximos no sétimo dia após inoculação (cy1). Em dois animais foi observada a detecção do HAV RNA na saliva sem o mesmo ter sido detectado no soro, o que exclui a possibilidade de contaminação com traços de sangue. Segundo alguns autores, a detecção do HAV RNA na saliva indica que a saliva representa uma via de excreção do HAV e sugerem que a mesma pode ser infecciosa (Cohen et al., 1989; Mackiewicz et al., 2004).

Através da técnica de imunofluorescência indireta, foi constatada a presença do antígeno viral (HAVAg) nos hepatócitos e nas glândulas submandibulares de todos os animais necropsiados entre os dias 15 e 60 após inoculação. Em concordância com estudos anteriores, o HAVAg foi observado em células de Kupffer ocasionais, que neste caso pode ser o resultado da fagocitose de um complexo imune (Baptista et al., 1993; Asher et al., 1995; Pinto et al., 2002). No entanto, o padrão de fluorescência perinuclear observado nos hepatócitos sugere uma replicação local. A presença do HAVAg no citoplasma das células serosas e mucosas das glândulas submandibulares durante o mesmo período de detecção nos hepatócitos, sugere que o vírus se replica na glândula salivar e é então excretado na saliva ao mesmo tempo que o vírus se replica no fígado. Entretanto, embora a alta carga viral na saliva associada à detecção do HAVAg em glândulas submandibulares indiquem uma possível replicação local, esse achados não são suficientes para afirmar a ocorrência de uma replicação extrahepática, já que a presença do HAV neste tecido pode ser devido a contaminação com o plasma, à aderência de vírus circulantes ao local ou devido à formação de imunocomplexos do HAV com imunoglobulinas secretadas.

Como o HAV se replica através da síntese de RNA de polaridade negativa complementar ao RNA genômico, o replicativo intermediário é um marcador da replicação ativa do HAV e, portanto, permite avaliar os sítios de replicação e

compreender melhor alguns aspectos da sua patogênese, ainda controversos e pouco compreendidos. Para isso, foi realizado um estudo em paralelo ao estudo experimental em animais, no qual visávamos desenvolver uma técnica de PCR em tempo real para detecção específica do RNA de fita negativa do HAV, a fim de monitorar sua replicação *in vitro* e *in vivo* (**artigo 4**).

Até o momento não havia estudos descrevendo a detecção do replicativo intermediário do HAV em tecidos de animais infectados experimentalmente. A detecção e exata localização do HAV nos tecidos destes animais têm um importante papel na compreensão da patogênese e história natural da infecção pelo HAV. Alguns aspectos da patogênese do HAV ainda são pouco compreendidos principalmente porque somente primatas não-humanos são modelos animais estabelecidos para este estudo (Daemer et al., 1981; Pinto et al., 2002). A cinética de replicação do HAV em cultura celular não é bem compreendida, principalmente devido às dificuldades de detecção de pequenas quantidades dos produtos de replicação viral quando comparados a grande quantidade de produtos celulares. Esse estudo também avaliou a cinética da replicação do HAV em cultura celular para uma melhor compreensão dos mecanismos de replicação nesses sistemas de cultivo celular e com isso poder contribuir com uma futura aplicação no desenvolvimento de vacinas inativadas em maior escala. A replicação do HAV em cultura celular é lenta e ineficiente, o que dificulta a produção em larga escala do antígeno viral para uso em diagnóstico e desenvolvimento de vacinas.

Para avaliar a cinética da replicação do HAV em cultivo celular, foram utilizadas células FRhK-4 inoculadas com a cepa HAF-203 do HAV (Gaspar et al., 1993). Com intervalos de 1, 5, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 75, 85, 100 horas e 10 dias pi, o HAV RNA foi extraído tanto do sobrenadante quanto da monocamada celular. Para detecção do replicativo intermediário do HAV *in vivo*, foram utilizadas as amostras de fígado dos animais infectados experimentalmente conforme descrito em nosso estudo anterior. O HAV RNA foi isolado dessas amostras após a necropsia desses animais nos dias 15, 30, 45 e 60 pi. A especificidade da técnica de amplificação da fita negativa do HAV RNA baseou-se na utilização da enzima termoestável rTth que conduz a transcrição reversa em altas temperaturas e utilizando-se somente *primers sense* específicos para as regiões conservadas 5'NC e VP3 do HAV. Neste estudo, a técnica de PCR em tempo real-fita específica apresentou sensibilidades de 20 e 30 cópias/mL para as regiões 5'NC e VP3, respectivamente. Esses resultados demonstraram que foi possível detectar o

replicativo intermediário do HAV em todos os pontos de replicação avaliados tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Ao avaliar a cinética da replicação do HAV *in vitro*, observou-se que a síntese de RNA é assimétrica e que embora a quantidade de RNA fita-positiva seja consideravelmente maior que a de RNA fita-negativa, esta pode ser detectada e considerada como marcador de replicação viral. Aproximadamente três dias pi, foi possível detectar altas concentrações de replicativo intermediário, que atingiu níveis máximos (1.0×10^7 cópias/mL) após 10 dias. Em concordância com nossos resultados, De Chastonay e Siegl (1987) demonstraram que durante o ciclo de replicação do HAV em células MRC-5 infectadas, a síntese de RNA ocorre a partir dos dois primeiros dias de infecção. Os resultados obtidos neste estudo demonstram a eficiência e aplicabilidade desta técnica para monitorar a replicação viral em cultivo celular e com isso acelerar os processos de produção viral utilizados para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos, assim como uma ferramenta para avaliar a inibição do HAV por drogas antivirais.

Durante o estudo da replicação do HAV *in vivo*, foi observada uma replicação ativa do HAV nos hepatócitos a partir do 15^o dia e com trinta dias de infecção a replicação atingiu seu platô (10^9 log) e se manteve por até sessenta dias, o que demonstra uma intensa replicação do HAV no fígado por pelo menos dois meses após infecção. Até o momento não existem dados publicados a respeito da detecção do replicativo intermediário do HAV em amostra de fígado de animais experimentalmente infectados. Esses resultados demonstram que essa técnica pode ser aplicada em futuros estudos de infecção experimental para verificar a taxa de replicação do HAV nos hepatócitos e avaliar possíveis sítios de replicação viral extrahepática.

A partir desses resultados satisfatórios, esta técnica de detecção do marcador de replicação viral ativa foi utilizada para investigar possíveis sítios de replicação extrahepática do HAV em amostras de glândulas salivares, tonsilas, linfonodo intestinal e fígado coletados dos animais infectados previamente (**artigo 3**). Neste estudo, observou-se uma replicação do HAV mais intensa nas glândulas salivares (10^3 cópias/mg) no começo da infecção (15 dias) do que nos hepatócitos (10^2 cópias/mg). Entretanto, posteriormente, a replicação do HAV tornou-se mais intensa no fígado (cerca de 10^4 cópias/mg) do que nos outros tecidos analisados, permanecendo constante até o final do estudo (60 dias). Muitos pesquisadores também descreveram a presença do antígeno viral em tecidos extrahepáticos como

rins, baço (Mathiesen et al., 1978; Karayiannis et al., 1986), linfonodos (Mathiesen et al., 1978), e duodeno (Karayiannis et al., 1986). Entretanto não existem dados a respeito da detecção do HAV e seu replicativo intermediário em glândulas salivares. A replicação do HAV foi fracamente detectada nas tonsilas e linfonodo intestinais e por um breve período, que provavelmente pode ser interpretado como consequência da captura viral por células apresentadoras de antígeno.

Nossos resultados evidenciaram uma replicação ativa do HAV nas glândulas submandibulares dos animais infectados experimentalmente. O pico de HAV RNA observado na saliva coincidiu com a maior taxa de replicação viral nas glândulas salivares e demonstrou uma significativa correlação positiva entre a taxa de replicação nesse sítio e a carga viral na saliva. Estes resultados sugerem que a replicação do HAV na cavidade oral e sua consequente eliminação na saliva podem implicar na infecciosidade desse fluido, que poderia, portanto, desempenhar um importante papel como fonte de transmissão do HAV, através da via oral-oral pelo contato pessoa-pessoa. Entretanto, esses achados não são suficientes para comprovar a transmissão do HAV através da saliva e, portanto, estudos mais detalhados são ainda necessários para investigar essa hipótese.

A partir dos nossos resultados podemos propor que após uma breve replicação do HAV nas glândulas salivares, sítio de entrada do HAV no organismo, os hepatócitos assumem a replicação liberando então os virions nos sinusóides e na bile. Em adição, esse estudo confirmou a suscetibilidade do cinomolgos à infecção pelo HAV de origem humana (cepa HAF-203), indicando que esta espécie pode ser estabelecida como modelo animal para o estudo da patogênese do HAV.

Este trabalho demonstrou a aplicabilidade das amostras de saliva para o diagnóstico da hepatite A, assim como sua importância para estudos de epidemiologia molecular, viabilizando a investigação de surtos e casos esporádicos de hepatite A. Além disso, nossos dados esclareceram alguns aspectos da patogênese do HAV como a ocorrência de replicação extrahepática em glândulas salivares, sugerindo a possibilidade de transmissão do HAV através da saliva. Entretanto, ainda é necessário investigar quais as implicações clínicas de uma replicação viral extrahepática e o potencial infeccioso da saliva para transmissão do HAV através de uma via oral-oral.

6- CONCLUSÕES

1. Nossos resultados mostram que as técnicas de Nested-PCR e PCR em tempo real estabelecidas neste estudo foram eficazes para detectar e quantificar o RNA do HAV em amostras de saliva. No entanto, a técnica de PCR em tempo real apresentou uma sensibilidade significativamente maior que o Nested-PCR.
2. Em geral, a presença do RNA do HAV foi mais frequentemente detectada em amostras de saliva (50%) do que nas de soro (42%), independentemente da técnica aplicada, mostrando que a saliva além de ser menos invasiva é uma amostra clínica eficiente e apropriada para detecção do HAV.
3. Foi possível a detecção do RNA do HAV em amostras de saliva (21% através da técnica de PCR em tempo real) de pacientes com sorologia negativa para hepatite A, o que demonstra a importância da detecção do HAV em amostras de saliva para um diagnóstico precoce de hepatite A e esclarecimento de casos de hepatite sem etiologia.
4. A análise nucleotídica revelou uma co-circulação dos subgenótipos IA e IB durante o surto. A comparação dos genótipos revelou a existência de subgenótipos diferentes entre algumas amostras pareadas de soro e saliva, demonstrando uma co-infecção desses pacientes por genótipos diferentes do HAV.
5. Os isolados de HAV deste estudo apresentaram alta identidade genética com cepas isoladas de surtos ocorridos previamente no Rio de Janeiro e em outros estados brasileiros como Bahia e Minas Gerais, indicando um padrão de circulação endêmica de cepas brasileiras de HAV durante surtos.
6. Nossos resultados indicam que durante o surto estudado, a principal via de transmissão tenha sido o contato pessoa-a-pessoa e que um bebedouro da creche, no qual foi detectado o RNA do HAV, tenha sido apenas um veículo de transmissão, excluindo a água como fonte de infecção.
7. Durante o curso da infecção experimental em macacos mostramos que o RNA do HAV é eliminado na saliva por até 45 dias após infecção com uma carga viral similar a do soro, ambas de aproximadamente 10^3 cópias/mL.
8. Nossos resultados mostram que a técnica de PCR em tempo real fita-específica estabelecida neste estudo é altamente sensível e aplicável para

detecção do replicativo intermediário do HAV, como marcador de replicação ativa tanto em cultura celular quanto em hepatócitos de animais inoculados experimentalmente.

- 9.** Nossos resultados demonstraram a existência de um sítio extrahepático de replicação do HAV em glândulas submandibulares dos animais infectados experimentalmente. Estes resultados sugerem que a replicação do HAV na cavidade oral e sua conseqüente eliminação na saliva podem implicar na infecciosidade desse fluido, que poderia, portanto, desempenhar um papel como fonte de transmissão do HAV, através da via oral-oral pelo contato pessoa-pessoa.

7- PERSPECTIVAS

Os dados obtidos nesta tese confirmaram a utilização de amostras de saliva para o diagnóstico molecular e estudos epidemiológicos do HAV durante surtos epidêmicos e pela primeira vez foi demonstrada a replicação extrahepática do HAV em glândula salivar de animais infectados experimentalmente. Pesquisas complementares serão desenvolvidas para se verificar o potencial infeccioso de amostras de saliva na transmissão do HAV pela realização de um estudo de infecção experimental em primatas não-humanos.

Além disso, alguns aspectos ainda serão investigados, como a viabilidade da saliva para o diagnóstico da hepatite A durante todo o curso da doença, uma vez que o curso da infecção pelo HAV através de amostras de saliva de indivíduos naturalmente infectados ainda não foi descrito. Portanto, serão realizados estudos para acompanhar o curso da infecção aguda pelo HAV mediante a aplicação de testes para detecção de marcadores sorológicos e moleculares do HAV em amostras de saliva de casos esporádicos e de surtos de hepatite A, comparando-as às amostras pareadas de soro.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El Galil, K.H., El Soky, M.A., Kheira, S.M., Salazar, A.M., Yates, M.V., Chen, W., Mulchandani, A., 2004. Combined immunomagnetic separation-molecular beacon-reverse transcription-PCR assay for detection of hepatitis A virus from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 70:4371-4374.

Almeida, L.M., Werneck, G.L., Cairncross, S., Coeli, C.M., Costa, M.C., Coletty, P.E., 2001. The epidemiology of hepatitis A in Rio de Janeiro: Environmental and domestic risk factors. *Epidemiol Infect* 127: 327-333.

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 Osw Cruz* 101:149-155.

Andino, R., Rieckhof, G.E., Achacoso, P.L., Baltimore, D., 1993. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J* 12: 3587-3598.

Andzhaparidze, A.G., Kazachkov, L.A., Balaian, M.S., Kusov, L., Poleschuk, V.F., 1987. Hepatitis A in *Macaca fascicularis* and *M. arctoides* infected by the Java monkey-55 strain of hepatitis A virus. *Vopr Virusol* 32:440-448.

Apaire-Marchais, V., Robertson, B.H., Aubineau-Ferre, V., Le Roux, M.G., Leveque, F., Schwartzbrod, L., Billaudel, S., 1995. Direct sequencing of hepatitis A virus strain isolated during an epidemic in France. *Appl Environ Microbiol* 61: 3977-3980.

Arauz-Ruiz, P., Sundqvist, L., García, Z., Taylor, L., Visoná, K., Norder, H., Magnus, L.O., 2001. Presumed common source outbreaks of hepatitis A in an endemic area confirmed by limited sequencing within the VP1 region. *Med Virol* 65:449-456.

Archibald, D.W., Zon, L.I., Groopman, J.E., Allan, J.S., McLane, M.F., Essex, M.E., 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.

Archibald, D.W., Barr C.E., Torosian, J.P., McLane, M.F., Essex M., 1987. *J Infect Dis* 155:793-796.

Asher, L.V., Binn, L.N., Mensing, T.L., Marchwicki, R.H., Vassell, R.A., Young, G.D., 1995. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Med Virol* 47:260-268.

Ashur, Y., Adler, R., Rowe, M., Shouval, D., 1999. Comparison of immunogenicity of two hepatitis A vaccines---VAQTA® and HAVRIX®---in young adults. *Vaccine* 17:2290-2296.

Bagg, J., Perry, K.R., Parry, J.V., Mortimer, P.P., Peters, T.J., 1991. The influence of dental status on the detection of IgG class anti-viral antibodies in human saliva. *Arch Oral Biol* 36:221-226.

Balayan, M.S. 1992. Natural hosts of hepatitis A virus. *Vaccine* 10 Suppl 1:S27-31.

Baptista, M.L., Marchevsky, R.S., Oliveira, A.V., Yoshida, C.F., Schatzmayr, H.G., 1993. Histopathological and immunohistochemical studies of hepatitis A virus infection in marmoset *Callithrix jacchus*. *Exp Toxicol Pathol* 45:7-13.

Bélec, L., Legoff, J, Si-Mohamed, A., Bloch, F., Mbopi Keou, F.X., Becquart, P., Matta, M., Prazuck, T., Petite, J.P., Gutmann, L., Payan, C., 2003. Mucosal humoral immune response to hepatitis C virus E1/E2 surface glycoproteins and HCV shedding in saliva and cervicovaginal fluids from chronically HCV-infected patients. *J Hepatol* 38:833-42.

Bhave, S., Bavdekar, A., Madan, Z., Jha, R., Bhure, S., Chaudhari, J., Pandit, A., 2006. Evaluation of immunogenicity and tolerability of a live attenuated hepatitis a vaccine in Indian children. *Indian Pediatr* 43:983-987.

Bidawid, S., Farber, J.M., Sattar, S.A., 2000. Contamination of foods by food handlers: experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption. *Appl Environ Microbiol* 66:2759-2763.

Blumer G., 1923. Infectious jaundice in the United States. *JAMA* 81:353-358.

Boggs, J.D., Melnick, J.L., Conrad, M.E., Felsher, B.F., 1970. Viral hepatitis. Clinical and tissue culture studies. *JAMA* 214:1041-1046.

Bonanni, P., Colombai, R., Franchi, G., Lo Nostro, A., Comodo, N., Tiscione, E., 1998. Experience of hepatitis A vaccination during an outbreak in a nursery school of Tuscany, Italy. *Epidemiol Infect* 121:377-80.

Bonanni, P., Franzin, A., Staderini, C., Pitta, M., Garofalo, G., Cecconi, R., Santini, M.G., Lai, P., Innocenti, B., 2005. Vaccination against hepatitis A during outbreaks starting in schools: what can we learn from experiences in central Italy? *Vaccine* 18: 2176-80.

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.

Brack, K., Frings, W., Dotzauer, A., Vallbracht, A., 1998. A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of hepatitis A virus. *J Virol* 72:3370-3376.

Brack, K., Berk, I., Magulski, T., Lederer, J., Dotzauer, A., Vallbracht, A., 2002. Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. *J Virol* 76:11920-11930.

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 particles: evidence HAV is an RNA virus. *J Med Virol* 2:175-187.

Bradley, D.W., Schable, C.A., McCaustland, K.A., Cook, E.H., Murphy, B.L., Fields, H.A., Ebert, J.W., Wheeler, C., Maynard, J.E., 1984. Hepatitis A virus: growth characteristics of in vivo and in vitro propagated wild and attenuated virus strains. *J Med Virol* 14:373-386.

Braga, W.S., Borges, F.G., Barros, J.G.M., Martinho, A.C., Rodrigues, I.S., Azevedo, E.P., Davis, G.H., Queiroz, M.B., Santos, S.H., Barbosa, T.V., Castilho Mda, C., 2009. Prevalence of hepatitis A virus infection: the paradoxical example of isolated communities in the western Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 42:277-281.

Brasil, Ministério da Saúde. 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6^a edição.

Brown, E.A., Jansen, R.W., Lemon, S.M. 1989. Characterization of a simian hepatitis A vírus (HAV): antigenic and genetic comparison with human HAV. *J Virol* 75:1414-1426.

Bruisten, S.M., Van Steenberghe, J.E, Pijl, A.S., Niesters, H.G., Van Doornum, G.J., Coutinho, R.A., 2001. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Amsterdam, the Netherlands. *J Med Virol* 63:88-95.

Bull, A.R., Kimmance, K.J., Parry, J.V., Perry, K.R., 1989. Investigation of an outbreak of hepatitis A simplified by salivary antibody testing. *Epidemiol Infect* 103:371-376.

Bustin, S.A., Mueller, R., 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 109:365-379.

Canuel, M., De Serres, G., Duval, B., Gilca, R., De Wals, P., Gilca, V., 2007. Trends of hepatitis A hospitalization and risk factors in Quebec, Canada, between 1990 and 2003. *BMC Infect Dis* 18:7:31.

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.

Casas, N., Amarita, F., de Marañón, I.M., 2007. Evaluation of an extracting method for the detection of Hepatitis A virus in shellfish by SYBR-Green real-time RT-PCR. *Int J Food Microbiol* 120:179-185.

Cástková, J., Benes, C., 2009. Increase in hepatitis A cases in the Czech Republic in 2008 - an update. *Euro Surveill* 14(3) pii: 19091.

CDC - Center of Disease Control and Prevention. 1996. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 45 (RR-15): 1--30.

CDC - Center of Disease Control and Prevention. 1998. Summary of notifiable diseases, United States. *MMWR* 47:1-92.

CDC - Center of Disease Control and Prevention. 1999. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 48 (RR-12):1--37.

CDC - Center of Disease Control and Prevention. 2006. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 55 (RR-07): 1-23.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention., 2009. Surveillance for Acute Viral Hepatitis — United States, 2007. Surveillance Summaries. *MMWR* 58 (SS23).

Chancellor, D.D., Tyagi, S., Bazaco, M.C., Bacvinskas, S., Chancellor, M.B., Dato, V.M., de Miguel, F., 2006. Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination. *J Food Prot* 69:1468-1472.

Chen, Y.D., Liu, M.Y., Yu, W.L., Li, J.Q., Zhou, Z.Q., Tisminetzky A.G., 2003. Mix-infection with different genotypes of HCV and with HCV plus other hepatitis viruses in patients with hepatitis C in China. *World J Gastroenterol* 9:984-992

Chironna, M., Germinario, C., De Medici, D., Fiore, A., Di Pasquale, S., Quarto, M., Barbuti, S., 2002. Detection of hepatitis A virus in mussels from different sources marketed in Puglia region (South Italy). *Int. J. Food Microbiol* 75:11-18.

Chironna, M., Grottola, A., Lanave, C., Villa, E., Barbuti, S., Quarto, M., 2003. Genetic analysis of HAV strains recovered from patients with acute hepatitis from Southern Italy. *J Med Virol* 70:343-349.

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.

Cliver, D.O., 1985. Vehicular transmission of hepatitis A. *Public Health Rev* 13:235-292.

Cockayne, E.A., 1912. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Quat J Med* 6: 1-29.

Coelho C., Heinert, A.P., Simoes, C.M., Barardi, C.R., 2003. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Food Prot* 66:507-511.

Cohen, J.I., Ticehurst, J.R., Purcell, R.H., Buckler-White, A., Baroudy, B.M., 1987. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol* 61: 50-59.

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.

Cohen, L., Benichou, D., Martin, A., 2002. Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J Virol* 76: 7495-7505.

Connor, B.A., 2005. Hepatitis A vaccine in the last-minute traveler. *Am J Med* 118 (Suppl 10A): 58S-62S.

Costa-Mattioli, M., Monpoeho, S., Schvoerer, C., Besse, B., Aleman, M.H., Billaudel, S., Christian, J., Ferre, V., 2001. Genetic analysis of hepatitis A virus outbreak in France confirms the co-circulation of subgenotypes IA, IB and reveals a new genetic lineage. *J Med Virol* 65: 233-240.

Costa-Mattioli, M., Monpoeho, S., Nicand, E., Aleman, M.H, Billaudel, S., Ferre, V., 2002a. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J. Viral Hepat* 9:101-106.

Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Perez-Bercof, R., Casane, D., Colina, R., Garcia, L., Veja, I., Glikman, G., Romanowsky, V., Castello, A., Nicand, E., Gassin, M., Billaudel, S., Ferre, V., 2002b. Molecular evolution of hepatitis A virus: a New classification based on the complete VP1 protein. *J Virol* 76: 9516-9525.

Costa-Mattioli, M., Di Napoli, A., Ferre, V., Billaudel, S., Perez-Bercoff, R., Cristina, J., 2003. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 84: 3191-3201.

Costa-Mattioli, M., Domingo, E., Cristina, J., 2006. Analysis of sequential hepatitis A virus strains reveals coexistence of distinct viral subpopulations. *J Gen Virol* 2006 87(Pt 1):115-118.

Cristina, J., Costa-Mattioli, M., 2007. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Res* 127:151-157.

Cuthbert, J.A., 2001. Hepatitis A: old and new. *Clin. Microbiol. Rev* 114:38-58.

Daemer, R.J., Feinstone, S.M., Gust, I.D., Purcell, R.H., 1981. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun* 32:388-93.

Dalton, C.B., Haddix, A., Hoffman, R.E., Mast, E.E., 1996. The cost of a food-borne outbreak of hepatitis A in Denver, Colo. *Arch Intern Med* 156:1013-6.

Day, S.P., Murphy, P., Brown, E.A., Lemon, S.M., 1992. Mutations within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA which enhance replication in BS-C-1 cells. *J Virol* 66:6533-6540.

de Alencar Ximenes, R.A., Martelli, 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., Figueiredo, 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* 37:852-861.

de Chastonay, J., Siegl, G., 1987. Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology* 157:268-275.

de Chanostay, J., Siegel, G., 1988. Effect of three known antiviral substances on hepatitis A virus replication. In: Viral hepatitis and liver disease. In: Zuckerman A.J., (Eds.), Alan R Liss, p. 956-996.

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 e IB Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 66: 22-27.

de Paula, V.S., Saback, F.L., Gaspar, A.M.C., Niel C., 2003. Mixed infection of a child care provider with hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB revealed by heteroduplex mobility assay. *J Virol Methods* 107:223-228.

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 Virol* 73:378-383.

de Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Villar, L.M., Luz, S.L., Silva, L.A., Jesus, M.S., da Silva, N.M., Gaspar, A.M., 2007. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res* 41:1169-1176.

Deinhardt, F., Courtois, G., Dherte, P. et al., 1962. Studies of liver function tests in chimpanzees after inoculation with human infectious virus. *Am J Hyg* 75:311-321.

Delem, A.D., 1992. Comparison of modified HAVAB and ELISA for determination of vaccine-induced anti-HAV response. *Biologicals* 20:289-291.

Diaz, B.I., Sariol, C.A., Normann, A., Rodríguez, L., Flehming, B., 2001. Genetic relatedness of Cuban HAV wild-type isolates. *J Med Virol* 64: 96-103.

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.

Dienstag, J.L., Feinstone, S.M., Purcell, R.H., Hoofnagle, J.H., Barker, L.F., London, W.T., Popper, H., Peterson, J.M., Kapikian, A.Z., 1975. Experimental infection of chimpanzees with hepatitis A virus. *J Infect Dis* 132:532-545.

Domingo, E., Mas, A., Yuste, E., Pariente, N., Sierra, S., Gutiérrez-Riva, M., Menéndez-Arias, L., 2001. Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. *Prog Drug Res* 57:77-115.

Domínguez, 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 programme in Catalonia, Spain. *J Viral Hepat* 15 (Suppl 2):51-6.

Doroshenko, N.V., Shevtsova, Z.V., Stakhanova, V.M., Lapin, B.A., Lomovskaia, I.B., Zairov, G.K., Krylova, R.I., Dzhelieva, Z.N., Anan'ev, V.A., 1990. The sensitivity of rhesus and cynomolgus macaques to the human hepatitis A virus. *Vopr Virusol* 35:299-303.

Dotzauer, A., Gebhardt, U., Bieback, K., Gottke, U., Kracke, A., Mages, J., Lemon, S.M., Vallbracht, A., 2000. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J Virol* 74: 10950-10957.

Emerson, S.U., Huang, Y.K., McRill, C., Lewis, M., Purcell, R.H., 1992. Mutations in both the 2B and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaptation to growth in cell culture. *J Virol* 66:650-654.

Emerson, S.U., Huang, Y.K., Purcell, R.H., 1993. 2b and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaptation to cell culture. *Virology* 194:475-480.

Emerson, S.U., Tsarev, S.A., Govindarajan, S., Shapiro, M., Purcell, R.H., 1996. A simian strain of hepatitis A virus, AGM-27, functions as an attenuated vaccine for chimpanzees. *J Infect Dis* 173:592-7.

Fabris, P., Infantolino, D., Biasin, M.R., Marchelle, G., Venza, E., Terribile Wiel Marin V., Benedetti P., Tositti G., Manfrin V., de Lalla F., 1999. High prevalence of HCV-RNA in the saliva cell fraction of patients with chronic hepatitis C but no evidence of HCV transmission among sexual partners. *Infection* 27:86-91.

Faridi, M.M., Shah, N., Ghosh, T.K., Sankaranarayanan, V.S., Arankalle, V., Aggarwal, A., Sathiyasekaran, M., Bhattacharya, N., Vasanthi, T., Chatterjee, S., Choudhury, J., Mitra, M., 2009. Immunogenicity and safety of live attenuated hepatitis A vaccine: a multicentric study. *Indian Pediatr* 46:29-34.

Feinstone, S.M., Kapikian, M.A.S., Purcell, R.H., 1973. Hepatitis A: detection by immunoelectronmicroscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-1028.

Ferreiro, M.C., Dios, P.D., Scully, C., 2005. Transmission of hepatitis C virus by saliva? *Oral Dis* 11:230-235.

Fiaccadori, F.S., Soares, C.M., Borges, A.M., Cardoso, D.D., 2006. Prevalence of hepatitis A virus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, by molecular and serological procedures, 1995-2002. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:423-426.

FitzSimons, D., Hendrickx, G., Vorsters, A., Van Damme, P., 2010. Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 28:583-538.

Formenty, P., Leroy, E.M., Epelboin, A., Libama, F., Lenzi, M., Sudeck, H., Yaba, P., Allarangar, Y., Boumandouki, P., Nkounkou, V.B., Drosten, C., Grolla, A., Feldmann, H., Roth, C., 2006. Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever in the Republic of Congo. *Clin Infect Dis* 42:1521-1526.

Gaspar, A.M., Vitral, C.L., Marchevsky, R.S., Yoshida, C.F., Schatzmayr, H.G., 1992. A Brazilian hepatitis A virus isolated and adapted in primate and primate cell line as a chance for the development of a vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87:449-450.

Gaspar, A.M., Vitral, C.L., Yoshida, C.F., Schatzmayr, H.G., 1993. Fast growth of a Brazilian hepatitis A virus (HAF-203) in a primate cell line. *Braz J Med Biol Res* 26:203-206.

Gauss-Muller, V., Jurgensen, D., Deutzmann, R., 1991. Autoproteolytic cleavage of recombinant 3C proteinase of hepatitis A virus. *Virology* 182:861-864.

Glickson, M., Galum E., Oren, R., 1992. Relapsing hepatitis A: review of 14 cases and literature survey. *Medicine* 71: 14-23.

Gosert, R., Egger, D., Bienz, K., 2000. A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* 266:157-169.

Goyal, A., Shaikh, N.J., Kinikar, A.A., Wairagkar, N.S., 2009. Oral fluid, a substitute for serum to monitor measles IgG antibody? *Indian J Med Microbiol* 27:351-353.

Gust, I.D., Coulepis, A.G., Feinstone, S.M., Locarnini, S.A., Moritsugu, Y., Najera, R., Siegl, G., 1983. Taxonomic classification of hepatitis A virus. *Intervirology* 20: 1-7.

Haeckel, R., Hänecke, P., 1996. Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34:171-191.

Haro, I., Pérez, S., García, M., Chan, W.C., Ercilla, G., 2003. Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design. *FEBS Lett* 540(1-3):133-140.

Havens, Jr. W.P., 1947. The etiology of infectious hepatitis. *JAMA* 134:653-655.

Heitmann, A., Laue, T., Schottstedt, V., Dotzauer, A., Pichl, L., 2005. Occurrence of hepatitis A virus genotype III in Germany requires the adaptation of commercially available diagnostic test systems. *Transfusion* 45:1097-1105.

Hendrickx, G., Van Herck, K., Vorsters, A., Wiersma, S., Shapiro, C., Andrus, J.K., Roper, A.M., Shouval, D., Ward, W., Van Damme, P., 2008. Has the time come to control hepatitis A globally? Matching prevention to the changing epidemiology. *J Viral Hepat* 15:1-15.

Hermida, M., Ferreira, M.C., Barral, S., Laredo, R., Castro, A., Diz Dios, P., 2002. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. *J Virol Methods* 101:29-35.

Hogle, J.M., Chow, M., Filman, D.J., 1985. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 229:1358-1365.

Hollinger, F.B., Emerson, S.U., 2007. Hepatitis A virus. In: Fields Virology. Knipe, D.M. and Howley, P.M. (Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, p. 911-947.

Holmes, A.W., Wolfe, L., Rosenblate, H. et al., 1969. Hepatitis in marmosets: induction of disease with coded specimens from a human volunteer study. *Science* 165:816-817.

Hussain, Z., Das, B.C., Husain, S.A., Polipalli, S.K., Ahmed, T., Begum, N., Medhi, S., Verghese, A., Raish, M., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., Kar, P., 2006. Virological course of hepatitis A virus as determined by real time RT-PCR: Correlation with biochemical, immunological and genotypic profiles. *World J Gastroenterol* 12:4683-4688.

Innis, B.L., Snitbhan, R., Kunasol, P., Laorakpongse, T., Poopatanakool, W., Kozik, C.A., Suntayakorn, S., Suknuntapong, T., Safary, A., Tang, D.B., Boslego, J.W., 1994. Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA* 4:1328-1334.

Ishak, K.G., 1976. Light microscopic morphology of viral hepatitis. *Am J Clin Pathol* 65:787–827.

Jacobsen, K.H., Koopman, J.S., 2004. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol Infect* 132:105-1022.

Jansen, R.W., Siegel, G., Lemon, S.M., 1990. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2867-2871.

Johnson, A.M., Parry, J.V., Best, S.J., Smith, A.M., de Silva, M., Mortimer, P.P., 1988. HIV surveillance by testing saliva. *AIDS* 5:369-371.

Kaic, B., Borcic, B., Ljubicic, M., Brkic, I., 2001. Mihaljevic I. Hepatitis A control in a refugee camp by active immunization. *Vaccine* 14:3615-3619.

Kamili, S., Spelbring, J., Krawczynski, K., 2002. DNA vaccination against hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. *J Gastroenterol Hepatol* 17:S365-9.

Kamili, S., Spelbring, J., Carson, D., Krawczynski, K., 2004. Protective efficacy of hepatitis E virus DNA vaccine administered by gene gun in the cynomolgus macaque model of infection. *J Infect Dis* 15:258-264.

Kanda, T., Gauss-Müller, V., Cordes, S., Tamura, R., Okitsu, K., Shuang, W., Nakamoto, S., Fujiwara, K., Imazeki, F., Yokosuka, O., 2009. Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein. *J Viral Hepat*

Kang, J.H., Lee, K.Y., Kim, C.H., Sim, D., 2004. Changing hepatitis A epidemiology and the need for vaccination in Korea. *Asian Pac J Allergy Immunol* 22:237-242.

Karayiannis, P., Jowett, T., Enticott, M., Moore, D., Pignatelli, M., Brenes, F., Scheuer, P.J., Thomas, H.C., 1986. Hepatitis A virus replication in tamarins and host immune response in relation to pathogenesis of liver cell damage. *J Med Virol* 18:261-276.

Koff, R.S., 1998. Hepatitis A. *Lancet* 351:1643-1649.

Konduru, K., Kaplan, G.G., 2010. Determinants in 3Dpol modulate the rate of growth of hepatitis A virus. *J Virol*. 84:8342-7.

Krawczynski, K.K., Bradley, D.W., Murphy, B.L., Ebert, J.W., Anderson, T.E., Doto, I.L., Nowoslawski, A., Duermeyer, W., Maynard, J.E., 1981. Pathogenetic aspects of hepatitis A virus infection in enterally inoculated marmosets. *Am J Clin Pathol* 76:698-706.

Krkić-Dautović, S., 2005. Persistence of IgM anti-HAV in prolonged form of HAV-infection. *Med Arh* 59:91-93.

Krkić-Dautović, S., 2006. Prolonged forms of hepatitis "A"- clinical and biochemical characteristics. *Med Arh* 60:90-92.

Krugman, S., Giles, J.P., Hammond, J., 1967. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* 1;200:365-73.

Kulkarni, M.A., Walimbe, A.M., Cherian, S., Arankalle, V.A., 2009. Full length genomes of genotype IIIA Hepatitis A Virus strains (1995-2008) from India and estimates of the evolutionary rates and ages. *Infect Genet Evol* 9:1287-1294.

Kusov, Y.Y., Gosert, R., Gauss-Muller, V., 2005. Replication and in vivo repair of the hepatitis A virus genome lacking the poly(A) tail. *J Gen Virol* 86:1363-1368.

Kusov, Y., Gauss-Müller, V., Morace, G., 2007. Immunogenic epitopes on the surface of the hepatitis A virus capsid: Impact of secondary structure and/or isoelectric point on chimeric virus assembly. *Virus Res* 130:296-302.

Kwon, O.S., Byun, K.S., Yeon, J.E., Park, S.H., Kim, J.S., Kim, J.H., Bak, Y.T., Kim, J.H., Lee, C.H., 2000. Detection of hepatitis A viral RNA in sera of patients with acute hepatitis A. *J Gastroenterol Hepatol* 15:1043-1047.

Lapin, B.A., Shevtsova, Z.V., 1990. Persistence of spontaneous and experimental hepatitis A in rhesus macaques. *Exp Pathol* 39:59-60.

Laskus, T., Radkowski, M., Wang, L.F., Nowicki, M., Rakela, J., 2000. Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease; confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol* 2000 74:1014-1017.

Lemon, S.M., Barclay, W., Ferguson, M., Murphy, P., Jing, L., Burke, K., Wood, D., Katrak, K., Sangar, D., Minor, P.D., 1992. Immunogenicity and antigenicity of chimeric picornaviruses which express hepatitis A virus (HAV) peptide sequences: evidence

for a neutralization domain near the amino terminus of VP1 of HAV. *Virology* 188: 285-295.

Lemon, S.M., 1997. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* 43:1494-1499.

Liou, T.C., Chang, T.T., Young, K.C., Lin, X.Z., Lin, C.Y., Wu, H.L., 1992. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 37:197-202.

Locarnini, S.A., Coulepis, A.G., Kaldor, J., Gust, I.D., 1980. Coproantibodies in hepatitis A: Detection by enzyme-linked immunosorbent assay and immune electron microscopy. *J Clin Microbiol* 11:710-716.

Lu, Ling, 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.

MacCallum, F.O., Bradley, W.H., 1944. Transmission of infective hepatitis to human volunteers. *Lancet* 2:228.

MacCallum, F.O., 1947. Homologous serum jaundice. *Lancet* 2:691-692.

Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 15:1292-1305.

Mackiewicz, V., Dussaix, E., Le Petitcorps, M.F., Roque-Afonso, A.M., 2004. Detection of hepatitis A virus RNA in saliva. *J Clin Microbiol* 42:4329-4331.

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.

Malamud D., 1992. Saliva as a diagnostic fluid. *BMJ* 25 :207-208.

Manfredi, R., Calza, L., Chiodo, F., 2005. Changing epidemiology of hepatitis A in the Bologna metropolitan area, northern Italy: importance of counselling and prophylactic measures for the male homo/bisexual population. *Clin Microbiol Infect* 11:845-848.

Programa Nacional de Imunizações, 2006. : Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância à Saúde, Coordenação de Imunizações e Auto-Suficiência em Imunobiológicos – Brasília.

Manso, C.F., Polo, D., Vilariño, M.L., Romalde, J.L., 2010. Genotyping of hepatitis A virus detected in bivalve shellfish in Galicia (NW Spain). *Water Sci Technol* 2010; 61:15-24.

Mao, J.S., Guo, X.Y., Huang, H.Y., Yu, P.H., Huang, B.Z., Ding, Z.C., Chen, N.L., Yu, J.H., Xie, R.Y., 1981. Studies on the transmission of human hepatitis A virus to stump-tailed monkey. *Sci Sin* 24:1590-1596.

Mao, J.S., Chai, S.A., Xie, R.Y., Chen, N.L., Jiang, Q., Zhu, X.Z., Zhang, S.Y., Huang, H.Y., Mao, H.W., Bao, X.N., Liu, C.J., 1997. Further evaluation of the safety and protective efficacy of live attenuated hepatitis A vaccine (H2-strain) in humans. *Vaccine* 15:944-947.

Martin, A., Lemon, S.M., 2006. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* 43:S164-172.

Marziali, A., Akesson, M., 2001. New DNA sequencing methods. *Ann Rev Biomed Eng* 13:195-223.

Mathiesen, L.R., Drucke, J., Lorenz, D., Wagner, J.A., Gerety, R.J., Purcell, R.H., 1978. Localization of hepatitis A antigen in marmoset organs during acute infection with hepatitis A virus. *J Infect Dis* 138:369-377.

Maynard, J.E., Bradley, D.W., Gravelle, C.R., 1975. Preliminary studies of hepatitis A in chimpanzees. *J Infect Dis* 131:194-196.

Maynard, J.E., 1978. Viral hepatitis as an occupational hazard in the health care profession. Viral hepatitis: Etiology, epidemiology, pathogenesis and prevention. In: Vyas, G.N., Cohen, S.N., Schmid, R. (Eds). Philadelphia: Franklin Institute Press, 321-332.

Mbayed, V.A., Sookoian, S., Alfonso, V., Campos, R.H., 2002. Genetic characterization of hepatitis A virus isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Med Virol* 2002 68:168-174.

Medronho, R.A.; Perez, M.A., 2005. Epidemiologia. In: Medronho, R.A. (Eds)., Atheneu, São Paulo, pp. 259-270.

Melnick, J.L., 1982. Classification of hepatitis A virus as enterovirus type 72 and of hepatitis B virus as hepadnavirus type 1. *Intervirology* 18:105-106.

Ministério da Saúde/SVS-SINA. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. [on line]. Brasil. [capturado mar 2010]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>

Minor, P., 1991. Picornaviridae. In: Classification on nomenclature of viruses. In: Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., Brown, F. (Eds.), Arch Virol (Suppl. 2). Wien: Springer-Verlag 320-326.

Molner, J.G., Meyer, K.F., 1940. Jaundice in Detroit. *Am J Public Health Nations Health* 30:509-515.

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.

Morais, L.M., de Paula, V.S., Arantes, M.R., Oliveira, M.A., Gaspar, A.M.C., 2006. Early infection and asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care in Rio de Janeiro, Brazil: Should attending children under two years of age be vaccinated? *Mem Inst Osw Cruz* 101:401-405.

Morris-Cunnington, M.C., Edmunds, W.J., Miller, E., Brown, D.W., 2004. A novel method of oral fluid collection to monitor immunity to common viral infections. *Epidemiol Infect* 132:35-42.

Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwe, C.T., 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24:954-958.

Naganuma, M., Tominaga, N., Miyamura, T., Soda, A., Moriuchi, M., Moriuchi, H., 2008. TT virus prevalence, viral loads and genotypic variability in saliva from healthy Japanese children. *Acta Paediatr* 97:1686-1690.

Nainan, O.V., Margolis, H.S., Robertson, B.H., Balayan, M., Brinton, M.A., 1991. Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J Gen Virol* 72 (Pt 7):1685-1689.

Nainan, O.V., Armstrong, G.L., Han, X., Williams, I.T, Bell, B.P., Margolis, H.S., 2005. Hepatitis A molecular epidemiology in the United States, 1996-1997: sources of infection and implications of vaccination policy. *J Infect Dis* 191:957-963.

Normann, A.M., Pfistere-Hunt, Schade, S., Graff, J., Chaves, R.L., Crovari, P., Icardi, G., Flehmig, B. 1995. Molecular epidemiology of an outbreak of hepatitis A in Italy. *J Med Virol* 47:467-471.

Normann, A., Jung, C., Vallbracht, A., Flehmig, B., 2004. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J Med Virol* 72:10-16.

Oba, I.T., Spina, A.M.M., Saraceni, C.P., Lemos, M.F., Senhoras, R.C.F. A, Moreira, R.G., Granato, C.F.H., 2000. Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 42:1-9.

Ochnio, J.J., Scheifele, D.W., 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* 35:98-101.

Papathanasopoulos, M.A., Hunt, G.M., Tiemessen, C.T., 2003. Evolution and diversity of HIV-1 in Africa--a review. *Virus Genes* 26:151-63.

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., 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., 1993. Simple and reliable salivary test for HIV and hepatitis A and B virus diagnosis and surveillance. *Ann NY Acad Sci* 694:216-233.

Paul, A.V., Tada, H., Von der Helm, K., Wissel, T., Kiehn, R., Wimmer, E., Deinhardt, F., 1987. The entire nucleotide sequence of the genome of human hepatitis A virus (isolate MBB). *Virus Res* 8:153-171.

Paul, J.R., Havens, W.P., Sabin, A.B., Philip, C.B., 1945. Transmission experiments in serum jaundice and infectious hepatitis. *JAMA* 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* 8:565-580.

Peters, K., Wiktorowicz, T., Heinkelein, M., Rethwilm, A., 2005. RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J Virol* 79: 7005-7013.

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.

Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Clemente-Casares, P., Jofre, J., Girones, R., 2001. genetic analyses of hepatitis A virus strains recovered from the environmental and from patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 82:2955-2963.

Ping, L.H., Jansen, R.W., Stapleton, J.T., Cohen, J.I., Lemon, S.M., 1988. Identification of an immunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8281-8285.

Ping, L.H., Lemon, S.M., 1992. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol* 66:2208-2216.

Pink, R., Simek, J., Vondrakova, J., Faber, E., Michl, P., Pazdera, J., Indrak, K., 2009. Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 153:103-110.

Pinto, M.A., Marchevsky, M.L., Baptista, M.L., De Lima, M.A., Pelajo-Machado, M., Vitral, C.L., Kubelka, C.F., Pissurno, J.W., Franca M.S., Schatzmayr, H.G., Gaspar, A.M.C., 2002. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: early detection of HAV antigen and viral fate. *Exp Toxicol Pathol* 53: 413-420.

Pintó, R.M., Aragonès, L., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A., 2007. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res* 127:158-163.

Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl Environ Microbiol* 75:7350-7355.

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.

Poovorawan, Y., Theamboonlers, A., Chongsrisawat, V., Jantaradsamee, P., Chutsirimongkol, S., Tangkijvanich, P., 2005. Clinical features and molecular characterization of hepatitis A virus outbreak in a child care center in thailand. *J clin Virol* 32: 24-28.

Prevot, S., Marechal, J., Pillot, J., Prevot, J., 1992. Relapsing hepatitis A in Saimiri monkeys experimentally reinfected with a wild type hepatitis A virus (HAV). *Arch Virol Suppl* 4:5-10.

Prikazsky, V., Oleár, V., Cernoch, A., Safary, A., Andre, F.E., 1994. Interruption of an outbreak of hepatitis A in two villages by vaccination. *J Med Virol* 44: 457-459

Probst, C., Jecht, M., Gauss-Muller, V., 1999. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *J Biol Chem* 274: 4527-4531.

Provost, P.J., Wolanski, B.S., Miller, 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.

Purcell, R.H., D'Hondt, E., Bradbury, R., Emerson, S.U., Govindarajan, S., Binn, L., 1992. Inactivated hepatitis A vaccine: active and passive immunoprophylaxis in chimpanzees. *Vaccine* 10 (Suppl 1):S148-51.

Purcell, R.H., Wong, D.C., Shapiro, M., 2002. Relative infectivity of hepatitis A virus by the oral and intravenous routes in 2 species of nonhuman primates. *J Infect Dis* 185:1668-1671.

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* 22:195-202.

Radha Krishna, Y., Saraswat, V.A., Das, K., Himanshu, G., Yachha, S.K., Aggarwal, R., Choudhuri, G., 2009. Clinical features and predictors of outcome in acute hepatitis A and hepatitis E virus hepatitis on cirrhosis. *Liver Int* 29:392-398.

Randhawa, J.S., Easton, A.J., 1999. Demystified...DNA nucleotide sequencing. *Mol Pathol* 52:117-124.

Rico-Hesse, R., Pallash, M.A., Nottay, B.K., Kew, O.M., 1987. Geographic distribution of wild type poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 160: 311-322.

Rigotto, C., Kolesnikovas, C.K., Moresco, V., Simões, C.M., Barardi, C.R., 2009. Evaluation of HA negatively charged membranes in the recovery of human adenoviruses and hepatitis A virus in different water matrices. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:970-974.

Robertson, B.H., Khanna, B., Nainan, O.V., Margolis, H.S., 1991. Epidemiologic patterns of wild-type hepatitis A virus determined by genetic variation. *J Infect Dis* 163:286-292.

Robertson, B.H., Jansen, R.W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O.V., Sieg, G., Widell, A., Margolis, H.S., Isomoura, S., Ito, K., Ishizu, T., Moritsuga, Y., Lemon, S.M., 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographic regions. *J Gen Virol* 73:1365-1377.

Robertson, B.H., Averhoff, F., Cromeans, T.L., Han, X., Khoprasert, B., Nainan, O.V., Rosenberg, J., Paikoff, L., DeBess, E., Shapiro, C.N., Margolis, H.S., 2000. Genetic relatedness of hepatitis A virus isolates during a community-wide outbreak. *J Med Virol* 62:144-150.

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.

Rossmann, M.G., He, Y., Kuhn, R.J., 2002. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol* 10:324-331.

Roy, K.M., Bagg, J., McCarron, B., Good, T., Cameron, S., Pithie, A., 1998. Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. *J Med Virol* 54:271-275.

Sagliocca, L., Amoroso, P., Stroffolini, T., Adamo, B., Tosti, M.E., Lettieri, G., Esposito, C., Buonocore, S., Pierri, P., Mele, A., 1999. Efficacy of hepatitis A vaccine in prevention of secondary hepatitis A infection: a randomised trial. *Lancet* 3: 1136-1139.

Sánchez, G., Pintó, R.M., Vanaclocha, H., Bosch, A., 2002. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J Clin Microbiol* 40:4148-4155.

Sánchez, G., Bosch, A., Gómez-Mariano, G., Domingo, E., Pintó, R.M., 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315:34-42.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.

Santos, D.R., Villar, L.M., Paula, V.S., Lima, G.S., Gaspar, A.M., 2008. Hepatitis A virus subgenotypes dissemination during a community outbreak in a surrounding region of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:254-258.

Santos, N.S., 2008. Hepatite A. In: Introdução a Virologia humana. Guanabara Koogan (Eds.), 2ed – Rio de Janeiro.

Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. 8º Boletim Informativo de Hepatites Virais. <http://www.saude.rj.gov.br/hepatites> (acessado em janeiro de 2010)

Scholz, E., Heinrich, U., Flehmig, B., 1989. Acid stability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 70 (Pt 9):2481-2485.

Shapshak, P., Segal, D.M., Crandall, K.A., Fujimura, R.K., Zhang, B.T., Xin, K.Q., Okuda, K., Petito, C.K., Eisdorfer, C., Goodkin, K., 1999. Independent evolution of HIV type 1 in different brain regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:811-820.

Shevtsova, Z.V., Lapin, B.A., Doroshenko, N.V., Krilova, R.I., Korzaja, L.I., Lomovskaya, I.B., Dzheleva, Z.N., Zairov, G.K., Stakhanova, V.M., Belova, E.G., 1988. Spontaneous and experimental hepatitis A in Old World monkeys. *J Med Primatol* 17:177-194.

Siegl, G., Weitz, M., 1993. Pathogenesis of hepatitis A: persistent viral infection as basis of an acute disease? *Microbiol Pathog* 14:1-8.

Silberstein, E., Dveksler, G., Kaplan, G.G., 2001. Neutralization of hepatitis A virus (HAV) by an immunoadhesin containing the cysteine-rich region of HAV cellular receptor-1. *J Virol* 75:717-725.

Silberstein, E., Xing, L., Van de Beek, W., Lu, J., Cheng, H., Kaplan, G.G., 2003. Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin-and mucin-like regions. *J Virol* 77:8765-8774.

Silva, A.M., Vieira, H., Martins, N., Granja, A.T., Vale, M.J., Vale, F.F., 2010. Viral and bacterial contamination in recreational waters: a case study in the Lisbon bay area. *J Appl Microbiol* 108:1023-1031.

Silva, P.de. C., Vitral, C.L., Barcellos, C., Kawa, H., Gracie, R., Rosa, M.L., 2007. Hepatitis A in the city of Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological pattern and socio-environmental variables. Cross-analysis of SINAN and population census data. *Cad Saude Publica* 23:1553-1564.

Smith, P.F., Grabau, J.C., Werzberger, A., Gunn, R.A., Rolka, H.R., Kondracki, S.F., Gallo, R.J., Morse, D.L., 1997. The role of young children in a community-wide outbreak of hepatitis A. *Epidemiol Infect* 118:243-252.

Sobsey, M.D., Shields, P.A., Hauchman, F.S., Davis, A.L., Rullman, V.A., Bosch, A., 1998. Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples. In: Zuckerman, A.J. (Eds.), *Viral hepatitis and liver disease*. New York: Alan R. Liss, 121-124.

Solodovnikov, IuP., Tibekin, A.T., Berglezova, L.N., Serdiukova, O.F., Fokina, I.V., Eremin, I.G., Zaitsev, B.E., 2003. Viral hepatitis A: epidemiologic role of parenteral route of transmission. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2:116-118.

Stapleton, J.T., Lemon, S.M., 1987. Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on hepatitis A virus. *J Virol* 61:491-498.

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.

Stevens, W., 2009. Can oral fluid testing be used to replace blood-based HIV rapid testing to improve access to diagnosis in South Africa? *J Acquir Immune Defic Syndr* 51:646-648; author reply 648-9. Scott, L.E., Noble, L.D., Langeveldt, M., Jentsch, U., Francois Venter, W.D.

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* 109:161-166.

Tam, A.W., White, R., Yarbough, P.O., Murphy, B.J., McAtee, C.P., Lanford, R.E., Fuerst, T.R., 1997. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 238:94-102.

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 Latina America. *Vaccine* 18: S57-S60.

Tapia-Conyer, R., Santos, J.I., Cavalcanti, A.M., Urdaneta, E., Rivera, L., Manterola, A., Potin, M., Ruttiman, R., Tanaka, Kido, J., 1999. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *Am J Trop Med Hyg* 61:825-829.

Taylor, M.B., 1997. Molecular epidemiology of South African strains of hepatitis A virus: 1982-1996. *J Med Virol* 51:273-279.

Tesar, M., Harmon, S.A., Summers, D.F., Ehrenfeld, E., 1992. Hepatitis A virus polyprotein synthesis initiates from two alternative AUG codons. *Virology* 186:609-618.

Teterina, N.L., Bienz, K., Egger, D., Gorbalenya, A.E., Ehrenfeld, E., 1997. Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology* 237:66-77.

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.

Tjon, G.M., Coutinho, R.A., Van den Hoek, A., Esman, S., Wijkmans, C.J., Hoebe, C.J., Wolters, B., Swaan, C., Geskus, R.B., Dukers, N., Bruisten, S.M., 2006. High and persistent excretion of hepatitis A virus in immunocompetent patients. *J Med Virol* 78:1398-1405.

Tong, M.J., el-Farra, N.S., Grew, M.I., 1995. Clinical manifestations of hepatitis A: recent experience in a community teaching hospital. *J Infect Dis* 171(Suppl 1):S15-18.

Totsuka, A., Moritsugu, Y., 1999. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology* 42:63-68.

Toyoda, H., Kumada, T., Kiriya, S., Sone, Y., Tanikawa, M., Hisanaga, Y., Kanamori, A., Lin, C.L., Liu, H.F., 2009. Clinical and molecular characteristics of hepatitis A virus infections during the years 1992-2003 in Ogaki, a centrally located city of Japan. *J Clin Virol* 44:145-148.

Trahan, C.J., LeDuc, J.W., Staley, E.C., Binn, L.N., Marchwicki, R.H., Lemon, S.M., Keenan, C.M., Bancroft, W.H., 1987. Induced oral infection of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*) with hepatitis A virus. *Lab Anim Sci* 37:45-50.

Tsarev, S.A., Emerson, S.U., Balayan, M.S., Ticehurst, J., Purcell, R.H., 1991. Simian hepatitis A virus (HAV) strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *J Gen Virol* 72:1677-1683.

Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Govindarajan, S., Shapiro, M., Gerin, J.L., Purcell, R.H., 1994. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10198-202.

Vacchino, M.N., 2008. Incidence of Hepatitis A in Argentina after vaccination. *J Viral Hepat* 15 (Suppl 2):47-50.

Vainio, K., Samdal, H.H., Anestad, G., Wedege, E., Skutlaberg, D.H., Bransdal, K.T., Mundal, R., Aaberge, I.S., 2008. Detection of measles- and mumps-specific IgG antibodies in paired serum and oral fluid samples from Norwegian conscripts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:461-465.

Vale, S., 2005. Hepatitis A associated with green onions. *N Engl J Med* 353:2300-2301.

Van Damme, P., Thoelen, S., Cramm, M., De Groote, K., Safary, A., Meheus, A., 1994. Inactivated hepatitis A vaccine: reactogenicity, and long-term antibody persistence. *J Med Virol* 44:446-451.

Villar, L.M., Esteves da Costa Mdo, C., de Paula, V.S., Gaspar, A.M., 2002. Hepatitis A outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:301-305.

Villar, L.M., Lampe, E., Meyer, A., Gaspar, A.M., 2004. Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Braz J Med Biol Res* 37:1779-1787.

Villar, L.M., Morais, L.M., Aloise, R., Melo, M.M., Calado, I.A., Lampe, E., Gaspar, A.M., 2006. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res* 39:873-881.

Villar, L.M., de Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Guimarães, F.R., Ferreira, F.F., Shubo, T.C., Miagostovich, M.P., Lampe, E., Gaspar, A.M., 2007. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol* 45:168-173.

Vitral, C.L., Marchevsky, R.S., Yoshida, C.F., Coelho, J.M., Gaspar, A.M., Schatzmayr, H.G., 1995. Intra-gastric infection induced in marmosets (*Callithrix jacchus*) by a Brazilian hepatitis A virus (HAF-203). *Braz J Med Biol Res* 28:313-321.

Vitral, C.L., Yoshida, C.F., Gaspar, A.M., 1998a. The use of non-human primates as animal models for the study of hepatitis viruses. *Braz J Med Biol Res* 31:1035-1048.

Vitral, C.L., Yoshida, C.F., Lemos, E.R., Teixeira, C.S., Gaspar, A.M., 1998b. 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.

Vitral, C.L., Gaspar, A.M.C., Souto, F.J.D., 2006. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002 – A. *Mem Inst Osw Cruz* 101:119-127.

Vitral, C.L., Souto, F.J., Gaspar, A.M., 2008. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. *J Viral Hepat* 15 (Suppl 2):22-25.

Wang, C.H., Tschen, S.Y., Heinrich, U., Weber, M., Flehmig, B., 1996. Immune response to hepatitis A virus capsid proteins after infection. *J Clin Microbiol*; 34:707-713.

Wang, C.C., Morishima, C., Chung, M., Engelberg, R., Krantz, E., Krows, M., Sullivan, D.G., Gretch, D.R., Corey, L., 2006. High serum hepatitis C virus (HCV) RNA load predicts the presence of HCV RNA in saliva from individuals with chronic and acute HCV infection. *J Infect Dis* 193:672-676.

Warburton, A.R., Wreghitt, T.G., Rampling, A., Buttery, R., Ward, K.N., Perry, K.R., Parry, J.V., 1991. Hepatitis A outbreak involving bread. *Epidemiol Infect* 106:199-202.

Waterman, F.A., Ibrahim, J.K., 2009. Foodborne outbreaks and agricultural practices: should public health prevention start in the field? *J Environ Health* 71:61-63.

Werzberger, A., Mense, B., Kuter, B., Brown, L., Lewis, J., Sitrin, R., Miller, W., Shouval, D., Wiens, B., Calandra, G., Ryan, J., Provost, P., Nalin, D., 1992. A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. *N Engl J Med* 327:453-457.

Wheeler, C., Vogt, T.M., Armstrong, G.L., Vaughan, G., Weltman, A., Nainam, O.V., Dato, V., Xia, G., Waller, K., Amon, J., Lee, T.M., Highbaugh-Battle, A., Hembree, C., Evenson, S., Ruta, M.A., Williams, I.T., Fiocre, A.E., Bell, B.P., 2005. An outbreak of hepatitis A associated with green onion. *N Engl J Med* 353:890-897.

Wiedmann, M., Boehm, S., Schumacher, W., Swysen, C., Zauke, M., 2003. Evaluation of three commercial assays for the detection of hepatitis a virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:129-130.

Wiens, B.L., Bohidar, N.R., Pigeon, J.G., Egan, J., Hurni, W., Brown, L., Kuter, B.J., Nalin, D.R., 1996. Duration of protection from clinical hepatitis A disease after vaccination with VAQTA. *J Med Virol* 49:235-241.

Yi, M., Lemon, S.M., 2002. Replication of subgenomic hepatitis A virus RNAs expressing firefly luciferase is enhanced by mutations associated with adaptation of virus to growth in cultured cells. *J Virol* 76:1171-1180.

Yokosuka, O., 2000. Molecular biology of hepatitis A virus: significance of various substitutions in the hepatitis A virus genome. *J Gastroenterol Hepatol* 15 (Suppl D) 91-97.

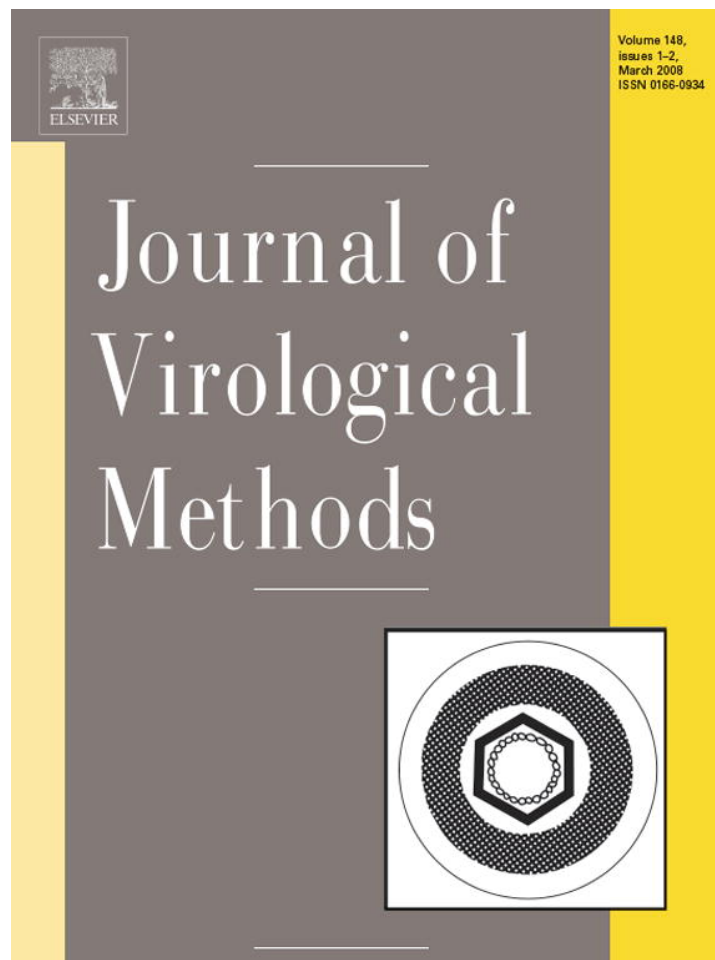
Yoon, Y.K., Chun, B.C., Lee, H.K., Seo, Y.S., Shin, J.H., Hong, Y.S., Sim, H.S., Kim, J.Y., Kim, J.Y., Park, Y.S., Park, D.W., Sohn, J.W., Kim, M.J., 2009. Epidemiological and genetic analysis of a sustained community-wide outbreak of hepatitis A in the Republic of Korea, 2008: a hospital-based case-control study. *J Clin Virol* 46:184-188.

Yoshizawa, H., Itoh, Y., Iwakiri, S., Tsuda, F., Nakano, S., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1980. Diagnosis of type A hepatitis by fecal IgA antibody against hepatitis A antigen. *Gastroenterology* 78:114-118.

Zhang, H., Chao, S.F., Ping, L.H., Grace, K., Clarke, B., Lemon, S.M., 1995. An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: Genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect. *Virology* 212:686-697.

Zhuang, F.C., Qian, W., Mao, Z.A., Gong, Y.P., Jiang, Q., Jiang, 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.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA

Luciane A. Amado^{a,*}, Livia M. Villar^b,
Vanessa S. de Paula^a, Ana Maria C. Gaspar^a

^a *Laboratory of Technological Development, Department of Virology, Oswaldo Cruz Institute Foundation (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900, Brazil*

^b *Laboratory of Viral Hepatitis, Department of Virology, Oswaldo Cruz Institute Foundation (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900, Brazil*

Received 24 May 2007; received in revised form 23 October 2007; accepted 26 October 2007
Available online 21 December 2007

Abstract

Due to the ease of collection, oral fluid is being investigated as an alternative to serum for diagnostic and epidemiological purposes. However, for prospective studies involving hepatitis A virus (HAV) RNA detection, a standard methodology must be developed. In the present study, nested RT-PCR and real-time PCR were optimized and evaluated for HAV detection and quantification, using oral fluid from healthy volunteers ($n = 20$) and paired serum/oral fluid samples from individuals involved in a hepatitis A outbreak ($n = 78$). Using nested RT-PCR, HAV RNA was detected in 50% of oral fluid and in 42% of serum samples from acute cases, as well as in 12% of all samples from cases without IgM and total anti-HAV. Using real-time PCR, HAV RNA was detected in 61% of oral fluid and in 71% of serum samples from acute cases, as well as in 17 and 12%, respectively, from patients without HAV markers. Mean viral loads were $1.7 \pm 3.24 \times 10^3$ copies/ml in oral fluid and $2.8 \pm 6.46 \times 10^3$ copies/ml in serum. Although nested RT-PCR and real-time PCR both detected HAV RNA in oral fluid, real-time PCR was more sensitive. Oral fluid sample testing could be used as a noninvasive method of detecting HAV RNA during HAV outbreaks.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Oral fluid; Hepatitis A virus; Nested RT-PCR; Real-time PCR

1. Introduction

Hepatitis A virus (HAV) infection is a public health problem worldwide. The viral genome consists of a linear, positive sense, single-stranded RNA that is approximately 7.5 kb in length (Provost et al., 1975). HAV is transmitted by the fecal-oral route, in developing countries can be acquired through person-to-person contact or through ingestion of contaminated water or food (Hutin et al., 1999). Poor hygiene conditions and crowding are often contributing factors in the spread of the virus and in the occurrence of hepatitis A outbreaks, especially in schools and day care centers (Villar et al., 2004; Morais et al., 2006).

Although outbreaks are often investigated using only epidemiological and serological studies, molecular investigation of hepatitis A cases and their contacts is essential since nucleotide sequence data can be used to identify links between apparently sporadic cases or apparently distinct outbreaks (Stene-Johansen et al., 2002), as well as to determine the sources of infection, thereby allowing the implementation of corrective measures. During the window period of infection, HAV RNA can be present in serum samples, and viral RNA detection is therefore an important tool for diagnosing asymptomatic individuals, as well as acute hepatitis cases of unknown etiology (De Paula et al., 2004).

Serological testing is the gold standard method of screening for HAV infection. However, it has been proposed that oral fluid could replace serum in the specific antibody detection used in order to diagnosis viral hepatitis (Parry, 1993; Oba et al., 2000; De Cock et al., 2004). The difficulties in collecting blood from children and the elderly has prompted interest in the analysis of oral fluid, as has the fact that such analysis is convenient, non-invasive, cost-effective and safer than serum analysis in terms

* Corresponding author at: Departamento de Virologia, Pavilhão Rocha Lima, sala 520, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Cx Postal 926, Av. Brasil 4365, Cep: 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 2598 4483; fax: +55 21 2270 6397.

E-mail address: L.amado@ioc.fiocruz.br (L.A. Amado).

of the collection, testing and disposal of samples. As a result, tests designed to detect viral antibodies in oral fluid have been developed (Hutse et al., 2005; Yaari et al., 2006; Amado et al., 2006).

The future use of an oral fluid-based testing will likely increase because of the inherent advantages of this technology: convenience; avoidance of inadvertent transmission of blood-borne pathogens; and ease of use in pediatric and geriatric populations.

The detection of viral genomes in oral fluid provides a non-invasive means of investigating hepatitis A outbreaks. In two recent studies, HAV RNA was detected in saliva samples by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and by real-time PCR. However, those studies produced conflicting results, the rate of HAV detection ranging from 0 (Poovorawan et al., 2005) to 83% (Mackiewicz et al., 2004) which underscores the need for a standardized molecular assay for HAV detection in oral fluid.

The main objective of this study was to standardize molecular methods for the detection of HAV in oral fluid samples using nested RT-PCR and real-time PCR and to evaluate the feasibility of using oral fluid samples, rather than serum samples, during a hepatitis A outbreak.

2. Material and methods

2.1. Specimens

2.1.1. Standardization using samples collected from healthy individuals

To standardize the assay, oral fluid samples were collected from 20 healthy adult volunteers without anti-HAV markers. All samples were collected using OraSure collection devices (Epitope Incorporated, Beaverton, OR, USA) according to the manufacturer instructions. The samples were later recovered by centrifugation at $2500 \times g$ for 15 min at 10°C and stored at -20°C until analysis. All of these samples were mixed together to produce a pool of saliva. To obtain saliva-positive HAV controls, this pool of saliva was inoculated with 1 ml of HAV concentrated from cell culture (HAF-203; Gaspar et al., 1993), containing 6×10^6 copies/ml (real-time PCR). The pool was then submitted to 10-fold serial dilutions (ranging from 6×10^6 to 6×10^1 copies/ml). To evaluate PCR inhibitors in saliva, HAV from cell culture was also added to ultra pure water, which was then also submitted to 10-fold serial dilutions.

2.1.2. Samples collected from individuals suspected of being infected with HAV

A total of 78 paired serum and saliva samples were collected from individuals involved in a hepatitis A outbreak that occurred in a day care center. The oral fluid samples were collected as described above. Total blood samples were collected by venipuncture into sterile tubes, after which serum was obtained by centrifugation and stored at -20°C . Blood samples are conventionally used for serological and molecular diagnosis of HAV and it was used as the 'gold standard' (Ochnio et al., 1997) for comparison with oral fluid tests. These 78 sample pairs were

selected for inclusion in this study based on their antibody status. These paired samples were submitted to a modified ELISA as described previously (Amado et al., 2006) and the results showed that 52 were IgM anti-HAV positive, whereas 26 were IgM negative and total anti-HAV negative. All oral fluid and serum specimens were processed on the day of collection. Oral fluid samples were inspected visually for blood contamination. Permission for the collection and testing of samples was obtained from the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation.

2.2. Detection of HAV RNA in oral fluid samples

The detection of HAV RNA in oral fluid samples was standardized based on protocols described previously for serum samples (De Paula et al., 2002).

2.2.1. RNA extraction from oral fluid samples

Three different techniques usually used to extract viral RNA were evaluated in terms of their effectiveness for detecting HAV RNA in oral fluid samples: the TRIzol method (Chomczynski and Sacchi, 1987), the silica method (Boom et al., 1990) and a commercial kit (QIAamp viral RNA minikit; QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany). Standardization was achieved using 10-fold serial dilutions of saliva-positive HAV controls obtained from healthy volunteers. For each protocol, the experiments were carried out in triplicate.

In the TRIzol method, 100 μl of oral fluid were mixed with 800 μl of TRIzol[®] LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 200 μl of chloroform. After centrifugation at $8000 \times g$ for 20 min at 4°C , the upper phase was precipitated with 600 μl of isopropanol at -20°C for 18 h. After an additional centrifugation, the pellet was washed with 70% ethanol, air dried, and finally resuspended in 10 μl ultrapure DNase/RNase-free water (Invitrogen).

In the silica method, 100 μl of oral fluid was added to a mixture containing 30 μl of size fractionated silica particles and 200 μl of L6 lysis buffer (8 M guanidine isothiocyanate; 0.1 M Tris-HCL at pH 6.4; 36 mM EDTA), after which the sample was maintained at room temperature for 10 min. After centrifugation, the pellet was washed once with 200 μl of L2 washing buffer (10 M guanidine isothiocyanate; 0.1 M Tris-HCL) at pH 6.4, twice with 500 μl of 70% (v/v) ethanol and once with 500 μl of acetone. The pellet was dried at 56°C for 10 min, and the nucleic acids were eluted with 1 μl of RNasin (Invitrogen) in 60 μl of water at 56°C for 10 min. The tube was centrifuged at $8000 \times g$ for 2 min to sediment the silica particles and the supernatant containing the RNA was used for cDNA synthesis.

Extraction with the commercial QIAamp viral RNA minikit was performed using 140 μl of oral fluid and according to the manufacturer instructions.

2.2.2. Reverse transcription

For cDNA synthesis in oral fluid samples, Moloney Murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase and Superscript II H⁻ reverse transcriptase (both purchased from Invitrogen) were evaluated by testing 10 IgM anti-HAV-positive saliva samples. All reverse transcription was carried out using 10 μl of

RNA, 20 pmol/ μ l of random primer (Invitrogen), 1 U/ μ l of RNasin (Promega, Madison, WI, USA), 125 mM deoxynucleoside triphosphates and 1 U/ μ l of reverse transcriptase (MMLV or Superscript, in a final volume of 20 μ l) at 37 °C for 1 h (for MMLV) or 42 °C for 1 h (for Superscript), followed by incubation for 10 min at 65 °C.

2.2.3. Qualitative PCR

To standardize the nested RT-PCR, three conditions were evaluated: *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l; Invitrogen) in a volume of 0.15 μ l (0.75 U) and 0.3 μ l (1.5 U); cDNA volume (5 and 10 μ l); and number of amplification cycles (30 and 40 cycles). The PCR was carried out using a final volume of 25 μ l. The VP1/2A junction region of the HAV genome was amplified through nested PCR using primers and conditions described elsewhere (De Paula et al., 2002), modifying only the parameters cited above. The PCR products were loaded onto 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide to visualize bands of an expected length of 247 bp. Each PCR experiment included the ultrapure DNase/RNase-free water as a negative control.

2.2.4. Quality standards of qualitative PCR

To determine the sensitivity of the qualitative PCR, the 10-fold serial dilutions of saliva-positive HAV controls (ranging from 6×10^6 to 6×10^1 copies/ml) were evaluated. In order to determine PCR inhibitors in saliva samples, the results for saliva-positive HAV controls were compared with those for the ultrapure water sample containing HAV.

In order to determine whether there was a relationship between HAV RNA detection in oral fluid samples and blood contamination of those samples, a commercial kit (URISTIK[®] kit; DIRUI Industrial Co. Ltd., Changchun, China) was used to detect hemoglobin ('hidden blood') macroscopically in oral fluid. The URISTIK kit, which is designed to detect hemoglobin in urine by visualization of reagent bands, was adapted for hemoglobin detection in oral fluid samples. To validate the URISTIK tests, oral fluid samples from negative volunteers were collected and evaluated through flow cytometry, which detected no blood. Subsequently, these samples were tested using the URISTIK kit, and all tested negative for blood (no false-positive results). To validate positive controls, some oral fluid samples were spiked with blood diluted in PBS to various concentrations (1:250.000, 1:750.000 and 1:1000.000). These contaminated oral fluid samples were analyzed using the URISTIK kit, and all tested positive for blood (no false-negative results).

2.2.5. TaqMan real-time PCR

To test the correlation between serum and oral fluid samples viral load, HAV RNA was quantified using the real-time TaqMan assay. In order to create standard curve points in real-time PCR, it was used a recombinant clone of the 5' noncoding (NC) region of the HAV strain HAF-203, quantified using a spectrophotometer (DU[®]460; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Cloned HAV was submitted to 10-log serial dilution to generate a standard curve. The standard curve was linear over the range from 1.4×10^1 to 1.4×10^8 copies/ml, with a slope of -3.39 (corre-

lation coefficient, 0.998). The detection limit of the assay was 14 copies of viral RNA per reaction.

Specific primers for HAV 5' NC and a single-labeled 5' FAM probe were designed based on the sequence of the cloned HAV, using Primer Express software, version 2.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), forward primer numbering as wild-type (M14707) 86–109 5' CTGCAGGTTTCAGGGTTCTTAAATC 3', reverse primers 219–240 5' GAGACCCTGGAAGAAAGAAGA 3' and HAV-probe 198–218 (FAM-5'ACTCATTTTTTCACGCTTTCTG 3'). All PCR procedures were performed using an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Wells contained 1 \times TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 12.5 μ l of assay (300 nM of each primer, 150 nM of probe). In addition, 5 μ l of standard curve points or cDNA of samples were added to 20 μ l of the PCR master mix (samples were run in duplicate). The thermal cycling conditions comprised an initial step at 50 °C for 2 min, followed by a denaturation step at 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min (De Paula et al., 2007).

2.2.6. Quality standards of quantitative PCR

The real-time sensitivity and reproducibility were determined using 10-fold serial dilution of saliva-positive HAV controls. However, to determine the reproducibility, these samples were examined in quadruplicate during each real-time PCR run (intra-assay) and on 4 consecutive days (inter-assay). The reproducibility of the real-time PCR was also determined by testing three HAV-seropositive and three HAV saliva-positive specimens, all samples were evaluated in triplicate. In order to distinguish negative from false-negative results related to PCR inhibition by substances present in saliva, a pre-optimized exogenous internal positive control (TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagent; Applied Biosystems) was spiked into HAV-RNA negative saliva samples. In the real-time PCR, the target (5' NC region of HAV) and internal positive control (non-human virus DNA) are amplified simultaneously. The internal positive control DNA was detected using a VIC-labeled probe, allowing it to be discriminated from the HAV RNA detected using the FAM-labeled probe. A negative result for the target and for internal positive control suggests PCR inhibition.

2.2.7. Evaluation of the performance of the nested RT-PCR and real-time PCR in oral fluid samples

After optimization of the methods, tests were also conducted to compare serum and saliva samples from individuals involved in an HAV outbreak and thus to assess the performance of these assays. Seventy-eight sample pairs collected from individuals involved in a hepatitis A outbreak (occurring in 2004 at a day care center in Rio de Janeiro, Brazil) were analyzed. Among these individuals, 52 samples were IgM anti-HAV positive and 26 were IgM/total anti-HAV negative.

2.3. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.D. Proportions of HAV RNA in saliva were examined in relation to the clinical

and sociodemographic variables, applying the chi-square (χ^2) test for independence, with Yates' continuity correction and Fisher's exact test when appropriate. To assess continuous variables, the Student's *t*-test or Mann–Whitney test was used as appropriate. A two-tailed $p < 0.05$ was considered statistically significant. The statistical package Instat GraphPad® 3.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used.

3. Results

3.1. Standardization of RT-PCR for HAV RNA detection in oral fluid samples

The use of the QIAamp kit was found to be the most efficient method, with a detection limit of 6×10^3 copies/ml. The silica method showed a detection limit of 6×10^4 copies/ml, compared with 6×10^5 copies/ml for the TRIzol method (Fig. 1). Therefore, the commercial QIAamp kit was chosen for use in the HAV RNA extraction from oral fluid samples. After verification of viral RNA extraction from oral fluid samples, the efficiency of the two reverse transcriptases (MMLV and Superscript) was tested in 10 IgM anti-HAV-positive oral fluid samples. Superscript demonstrated the greatest efficiency in the reverse transcription of oral fluid samples, generating positive scores in 7/10, compared with only 2/10 for MMLV (Fig. 2). Based on these data, Superscript was chosen for subsequent reverse transcription reactions.

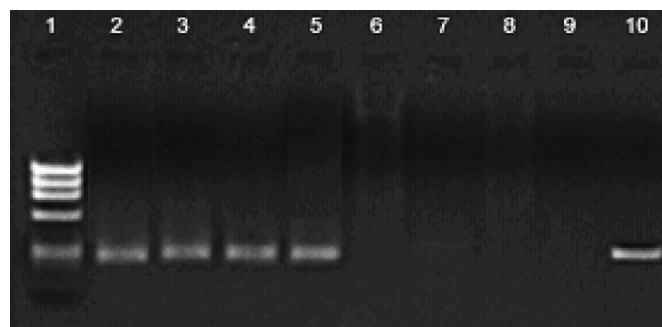


Fig. 3. The detection limit of HAV RNA using nested RT-PCR in saliva samples. Nested RT-PCR products were visualized by 1.5% agarose gel analysis and ethidium bromide staining. Lanes: (1) ϕ X 174 DNA ladder for molecular size standard; (2) HAF-203 (6×10^6 copies/ml); (3) HAF-203 diluted 1:10 (6×10^5 copies/ml); (4) HAF-203 diluted 1:10² (6×10^4 copies/ml); (5) HAF-203 diluted 1:10³ (6×10^3 copies/ml); (6–8) HAF-203 diluted 1:10⁴ to 1:10⁰ (6×10^2 to 6×10^0 copies/ml); (9) negative control; (10) positive control.

The nested RT-PCR parameters were determined by increasing the cDNA and *Taq* polymerase volume to 10 and 0.3 μ l (1.5 U), respectively, drawing comparisons with a previously developed method of detecting HAV in serum (De Paula et al., 2002). The increased volume made this system more reliable for HAV detection in oral fluid samples, generating positive scores in 8/10 samples.

After optimization of the nested RT-PCR, the sensitivity of the technique was 6×10^3 copies/ml, which was the lower limit of detection (Fig. 3).

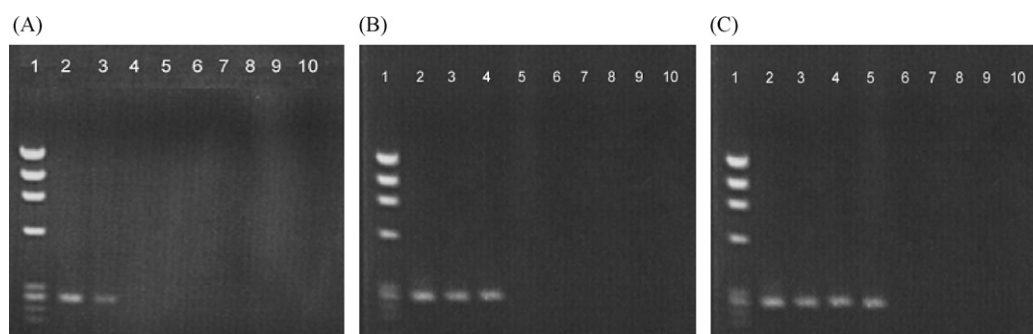


Fig. 1. Comparative sensitivities of nested RT-PCR detection after three different RNA extraction methods, as analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis of amplification products. Methods: (A) TRIzol; (B) Silica; (C) QIAamp kit. Lanes: (1) ϕ X 174 DNA ladder for molecular size standard; (2–9) HAF-203 diluted from 6×10^6 to 6×10^{-1} copies/ml; (10) negative control.

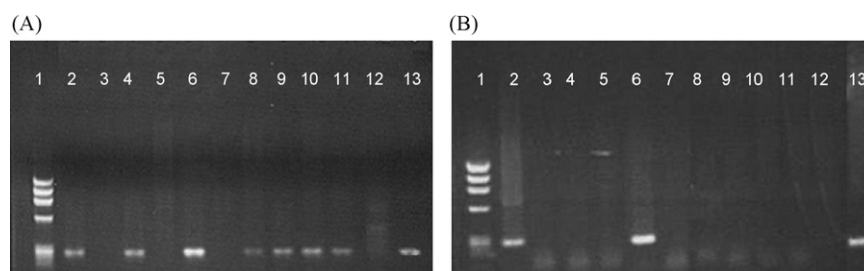


Fig. 2. Comparative detection of HAV RNA in IgM anti-HAV-positive saliva samples using two different reverse transcriptase enzymes. Nested RT-PCR products were visualized by 1.5% agarose gel analysis and ethidium bromide staining. Methods: (A) Superscript II; (B) MMLV. Lanes: (1) ϕ X 174 DNA ladder for molecular size standard; (2–11) IgM anti-HAV positive saliva samples; (12) negative control; (13) positive control (HAF-203).

3.2. Validation of TaqMan real-time PCR in oral fluid samples

The analytical sensitivity of real-time PCR for oral fluid samples was 140 copies/ml. Amplification of the saliva-positive HAV controls at different concentration showed linearity over the range from 10^8 to 10^1 copies/ml, with a correlation coefficient greater than 0.997.

In the tests run in order to evaluate inter- and intra-assay reproducibility, there was no statistically significant difference between the inter-assay variability (mean coefficient of variation, 1.37%) and the intra-assay variability (mean coefficient of variation, 1.59%) ($p > 0.05$, data not shown). In addition, the reproducibility of real-time PCR was determined by performing runs with saliva samples, in which the coefficient of variation was found to be less than 2.55%.

All saliva samples HAV RNA negative containing the exogenous internal positive control, produced a negative result for the target and a positive result for the internal positive control. This indicates that oral fluid samples were truly negative due to the absence of the HAV RNA rather than due to the presence of inhibitory substances in the oral fluid.

3.3. Detection and quantification of HAV RNA in paired serum and saliva samples

3.3.1. Nested RT-PCR

Among the 52 IgM anti-HAV-positive sample pairs, nested RT-PCR detected HAV RNA in 22 (42%) of the serum samples and 26 (50%) of the saliva samples (Table 1). In addition, three (12%) of the 26 sample pairs collected from patients without HAV markers (IgM and total anti-HAV negative) were positive for HAV RNA, demonstrating early detection of the virus, still within the window period of infection, in both clinical specimen types. Therefore, nested RT-PCR detected HAV in 37.2% (29/78) of the saliva samples and in 32% (25/78) of the serum samples.

A total of 39 saliva samples (29 HAV RNA-positive samples and 10 HAV RNA-negative samples) were analyzed to determine whether they contained 'hidden blood' that could produce false-positive PCR results. Of the 29 HAV RNA-positive saliva samples, only eight tested positive for blood and among HAV RNA-negative saliva samples, only two were positive for blood.

No statistically significant association was observed between the presence of blood in saliva and HAV RNA detection in saliva samples ($p = 0.6$; 95% CI: 0.4–5.44), indicating the absence of false-positive PCR results caused by blood contamination of samples.

3.3.2. Real-time PCR

Among the samples collected from the IgM anti-HAV positive subjects ($n = 52$), real-time PCR successfully detected HAV RNA in 37 (71%) of the serum samples and 32 (61%) of the oral fluid samples. In addition, among the samples collected from IgM/total anti-HAV negative subjects ($n = 26$), the virus was detected in 3 (12%) of the serum samples and 15 (58%) of the saliva samples (Table 1). Therefore, real-time PCR detected HAV in 60.8% (47/78) of the saliva samples and in 51% (40/78) of the serum samples. Real-time PCR showed greater efficiency, identifying 60.8% of the saliva samples as positive, compared with only 37% for RT-PCR. This difference was statistically significant ($p = 0.017$).

The HAV RNA viral load in saliva samples ranged from 1.0×10^2 to 1.4×10^4 (mean, $1.7 \pm 3.24 \times 10^3$ copies/ml), compared with 1.2×10^2 to 3.2×10^4 copies/ml (mean, $2.8 \pm 6.46 \times 10^3$ copies/ml) in serum samples. Therefore, the difference between saliva and serum viral load was not significant ($p = 0.187$). Interestingly, in eight of the sample pairs, the viral load was higher in the saliva sample than in the serum sample. Individual viral loads in 23 positive paired samples are shown in Table 2, it was found a strong positive correlation ($r = 0.597$; $p = 0.003$) between oral fluid and serum viral load.

Among the paired samples, no association was found between the detection of HAV RNA in saliva samples and the serum viral load, since there was no significant difference between HAV RNA-negative saliva samples and HAV RNA-positive saliva samples in terms of the viral loads of the corresponding serum samples ($r = 0.28$; $p = 0.25$).

4. Discussion

The sensitivity and reliability of PCR for diagnostic and research purposes depend upon efficient procedures of virus extraction and detection. The major limiting factors in amplification reactions using oral fluid are low RNA concentration and the presence of inhibitory substances (Wilde et al., 1990).

Table 1
Detection of HAV RNA in serum and saliva samples by nested RT-PCR and real-time PCR

Saliva	Nested RT-PCR ^a				Total	Real-time PCR ^a				
	IgM positive		IgM/total negative			IgM positive		IgM/total negative		
	HAV-RNA		HAV-RNA			HAV-RNA		HAV-RNA		
	Positive ^b	Negative ^b	Positive ^b	Negative ^b		Positive ^b	Negative ^b	Positive ^b	Negative ^b	
Positive	14	12	1	2	29	23	9	1	14	47
Negative	8	18	2	21	49	14	6	2	9	31
Total	22	30	3	23	78	37	15	3	23	78

^a $p = 0.017$ (significant difference between nested RT-PCR and real-time PCR in terms of HAV RNA detection).

^b Serum.

Table 2
Quantification of HAV RNA from patients with paired serum and oral fluid samples

Patients	Viral load (copies/ml)	
	Oral fluid	Serum
1	1.0×10^2	4.5×10^2
2	1.0×10^2	3.5×10^2
3	1.2×10^2	2.9×10^2
4	1.8×10^2	5.4×10^2
5	2.1×10^2	3.6×10^2
6	2.2×10^2	2.9×10^2
7	3.2×10^2	2.0×10^2
8	3.6×10^2	2.6×10^3
9	4.9×10^2	1.9×10^2
10	5.1×10^2	8.9×10^2
11	6.9×10^2	1.0×10^3
12	1.2×10^3	1.5×10^3
13	1.2×10^3	2.5×10^3
14	1.3×10^3	5.3×10^3
15	1.6×10^3	1.3×10^3
16	1.9×10^3	9.8×10^2
17	2.2×10^3	1.9×10^3
18	2.4×10^3	3.1×10^3
19	2.4×10^3	2.0×10^3
20	3.7×10^3	2.8×10^3
21	4.2×10^3	6.6×10^3
22	5.0×10^3	3.1×10^2
23	1.7×10^4	1.4×10^3

Therefore, choosing the appropriate RNA extraction methods is a critical step in the successful and valid use of PCR in clinical samples. In this study, three methods of RNA extraction (TRIzol, silica and QIAamp) were compared. The use of the QIAamp kit was found to be the most sensitive method, detecting 6×10^3 copies/ml, compared with 6×10^4 copies/ml for the silica method and 6×10^5 copies/ml for TRIzol method. The results obtained with the kit clearly demonstrate that it is suitable for use with oral fluid samples, as previously demonstrated by other researchers (Mackiewicz et al., 2004).

Of the two reverse transcriptase enzymes evaluated, Super-script was found to be the more efficient. This is probably due the absence of RNase H activity, since this property increases the chances of RNA degradation when it is hybridized with DNA. In addition, the volumes of cDNA and *Taq* polymerase were greater than those used for serum samples (De Paula et al., 2002) resulted in highly efficient HAV RNA detection in oral fluid samples. Due to the low quantity of virus in oral fluid samples, the greater concentration of cDNA improved the detection of HAV RNA by RT-PCR, which showed high sensitivity (6×10^3 copies/ml) and specificity (no signals being generated by nonspecific targets).

In the present study, the investigation into whether blood contamination ('hidden blood') could be a contributing factor in oral fluid sample HAV RNA positivity yielded results that are in accordance with those of studies involving HCV (Liou et al., 1992; Hermida et al., 2002). In those studies, no association was observed between the presence of blood in a given oral fluid sample and HAV RNA positivity of that sample. Taken together, these findings show that the presence of blood in an oral fluid

sample is not predictive of HAV RNA positivity of the sample and suggest that this is not the mechanism by which the virus enters the oral fluid.

The qualitative and quantitative PCR were optimized in oral fluid samples. Subsequently, in order to assess their performance, both tests were conducted on serum and oral fluid samples from individuals involved in an HAV outbreak. In both tests evaluated, viral RNA was more frequently in oral fluid samples than in serum samples, indicating that analysis of oral fluid could be useful for molecular investigation during hepatitis A outbreaks. In addition, both tests were able to detect HAV RNA in oral fluid and serum sample pairs collected from individuals without HAV markers. Among those same samples, real-time PCR identified HAV RNA positivity in 65% of the oral fluid samples and 13% of the serum samples, attesting to the high sensitivity of this method. These results show that oral fluid samples can be used for early detection of the virus (during the window period of infection), as demonstrated previously in serum samples (De Paula et al., 2004).

Real-time PCR produced a satisfactory linear response from 14 to 1.4×10^8 copies/ml, with a correlation coefficient of 0.997. Other studies have shown that HAV viral load typically ranges from 1.8×10^3 to 2.3×10^7 copies/ml in serum (Sanchez et al., 2006) and from 9.3×10^2 to 1.9×10^4 copies/ml in saliva (Mackiewicz et al., 2004). This implies that the method described here is suited to quantifying HAV in serum and oral fluid samples. The real-time PCR described at this present study demonstrated a sensitivity of 14 copies/ml in serum samples, which is higher than that reported in serum samples using other methods: real-time TaqMan assays with 360 RNA copies/ml (Costa-Mattioli et al., 2002) or 2×10^4 RNA copies/ml (Jothikumar et al., 2005); or kits commercially available from Roche and Arthus, with 210 and 500 copies/ml, respectively (Sanchez et al., 2006). In the present study, the sensitivity in oral fluid samples was 140 copies/ml, and the linear range was $140\text{--}1.4 \times 10^8$ copies/ml, which is also higher than the 600 copies/ml previously reported by Mackiewicz (2004), who used the Roche kit to test saliva samples. In addition, intra- and inter-assay coefficients of variation are consistent with values found using other TaqMan assays (Monpoeho et al., 2000; Costa-Mattioli et al., 2002). Furthermore, the possibility of false-negative results was ruled out, since the HAV sequence tested negative, and the internal control tested positive. This indicates that the samples testing negative were truly negative due to the absence of the target sequence (HAV-RNA) and not due to PCR inhibition (Stamey et al., 2001).

In relation to the viral loads, the 2-log difference between serum and saliva samples reported by Mackiewicz et al. (2004) was not observed in the present study. This is probably attributable to the use of different methods of quantification and different timing of sample collection (Kwon et al., 2000).

It has been shown that the presence of HCV RNA in saliva correlates with HCV viremia (Fabris et al., 1999; Hermida et al., 2002). However, in the present study, no significant relationship was observed between serum viral load and oral fluid HAV RNA detection, suggesting that high viral load in serum is not predictive of HAV detection in oral fluid.

In conclusion, although nested RT-PCR and real-time PCR can both be used to detect HAV RNA in oral fluid, real-time PCR is the more sensitive of the two. The collection and analysis of oral fluid samples could be used as a noninvasive method of detecting and quantifying HAV RNA in individuals during HAV outbreaks.

Acknowledgments

We would like to thank Liliane Morais, Debora Santos, Elisangela Ferreira and Ilton Santana for the technical assistance provided, as well as the staff of the day care center for allowing us to investigate the hepatitis A outbreak and Dr. Adilson Almeida for his help in conducting the statistical analyses. This study received financial support from the following Brazilian agencies: the *Fundação Instituto Oswaldo Cruz* (FIOCRUZ, Oswaldo Cruz Institute Foundation) and the *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ, Carlas Chagas Filho Foundation for the support of Research in the State of the Rio de Janeiro).

References

- 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.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann. Clin. Biochem.* 162, 156–159.
- Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Perez-Bercof, R., Casane, D., Colina, R., Garcia, L., Veja, 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 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, C.N., Gaspar, A.M.C., 2002. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro. *J. Med. Virol.* 66, 22–27.
- De Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Villar, L.M., Luz, S.L.B., Silva, L.A., Jesus, M.S., Da Silva, N.M.V.S., Gaspar, A.M.C., 2007. Hepatitis A in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res.* 41, 1169–1176.
- De Paula, V.S., Villar, L.M., Morais, L.M., Lewis-Ximenez, L.L., Niel, C., Gaspar, A.M.C., 2004. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. *J. Clin. Virol.* 29, 254–259.
- Fabris, P., Infantolino, D., Biasin, M.R., Marchelle, G., Venza, E., Terribile Wiel Marin, V., Benedetti, P., Tossitti, G., Manfrin, V., del Lalla, F., 1999. High prevalence of HCV RNA in the saliva fraction of patients with chronic hepatitis C but no evidence of HCV transmission among sexual partners. *Infection* 27, 86–91.
- Gaspar, A.M.C., Vitral, C.L., Yoshida, C.F., Schatzmayer, H.G., 1993. Fast growth of a Brazilian hepatitis A virus (HAF-203) in a primate cell line. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26, 203–206.
- Hermida, M., Ferreira, M.C., Barral, S., Laredo, R., Castro, A., Dios, P., 2002. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. *J. Virol. Methods* 101, 29–35.
- Hutin, Y.P., Pool, V., Cramer, E.H., Nainan, O.V., Weth, J., Williams, I.T., Goldstein, S.T., Gensheimer, K.F., Bell, B.P., Shapiro, C.N., Alter, M.J., Margolis, H.S., 1999. A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. National Hepatitis A Investigation Team. *N. Engl. J. Med.* 340, 595–602.
- Hutse, V., Verhaegen, E., De Cock, L., Quoilin, S., Vandenberghe, H., Horsman, Y., Michielsen, P., Van Damme, P., Vlierberghe, H.V., Claeys, F., Vranckx, R., Oyen, H.V., 2005. Oral fluid as a medium for the detection of hepatitis B surface antigen. *J. Med. Virol.* 77, 53–56.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Sobsey, M.D., Robertson, B.H., 2005. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3359–3363.
- Kwon, O.S., Byun, K.S., Yeon, J.E., Park, S.H., Kim, J.S., Kim, J.H., Bak, Y.T., Ho Kim, J., Lee, C.H., 2000. Detection of hepatitis A viral RNA in sera of patients with acute hepatitis A. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 1043–1047.
- Liou, T.C., Chanf, T.T., Young, K.C., 1992. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid and ascites. *J. Med. Virol.* 37, 197–202.
- Mackiewicz, V., Dussaix, E., Le Petitcorps, M.F., Roque-Afonso, A.M., 2004. Detection of hepatitis A virus RNA in saliva. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4329–4331.
- Monpoeho, S., Dehé, A., Mignotte, B., 2000. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples by single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques* 29, 88–93.
- Morais, L.M., De Paula, V.S., Arantes, M.R., Oliveira, M.A., Gaspar, A.M.C., 2006. Early infection and asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care in Rio de Janeiro, Brazil: Should attending children under two years of age be vaccinated? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 401–405.
- Oba, I.T., Spina, A.M.M., Saraceni, C.P., Lemos, M.F., Senhoras, R.C.F.A., Moreira, R.G., Granato, C.F.H., 2000. Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 42, 1–9.
- Ochnio, J.J., Scheifele, D.W., Ho, M., Mitchell, L.E.A., 1997. New, ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine and disease induced hepatitis A virus specific immunoglobulin G in saliva. *J. Clin. Microbiol.* 35, 98–101.
- 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.
- Poorawan, Y., Theamboonlers, A., Chongsrisawat, V., Jantaradsamee, P., Chutsirimongkol, S., Tangkijvanich, P., 2005. Clinical features and molecular characterization of hepatitis A virus outbreak in a child care center in Thailand. *J. Clin. Virol.* 32, 24–28.
- Provost, P.J., Wolanski, B.S., Miller, 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.
- Sanchez, G., Populaire, S., Butot, S., Putallaz, T., Joosten, H., 2006. Detection and differentiation of human hepatitis A strains by commercial quantitative real-time RT-PCR tests. *J. Virol. Methods* 132, 160–165.
- Stamey, F.R., Patel, M.M., Holloway, B.P., Pellett, P.E., 2001. Quantitative, fluorogenic probe PCR assay for detection of human herpesvirus 8 DNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3537–3540.
- Stene-Johansen, K., Jennum, P.A., Hoel, T., Blystad, H., Sunde, H., Skaug, K., 2002. An outbreak of hepatitis A among homosexuals linked to a family outbreak. *Epidemiol. Infect.* 129, 113–117.
- Villar, L.M., Lampe, E., Meyer, A., Gaspar, A.M.C., 2004. Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 1779–1787.
- Wilde, J., Eiden, J., Yolken, R., 1990. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1300–1307.
- Yaari, A., Tovbin, D., Zlotnick, M., Mostoslavsky, M., Shemer-Avni, Y., Hanuka, N., Burbea, Z., Katzir, Z., Storch, S., Margalith, M., 2006. Detection of HCV salivary antibodies by a simple and rapid test. *J. Virol. Methods* 133, 1–5.



**MIXED INFECTION OF HEPATITIS A VIRUS SUBGENOTYPES
IN CHILDREN EXPOSED OF AN OUTBREAK USING PAIRED
SERUM AND SALIVA SPECIMENS**

Journal:	<i>Journal of Medical Virology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Amado, Luciane; Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz Villar, Livia; Instituto Oswaldo Cruz de Paula, Vanessa; Instituto Oswaldo Cruz Pinto, Marcelo; Instituto Oswaldo Cruz Gaspar, Ana Maria; Instituto Oswaldo Cruz
Keywords:	molecular epidemiology, saliva, hepatitis A, outbreak



1
2
3 1 **MIXED INFECTION OF HEPATITIS A VIRUS SUBGENOTYPES IN**
4
5 2 **CHILDREN EXPOSED OF AN OUTBREAK USING PAIRED SERUM AND**
6
7 3 **SALIVA SPECIMENS**
8
9

10 4
11
12 *Luciane Almeida Amado ¹, Livia Melo Villar ², Vanessa Salete de Paula ¹,
13
14
15 6 Marcelo Alves Pinto¹ and Ana Maria Coimbra Gaspar ¹
16
17

- 18 7
19 8 1. Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo
20
21 9 Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, Brazil
22
23 10 2. Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de
24
25 11 Janeiro/RJ, Brazil
26
27

28 12
29 13
30 14
31 15
32 16 ***Corresponding author:** Luciane Almeida Amado, Pavilhão Helio e Peggy Pereira,
33
34 17 sala B219, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Cx Postal 926. Av. Brasil 4365, Cep:
35
36 18 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Fax (+ 55 21) 2270-6397. Tel: (+ 55 21) 21
37
38 19 2562-1876.; e-mail address: l_amado@ioc.fiocruz.br
39
40
41

42 20
43 21
44 22
45 23
46 24 **Running titer:** HAV subgenotypes in paired serum and saliva specimens
47
48 25
49 26
50 27

51 28 **Financial support:** Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do
52
53 29 Rio de Janeiro (FAPERJ) and Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e
54
55 30 Tecnológico (CNPq).
56
57 31
58 32
59 33
60 34
35
36

Abstract

Paired serum and saliva samples were collected simultaneously from 124 subjects exposed to a hepatitis A outbreak, in a day care center at Rio de Janeiro, Brazil. All samples were tested for IgM and total anti-HAV antibodies by EIA. Hepatitis A virus (HAV) was detected by nested PCR in serum, saliva and water samples, employing primers for VP1/2A region. Positive products were sequenced. Viral load of paired samples was determined by real-time PCR using the TaqMan system. HAV-RNA was identified by nested PCR, in 37.7% of saliva, 29.5% of serum samples and in one water sample. Mean of HAV viral load was similar in serum and saliva specimens (10^3 copies/ml). HAV genotypes IA and IB were detected in both specimens and the isolate from water sample was classified as genotype IB. This result indicates the existence of more than one source of infection at the center. In six infected patients a differing HAV subgenotype was found in serum compared to their paired saliva specimen. This unusual pattern of mixed HAV infection was further investigated by molecular cloning followed by nucleotide sequencing. All clones derived from saliva samples belonged to subgenotype IB and showed a great identity within them (96.5-100%). However clones derived from their corresponding paired serum belonged to subgenotype IA and showed a discrete heterogeneity within them (90.5-100% of identity). This study showed the important role of noninvasive salivary investigations of HAV in molecular epidemiology studies of hepatitis A outbreak.

Key Words: molecular epidemiology, saliva, outbreak, hepatitis A.

INTRODUCTION

Hepatitis A virus is the prototype of the genus hepatovirus in the family Picornaviridae [Gust et al., 1983; Melnick, 1992]. HAV has a single antigenic serotype [Lemon and Binn, 1983] determining a lifelong immunity as a result of the high conservation of amino acid sequences and the lack of nucleotide diversity. However, despite this antigenic uniformity, variation can be found by phylogenetic analysis that has enabled the classification of human and simian isolates into six genotypes (I–VI) [Costa-Mattioli et al., 2003; Lu et al., 2004]. Genotypes I–III are of human origin and IV–VI of simian origin. Each of human genotypes (I–III) possesses two subgenotypes, A and B. Genotypes have more than 15% nucleotide variation and subgenotypes have 7–7.5% nucleotide variation [Robertson et al., 1992].

Hepatitis A is transmitted by fecal oral route and is responsible for the majority of viral hepatitis cases worldwide being recognized as an important public health disease especially in intermediate endemicity regions [FitzSimons et al., 2010]. Due to public health improvements and better social economic conditions, there has been a reduction of HAV endemicity over the past few decades in Brazil [Morais et al., 2006; Tanaka, 2000; Villar et al., 2004; Vitral et al., 2006]. This decrease in natural immunization allows potentially massive outbreaks in closed communities, such as schools and day care centers [de Paula et al., 2002; Morais et al., 2006; Villar et al., 2002]. These institutions play an important role on HAV chain transmission due to the asymptomatic infection in children younger than 6 years old that leads a silent dissemination of the disease among susceptible people [Desenclos and MacLafferty, 1993; Poovorawan et al., 2005; Venczel et al., 2001].

Molecular epidemiology has shown that genotype IA of HAV is the most prevalent globally while type IB predominates in the Middle East [FitzSimons et al., 2010]. South America human HAV isolates have been characterized almost exclusively

1
2
3 93 as subgenotype IA, with exception of Brazil, where subgenotype IB have also been
4
5 94 reported in hepatitis A outbreaks [Costa-Mattioli et al., 2001; de Paula et al., 2002] and
6
7
8 95 in sporadic cases [de Paula et al., 2004; Fiaccadori et al., 2006; Villar et al., 2006b]. In
9
10 96 addition, co-circulation of both subgenotypes IA and IB in hepatitis A outbreaks have
11
12
13 97 also been reported [Costa-Mattioli et al., 2001; de Paula et al., 2002].

14
15 98 Hepatitis A diagnosis is carried out in serum samples, but many studies show the
16
17 99 applicability of saliva for HAV diagnosis in sporadic or outbreak cases [Amado et al.,
18
19
20 100 2006; Oba et al.; Ochnio et al., 1997; Stuart et al., 1992]. Saliva sample collection is
21
22 101 safer and cheaper than blood collection in epidemiologic field studies and can facilitate
23
24 102 HAV studies on outbreaks of the disease.

25
26
27 103 To date, two studies demonstrate HAV RNA in saliva samples [Amado et al.,
28
29 104 2008; Mackiewicz et al., 2004], but to our knowledge the use of saliva samples has not
30
31 105 been described in molecular epidemiological studies of HAV outbreaks. Therefore, in
32
33 106 this study the feasibility of saliva specimen for molecular epidemiological studies was
34
35 107 evaluated among children infected during a Hepatitis A outbreak in a day care center in
36
37 108 Rio de Janeiro, Brazil.

109 110 **MATERIAL AND METHODS**

111 **Epidemiological research**

112
113 114 During October 2006, four cases of acute hepatitis A (three children and one
115
116 115 detailed demographic and risk factor information for hepatitis A infection were
117
118 116 obtained. The only common risk factor among these cases was attendance to a day care
119
120 117 center located in Rio de Janeiro City, Brazil. Therefore, an investigation of this possible
121
122 118 hepatitis A outbreak was conducted. Hepatitis A case was defined by a positive

1
2
3 119 serologic test for IgM anti-HAV antibodies. All individuals, including children,
4
5 120 household contacts and staff that gave formed consent was included in this study.
6
7
8 121 Demographic and risk factors information were collected by an epidemiological
9
10 122 questionnaire. Risk factors for HAV infection was defined as having school or
11
12 123 household contact with cases; absence of sewage system at home and consumption of
13
14 124 non-treated water. Permission for sample collection and HAV tests was obtained from
15
16 125 the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (CONEP-Fiocruz, resolution #
17
18 126 7071)
19
20
21

22 127 23 128 24 129 **Samples collection and processing** 25 130

26 131 Matched blood and saliva samples were obtained from 124 individuals. Blood
27
28 132 was collected by venipuncture into sterile tubes and serum was separated by
29
30 133 centrifugation and stored at -20°C . Saliva samples were collected using OraSure
31
32 134 collection devices (Epitope Incorporated, Beaverton, OR, USA) according to the
33
34 135 manufacturer instructions and centrifuged at $2500\times g$ for 15 min at room temperature.
35
36 136 All saliva and serum specimens were processed on same day of collection and stored at
37
38 137 -20°C until analysis.
39
40
41
42

43 138 Additionally, water samples were collected to investigate this role on HAV
44
45 139 dissemination at the outbreak. Ten different sources of water, including water-
46
47 140 reservoirs, taps and drinking fountains, were collected at day care center. After water
48
49 141 collection, tap water was dechlorinated by sodium thiosulfate with a final concentration
50
51 142 of 50mg/L. A total of 500mL of each sample was processed as previously described
52
53 143 [Villar et al., 2006b] to concentrate the virus and a final volume of 800 μL of
54
55 144 suspension was obtained.
56
57
58
59
60

146 **Anti-HAV Detection in serum and saliva samples**

147 IgM and total anti-HAV enzyme immunoassays were performed on serum samples
148 (n=124) by using a Biokit (Biokit, S.A. Barcelona, Espanha) according to the
149 manufacturer's instructions. For saliva samples (n=124), undiluted samples (100µL and
150 15 µL for IgM and total anti-HAV, respectively) were tested in a modified ELISA
151 (Biokit, S.A. Barcelona, Spanish). Sensitivity of modified total and IgM anti-HAV EIAs
152 were 98% and 96% [Amado et al., 2008].

153

154 **Detection and quantification of HAV in serum, saliva and water samples.**

155 Viral RNA was extracted from 140µL of serum, saliva and water samples by
156 using the QIAmp viral RNA kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the
157 manufacturer's instructions. Elution of RNA from Qiam spin column was done with
158 60µL of RNase/DNase free water and stored at -80°C until use.

159 A 247-bp fragment encompassing the VP1-2A junction of HAV genome was
160 amplified by nested reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR) using
161 previously described primers and conditions [de Paula et al., 2003b]. RT-PCR was
162 performed with 10µL of extracted RNA using Superscript II H⁻ reverse transcriptase
163 (Invitrogen) and random hexamers primers according to the manufacturer's instructions.
164 For saliva samples, cDNA and Taq Polymerase volume was increased in two fold in
165 relation to serum samples to increase sensitivity [Amado et al., 2008] .

166 HAV RNA was quantified from 5µL of cDNA using TaqMan® real-time PCR
167 assay in Applied Biosystems 7500 System (Applied Biosystems, Foster City, California,
168 USA). A recombinant clone of the conserved 5' noncoding region (NCR) of HAV
169 (strain HAF-203) [Gaspar et al., 1993] was used as standard curve points and specific
170 primers for 5' NCR of HAV and a single-labelled 5' FAM probe were used as

1
2
3 171 previously described [De Paula et al., 2007]. The lowest quantification limit of this
4
5 172 assay on serum, saliva and water samples were 14 copies /ml, 140 copies/ml and 60
6
7
8 173 copies/ml, respectively [Amado et al., 2008; De Paula et al., 2007; Villar et al., 2006a]
9
10 174 Particular care was taken in order to prevent cross-contamination of samples during
11
12 175 molecular assays. The tests were conducted in separated rooms and in every PCR run,
13
14
15 176 three negative samples were included to control for contamination of the reverse
16
17 177 transcription, first and second round PCR.
18
19
20 178

21 22 179 **HAV genetic analysis**

23
24 180 HAV RNA positive samples were genotyped by direct sequencing of the
25
26 181 purified second PCR products using internal primers and ABI PRISM BigDye
27
28 182 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems, Foster City, CA) in a Gene
29
30 183 Amp PCR System 9700 sequencer apparatus (Perkin Elmer, France) [Otto et al., 2008].
31
32 184 A 168 bp sequences of VP1/2A were used to construct a neighbor-joining tree based on
33
34 185 Kimura-2 parameter distances in the program MEGA [Kumar et al., 2001]. The HAV
35
36 186 genotype was determined by including reference sequences from Genbank including
37
38 187 genotypes strains IA: HAS-15 (X15464, USA); IB: HM-175 (M14707, Australia) and
39
40 188 HAF-203 (AF26896, Brazil); IIA: (L07729, Sierra Leone), IIB: CF-53 (L07693,
41
42 189 France) and IIIA: GA76 (L07668, USA). Thirteen HAV strains isolated from different
43
44 190 Brazilian states and South American counties available from GenBank were also
45
46 191 included in this analysis. GenBank accession numbers for the VP1/2A nucleotide
47
48 192 sequences reported here are HM357765 to HM357788.
49
50

51
52 193 Mixed HAV infection in patients with two subgenotypes was investigated by
53
54 194 cloning HAV PCR products (247pb) into pCR4.1-TOPO vector (TOPO TA cloning kit,
55
56 195 Invitrogen, San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions. After
57
58
59
60

1
2
3 196 transformation and growth of *Escherichia coli* cells, recombinant plasmids were
4
5 197 purified by using the QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN, Hilden, Germany), and both
6
7
8 198 strands of the insert DNA were sequenced using forward and reverse M13 primers
9
10 199 (TOPO TA cloning kit, Invitrogen, San Diego, CA) [de Paula et al., 2003a].
11
12

13 200

14 15 201 **Data analysis**

16
17 202 Epidemiological data of the patients were included in a logistic regression analysis to
18
19 203 identify independent factors associated with detection of IgM anti-HAV in serum and
20
21 204 saliva samples after adjustment for confounding variables. To assess continuous
22
23 205 variables, Student's t-test or Mann-Whitney test were used as appropriate. A two-tailed
24
25 206 $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. Analyses were conducted using the
26
27 207 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for windows, release 8.0; SPSS Inc.,
28
29 208 Chicago, IL).
30
31
32

33 209

34 35 210 **RESULTS**

36 37 211 **Epidemiology**

38
39 212 Sixty-five children aged 1-4 years (3.1 ± 0.7 years), 21 staff members (teachers
40
41 213 and cooks) aged 22-57 years (37.1 ± 10.7 years) and 38 household contacts aged 1-11
42
43 214 years (5.7 ± 2.7 years) were enrolled in this study.
44
45

46
47 215 Most of studied population (61%) presented low socioeconomic status. Although
48
49 216 most of subjects related to have access to sewage disposal (94%), 46% of them reported
50
51 217 to live nearby open sewage, and among them 11% had direct contact with this sewage
52
53 218 water. At least 31% reported previous contact with hepatitis A case. Twenty seven
54
55 219 percent reported to consume non-treated water. However, epidemiological data showed
56
57 220 that none of risk factors were related to hepatitis A infection ($p > 0.05$).
58
59
60

1
2
3 221 Hepatitis A cases were confirmed among 52 (42%) individuals that tested
4
5 222 positive for IgM anti-HAV in serum sample and in 51 (41%) subjects by saliva samples.
6
7
8 223 Among them 64% were asymptomatic. The frequency of acute infection was higher in
9
10 224 children up to 3 years than household contacts (8/52) and staff members (1/52) showing
11
12 225 significant association ($\chi^2 = 52.2$; $p=0.002$). Total anti-HAV was detected in 77%
13
14 226 (96/124) of saliva and in 78% (97/124) of serum samples, among them 47% (46/97) had
15
16 227 past infection. Still remained susceptible for hepatitis A infection, 21% (26/124) of the
17
18 228 subjects (Table I).
19
20
21
22
23

24 230 **Detection of HAV-RNA in serum and saliva samples**

25
26
27 231 HAV RNA was investigated in serum and saliva samples from acute hepatitis A
28
29 232 patients (IgM anti-HAV positive, $n=52$) and from susceptible patients (IgM and total
30
31 233 anti-HAV negative, $n=26$). HAV RNA was detected by nested PCR, in 38% (20/52) of
32
33 234 the serum samples and in 49% (25/51) of the saliva samples from acute hepatitis A
34
35 235 cases. Among patients IgM and total anti-HAV negative, HAV RNA was detected in
36
37 236 three sera and in four saliva samples. Overall, HAV was detected by nested PCR in
38
39 237 37.7% (29/77) of the saliva samples and in 29% (23/78) of the serum samples. HAV
40
41 238 RNA detection was higher within children (25/54) when compared to household
42
43 239 contacts (5/22) and staff members (0/2). Real time PCR successfully detected HAV in
44
45 240 48.7% (38/78) serum and in 58.9% (46/78) of saliva samples. Among them, 3 serum
46
47 241 and 15 saliva samples were from IgM/total anti-HAV negative subjects. HAV viral load
48
49 242 in saliva samples ranged from 1.0×10^2 to 1.4×10^4 (mean of $1.7 \pm 3.24 \times 10^3$ copies/ml),
50
51 243 which was similar to serum viral load, that ranged from 1.2×10^2 to 3.2×10^4 copies/ml
52
53 244 (mean of $2.8 \pm 6.46 \times 10^3$ copies/ml). Of the water samples collected, HAV-RNA was
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 245 detected in one sample (1/10) from a drinking fountain used exclusively by children of
4
5 246 the day care center.
6
7

8 247

10 248 **Genetic analysis of HAV isolates**

11 249

12 250 Sequence information was obtained from HAV RNA isolates of 23 sera and 26
13
14
15 251 saliva samples (three saliva samples were untypeable by sequencing). All isolates
16
17 252 belonged to genotype I. Of these, 16 isolates from serum were assigned to genotype IA
18
19 253 and 7 to genotype IB. Among sequences isolated from saliva, 9 belonged to genotype
20
21
22 254 IA while 17 to genotype IB. As seen in figure 1, the majority of the strains of this
23
24
25 255 outbreak that share the same subgenotype are clustered together. After pair wise
26
27 256 comparison, HAV isolates of genotypes IA showed slightly higher identity (93.6-100%;
28
29 257 mean 96.8%) than isolates of genotype IB (90.5-100%; mean 95.4%). The virus
30
31 258 genotype in the salivary specimens was the same as that found in the paired serum
32
33 259 specimens of six patients: IA and IB. The remaining six patients had differing
34
35 260 subgenotypes in their paired serum and saliva specimens. This unusual pattern of mixed
36
37 261 HAV population in those patients was further investigated by molecular cloning
38
39 262 followed by nucleotide sequencing.
40
41
42

43 263 HAV sequence isolated from drinking fountain clustered into subgenotype IB
44
45 264 and showed 97.5 to 99.3% of identity with saliva sequences of subgenotype IB, isolated
46
47 265 from children of the day care center.
48
49

50 266

52 267 **Phylogenetic analysis of the HAV isolates**

53 268 The HAV sequences isolated from this study were compared with ten isolates
54
55 269 from other regions of Brazil and three other South American counties whose sequences
56
57
58 270 were determined previously [de Paula et al., 2004], in order to gain insight into the
59
60

1
2
3 271 degree of genetic heterogeneity of this outbreak. Within subgenotype IA, most of the
4
5 272 sequences from this work were 96.3-100% homologous with other previous isolates
6
7
8 273 from sporadic cases of Brazilian states (MG, GO, BA and PA). Among subgenotype IB,
9
10 274 the isolates from this study were 98.1-100% homologous with sequences previously
11
12 275 isolated in outbreaks at Rio de Janeiro, clustering on the same branch of the tree. When
13
14
15 276 compared to Uruguay, Argentine and Chile HAV isolates it appears in a different sub-
16
17 277 cluster from isolates IA of this study (Fig.1).
18
19
20 278

21 22 279 **Mixed infection with subgenotypes IA and IB of HAV**

23
24 280 Nested PCR and nucleotide sequencing of samples from mixed infected patients
25
26
27 281 were repeated to evaluate contamination and to confirm the results obtained. However it
28
29 282 was still observed the presence of both subgenotypes at these specimens. In order to
30
31 283 investigate this mixed infection of patients with different subgenotypes in their paired
32
33 284 serum and saliva specimens, it was undertaken a molecular cloning of these PCR
34
35 285 products of four patients (se07 and sa07; sa22 and se22; sa29 and se29; sa37 and se37),
36
37 286 followed by multiple sequencing on different clones. Clones from two patients (32 and
38
39 287 38) were untypeable by sequencing. A total of 32 clones were selected at random for
40
41 288 further characterization by nucleotide sequencing. Table III, shows that all clones
42
43
44 289 derived from saliva samples (n=14) belonged to subgenotype IB and at nucleotide level,
45
46 290 showed a great identity within them. However all clones derived from their
47
48 291 corresponding paired serum (n=19) belonged to subgenotype IA and showed a discrete
49
50
51 292 heterogeneity within them.
52
53
54 293

55
56
57 294
58
59
60 295

DISCUSSION

296
297
298 Epidemiologic investigations of hepatitis A outbreaks have traditionally focused
299 on demographic and risk factors information and more recently also based on molecular
300 characterization of HAV from serum samples. This report describes a molecular
301 epidemiology study of a hepatitis A outbreak by identification and characterization of
302 HAV genome from saliva specimens. Child care center have been described as an
303 important source for HAV transmission [Morais et al., 2006; Venczel et al., 2001], as
304 the spread of HAV depends primarily on poor hygiene conditions (e.g. close contacts
305 between toddlers, who still are in diapers, and young children). In accordance with
306 previous studies, the high frequency of children under 5 years of age in a center is a
307 significant risk factor ($p < 0.05$) for occurrence of the hepatitis A outbreak [Morais et al.,
308 2006; Robertson et al., 2000; Smith et al., 1997]. In this present study, direct contact
309 with previous hepatitis A cases was not observed as a significant risk factor for HAV,
310 most likely due the subclinical nature of the disease among children, as 64% of the
311 cases were asymptomatic. Together with other studies, children with asymptomatic
312 infection showed to be an important source of hepatitis A disease for household contacts
313 with no recognized risk factors during the day care center outbreak [Nainan et al., 2005;
314 Staes et al., 2000].

315 The association of water consumption and hepatitis A dissemination was
316 investigated and HAV was detected at a sample from drinking water fountain. However
317 it was not detected in samples from water-reservoirs that supply this drinking fountain.
318 Pairwise comparison revealed that HAV isolated from the drinking water had a great
319 identity (97.5-99.3%) with HAV isolated from the saliva of children linked to the
320 outbreak. Although we are unable to prove, these findings suggest that the drinking
321 fountain could be contaminated by child's hands or saliva containing HAV. This

1
2
3 322 epidemiological analysis indicates that the drinking fountain might be a vehicle of HAV
4
5 323 transmission (potential reservoir), excluding the water contamination as a source of
6
7
8 324 HAV infection. The epidemiological investigation was not able to reveal statistically
9
10 325 significant risk factor or common sources of HAV, most likely due the subclinical
11
12 326 nature of the disease at outbreak and homogeneity of demographic data of studied
13
14
15 327 population.

16
17 328 In this study the subgenotype IA was the most prevalent, which is in accordance
18
19 329 with previous studies conducted in American continent [Costa-Mattioli et al., 2001;
20
21 330 Diaz et al., 2001; Mbayed et al., 2002; Robertson et al., 1992]. The predominance of
22
23 331 HAV subgenotype IA circulating in South America, has suggesting an endemically
24
25 332 circulation of this subgenotype in these countries [Costa-Mattioli et al., 2001]. In
26
27 333 agreement with previous studies conducted at Rio de Janeiro State [de Paula et al.,
28
29 334 2002; de Paula et al., 2003a; Devalle et al., 2003] we also found co-circulation of
30
31 335 subgenotypes IA and IB in the day care center outbreak. Many isolates from this study
32
33 336 were closely related genetically (or even identical) (96.3-100% of identity) to isolates
34
35 337 originating in previous studies in Brazil (Fig I). These findings suggest an endemic
36
37 338 pattern of HAV Brazilian strains circulation during outbreaks.

38
39 339 The comparison of HAV genotypes between paired serum and saliva specimens
40
41 340 identified six patients whose virus genotype in the salivary specimens was the same as
42
43 341 that found in the paired serum specimens, and the remaining six patients had differing
44
45 342 subgenotypes in their paired serum and saliva specimens. These patients may have a
46
47 343 mixed infection, with a different predominant subgenotype in the two body fluids and
48
49 344 when sequencing was undertaken, only the predominant sequence may prevail, or
50
51 345 alternatively, an indeterminate sequence emerges as the mixed sequences from the
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 346 different virus appear together, which might explain the high numbers of isolates that
4
5 347 could not be genotyped [Roy et al., 1998].
6
7

8 348 Two conditions seems to be necessary for this phenomenon; the co-circulation
9
10 349 of different subgenotypes in this outbreak, and the contact, in a short period of time, of a
11
12 350 susceptible subjects with at least two sources of infection. Although mixed infection is
13
14
15 351 uncommon, it was also reported by de Paula et al., (2003b) in a patient exposed of a
16
17 352 hepatitis A outbreak at a child care center, indicating that multiple exposures of HAV
18
19 353 seems to be inevitable within this patient group at a day care center outbreak.
20
21

22 354 The molecular cloning conducted to investigate the mixed infection showed that
23
24 355 the distribution of genotypes in saliva was different from serum, since all clones from
25
26 356 saliva were classified as IB and in serum as IA. Coexisting virus subpopulations at
27
28 357 different sites have been extensively documented for HIV type I [Papathanasopoulos et
29
30 358 al., 2003; Shapshak et al., 1999] and HCV [Chen et al., 2003; Laskus et al., 2000],
31
32 359 suggesting that it may allow the virus to adapt rapidly to changes in the landscape
33
34
35 360 topology [Cristina and Costa-Mattioli, 2007]. Sanchez et al. (2003) reported that the
36
37 361 presence of different HAV strains at the involved sites may be related with generation
38
39 362 of a mutant spectrum in the course of each HAV replication, likely due to different
40
41 363 selective pressures.
42
43
44

45 364 In the other way, this unexpected discrepancy between saliva and serum
46
47 365 provided some interesting data which question the understanding of the source of
48
49 366 salivary HAV RNA. This study showed that HAV is more frequently present in the
50
51 367 saliva of acutely infected patients (37.7%) than in serum (29%). The results of this study
52
53 368 suggest that probably, in addition to transudation of fluid containing HAV from the
54
55 369 general circulation into saliva through gengivo-crevicular fluid, there may be other
56
57
58 370 sources of HAV in saliva, possibly including active replication at the site of salivary
59
60

1
2
3 371 secretion in some individuals, as has been suggested for hepatitis C virus infections
4
5 372 [Arrieta et al., 2001; Roy et al., 1998; Takamatsu et al., 1992]. We have recently
6
7
8 373 reported that HAV negative-strand RNA (intermediate replicative) can be detected in
9
10 374 salivary gland of non-human primates experimentally infected with HAV,
11
12 375 demonstrating an active HAV replication at this site [Amado et al., 2010]. This would
13
14
15 376 perhaps explain the discrepant subgenotypes between paired serum and saliva
16
17 377 specimens, but further studies are needed to determine whether HAV RNA positive
18
19 378 saliva can actually transmit infection.

20
21
22 379 In conclusion, we demonstrated the saliva reliability for molecular epidemiology
23
24 380 purposes during an outbreak and that it is more appropriate specimen for HAV detection
25
26 381 during outbreak. The occurrence of co-infections with different subgenotypes was
27
28 382 confirmed in this HAV outbreak. However, further studies are necessary to investigate
29
30 383 the biological and clinical meaning of the uneven distribution of HAV subgenotypes
31
32 384 observed in paired serum and saliva specimens of the mixed infected patients.
33
34
35
36
37
38
39
40

41 387 **Acknowledgements**

42
43 388 The authors thank to Dra. Flor Pujol for revising this manuscript, Marcia
44
45 389 Paschoal do Espírito-Santo for molecular analysis, Liliane Morais, Debora R.L. dos
46
47 390 Santos, Elisangela Ferreira and Ilton Santana for technical assistance, as well as to day
48
49 391 care center staff for allowing us to investigate this hepatitis A outbreak. We also thank
50
51 392 to Dr. Adilson José de Almeida for his help in conducting statistical analyses and the
52
53 393 genomic platform –PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A) for conduct the genomic sequencing.
54
55
56 394 This work was supported by the *Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)*, *Conselho*
57
58
59
60

395 *Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos*
 396 *Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).*

397

398

REFERENCES

- 399 Amado L, Marchevsky R, de Paula V, Hooper C, Freire MS, Gaspar A, Pinto M.
 400 2010. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus
 401 monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV
 402 replication. *Int J Exp Pathol* 91(1):87-97.
- 403 Amado L, Villar L, de Paula V, de Almeida A, Gaspar A. 2006. Detection of
 404 hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for
 405 epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(2):149-155.
- 406 Amado L, Villar L, de Paula V, Gaspar A. 2008. Comparison between serum and
 407 saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *J Virol Methods* 148(1-
 408 2):74-80.
- 409 Arrieta J, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolomé J, Pardo M,
 410 Manzarbeitia F, Oliva H, Macías D, Carreño V. 2001. In situ detection of
 411 hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol* 158(1):259-264.
- 412 Chen Y, Liu M, Yu W, Li J, Dai Q, Zhou Z, Tisminetzky S. 2003. Mix-infections
 413 with different genotypes of HCV and with HCV plus other hepatitis viruses
 414 in patients with hepatitis C in China. *World J Gastroenterol* 9(5):984-992.
- 415 Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferré V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J.
 416 2003. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 84(Pt 12):3191-
 417 3201.
- 418 Costa-Mattioli M, Ferre V, Monpoeho S, Garcia L, Colina R, Billaudel S, Vega I,
 419 Perez-Bercoff R, Cristina J. 2001. Genetic variability of hepatitis A virus in
 420 South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic
 421 outbreaks. *J Gen Virol* 82(Pt 11):2647-2652.
- 422 Cristina J, Costa-Mattioli M. 2007. Genetic variability and molecular evolution of
 423 hepatitis A virus. *Virus Res* 127(2):151-157.
- 424 de Paula V, Baptista M, Lampe E, Niel C, Gaspar A. 2002. Characterization of
 425 hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro,
 426 Brazil. *J Med Virol* 66(1):22-27.
- 427 De Paula V, Diniz-Mendes L, Villar L, Luz S, Silva L, Jesus M, da Silva N, Gaspar
 428 A. 2007. Hepatitis A virus in environmental water samples from the
 429 Amazon Basin. *Water Res* 41(6):1169-1176.
- 430 de Paula V, Lu L, Niel C, Gaspar A, Robertson B. 2004. Genetic analysis of
 431 hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol* 73(3):378-383.
- 432 de Paula V, Saback F, Gaspar A, Niel C. 2003a. Mixed infection of a child care
 433 provider with hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB
 434 revealed by heteroduplex mobility assay. *J Virol Methods* 107(2):223-228.
- 435 de Paula V, Villar L, Coimbra Gaspar A. 2003b. Comparison of four extraction
 436 methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. *Braz J*
 437 *Infect Dis* 7(2):135-141.
- 438 Desenclos J, MacLafferty L. 1993. Community wide outbreak of hepatitis A linked
 439 to children in day care centres and with increased transmission in young
 440 adult men in Florida 1988-9. *J Epidemiol Community Health* 47(4):269-273.

- 1
2
3 441 Devalle S, de Paula V, de Oliveira J, Niel C, Gaspar A. 2003. Hepatitis A virus
4 442 infection in hepatitis C Brazilian patients. *J Infect* 47(2):125-128.
5 443 Diaz B, Sariol C, Normann A, Rodríguez L, Flehmig B. 2001. Genetic relatedness
6 444 of Cuban HAV wild-type isolates. *J Med Virol* 64(2):96-103.
7 445 Fiaccadori F, Soares C, Borges A, Cardoso D. 2006. Prevalence of hepatitis A virus
8 446 infection in Goiânia, Goiás, Brazil, by molecular and serological
9 447 procedures, 1995-2002. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(4):423-426.
10 448 FitzSimons D, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. 2010. Hepatitis A and E:
11 449 update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 28(3):583-588.
12 450 Gaspar A, Vitral C, Yoshida C, Schatzmayr H. 1993. Fast growth of a Brazilian
13 451 hepatitis A virus (HAF-203) in a primate cell line. *Braz J Med Biol Res*
14 452 26(2):203-206.
15 453 Gust I, Coulepis A, Feinstone S, Locarnini S, Moritsugu Y, Najera R, Siegl G.
16 454 1983. Taxonomic classification of hepatitis A virus. *Intervirology* 20(1):1-7.
17 455 Kumar S, Tamura K, Jakobsen I, Nei M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary
18 456 genetics analysis software. *Bioinformatics* 17(12):1244-1245.
19 457 Laskus T, Radkowski M, Wang L, Nowicki M, Rakela J. 2000. Uneven distribution
20 458 of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver
21 459 disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for
22 460 the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol* 74(2):1014-1017.
23 461 Lemon S, Binn L. 1983. Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus
24 462 determined by cross-neutralization. *Infect Immun* 42(1):418-420.
25 463 Lu L, Ching K, de Paula V, Nakano T, Siegl G, Weitz M, Robertson B. 2004.
26 464 Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis
27 465 A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol* 85(Pt 10):2943-2952.
28 466 Mackiewicz V, Dussaix E, Le Petitcorps M, Roque-Afonso A. 2004. Detection of
29 467 hepatitis A virus RNA in saliva. *J Clin Microbiol* 42(9):4329-4331.
30 468 Mbayed V, Sookoian S, Alfonso V, Campos R. 2002. Genetic characterization of
31 469 hepatitis A virus isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Med Virol*
32 470 68(2):168-174.
33 471 Melnick J. 1992. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine* 10
34 472 Suppl 1:S24-26.
35 473 Morais L, de Paula V, Arantes M, Oliveira M, Gaspar A. 2006. Early infection and
36 474 asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care center in
37 475 Rio de Janeiro, Brazil: should attending children under two years of age be
38 476 vaccinated? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(4):401-405.
39 477 Nainan O, Armstrong G, Han X, Williams I, Bell B, Margolis H. 2005. Hepatitis a
40 478 molecular epidemiology in the United States, 1996-1997: sources of
41 479 infection and implications of vaccination policy. *J Infect Dis* 191(6):957-963.
42 480 Oba I, Spina A, Saraceni C, Lemos M, Senhoras R, Moreira R, Granato C.
43 481 Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical
44 482 samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42(4):197-200.
45 483 Ochnio J, Scheifele D, Ho M, Mitchell L. 1997. New, ultrasensitive enzyme
46 484 immunoassay for detecting vaccine- and disease-induced hepatitis A virus-
47 485 specific immunoglobulin G in saliva. *J Clin Microbiol* 35(1):98-101.
48 486 Otto T, Vasconcellos E, Gomes L, Moreira A, Degraive W, Mendonça-Lima L,
49 487 Alves-Ferreira M. 2008. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality
50 488 control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res*
51 489 7(3):861-871.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 490 Papathanasopoulos M, Patience T, Meyers T, McCutchan F, Morris L. 2003. Full-
4 491 length genome characterization of HIV type 1 subtype C isolates from two
5 492 slow-progressing perinatally infected siblings in South Africa. *AIDS Res*
6 493 *Hum Retroviruses* 19(11):1033-1037.
- 8 494 Poovorawan Y, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P,
9 495 Chutsirimongkol S, Tangkijvanich P. 2005. Clinical features and molecular
10 496 characterization of hepatitis A virus outbreak in a child care center in
11 497 Thailand. *J Clin Virol* 32(1):24-28.
- 13 498 Robertson B, Averhoff F, Cromeans T, Han X, Khoprasert B, Nainan O,
14 499 Rosenberg J, Paikoff L, DeBess E, Shapiro C, Margolis H. 2000. Genetic
15 500 relatedness of hepatitis A virus isolates during a community-wide outbreak.
16 501 *J Med Virol* 62(2):144-150.
- 17 502 Robertson B, Jansen R, Khanna B, Totsuka A, Nainan O, Siegl G, Widell A,
18 503 Margolis H, Isomura S, Ito K. 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus
19 504 strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 73 (Pt
20 505 6):1365-1377.
- 22 506 Roy K, Bagg J, McCarron B, Good T, Cameron S, Pithie A. 1998. Predominance of
23 507 HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. *J Med Virol* 54(4):271-
24 508 275.
- 26 509 Shapshak P, Segal D, Crandall K, Fujimura R, Zhang B, Xin K, Okuda K, Petito
27 510 C, Eisdorfer C, Goodkin K. 1999. Independent evolution of HIV type 1 in
28 511 different brain regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15(9):811-820.
- 29 512 Smith P, Grabau J, Werzberger A, Gunn R, Rolka H, Kondracki S, Gallo R,
30 513 Morse D. 1997. The role of young children in a community-wide outbreak
31 514 of hepatitis A. *Epidemiol Infect* 118(3):243-252.
- 33 515 Staes C, Schlenker T, Risk I, Cannon K, Harris H, Pavia A, Shapiro C, Bell B.
34 516 2000. Sources of infection among persons with acute hepatitis A and no
35 517 identified risk factors during a sustained community-wide outbreak.
36 518 *Pediatrics* 106(4):E54.
- 37 519 Stuart J, Majeed F, Cartwright K, Room R, Parry J, Perry K, Begg N. 1992.
38 520 Salivary antibody testing in a school outbreak of hepatitis A. *Epidemiol*
39 521 *Infect* 109(1):161-166.
- 41 522 Takamatsu K, Okayasu I, Koyanagi Y, Yamamoto N. 1992. Hepatitis C virus
42 523 propagates in salivary glands. *J Infect Dis* 165(5):973-974.
- 43 524 Tanaka J. 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 18
44 525 Suppl 1:S57-60.
- 46 526 Venczel L, Desai M, Vertz P, England B, Hutin Y, Shapiro C, Bell B. 2001. The
47 527 role of child care in a community-wide outbreak of hepatitis A. *Pediatrics*
48 528 108(5):E78.
- 49 529 Villar L, de Paula V, Diniz-Mendes L, Lampe E, Gaspar A. 2006a. Evaluation of
50 530 methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples.
51 531 *J Virol Methods* 137(2):169-176.
- 53 532 Villar L, Esteves da Costa MC, de Paula V, Gaspar A. 2002. Hepatitis a outbreak
54 533 in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*
55 534 97(3):301-305.
- 56 535 Villar L, Lampe E, Meyer A, Gaspar A. 2004. Genetic variability of hepatitis A
57 536 virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school
58 537 children. *Braz J Med Biol Res* 37(12):1779-1787.
- 60

- 1
2
3 538 **Villar L, Morais L, Aloise R, Melo M, Calado I, Lampe E, Gaspar A. 2006b. Co-**
4 539 **circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil.**
5 540 **Braz J Med Biol Res 39(7):873-881.**
6 541 **Vitral C, Gaspar A, Souto F. 2006. Epidemiological pattern and mortality rates for**
7 542 **hepatitis A in Brazil, 1980-2002--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz**
8 543 **101(2):119-127.**
9
10 544
11 545
12
13
14
15
16 546
17
18
19 547
20
21 548
22
23
24
25
26 549
27
28 550
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Peer Review

Table I: Demographic characteristics and HAV status of the studied population

Characteristic	Day Care Children (n=65)	Staff Members (n=21)	Household contacts (n=40)	Total (n=126)
Gender				
Male	31 (48%)	2 (9.5%)	23 (58%)	56 (44%)
Female	34 (52%)	19 (90.5%)	17 (42%)	70 (55%)
Age distribution				
0-5	65 (100%)	0	18 (45%)	83 (66%)
6-10	0	0	21 (53%)	21 (17%)
11-15	0	0	1 (3%)	1 (0.8%)
16-20	0	0	0	0
21-30	0	7 (33%)	0	7 (6%)
31-40	0	6 (29%)	0	6 (5%)
>40	0	9 (43%)	0	9 (7%)
Hepatitis A status*				
acute	43 (66%)	1 (5%)	8 (20%)	52 (41%)
susceptible	11 (17%)	1 (5%)	14 (35%)	26 (21%)
immune	22 (34%)	19 (90%)	16 (40%)	57 (45%)
HAV-RNA positive	20 (31%)	0	5 (13%)	25 (20%)
Risk factors				
Close contact with HAV cases	16 (25%)	17 (81%)	6 (15%)	39 (31%)
Sewage disposal	62 (95%)	21 (100%)	36 (90%)	119 (94%)
Contact with sewage water	6 (9%)	0 (0%)	8 (20%)	14 (11%)
Consumption of non-treated water	22 (34%)	3 (14%)	9 (22%)	34 (27%)

*Hepatitis A status: Acute= IgM and total anti-HAV positive; susceptible= IgM and total anti-HAV negative; Immune= Total anti-HAV positive

Table II: Homology among clones generated from HAV isolates in paired serum and saliva samples of co-infected patients.

Subject	Serum		Saliva	
	Amplicons* genotype	Clones homology (n)	Amplicons* genotype	Clones homology (n)
07	IA	97.5-100% (5)	IB	100% (3)
22	IA	99.4-100% (8)	IB	100% (2)
29	IA	90.5-95.2% (3)	IB	96.5-99.1% (5)
37	IA	92.3-95.2% (3)	IB	100% (4)

*The genotyping was based on PCR amplicons of 168 bp of VPI/2a region of HAV genome

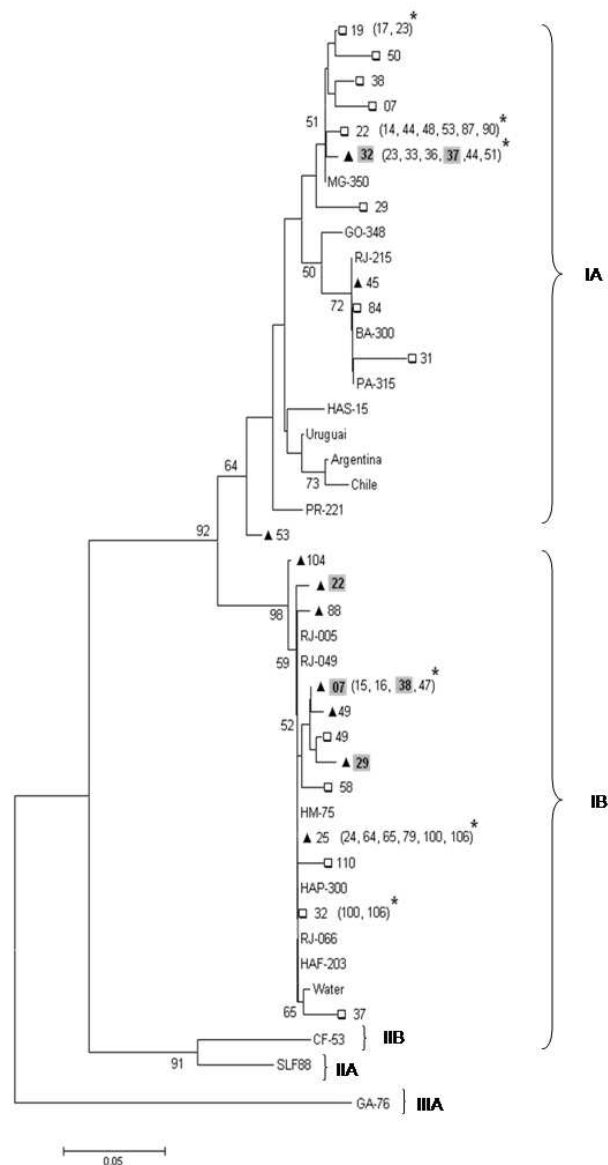


Figure I: Phylogenetic tree of 68 HAV isolates, constructed with the neighbor-joining method, and based on 168 nucleotides (positions 3024±3191). Roman numerals designate the respective genotype groupings, whereas A and B designate subgenotypes. Bootstrap percentages were calculated from 2000 replicates and the numbers higher than 50 are shown. The horizontal bar at the top represents an evolutionary distance of 0.05. The following symbols indicate the type of clinical specimen of the HAV isolate in this work: serum (\square), saliva (\blacktriangle) and the identical sequences with 100% of homology (*). Gray square indicates saliva samples of the patients mixed infected with subgenotypes IA and IB. Reference sequences from GenBank included subgenotypes IA: HAS-15 (X15464, USA), IB: HM-175 (M14707, Australia) and HAF-203 (AF26896, Brazil), IIA: (L07729, Sierra Leone), IIB: CF-53 (L07693, France) and IIIA: GA76 (L07668, USA). The sequences from Brazilian states: RJ (Rio de Janeiro) (AY322851) (AY322850) (AF410381) (AF410387) (AF538727), MG-350 (Minas Gerais) (AY323002), GO-348 (Goiás) (AY322994), PA-315 (Pará) (AY322923), BA-300 (Bahia) (AY322898), PR-221 (Paraná) (AY323046) and from Uruguay (AJ306387), Chile

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(AJ306383) and Argentine (AJ306374) has been reported by De Paula et al., 2004.
190x275mm (96 x 96 DPI)

For Peer Review

Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication

Luciane A. Amado*, Renato S. Marchevsky†, Vanessa S. de Paula*, Cleber Hooper‡, Marcos da S. Freire§, Ana Maria C. Gaspar* and Marcelo A. Pinto*

*Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, †Laboratório de Neurovirulência, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Biomanguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ‡Serviço de Controle de Qualidade Animal, CECAL/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil and §Laboratório de Tecnologia Viral, Biomanguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

INTERNATIONAL
JOURNAL OF
EXPERIMENTAL
PATHOLOGY

Summary

This work studied the replication sites of hepatitis A virus (HAV) in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) after intravenous inoculation. The cynomolgus monkeys were inoculated with the Brazilian hepatitis A virus strain (HAF-203). Monkeys were euthanized on days 15, 30, 45 and 60 postinoculation (pi). Liver samples, submandibular salivary gland, mesenteric lymph node and tonsils were removed for virological and pathological evaluation. Immunofluorescence analyses on liver and salivary gland sections using confocal laser scanning microscopy revealed the presence of HAV antigen (HAV Ag). The presence of HAV genome was monitored by real-time PCR. The HAV RNA was detected at 7 days postinoculation (dpi), concomitantly in serum, saliva and faeces. The highest HAV viral load was observed in faeces at 15 dpi (10^5 copies/ml), followed by serum viral load of 10^4 copies/ml at 20 dpi and saliva viral load of 10^3 copies/ml at 7 dpi. The animals showed first histological and biochemical signs of hepatitis at 15 dpi. The HAV antigen (Ag) was present from day 7 until day 60 pi in the liver and salivary glands. The HAV replicative intermediate was also detected in the liver (4.5×10^4 copies/mg), salivary glands (1.9×10^3 copies/mg), tonsils (4.2×10^1 copies/mg) and lymph nodes (3.4×10^1 copies/mg). Our data demonstrated that the salivary gland as an extrahepatic site of early HAV replication could create a potential risk of saliva transmitted infection. In addition, the cynomolgus monkey was confirmed as a suitable model to study the pathogenesis of HAV human infection.

Keywords

cynomolgus, extrahepatic site, Hepatitis A, intermediate replicative, saliva and pathogenesis

Received for publication:
9 March 2009
Accepted for publication:
29 October 2009

Correspondence:

Luciane Almeida Amado
Pavilhão Helio e Peggy Pereira
sala B219
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Av.
Brasil 4365
CEP: 21040-360
Rio de Janeiro
RJ
Brazil
Tel.: (+55 21) 21 2562-1876
Fax: (+55 21) 2270-6397
E-mail: l_amado@ioc.fiocruz.br

Hepatitis A is one of the most reported infectious diseases and is a public health problem worldwide (Martin & Lemon 2006). Hepatitis A virus (HAV) is mainly transmitted through the faecal-oral route, by person-to-person contact and/or contaminated food and drinking water (Hadler *et al.* 1980). HAV causes a self-limited infection in the liver (Vital *et al.* 2006) that occurs in both sporadic and epidemic cases. The exact pathogenesis of HAV remains undefined. However, it is generally accepted that after entry via the gastrointestinal tract, the virus reaches the liver, replicates into hepatocytes and is then transported via bile to the intestines (Asher *et al.* 1995).

Like other members of the Picornavirus family, HAV replication is via a complementary minus-strand RNA (intermediate replicative). The copies of picornavirus minus-strands are 100-fold fewer than that of plus-strands in infected cells, suggesting that each minus-strand may serve as a template for the synthesis of many plus-strands (Gromeier *et al.* 1999; de Paula *et al.* 2009). The presence of HAV RNA is not sufficient to demonstrate its replication in other tissues, as viral RNA may be present because of contamination with plasma and/or adherence of circulating viruses, or as a result of immune complexes of the virus with secretory immunoglobulin. Therefore, the presence of this replicative intermediate is a hallmark of viral replication. Once detected, it could open up new possibilities to the understanding of the liver tropism and the pathogenesis of HAV (Jiang *et al.* 2004).

The replication of HAV in extrahepatic tissues is controversial. There are still unsolved questions concerning its transmission and pathogenesis (Pinto *et al.* 2002). In addition, HAV replication is remarkably slow in cell culture systems, showing a non-cytopathic behaviour (Lemon 1992). Previous studies have reproduced subclinical HAV infections in New World non-human primate species including common marmosets (*Callithrix jacchus*) and squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) (Pinto *et al.* 2002). Their small size and ease in manipulation give them many advantages over Old World monkeys as laboratory animal species. Macaque monkeys are widely used for biomedical research. Experimental infection of cynomolgus monkeys with human strain of HAV has provided a suitable model for studying HAV pathogenesis (Shevtsova *et al.* 1988). However, potential limitations of this model include poor descriptions and imprecise results (Balayan 1992). Previous studies of natural HAV infection in cynomolgus monkeys from the Malaysian tropical forest have been described (Burke & Heisey 1984; Belova *et al.* 1991; Nainan *et al.* 1991).

In this report, we demonstrate that intravenous infection of cynomolgus monkeys with HAV revealed an extrahepatic

replication site, which could be useful for studies regarding the transmission and pathogenesis of this disease.

Materials and methods

Animals

Five clinically healthy young male adult (weighing 3–5 kg) cynomolgus monkeys from the Primatology Department of the Center for Laboratory Animal Breeding of the Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, were used and confirmed to be seronegative for HAV. This colony of cynomolgus monkeys originated in 1988 with animals from the Philippines. The monkeys first went to the Hazleton Primate Center in Reston, Virginia, USA and after quarantine, they were shipped to Brazil. Since its establishment, the colony has been kept closed to the introduction of new animals. All animals have health certificates, which guarantee the absence of infectious diseases. A serological survey confirmed that they were free of simian immunodeficiency virus (SIV) and simian type D retrovirus (SRV/D).

During the study and quarantine periods, the monkeys were housed individually in stainless-steel squeeze-back cages in a climate-controlled room (temperature 21 ± 1 °C and relative humidity $55 \pm 5\%$) with a 12 h light/dark cycle.

The experimental protocol was reviewed and approved by the Fiocruz Ethics Commission for the Use of Animals (CEUA-Fiocruz, resolution #P0064-00). This study was performed in 2007.

Inoculum

The strain (HAF-203 accession: GenBank AF268396) of HAV was isolated from stool of a Brazilian child with sporadic hepatitis A infection (Gaspar *et al.* 1992). The stool samples were diluted 1% (w/v) in PBS (10 mM sodium phosphate, 0.15 M NaCl) with penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 mg/ml), clarified by low-speed centrifugation and filtered through a 0.45 µm membrane. HAV was titred by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (1:320) (Gaspar *et al.* 1992) and by real-time PCR (titer of 3×10^5 copies/ml). Four animals were inoculated intravenously with 0.5 ml of this faecal suspension, whereas one animal was maintained as uninfected control.

Experimental design

Preinoculation serum, saliva and liver samples were collected to establish individual baseline values for

biochemical, virological and immunological parameters. Clinical observation and rectal temperature were checked every day. Faeces were collected daily from the 7th to the 60th dpi. On days 7, 15, 20, 30, 45 and 60 pi, the animals were anaesthetized with 10–20 mg/kg ketamine hydrochloride (Vetanarcol™, Konig, Brazil) to collect saliva and blood samples.

The monkeys were sacrificed by total exsanguination under deep anaesthesia on days 15 (cy1), 30 (cy2), 45 (cy3) and 60 (cy4 and cy5) pi. After necropsy, samples of the liver, submandibular salivary gland, mesenteric lymph node and tonsils were excised for histological and virological studies. Control specimens were obtained from the seronegative control animal (cy5).

Samples collection

Total blood samples were collected by venipuncture into sterile tubes, after which serum was obtained by centrifugation and stored at -20°C . Saliva samples were collected using OraSure® collection devices (Epitope Incorporated, Beaverton, OR, USA) according to the manufacturer's instructions. The samples were later recovered by centrifugation at 2500 g for 15 min at 10°C and then stored at -20°C until analysis.

Serum aminotransferases

Serum from the monkeys was assessed for alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels by a manual colorimetric procedure using a commercially available kit (Abbott, North Chicago, IL, USA). ALT and AST baseline levels were obtained from preinoculation and control group blood samples.

HAV antibodies

Serum was analysed by ELISA using a commercial kit (Bioelisa HAV 96T Kit, Biokit, S.A., Barcelona, Spain) to detect IgM and total anti-HAV antibodies.

Haematological analyses

Blood samples for haematocrit and total white blood cells were collected using Capiject® dipotassium-EDTA capillary blood collection tubes and analysed by a fully automated veterinary haematology analyzer ABX ABC Vet (Horiba ABX, Montpellier, France). For the leucocytes, a series of blood films were prepared and treated for May-Grünwald-Giemsa staining.

Histopathological and immunofluorescence examination

Samples of the liver, salivary gland, mesenteric lymph node and tonsils were fixed in 10% neutral formalin. Paraffin sections, 4 μm thick were stained with haematoxylin and eosin (H&E). The excised liver and salivary gland tissues were immediately put in liquid nitrogen and stored at -70°C until assayed for HAV Ag by immunofluorescence using a mouse anti-HAV IgG1 monoclonal antibody (against HAV conformational epitope) as primary antibody (0.1 mg/ml) diluted 1:20 (United States Biological, Swampscott, MA, USA), followed by Alexa Fluor 488-labelled chicken anti-mouse IgG (2 mg/ml) diluted 1:300 (Molecular Probe, Eugene, OR, USA) as secondary antibody. Slides were counterstained with Evans Blue, coverslip with Slow Fade® in glycerol with DAPI stain (Molecular Probe) and the images of positive fields were obtained by confocal microscopy LSM Zeiss 510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). In addition, to check the specificity of the staining in infected tissues, the primary antibody was replaced with a negative isotype control of mouse immunoglobulin IgG1 (0.5 mg/ml) diluted 1:20 (Chemicon, Melbourne, Australia). Non-infected tissue sections were also stained with the primary antibody (mouse anti-HAV IgG1 monoclonal antibody).

Real-time PCR

Viral RNA was extracted from 140 μl of serum, saliva and faecal suspension (10% w/v in PBS) samples and 60 μl of RNA was eluted using the commercial assay QIAamp viral RNA (Qiagen, Valencia, CA, USA). Total RNA was isolated from 0.03 g of tissue samples of the liver, salivary gland, tonsils and mesenteric lymph node, by a commercial rapid shell-vial-assay (Promega, Madison, WI, USA) and then eluted in 100 μl of RNase-free water. The cDNA was prepared at 42°C over a course of 60 min using 10 μl of RNA, RNAsin (IU/ μl), random primers (20 pmol/ μl) (Invitrogen), dNTP (1.25 mM) (Invitrogen) and the Superscript III transcriptase (IU/ μl) (Invitrogen). HAV RNA was quantified with the TaqMan® real-time PCR assay using an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

To quantify HAV RNA, a standard curve of a recombinant clone of the 5' non-coding (NC) region of the HAV (strain HAF-203) was used. The clone was quantified using a GeneQuant Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) (de Paula *et al.* 2007). The recombinant clone was submitted to 10-log serial dilution to generate the standard curve points. The standard curve is linear

over the range from 1.4×10^1 to 1.4×10^8 copies/ml, with a slope of -3.39 (correlation coefficient $R^2 = 0.998$). The detection limit of the assay is 14 copies of viral RNA per reaction. Specific primers for HAV 5' NC and a single-labelled 5' FAM probe were designed based on the sequence of the cloned HAV, using Primer Express software, version 2.0 (Applied Biosystems), forward primer numbering as wild-type (M14707) 86–109 5'-CTGCAGGTTTCAGGG-TTCTTAAATC-3', reverse primers 219–240 5'-GAGACCCTGGAAGAAAGAAGA-3' and HAV probe 198–218 (FAM-5'-ACTCATTTTTTCACGCTTCTG-3').

To confirm HAV detection and its genotype, after reverse transcription, the VP1/2A junction region of the HAV genome was amplified using nested PCR as described by de Paula *et al.* (2003). Amplicons of the expected size (247 bp) were purified using QIAquick PCR Purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and sequenced directly using Big Dye[®] Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit on Gene Amp PCR System 9700 sequencer apparatus. Sequencing products were analysed on an ALFexpress automated sequencer (ABI-3730) (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). Nucleotide sequences were compared with other sequences deposited in the GenBank.

Detection of HAV negative-strand RNA

To analyse HAV replication levels in tissue samples, the negative-strand HAV RNA was detected and quantified by *rTth*-based strand-specific real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Applied Biosystems). With a thermostable enzyme *rTth*, false priming of the incorrect strand was avoided by conducting cDNA synthesis at 70 °C. Strand specificity requires that no RT activity remain after cDNA synthesis when both primers are added for PCR amplification (de Paula *et al.* 2009).

Negative-strand RNA from tissue samples was amplified in 5' NC region. The cDNA was generated in 50 µl of a reaction mixture containing 10 pmol/µl of sense primer for 5' NC region (5'-ACCAATATATCGCGCTGCTGTAC-3'; nucleotide position 452–477), 1 × RT buffer, 2 µl of MnCl₂, 10 mM of each deoxynucleoside triphosphate, and 2.5 U of *rTth*. Reverse transcription of the negative strand was performed at 60 °C for 1 h, followed by 10 min at 95 °C.

To quantify negative strands, a standard curve for real-time PCR was developed. After identity confirmation of the 5' NC region by nucleotide sequencing, these amplicons were cloned into a TOPO cloning vector (Invitrogen) and a plasmid from a recombinant clone was used for establishing standard curve points for negative strands. The recombinant

plasmid was quantified using a GeneQuant Spectrophotometer (Amersham Biosciences). Standard curves were generated using 10^1 – 10^7 copies. All PCR reactions were carried out using the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) and the primers and probes were identified using the Primer Express program (TaqMan gene expression assay). For each PCR run, a master mix was prepared on ice with 1 × TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 1.25 µl of assay (300 nM of sense: 5'-ACCAATATATCGCGCTGCTGTAC-3' and reverse primers: 5'-CGGG-TGAAACCTTAGCTAATAC-3' and 150 nM of probe: FAM-5'CCTATCCAAGGTCTCT-3') (Gentec, Applied Biosystems Assay). Five microlitres of cDNA and standard curve points (recombinant plasmid, specific for 5' NC region negative-strand of HAV) were added to 20 µl of the PCR master mix. The thermal cycling conditions were an initial step at 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 1 min.

The sensitivity and strand specificity of this reaction were established using synthetic RNAs as templates for the HAV 5' NC region. The sensitivity of this negative-strand assay was 20 copies/µl. Self-priming or endogenous priming was ruled out by the lack of any amplification products following RT-PCR and without primers in the RT mixture. All assays were carried out in duplicate and the mean values were obtained by direct real-time PCR.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis for continuous variables was performed using non-parametric (Kruskal–Wallis H test) statistics to compare medians and the Pearson's correlation coefficient (r) (or Spearman's rho coefficient of rank correlation) for correlation analysis of viral load logarithmic data (log viral load). All P -values were two-tailed and $P < 0.05$ was considered statistically significant. All calculations were undertaken using GraphPad InStat 1998, version 3.01 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Clinical signs, liver enzymes and serum anti-HAV responses

None of the five animals displayed clinical signs of viral hepatitis. Biochemical and viral profiles from each animal are summarized in Figure 1. The average data of liver enzymes are described in Table 1.

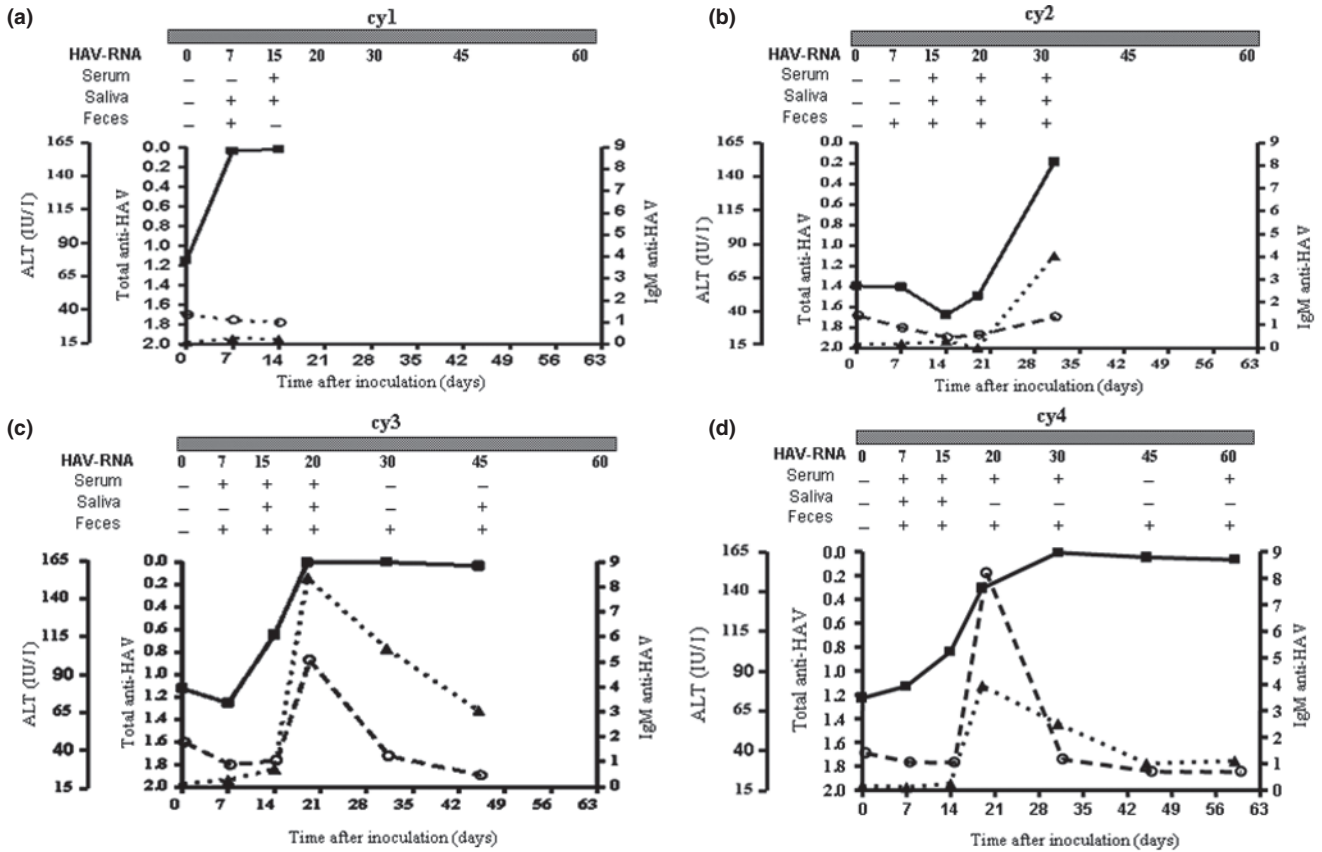


Figure 1 Course of hepatitis A infection in cynomolgus monkeys after inoculation with hepatitis A virus (HAV). During the time-course, serum, saliva and faeces were assayed for HAV RNA (+ or -). Serum samples obtained during follow-up were analysed for alanine aminotransferase level and anti-HAV antibodies (*). Cut-off for normal ALT was 22.5 IU/l. *Total and IgM anti-HAV are shown in DO/cutoff values.

This study indicates that in the preinoculation sera, no IgM or total anti-HAV antibodies were detectable. The animal (cy1) euthanized at 15 dpi did not produce IgM anti-HAV antibodies. Its seroconversion was considered, just by the elevation of serum total anti-HAV titres, which occurred at the first week pi without elevation of ALT (Figure 1a). The cy2 (euthanized day 30) showed a delayed elevation of IgM and total anti-HAV levels, with the highest peak at 30 dpi, with slight ALT elevation (Figure 1b). Monkeys cy3 and cy4 (euthanized day 45 and 60 respectively) showed increasing titres of IgM anti-HAV, reaching the highest titres on 20 days pi (Figure 1c, d) associated with ALT peaks and the presence of liver lesions characterized by infiltration of mononuclear inflammatory cells. Detection of total anti-HAV antibodies increased after the first week (Figure 1c, d). Neither IgM nor total anti-HAV antibodies were detected in the control animal (cy5). Peak ALT levels were recorded on day 20 postinoculation. However, the average AST level was inconclusive (Table 1).

Virus load from faeces, serum and saliva

The earliest HAV sequences were detected in faeces on the first day of collection (7 dpi) in all inoculated animals. After this period, virus was observed in saliva and serum intermittently. Only one monkey (cy2) showed viral shedding in faeces, serum and saliva for the full follow-up (30 dpi).

The highest HAV-RNA titre was observed in faeces from cy3 and cy4, between 15 and 20 dpi (10^4 and 10^5 copies/ml respectively). Both showed a decrease in faeces viral load after 20 dpi dropping to 10^2 copies/ml at the end of the follow-up period (Figure 2c, d). A similar decreasing pattern of viral load was seen in their sera (10^4 – 10^2 copies/ml). In the animal cy2, a constant faecal and serum viral load (10^2 copies/ml) was maintained during the whole period studied (Figure 2b). The unique apparent viral clearance of peripheral blood occurred in cy3 (45 dpi). Two animals, cy1 and cy4, showed measurable salivary viral load in the first week pi (Figure 2a, d). However, in other animals (cy2 and cy3), the HAV RNA

Table 1 Biochemical and haematological characteristics during the course of hepatitis A infection in cynomolgus monkeys

Characteristics*	Days postinoculation							P-value
	0	7	15	20	30	45	60	
ALT (IU/l)	37.7 ± 5.2	29.2 ± 3.7	27.7 ± 6.8	90.0 ± 65.6	33.0 ± 3.0	22.5 ± 0.7	22 ± 0.0	0.0198 [†]
AST (IU/l)	96.0 ± 2.4	56.0 ± 6.2	56.0 ± 12.9	72.6 ± 27.1	54.0 ± 16.5	61.5 ± 3.5	75.0 ± 0.0	0.0432 [†]
Leucocyte (cel/mm ³)	1,1025.0 ± 3664	1,4475 ± 1960	1,3500 ± 3349	9233 ± 115.5	9500 ± 1473	9200 ± 1272	7900 ± 0.0	0.0346 [†]
Neutrophil (cel/mm ³)	6871 ± 4155	6116 ± 4245	7738 ± 3551	3592 ± 1264	3358 ± 896	3292 ± 1486	2291 ± 0.0	0.3410
Band cell (cel/mm ³)	0 ± 0	289 ± 327	846.5 ± 872	146.4 ± 4	436.6 ± 386	175 ± 104.6	0 ± 0	0.0351 [†]
Lymphocyte (cel/mm ³)	3884 ± 700.6	6130.5 ± 1459	5288.2 ± 535.2	5239.3 ± 1120	5544 ± 2137	5531 ± 394.6	5451 ± 0.0	0.0646
Eosinophil (cel/mm ³)	0.0 ± 0.0	1.6 ± 1.1	2.5 ± 1.7	1.3 ± 1.1	1.7 ± 0.6	0.5 ± 0.7	1.0 ± 0.0	0.2516
Monocytes (cel/mm ³)	269.25 ± 85	379.00 ± 326	102.5 ± 150.7	277.6 ± 162	438.3 ± 261	206 ± 56.5	79 ± 0.0	0.3110
Platelet (1000/mm ³)	414.5 ± 87.5	401.5 ± 31.4	376.5 ± 156.2	357.7 ± 24.5	369.7 ± 115.6	352.5 ± 47.4	371 ± 0.0	0.934

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

*Values of the characteristics are the means ± SD of the four infected monkeys and the control.

[†]Difference of mean values of each day postinoculation highly significantly ($P < 0.05$).

was detectable in saliva samples only from the second week pi, followed by a nearly constant viral load (10^2 – 10^3 copies/ml) until death. In cy3, HAV RNA showed an intermittent pattern of shedding in saliva, as it became undetectable on day 30, but reappeared again on 45 dpi (Figure 2c). HAV RNA was undetectable in the control animal (cy5).

Peripheral blood cell behaviour during infection

The values obtained from all inoculated animals were depicted as the mean of absolute counts of white cells and platelets (Table 1). The number of leucocyte counts began to decrease at 20 dpi and had a significant decrease at 60 dpi of the study ($P = 0.0346$). The animals had a slightly reduced number of neutrophils after 15 dpi. This fact was associated with the increased number of band cells on day 15 ($P = 0.0351$) and recovered gradually towards baseline by the end of the follow-up period. However, variations among the means of lymphocytes, monocytes, eosinophils and platelet levels were considered not significant ($P > 0.05$) throughout the course of infection.

Histopathological findings and HAV antigen detection by indirect immunofluorescence

Histopathological findings of the liver revealed (suggestive) changes as a consequence of the HAV infection. At the

interface between portal tracts and parenchyma, there were diffusely scattered macrophages mixed with lymphocytes and a few polymorphonuclear leucocytes (Figure 3a). Hepatocellular swelling started at 7 dpi, acidophilic degeneration from 15 dpi and portal tract inflammatory cells from 20 dpi. Hepatocyte regeneration was characterized by the presence of numerous multinucleated hepatocytes at 7 and 30 dpi. Portal tracts were enlarged by moderate infiltration of mononuclear cells from 20 to 45 dpi (cy3, cy4). Microvesicular steatosis of the hepatocytes was present at the first week after HAV inoculation (cy1, cy2). A slight focal inflammation with macrophage infiltration was first seen on 15th dpi (cy1, cy2), followed by a moderate inflammation from 30 dpi (cy2, cy3). At 3 weeks pi, hepatocytes of cy2 showed diffuse ballooning with clear cytoplasm and numerous clusters of macrophages. Severity of liver histological lesions was totally coincident with ALT and antibody peak values (at 20 dpi). Liver sections from control animal, in contrast, did not show any abnormality (cy5).

Hepatitis A virus antigen was detected 2 weeks after inoculation by specific fluorescence in the cytoplasm of hepatocytes and in Kupffer cells, which presented a fine and granular perinuclear immunostaining and maintained this characteristic until the end of the study (Figure 3c). In addition, periportal distribution of HAV Ag was also detected during the follow-up.

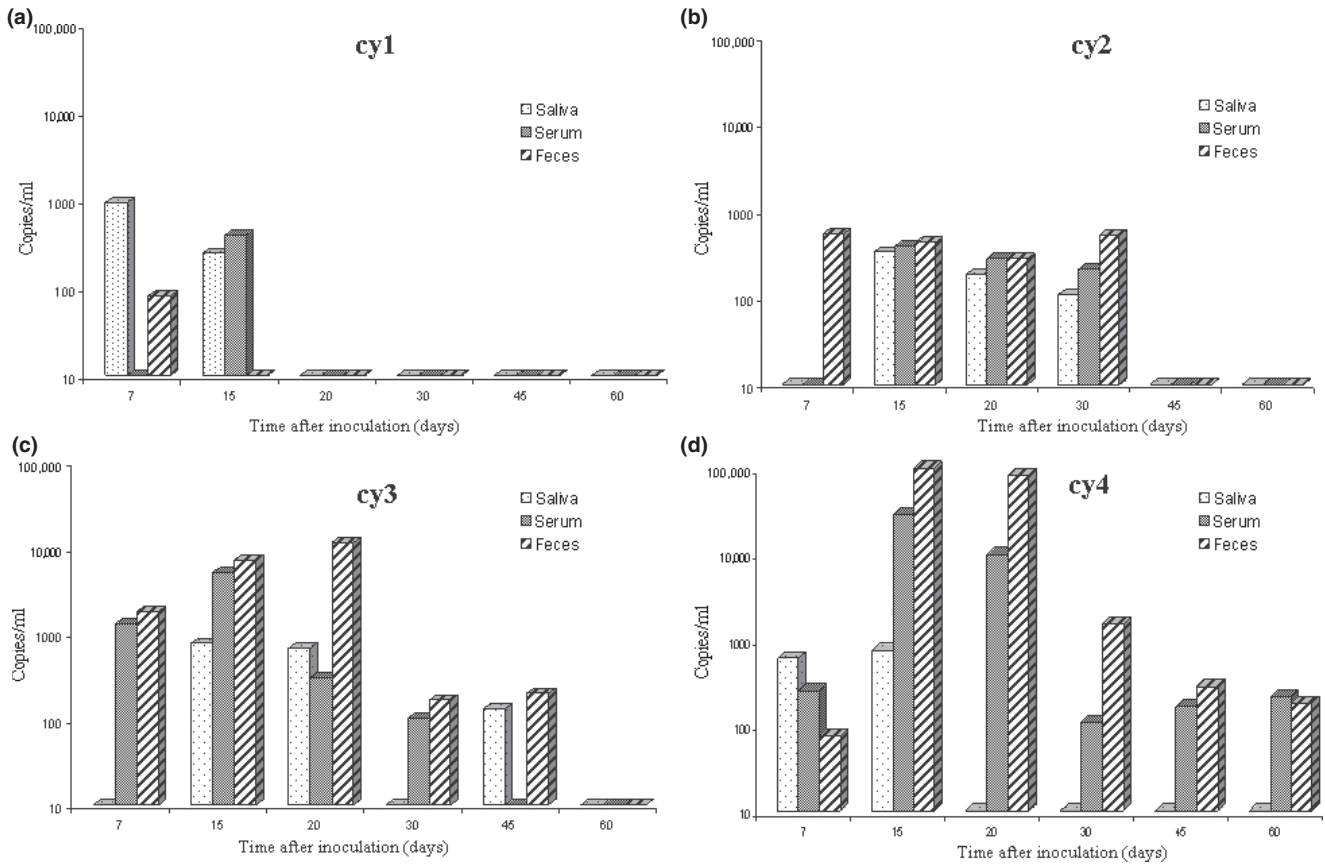


Figure 2 Hepatitis A virus titres by real-time PCR in saliva, serum and faeces from intravenously inoculated cynomolgus monkeys.

At 60 dpi after inoculation, HAV Ag was still detected in the liver. Any pathological changes were diagnosed on post-mortem examination of the salivary gland. A positive signal was observed in cytoplasm of both serous and mucous glandular cells and in a diffuse pattern surrounding the interlobular excretory duct (Figure 3f).

Replication dynamics of HAV in liver and extrahepatic tissues

Specific real-time RT-PCR assay was used to quantify the level of viral strand-specific RNA, especially of HAV minus-stranded RNA, in salivary glands, tonsils, mesenteric lymph nodes and liver. The highest positive-strand HAV RNA viral load was found in the liver (8.7×10^8 copies/mg), which was significantly higher than the viral titres obtained from salivary glands (2.3×10^4 copies/mg) ($P < 0.001$), tonsils (1.6×10^3 copies/mg) ($P < 0.001$) and mesenteric lymph nodes (6.4×10^2 copies/mg) ($P < 0.01$). In the minus-strands HAV RNA, the highest viral

load was also in the liver (4.5×10^4 copies/mg), followed by salivary glands (1.9×10^3 copies/mg), tonsils (4.2×10^1 copies/mg) and mesenteric lymph nodes (3.4×10^1 copies/mg). There were significant differences between individual values of minus-strands HAV RNA viral load (Figure 4) in the liver and salivary glands ($P = 0.0067$). The RNA replicative intermediate detection was more intense in salivary glands (10^3 copies/mg) at the beginning of the infection (15 dpi) than in the liver (10^2 copies/mg). Thereafter, the liver active replication became higher (10^4 copies/mg) than in the other tissues and remained approximately constant. The replicative intermediate of HAV was also weakly detected in tonsils and lymph nodes.

A very significant positive correlation ($r = 0.965$; $P = 0.008$) was observed between the salivary viral load and the level of intermediate replicative in salivary glands. No other significant correlations were observed between biological sample viral loads and quantitative levels of intermediate replicative in the tissue samples.

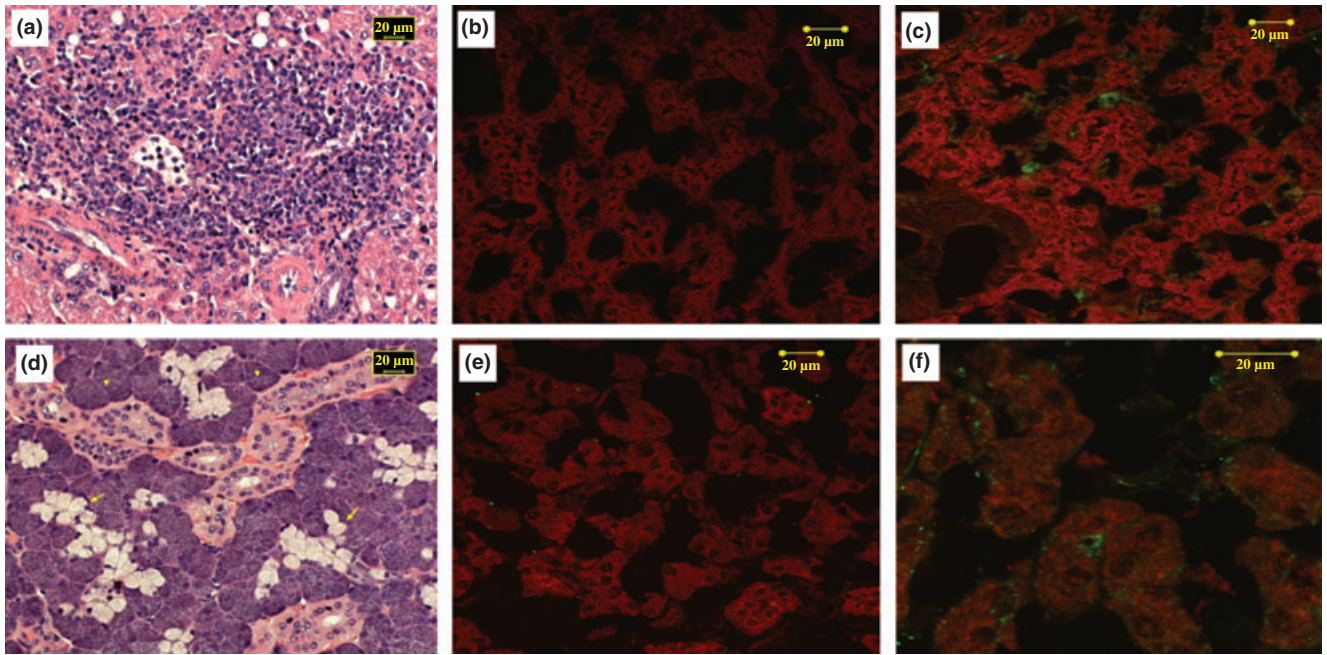


Figure 3 Optical and confocal immunofluorescence microscopy characteristics of the liver (a, b and c) and submandibular salivary gland (d, e and f) from cynomolgus monkeys after inoculation with hepatitis A strain HAF-203. Panel A shows portal tract with dense infiltrate of mononuclear inflammatory cells with moderate interface hepatitis (H&E); Panel B shows isotype (IgG1) control of infected liver. Panel C shows specific green-fluorescence indicating viral-positive in the cytoplasm of Kupffer cells; Panel D exhibits section of a salivary gland duct with the epithelial lining surrounded by thin connective tissue. Serous acini (head arrows) are more plentiful than mucous acini (arrows) (H&E); Panel E shows isotype (IgG1) control of infected salivary gland and Panel F visualizes specific green-fluorescence in cytoplasm of acinar cells.

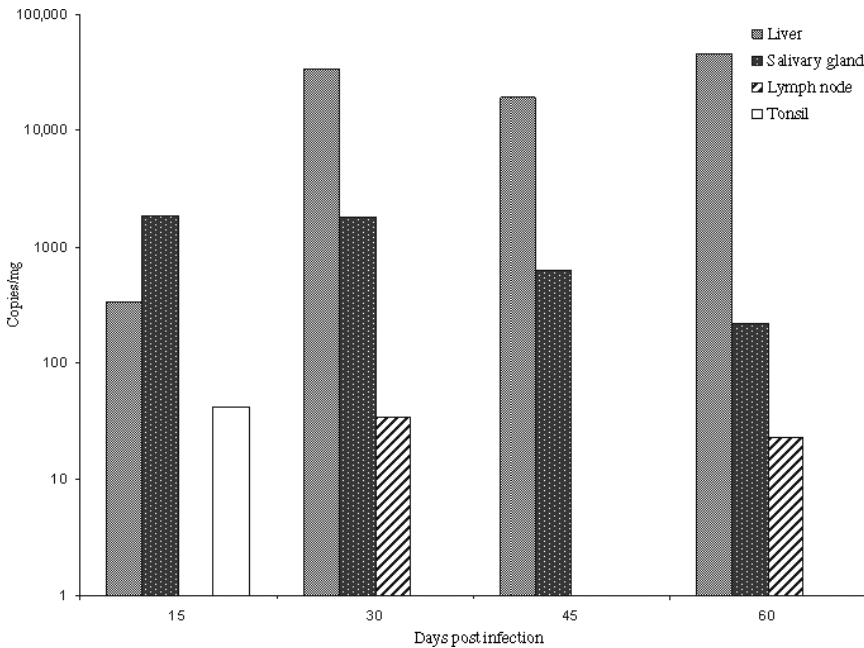


Figure 4. Specific detection of hepatitis A virus (HAV) negative-strand RNA in tissue samples (liver, salivary gland, tonsil and lymph node) from inoculated cynomolgus monkeys. The amount of HAV intermediate replicative in tissues was assayed by *rTth*-based RT-PCR.

Discussion

This report describes the susceptibility of cynomolgus monkeys (*M. fascicularis*) to experimental HAV infection in light of advanced techniques of molecular biology. None of these HAV inoculated monkeys exhibited clinical manifestations related to hepatitis A infection. Liver histology and immunohistochemistry remain the “gold standard” in diagnostic evaluation of experimental HAV in monkeys associated with aminotransferase abnormalities (Balayan 1992).

In this study, the ALT peak values were chronologically coincident with most of liver morphology changes and with peak of anti-HAV antibody titres. Together, these findings suggest that the hepatocellular injury is a consequence of host immune response against HAV infection as has been reported (Popper *et al.* 1980; Keenan *et al.* 1984; Asher *et al.* 1995). In addition, several other reports have described coincident peaks of viral excretion in stools and ALT elevation (Keenan *et al.* 1984; Karayiannis *et al.* 1986).

HAV RNA was first detected in faeces at 7 dpi in all experimentally infected cynomolgus monkeys, which is consistent with previous studies (Asher *et al.* 1995). In general, in this study, the cynomolgus monkeys showed a similar faecal HAV RNA excretion pattern to that of tamarins (Karayiannis *et al.* 1986) and owl monkeys (Asher *et al.* 1995). In this study, faeces viral load ranged from 10^2 to 10^5 copies/ml and HAV RNA was detected until 60 dpi, probably because of the high sensitivity of the real-time PCR. The same result was not demonstrated by Asher *et al.* (1995) who reported faecal HAV excretion until 35 dpi. A previous study using chimpanzees experimentally infected with HAV, describes a higher viral load in faeces (10^9 – 10^{10}) (Cohen *et al.* 1989) using the CID 50 (50% chimpanzee infectious dose) technique that detects only HAV Ag particles, in which a major portion of the antigens can be associated with non-infectious, empty particles (Ruchti *et al.* 1991).

Viraemia titres were detected from 7 to 30 dpi in all inoculated monkeys. We also observed persistent viraemia up to 60 dpi in one animal (cyn 2), even after antibody seroconversion. The relationship between HAV detection and infectivity has not been established yet (Polish *et al.* 1999). Through immunoenzymatic assay previously described by Baptista *et al.* (1993) we observed excretion of HAV antigen in blood up to 60 dpi until 10^{-4} dilution (data not shown). These results associated with the HAV RNA detection in blood and high rates of HAV replication in liver (approximately 10^4 copies/mg) suggest the detection of potentially infectious viruses up to 60 dpi, despite seroconversion. However, the presence of viral particle and genetic material does not necessarily correlate with infectivity, as the majority of

particles are usually defective (Ruchti *et al.* 1991; Polish *et al.* 1999). Investigations into human HAV infections showed a similar kinetics and a mean serum viral load of 10^3 copies/ml (Costa-Mattioli *et al.* 2002; Normann *et al.* 2004).

Animal experiments have further shown that infectious virus is shed in saliva during the incubation period and in the early acute phase (Asher *et al.* 1995) and that HAV RNA may be detected in saliva from 6 h postinoculation until several weeks after hepatitis onset (Pinto *et al.* 2002). It should be noted that in our model, HAV RNA was present in saliva during the first 15 dpi reaching peak titre on day 7. Other experimental protocols performed with orally inoculated chimpanzees also confirmed a short period of HAV excretion in saliva between 18 and 25 dpi (Cohen *et al.* 1989) and marmosets at 6 h after oral inoculation (Pinto *et al.* 2002). This early detection probably reflected the arrested inoculum in the oropharynx. However, this hypothesis must be excluded from our design, as the animals were inoculated intravenously. In addition, when HAV was detected in saliva there was a similar titre in the serum (on average of 10^3 copies/ml) and in two monkeys (cy2 and cy3), the saliva was positive without serum detection of HAV that would exclude the possibility of blood trace contamination. The presence of HAV in saliva as reported in this study and described in *Callithrix sp.* (Pinto *et al.* 2002) and *Pan troglodytes* (Cohen *et al.* 1989) suggests that this may represent a possible route of viral excretion. In acutely infected patients, HAV load in the saliva ranged from 10^2 to 10^4 copies/ml, suggesting that saliva may be infectious (Mackiewicz *et al.* 2004; Amado *et al.* 2008).

This experiment shows that cynomolgus monkeys developed mild-to-moderate hepatic pathology suggestive of infection with HAV, with typical lesions of HAV infection that have also been reported in many other studies (Shevtsova *et al.* 1988; Asher *et al.* 1995; Pinto *et al.* 2002). HAV antigen was a conspicuous finding in the liver and salivary gland of all animals necropsied from 15 to 60 dpi. The presence of HAV antigen in the cytoplasm of serous and mucous cells of the submandibular salivary glands during the follow-up suggests that HAV replicated in this organ and was excreted into saliva at the same time that the virus replicated in the liver.

In accordance with previous studies (Baptista *et al.* 1993; Asher *et al.* 1995; Pinto *et al.* 2002), HAV antigen was also observed in occasional Kupffer cells at 2 weeks pi, which may result from phagocytosis of immune complexes rather than active replication. However, the perinuclear fluorescence pattern observed in hepatocytes suggests an active HAV replication.

It should be noted (Table 1) that a significant decrease in the total leucocyte count at 20 dpi that probably results from a reduction in neutrophils, which is actually observed in acute viral hepatitis (Krugman *et al.* 1962), might point towards migration at sites of virus replication.

The pathogenesis of HAV is still controversial. Numerous attempts have been made to describe early events before viral replication in hepatocytes. Our study focused on the early events of HAV infection. We detected a more pronounced active replication viral marker (intermediate replicative) in cells of salivary glands before viral replication in the liver. Several groups have detected HAV Ag at extrahepatic sites, including the kidney, spleen (Mathiesen *et al.* 1978; Karayiannis *et al.* 1986), lymph node (Mathiesen *et al.* 1978), and duodenum (Karayiannis *et al.* 1986). HAV Ag and genomic material were also observed in tonsils and saliva, but it was inconsistently identified in other organs (Karayiannis *et al.* 1986; Cohen *et al.* 1989; Asher *et al.* 1995). Detection of HAV in tonsils and saliva, soon after the appearance of the virus in the blood, suggests that the earliest replication event could occur in the oropharynx or salivary gland (Cohen *et al.* 1989). However, the presence of HAV Ag at a given site is yet to be defined as a local site of viral replication, whereas replicative intermediate detection provides direct evidence of active viral replication.

The HAV titre peak in saliva occurred at 15 dpi. This peak coincided with that of positive and negative strands of HAV RNA detection in salivary glands. This finding was associated with a very significant positive correlation observed among intermediate replicative titres and saliva viral loads, suggesting that the HAV viral load in saliva samples may reflect a local site of HAV replication. These promising results suggest that HAV replication in the oral cavity and its consequent release into saliva may play an infectivity role of saliva as a potential source of person-to-person transmission.

HAV-RNA replication was also observed in tonsils and the mesenteric lymph node, but it was brief and weakly positive, which may be understood as viral capture by antigen-presenting cells on lymphoid tissue. We could speculate that after brief HAV replication in salivary gland, the hepatocytes assume HAV replication, releasing virions into the bile and sinusoids.

Although previous studies have shown that the chimpanzee is a good animal model for HAV studies, this species shows many disadvantages compared with cynomolgus monkeys, such as their greater size and manipulation difficulties. This work used advanced techniques, such as real-time PCR to quantify the HAV in different body fluids of experimentally infected non-human primates. The results

are in accordance with HAV load reported in saliva (mean of 10^3 copies/ml) (Mackiewicz *et al.* 2004; Amado *et al.* 2008) and in serum of human patients (Costa-Mattioli *et al.* 2002; Normann *et al.* 2004), demonstrating the feasibility of this species to reproduce human hepatitis A infection.

In conclusion, hepatitis A infection was successfully reproduced in cynomolgus monkeys (*M. fascicularis*) using a Brazilian human strain of HAV (HAF-203), confirming this species as useful model to study HAV pathogenesis *in vivo* as well as a candidate for possible hepatitis A vaccine studies. To our knowledge, this is the first study that proves HAV replication in monkey salivary glands and hypothesizes that HAV could be also transmitted through saliva by close person-to-person contact. However, there is no evidence that HAV can be transmitted by saliva and further studies are necessary to investigate this hypothesis.

Acknowledgements

We thank Simone Ramos for the biochemical analyses provided; Idevaldo Inácio Ferreira and Edney do Monte for the technical assistance during experimental infection; Dr. Adilson José de Almeida for the support in statistical analyses and Sheila Maria Barbosa de Lima, Liliane Morais and Luciane Gaspar for the laboratory assistance. This study received financial support from the following Brazilian agencies: Biomanguinhos/FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) and CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

References

- Amado L.A., Villar L.M., de Paula V.S., Gaspar A.M. (2008) Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *J. Virol. Methods* **148**, 74–80.
- Asher L.V., Binn L.N., Mensing T.L., Marchwicki R.H., Vassell R.A., Young G.D. (1995) Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Med. Virol.* **47**, 260–268.
- Balayan M.S. (1992) Natural hosts of hepatitis A virus. *Vaccine* **10**(Suppl. 1), S27–31.
- Baptista M.L., Marchevsky R.S., Oliveira A.V., Yoshida C.F., Schatzmayr H.G. (1993) Histopathological and immunohistochemical studies of hepatitis A virus infection in marmoset *Callithrix jacchus*. *Exp. Toxicol. Pathol.* **45**, 7–13.
- Belova E.G., Krylova R.I., Lomovskaia I.B., Shevtsova Z.V. (1991) Comparative morphology of spontaneous hepatitis A in lower Old World monkeys. *Arkh. Patol.* **53**, 28–32.

- Burke D.S. & Heisey G.B. (1984) Wild Malaysian cynomolgus monkeys are exposed to hepatitis A virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**, 940–944.
- 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., Monpoeho S., Nicand E., Aleman M.H., Billaudel S., Ferre V. (2002) Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J. Viral Hepat.* **9**, 101–106.
- Gaspar A.M., Vitral C.L., Yoshida C.F., Schatzmayr H.G. (1992) Primary isolation of a Brazilian strain of hepatitis A virus (HAF-203) and growth in a primate cell line (FRhK-4). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **25**, 697–705.
- Gromeier M., Bossert B., Arita M., Nomoto A., Wimmer E. (1999) Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence. *J. Virol.* **73**, 958–964.
- Hadler S.C., Webster H.M., Erben J.J., Swanson J.E., Maynard J.E. (1980) Hepatitis A in day-care centers. A community-wide assessment. *N. Engl. J. Med.* **302**, 1222–1227.
- Jiang Y.J., Liao G.Y., Zhao W. *et al.* (2004) Detection of infectious hepatitis A virus by integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 1105–1112.
- Karayiannis P., Jowett T., Enticott M. *et al.* (1986) Hepatitis A virus replication in tamarins and host immune response in relation to pathogenesis of liver cell damage. *J. Med. Virol.* **18**, 261–276.
- Keenan C.M., Lemon S.M., LeDuc J.W., McNamee G.A., Binn L.N. (1984) Pathology of hepatitis A infection in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Am. J. Pathol.* **115**, 1–8.
- Krugman S., Ward R., Giles J.P. (1962) The natural history of infectious hepatitis. *Am. J. Med.* **32**, 717–728.
- Lemon S.M. (1992) Inactivated hepatitis A virus vaccines. *Hepatology* **15**, 1194–1197.
- Mackiewicz V., Dussaix E.L., Petitcorps M.F., Roque-Afonso A.M. (2004) Detection of hepatitis A virus RNA in saliva. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4329–4331.
- Martin A. & Lemon S.M. (2006) Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* **43**, S164–172.
- Mathiesen L.R., Drucker J., Lorenz D., Wagner J.A., Gerety R.J., Purcell R.H. (1978) Localization of hepatitis A antigen in marmoset organs during acute infection with hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.* **138**, 369–377.
- Nainan O.V., Margolis H.S., Robertson B.H., Balayan M., Brinton M.A. (1991) Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* **72**(Pt 7), 1685–1689.
- Normann A., Jung C., Vallbracht A., Flehmig B. (2004) Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J. Med. Virol.* **72**, 10–16.
- de Paula V.S., Villar L.M., Gaspar A.M. (2003) Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. *Braz. J. Infect. Dis.* **7**, 135–141.
- de Paula V.S., Diniz-Mendes L., Villar L.M. *et al.* (2007) Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res.* **41**, 1169–1176.
- de Paula V.S., Perse A.S., Amado L.A. *et al.* (2009) Kinetics of hepatitis A virus replication *in vivo* and *in vitro* using negative-strand quantitative PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 1167–1176.
- Pinto M.A., Marchevsky R.S., Baptista M.L. *et al.* (2002) Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: early detection of HAV antigen and viral fate. *Exp. Toxicol. Pathol.* **53**, 413–420.
- Polish L.B., Robertson B.H., Khanna B. *et al.* (1999) Excretion of Hepatitis A virus (HAV) in adults: comparison of immunologic and molecular detection methods and relationship between HAV positivity and infectivity in tamarins. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3615–3617.
- Popper H., Dienstag J.L., Feinstone S.M., Alter H.J., Purcell R.H. (1980) The pathology of viral hepatitis in chimpanzees. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.* **387**, 91–106.
- Ruchti F., Siegl G., Weitz M. (1991) Identification and characterization of incomplete hepatitis A virus particles. *J. Gen. Virol.* **72**(Pt 9), 2159–2166.
- Shevtsova Z.V., Lapin B.A., Doroshenko N.V. *et al.* (1988) Spontaneous and experimental hepatitis A in Old World monkeys. *J. Med. Primatol.* **17**, 177–194.
- Vitral C.L., Gaspar A.M., Souto F.J. (2006) Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980–2002 – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 119–127.

Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR

V. S. de Paula · A. S. Perse · L. A. Amado ·
L. M. de Moraes · S. M. B. de Lima · R. S. Tourinho ·
A. M. C. Gaspar · M. A. Pinto

Received: 4 May 2009 / Accepted: 10 May 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The replication of hepatitis A virus (HAV) is via a complementary negative-strand RNA. Each negative strand may serve as a template for the synthesis of many positive strands. The aim of this study was to detect the intermediate replicative (negative strand) of HAV in order to monitor its replication in vitro and in vivo. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was standardized to detect the intermediate replicative of HAV in cell culture and liver from non-human primates infected experimentally. HAV primers from the 5' non-translated region and VP3 were used in the cDNA synthesis of negative-strand RNA. The negative strand was detected in the infected cell lines and liver by highly strand-specific *rTth* recombinant *Thermus thermophilus* DNA polymerase reverse transcription followed by quantitative PCR. The results indicate that the negative-strand HAV RNA can be detected in vivo and in vitro. This model is an approach for assessing the dynamic patterns of replication and should represent a valuable tool for the monitoring of HAV replications in cell cultures and for the evaluation of experimental infections in animal models.

Introduction

Hepatitis A virus (HAV) has a single-stranded RNA genome of 7.5 kb with positive polarity. As a member of

the Picornavirus family, it is unique in its biological properties, in particular, in its highly protracted replicative cycle in cell cultures and its inability to shut off the host cell metabolism. HAV causes a self-limiting infection of the liver with usually mild or no symptoms in young patients, whereas adult patients might suffer from severe symptoms [1, 2].

Similar to other positive-strand RNA viruses, the picornaviral genome serves as a template for both translation and replication. Initially, the viral RNA is translated into a polyprotein (P1–P2–P3), which is cleaved into the mature viral proteins by virus-encoded proteinases, making picornaviral gene expression mostly dependent on polyprotein processing. The viral structural proteins, VP1, VP2, VP3, and VP4, are released from their common precursor, P1. In a regulated fashion, the non-structural proteins, including the viral proteinase (3C) and polymerase (3D), are liberated from domains P2 and P3 of the polyprotein and are the major constituents of the virus replication complex, which catalyzes RNA genome synthesis. Once the replication complex is formed, viral RNA is used as the template for replication [3]. The genomic RNA is free in the cytoplasm and it is first translated to give rise to an array of viral proteins [4–6]. An unknown number of these viral polypeptides use the positive-stranded genomic RNA as a template to make a complementary negative-stranded RNA. This negative-stranded RNA is used, in turn, as a template to synthesize more copies of positive-stranded RNA molecules that can fulfill several requirements, i.e., they can be used as mRNAs to make viral proteins or as templates to make more copies of negative-stranded RNA, or they can be encapsidated to generate mature virions [7, 8].

The slow and inefficient replication of HAV in cell culture contrasts strongly with most other picornaviruses and hampers the large-scale, cost-effective production of

V. S. de Paula (✉) · A. S. Perse · L. A. Amado · R. S. Tourinho ·
A. M. C. Gaspar · M. A. Pinto
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ,
Pav. Helio e Peggy Pereira, Av. Brasil, 4365, Manguinhos,
CEP: 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil
e-mail: vdpaula@ioc.fiocruz.br

L. M. de Moraes · S. M. B. de Lima
Biomanguinhos, FIOCRUZ,
Rio de Janeiro, Brazil

viral antigen for diagnostic and vaccine use. Numerous studies have examined the restricted replication of HAV, and despite the limited information available, many hypotheses have been proposed. The kinetics of RNA synthesis is not well understood, mainly due to difficulties in detecting small amounts of viral product against the high background of cellular product seen after metabolic labeling, a result of the inability of HAV to inhibit host cell protein synthesis [9].

The pathogenesis of HAV is poorly understood because non-human primates are the only animal model for this virus [10, 11]. To understand the mechanism(s) of HAV, pathogenesis is a critical step toward the development of a live attenuated vaccine for HAV. Several inactivated vaccines which effectively protect individuals against HAV infection are currently available [12]. However, these inactivated vaccines are not generally available due to their cost, especially in developing countries. Further studies of HAV replication are required for a better understanding of such processes which could help toward the development of inactivated vaccines on a larger scale.

Previous studies have shown that quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) is useful to detect HAV in cell cultures [13] and in humans [14, 15]. However, the number of negative RNA strands in liver tissues should serve as a more reliable marker of active viral replication than positive-strand RNA in the liver [16]. Until now, no quantitative study describing HAV negative strands in tissue samples has been carried out. In order to describe the kinetics of HAV replication in vitro and in vivo, quantitative real-time PCR to detect negative strands was developed. The aim of this study was to detect the intermediate replicative (negative strand) of HAV to monitor its replications in cell cultures and in the liver from non-human primates infected experimentally.

Materials and methods

Cells and viruses

Fetal rhesus kidney cells (FRhK-4) were grown at 37°C in 25-cm³ disposable bottles containing 10 mL of 199 essential medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and fetal bovine serum (FBS), 10% in growth and 2% in maintenance medium. Semi-confluent cells were inoculated with 1 mL of HAF-203 [17] ten-fold diluted (6×10^6 copies/mL). After 1 h of viral adsorption at 37°C, the inoculum was replaced by 199 medium with 2% FBS. After 1, 5, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 75, 85, 100 h, and 10 days post-infection, the resulting supernatant and cell monolayers from each flask were collected and frozen. The cell

monolayers were harvested with 0.25% trypsin and 0.01% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.6), collected, and frozen at -70°C in sterile tubes until use for HAV RNA positive and negative strands analyses. Three flasks were not infected and were used as negative controls.

Tissue samples

Seven clinically healthy young adult 3–5-Kg cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) provided by the Oswaldo Cruz Institute colony were maintained in individual cages during quarantine and experiments. The study was performed according to biosafety level 2 precautions and procedures. The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA-Fiocruz: P.0064/00). Four animals, which were serologically negative to anti-HAV IgG, were inoculated intravenously with 0.5 mL of fecal suspension (titer of HAV 3×10^8 copies/mL) obtained from the stool of a Brazilian child with sporadic hepatitis A infection (HAF-203) [17]. Three animals were maintained as controls. Control liver samples were obtained from seronegative animals euthanized without inoculation at the end of the study. Liver samples from inoculated animals were collected during the necropsies, which were performed at 15, 30, 45, or 60 days post-inoculation. The animals were euthanized by exsanguinations under deep ketamine anesthesia.

Extraction of viral RNA from cell culture supernatant

Viral RNA was extracted from 140 µL of the cell culture supernatant using the commercial kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.

Extraction of RNA from infected cell pellets and liver

RNA from cultured cells and liver samples were extracted by using the SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI), which is specific to purifying viral RNA from tissues and cultured cells. This method is based on a lysis-centrifugation process followed by a column filtration through a silica membrane in an RNase-free environment. The cells trypsinized were pelleted by centrifugation at $500 \times g$ for 5 min and the supernatant was discarded. The whole-cell pellets were disrupted by adding 300 µL of lysis buffer and viral RNA was extracted from whole lysed cell samples. Viral RNA was also extracted from 30 mg of liver samples and the following procedures were carried out according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcription of positive-strand HAV RNA

The positive strands were amplified in the 5' non-translated region (5'NTR) of the HAV genome that was selected as the target due to its sequence conservation. The primers used were checked against complete HAV sequences available at GenBank and target the six genotypes of HAV. The positive strands were reverse-transcribed using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The reaction was carried out using 10 µL of RNA (10 pg–5 µg), 10 pmol/µL of anti-sense primer (HAV5NCRI-R) (Table 1), 1 U/µL of RNasin (Promega, Madison, WI), 125 mM of each deoxynucleoside triphosphate, and 1 U/µL of Superscript III reverse transcriptase, in a final volume of 20 µL at 50°C for 1 h, followed by incubation for 10 min at 65°C.

Reverse transcription of negative-strand HAV RNA

Negative-strand RNA from cell pellets and liver samples was amplified in 5'NTR and in the VP3 region (Fig. 1). The VP3 gene encoding a major capsid protein was targeted for the first amplification. Negative-strand specificity of reverse transcription PCR (RT-PCR) for the detection of 5' NTR and VP3 was ascertained by conducting cDNA synthesis at a high temperature with the thermostable enzyme *rTth* (Applied Biosystems, Hammon, NJ). The cDNA was generated in 50 µL of a reaction mixture containing 10 pmol/µL of sense primer for 5'NTR (HAV5NCRI-F) or VP3 (HAVVP3RI-F) (Table 1), 1× RT buffer, 2 µL of MnCl₂, 10 mM of each deoxynucleoside triphosphate, and 2.5 U of *rTth*. Reverse transcription was performed at 60°C for 1 h, followed by 10 min at 95°C.

Qualitative PCR amplification

In order to develop the standard curve for real-time PCR and to confirm by sequencing the detection of the negative strands of the 5'NTR and VP3 regions, a qualitative PCR was performed in both regions (Fig. 1). The transcription of negative strands was confirmed using five microliters of cDNA to carry out the PCR. After a denaturation of 4 min

at 94°C, the positive and negative cDNA from 5'NTR were amplified for 30 cycles at 94°C for 30 s, 59.2°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and an additional 7 min at 72°C in the last cycle, in a final volume of 25 µL. The VP3 negative strand was amplified under the same conditions, using 58.5°C as the annealing temperature. The primers for the 5' NTR and VP3 regions and bands of expected length are described in Table 1. PCR products (10 µL) were loaded on a 1.5% agarose gel, electrophoresed, and stained with ethidium bromide to visualize the bands of expected length. The products of the qualitative PCR were then sequenced to confirm the identity of the 5'NTR and VP3 regions of HAV.

Development of a standard curve for real-time PCR

A TaqMan real-time PCR was conducted to quantify the 5' NTR region of positive strands, as previously described by de Paula et al. [18], with a detection limit of 60 copies/mL.

To quantify negative strands, the 5'NTR and VP3 regions of the HAV genome were chosen to design the TaqMan assay. The primers and probes (Table 1) were identified using the Primer Express program (TaqMan gene expression assay). After identity confirmation of the 5'NTR and VP3 amplicons by nucleotide sequencing, these amplicons were then cloned into a TOPO cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and a plasmid from a recombinant clone was used for establishing standard curve points for negative strands in the real-time PCR. The recombinant plasmid was quantified using a GeneQuant Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Standard curves were generated using 10¹–10⁷ copies. All PCR reactions were carried out using the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems).

Real-time PCR

The cDNAs synthesized from positive and negative strands were quantified by real-time PCR (Fig. 1). For each PCR run, a master mix was prepared on ice with 1× TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Hammon, NJ) and 1.25 µL of assay (300 nM each primer, 150 nM probe) (Gentec, Applied Biosystems Assay, Foster

Table 1 Primers and probes used to detect negative strands of hepatitis A virus (HAV) in vivo and in vitro

Name	Sequence (5'-3')	Nucleotide position*	Fragment size
5'NTR			
HAV5NCRI-F	5'-ACCAATATATCGCGCTGCTGTTAC-3'	452-477	
HAV5NCRI-R	5'-CGGGTGAAACCTTAGCTAATAC-3'	401-426	75 pb
Probe	FAM-5'CCTATCCAAGGTCTCT-3'	435-453	
VP3			
HAVVP3RI-F	5'-TCCAGGTTTCAATTCAGGAAATCT-3'	2404-2430	
HAVVP3RI-R	5'-GCACCTGTGGGAGCTATCAT-3'	2346-2365	84 pb
Probe	FAM-5'CAATTGATCCAGTTTTAG-3'	2368-2389	

*HAF-203 accession number AF268396

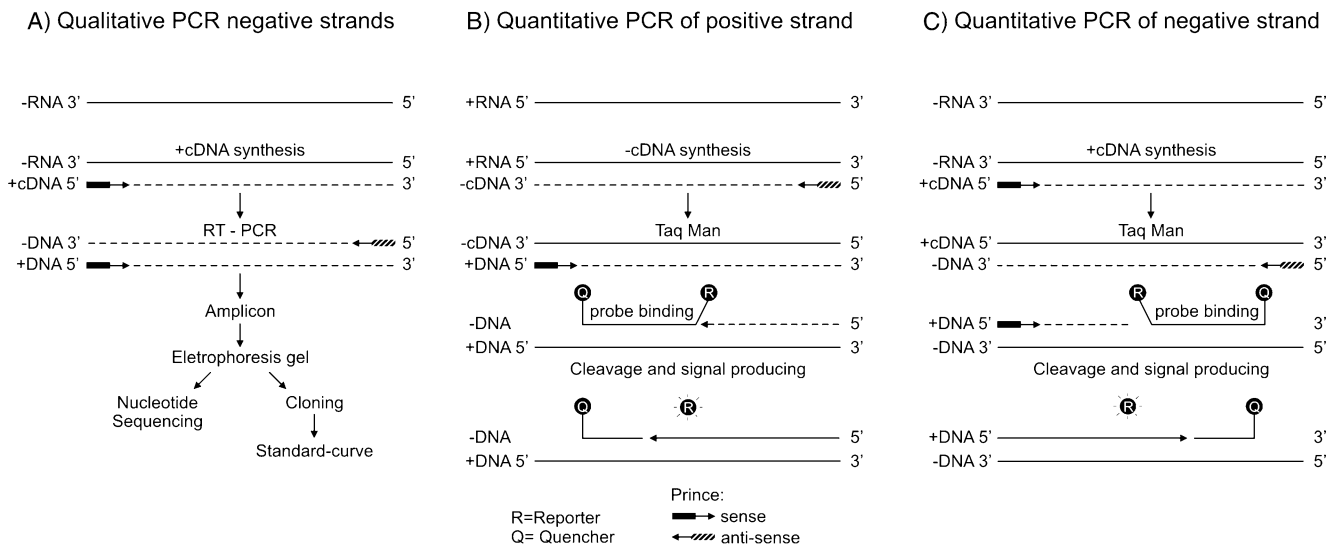


Fig. 1 a–c Schematic drawing of the HAV RNA strand-specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) procedures. **a** Detection of negative-strand RNA by qualitative PCR. **b**

Quantification of positive-strand RNA (5'NTR) by quantitative PCR. **c** Quantification of negative-strand RNA (5'NTR and VP3) by quantitative PCR

City, CA). Five microliters of cDNA and standard curve points, specific for each HAV region (5'NTR positive and negative strands and VP3 negative strand), were added to 20 μ L of the PCR master mix. The thermal cycling conditions were an initial step at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 1 min. The sequence of primers and probes are shown in Table 1.

Validation of the assays

To determine the lower detection limit of these real-time assays, standard RNA samples were first transcribed and then submitted to ten-fold serial dilutions with DNA/RNase free water, ranging from 2.0×10^7 to 2.0×10^1 and from 3.0×10^7 to 3.0×10^1 copies/ μ L of 5'NTR and VP3, respectively. Finally, the results of each concentration of the standards were measured by fluorometric analysis.

The variability between assays was evaluated using four different known concentrations of RNA (5.8×10^4 to 5.8×10^1 copies/ μ L) that were amplified in triplicate to examine the intra-assay precision, which defines the variability within the same run. The inter-assay precision, representing the variability of different runs under the same conditions, was evaluated by testing these same samples on three consecutive days. For each experiment, the coefficient of variation was calculated.

Specificity for HAV detection was evaluated by spiking a pre-optimized exogenous internal positive control of non-human virus DNA (TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagent; Applied Biosystems) in the extracts of RNA from a non-infected cell culture pellet and from a non-infected animal liver sample.

In order to verify the amplification of falsely primed cDNA generated during the RT-PCR step, some amplification was conducted without the RT primer. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). To assess continuous variables, Student's *t*-test or the Mann–Whitney test was used as appropriate. A two-tailed $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. The statistical package Instat GraphPad® 3.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used.

Results

Qualitative PCR amplification

The amplification of the negative strands of HAV RNA was improved by combining the benefits of RT-PCR and *rTth*. The reverse-transcriptase step used the thermostable reverse transcriptase *rTth* and was carried out at 60°C using a sense primer specific for each HAV region (5'NTR and VP3). Figure 2 shows the amplification of 5'NTR and VP3 negative strands in the qualitative PCR. The amplified products were then sequenced to confirm the amplification of HAV strands.

Development and validation of the quantitative PCR

Range of quantification and sensitivity

A ten-fold dilution series of HAV 5'NTR and VP3 negative strands were used to determine the range and sensitivity of quantification in real-time PCR. The lower detection limits for the 5'NTR and VP3 regions were 20 and 30 copies per

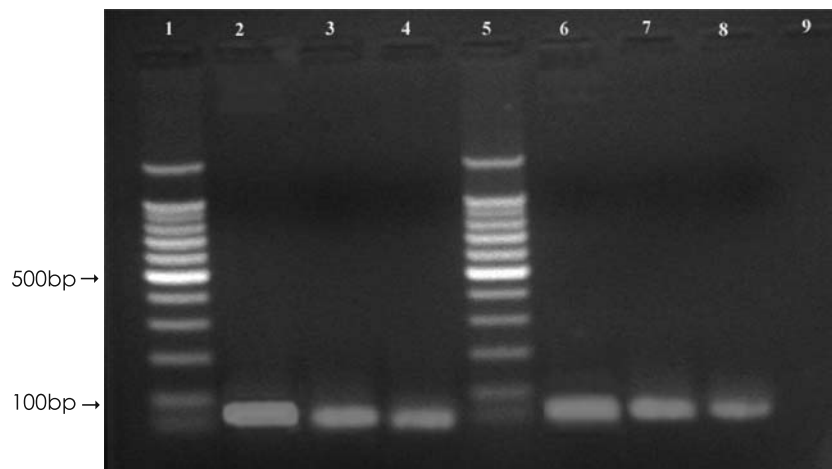


Fig. 2 The detection of positive and negative strands by qualitative PCR. Qualitative PCR products were visualized by 1.5% agarose gel analysis and ethidium bromide staining. Lanes: (1) 100 bp DNA ladder for molecular size standard; (2) 5'NTR positive strand in vitro;

(3) 5'NTR negative strand in vitro; (4) VP3 negative strand in vitro; (5) 100 bp DNA ladder for molecular size standard; (6) 5'NTR positive strand in vivo; (7) 5'NTR negative strand in vivo; (8) VP3 negative strand in vivo; (9) negative control

mL, respectively. The same correlation coefficient greater than 0.99 ($R^2=0.997$) was obtained for both regions over the range of 10^7 – 10^1 copies/ mL (Fig. 3a, b).

Reproducibility and specificity of the assay

Performing the assay in triplicate (intra-assay variability), the corresponding coefficient of variation (CV%) ranged from 1.0 to 5.0 in the 5'NTR assays and from 0.1 to 7.4 in the VP3 assays. Inter-assay variability ranged from 0.4 to 1.6 and 0.3 to 1.5 in the 5'NTR and VP3 assays, respectively. These values demonstrated that the assays were reproducible (Table 2). There were no statistically significant differences between the inter- and intra-assay variability for the 5'NTR and VP3 regions ($P>0.05$). For the specificity test, the exogenous internal positive control of non-human virus DNA showed negative results by these real-time assays (data not shown). For the RT-PCR carried out without RT primer, no amplicons were observed, demonstrating no self-priming.

Kinetics of HAV replication in vitro by the detection of positive- and negative-strand RNA

The replication of viral RNA during the growth cycle of HAV in FRhK-4 cells was examined by real-time PCR with HAV-specific negative-strand probes. RNA was extracted from the supernatant and infected cells after 1, 5, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 75, 85, and 100 h, and 10 days post-infection. Figure 4 shows the kinetics of the RNA synthesis in HAV-infected cells. In the supernatant, a decrease in the number of copies during the first 10 h of

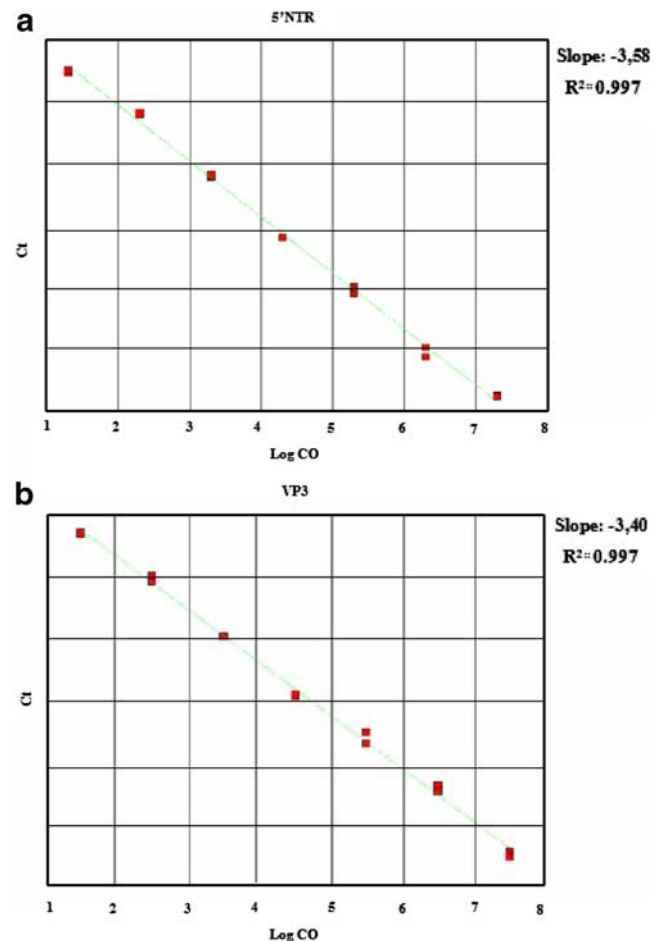


Fig. 3 a, b Range and sensitivity of the HAV 5'NTR and VP3 negative-strand TaqMan assays. **a** Ten-fold serial dilutions of 5'NTR negative-strand RNA transcribed in vitro, ranging from 2.0×10^7 to 2.0×10^1 with a sensitivity of 20 copies/mL. **b** ten-fold serial dilutions of VP3 negative-strand RNA transcribed in vitro, ranging from 3.0×10^7 to 3.0×10^1 with a sensitivity of 30 copies/mL. The same correlation coefficient was obtained ($R^2=0.997$) for both negative-strand RNAs assays

Table 2 Intra- and inter-assay reproducibility of the real-time polymerase chain reaction (PCR)

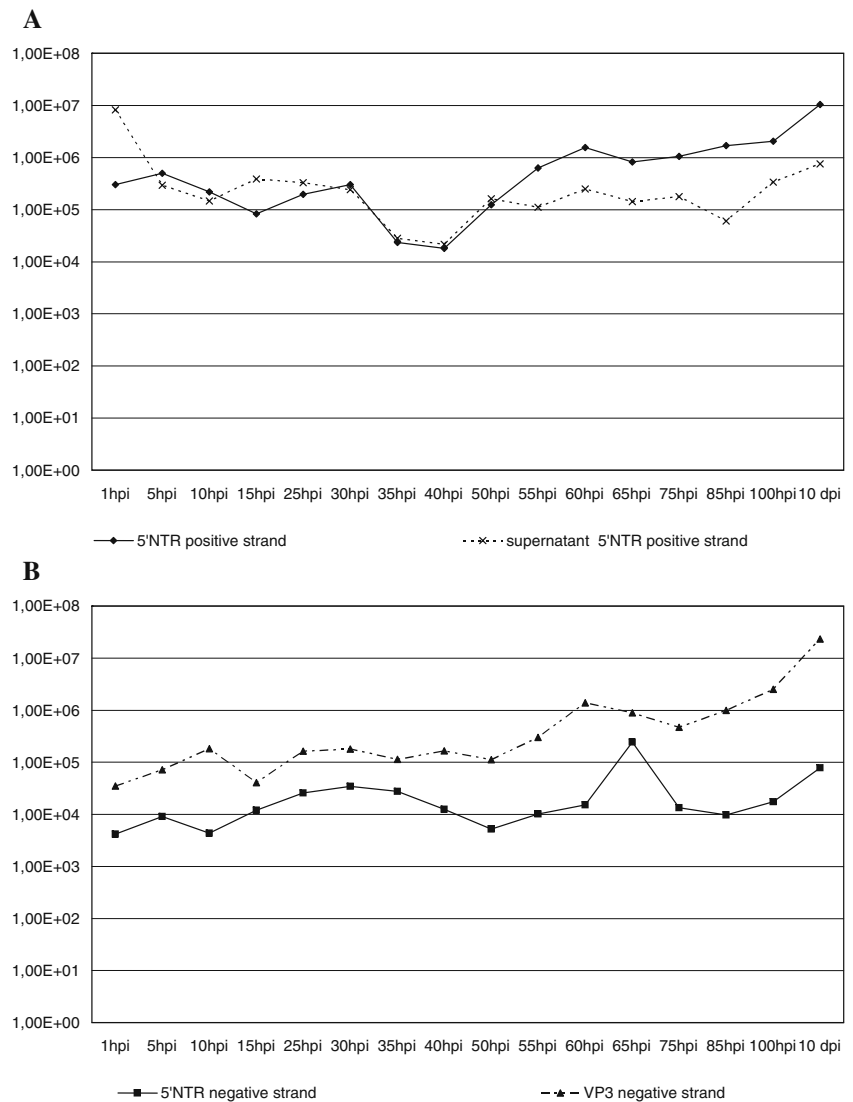
	Copies of 5'NTR transcripts				Copies of VP3 transcripts			
	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10	10 ²	10 ³	10 ⁴
Intra-assay variability (CV%)	1.0	2.5	5.0	1.5	2.9	2.8	0.1	7.4
Inter-assay variability (CV%)	0.8	0.7	0.4	1.6	0.4	0.3	1.5	1.5

CV = coefficient of variation calculated on the basis of the Ct values

infection was observed, while in infected cells, the number of copies of positive (Fig. 4a) and negative strands (Fig. 4b) increased, suggesting that the cells were infected. One hour post-infection, the replication of HAV through 5'NTR and VP3 negative-strand detection (Fig. 4b) could be measured. In the 5'NTR region, the replication was more asynchronous than in the VP3 region. Observing the kinetics of positive strands, the eclipse of the input HAV was observed from 30 hpi (hours post-infection) to 50 hpi (Fig. 4a), while,

concomitantly, a massive replication of HAV could be observed through negative strands (Fig. 4b). Approximately three days post-infection, an increased title of viral load could be detected in all strands. However, the highest virus title isolated from the cell culture in 5'NTR and VP3 strands was observed 10 days post-infection. The viral load, measured through the positive strands, detected at this point was statistically significantly higher in comparison to all previous points ($P < 0.001$).

Fig. 4 a, b Kinetics of replication of hepatitis A virus (HAV) in vitro. The detection of positive and negative strands is shown in hours post-infection (hpi). **a** Detection of 5'NTR positive strand from supernatant and infected cells. **b** Detection of 5'NTR and VP3 negative strands from infected cells



Kinetics of HAV replication in vivo by the detection of positive- and negative-strand RNA

To extend the investigation of HAV replication from cell culture to live animals, liver samples from experimentally infected monkeys were accessed. The liver samples were collected during the necropsies, which were performed at 15, 30, 45, or 60 days post-inoculation. The first liver sample was collected 15 dpi (days post-infection) when the infection was already persistent. The increased number of positive and negative strands can be observed at 30 dpi in the kinetics of the experimentally infected animals (Fig. 5). A parallel replication was observed between detection of the positive strand in the 5'NTR region and the negative strand in the VP3 region. After one month of infection (30 dpi), a strong replication in liver tissue was observed and the infection was persistent until 60 dpi, when the last animal was euthanized (Fig. 5).

Quantification of negative and positive strands in vivo and in vitro

Table 3 shows the mean number of positive and negative strands of HAV in cell cultures and liver samples by real-time PCR. The amounts of 5'NTR and VP3 negative strands, observed in vitro, were, on average, $32,597 \pm 58,915$ and $1,940,080 \pm 5,761,451$, respectively, while in vivo, these mean values were higher for both 5'NTR ($679,378 \pm 1,009,350$) and VP3 ($4,718,400 \pm 3,439,833$) regions. In general, the amount of positive-strand RNA from infected cell cultures was higher than the negative-strand RNA of 5'NTR and VP3 at different days post-infection, except at 10 dpi, when the amount of VP3 negative strand was greater than that of the positive strand (Table 3). The mean value of positive strands in cell culture was $1,251,228 \pm 2,532,265$ and the number of copies ranged from 17,950 (40 hpi) to 10,440,000 (10 dpi) copies/mL. In

the animals infected experimentally, the mean number of positive strands was $2,720,000,000 \pm 1,930,000,000$ and the number of copies ranged from 5,800 (15 dpi) to 4,550,000,000 (45 dpi) copies/mL. As observed in vitro, the amount of positive-stranded RNA in vivo was also higher than negative-stranded RNA, except at the beginning (15 dpi) of the infection, when the number of negative strands was higher than the number of positive strands.

Discussion

Little is known concerning the significance of quantifying negative-strand RNA replicative intermediates of HAV in cell culture and in the liver. In the past, methods to detect positive- and negative-strand RNA synthesis generally involved hybridization assays [19, 20] or amplification assays, predominantly conventional RT-PCR [13, 21–24]. The principal limitations of these methods are often time-consuming procedures and result in only semi-quantitative, rather than actual, active replication. Consequently, a strand-specific real-time RT-PCR assay approach for measuring viral replication would be a powerful tool to prove viral active replication in vitro and in vivo.

In the present study, a quantitative PCR was developed for the specific determination of HAV negative-strand RNA. The *rTth* enzyme was used and cDNA was synthesized with a target sense primer at an elevated temperature. In this study, the newly developed real-time assays were sensitive enough to detect 20 and 30 copies/mL, in 5'NTR and VP3, respectively. These assays produced excellent linearity between 10^7 and 10^1 copies, with a correlation coefficient (R^2) of around 0.99 (Fig. 3). The easy-to-handle methods showed high sensitivity, reproducibility, and specificity. The results showed that the quantitative real-time PCR was efficient in detecting negative strands at all points post-infection both in vitro and

Fig. 5 Kinetics of replication of HAV in vivo. The detection of positive and negative strands is shown in days post-infection (dpi)

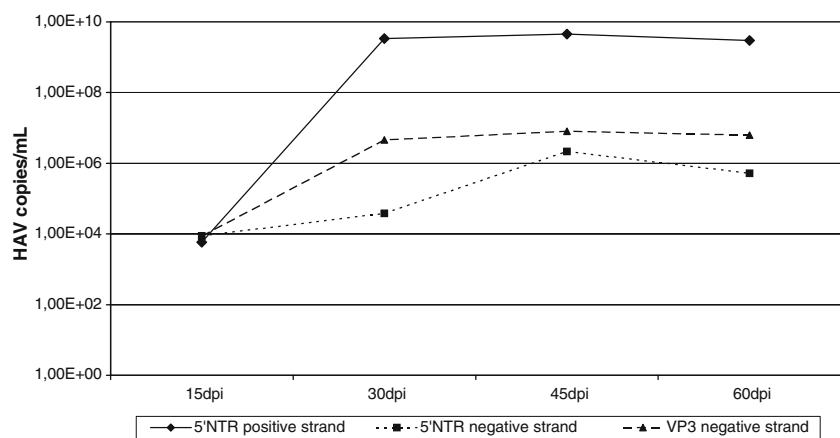


Table 3 Quantification of positive- and negative-strand HAV RNA in cell culture and in the liver using a strand-specific real-time PCR

Samples	Time	Copies/mL		
		5'NTR (+)	5'NTR (-)	VP3 (-)
Cell culture				
P1	01 hpi	301,050	4,170	34,850
P2	05 hpi	501,000	9,020	72,160
P3	10 hpi	218,500	4,370	183,450
P4	15 hpi	82,700	11,900	40,850
P5	25 hpi	197,500	25,700	162,900
P6	30 hpi	301,500	34,300	179,000
P7	35 hpi	23,450	27,500	113,100
P8	40 hpi	17,950	12,500	166,000
P9	50 hpi	124,500	5,240	111,500
P10	55 hpi	632,500	10,200	302,000
P11	60 hpi	1,555,000	15,100	1,385,000
P12	65 hpi	817,000	243,000	894,500
P13	75 hpi	1,059,000	13,400	469,000
P14	85 hpi	1,690,000	9,760	997,000
P15	100 hpi	2,058,000	17,500	2530,000
P16	10 dpi	10,440,000	77,900	23,400,000
Mean (\pm SD)		1,251,288 (\pm 2,532,265)	32,597 (\pm 58,915)	1,940,081 (\pm 5,761,451)
Liver				
L1 (I2)	15 dpi	5,800	8,915	8,600
L2 (H8)	30 dpi	3,370,000,000	38,600	4,595,000
L3 (V13)	45 dpi	4,550,000,000	2,152,500	8,035,000
L8 (V3)	60 dpi	2,960,000,000	517,500	6,235,000
Mean (\pm SD)		2,720,000,000 (\pm 1,930,000,000)	679,378 (\pm 1,009,358)	4,718,400 (\pm 3,439,833)

in vivo. As reported previously in poliovirus-infected cells, positive-strand RNA was the most abundant form quantified [25, 26]. By using strand-specific quantitative PCR for the detection of negative strands, it was possible to identify an active viral replication. The results showed that HAV RNA synthesis was asymmetric (Fig. 4a) and that the synthesis of positive strands was greater than the synthesis of negative strands (Table 3). Although the negative strands detection was lower than that for positive strands, it can be used as a marker for viral replication.

The VP3 gene, a major capsid protein, is the most common target region used to detect replicative intermediates of HAV in cell cultures [14, 21]. In our study, using real-time PCR to detect negative strands, the quantification of the number of copies in the VP3 region was higher than in the 5'NTR region, which is probably because VP3 is the target region for the first HAV amplification and a full-length cDNA template could not be achieved in premature cDNAs, leading to a lack of copies in the 5'NTR region. In vitro experiments with

picornaviruses using inhibitors of protein synthesis demonstrated that, when ribosomes are frozen on the viral RNA, replication of the RNA is inhibited. In contrast, when ribosomes are released from viral RNA, its replication is increased [27], suggesting that replication and translation cannot occur on the same template simultaneously. These results could explain the difference between the detection of the replication of 5'NTR and VP3 negative strands.

Figure 3 shows the kinetics of HAV replication in the first few hours post-infection. The 5'NTR region, the most conserved region in the HAV genome, was chosen to quantify positive strands in supernatant and in infected cells. It was possible to observe a decrease of HAV RNA copies in the supernatant and an increase in the infected cells. The replication was asynchronous over time, suggesting a delayed uncoating of viral particles, which could be a factor that contributes to asynchronous replication [28]. Viral RNAs are sequestered into the nascent HAV capsid and, thus, are unavailable for replication [20]; besides, defective interfering particles could inhibit HAV replication

[29]. Cho and Ehrenfeld [30] have suggested that asynchronous replication rather than slow replication is responsible for the protracted growth kinetics of HAV. Otherwise, Bishop and Anderson [9] observed a highly efficient encapsidation of HAV RNA, suggesting a sequestration of RNA into virions, limiting the number of replicative intermediates and, thus, the growth rate and yield of the virus.

In this study, the maximum concentration (1.0×10^7 copies/mL) was reached at 10 days post-infection. This result can explain the typical slow cycle of HAV replication and HAV release from cells in the absence of the cytopathic effect. However, the results of positive strands in the 5'NTR region and negative strands in the VP3 region showed that, approximately at 3 days, a high viral load replication can be detected by real-time PCR, which demonstrated the feasibility and rapidity of these methods in studies of the virus and vaccine production. During the cycle of active replication in infected cells, the synthesis of both negative and positive strands of HAV RNA were reported to occur as early as 2–4 days post-infection, as reported previously by De Chastonay and Siegl [19] in the replication of HAV in MRC-5 cells.

When real-time PCR was applied to examine replication in vivo, the animals infected experimentally were monitored through to 60 dpi. After 30 dpi, HAV titers reached a plateau (10^9 log) in the liver of infected animals. The detection of negative strands two months after infection showed an intensive HAV replication in the liver. The different results between the kinetics of replication found in the in vivo and in vitro experiments could be due to hepatotropism of HAV and suggest that host-specific factors interact with replication mechanisms for positive and negative strand synthesis. Up to now, there are no data available for positive and negative strands from HAV-infected liver tissue using real-time PCR.

In conclusion, this quantitative real-time PCR, to detect negative strands, can be adopted further in experimental infection in order to examine the HAV replication rate in the liver and in other extra hepatic sites. In addition, it could be also used as a valuable tool for understanding HAV replication in cell culture for monitoring the inhibition of HAV with antiviral drugs, HAV replication after transplantation, and vaccine production. With the sensitive system described here, we provide evidence that even very low levels of HAV genome replication can be detected by real-time PCR.

Acknowledgments This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projeto (FINEP). We thank Heloisa Maria Nogueira Diniz of the Serviço de Produção e Tratamento de Imagem, IOC/Fiocruz, for the PCR schematic drawing.

References

1. Fujiwara K, Yokosuka O, Fukai K, Imazeki F, Saisho H, Omata M (2001) Analysis of full-length hepatitis A virus genome in sera from patients with fulminant and self-limited acute type A hepatitis. *J Hepatol* 35:112–119. doi:10.1016/S0168-8278(01)00074-5
2. Vento S, Garofano T, Renzini C, Cainelli F, Casali F, Ghironzi G, Ferraro T, Concia E (1998) Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 338:286–290. doi:10.1056/NEJM199801293380503
3. Gamarnik AV, Andino R (1998) Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 12:2293–2304. doi:10.1101/gad.12.15.2293
4. Kräusslich HG, Wimmer E (1988) Viral proteinases. *Annu Rev Biochem* 57:701–754. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.003413
5. Carrasco L, Otero MJ, Castrillo JL (1989) Modification of membrane permeability by animal viruses. *Pharmacol Ther* 40:171–212. doi:10.1016/0163-7258(89)90096-X
6. Palmenberg AC (1990) Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol* 44:603–623. doi:10.1146/annurev.mi.44.100190.003131
7. Wimmer E, Kuhn RJ, Pincus S, Yang CF, Toyoda H, Nicklin MJ, Takeda N (1987) Molecular events leading to picornavirus genome replication. *J Cell Sci Suppl* 7:251–276
8. Semler BL, Kuhn RJ, Wimmer E (1988) Replication of the poliovirus genome. In: Domingo E, Holland JJ, Ahlquist P (eds) *RNA genetics*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 23–48
9. Bishop NE, Anderson DA (2000) Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. *J Virol* 74:3423–3426. doi:10.1128/JVI.74.7.3423-3426.2000
10. Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH (1981) Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun* 32:388–393
11. Pinto MA, Marchevsky RS, Baptista ML, de Lima MA, Pelajo-Machado M, Vitral CL, Kubelka CF, Pissurno JW, Franca MS, Schatzmayr HG, Gaspar AM (2002) Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: early detection of HAV antigen and viral fate. *Exp Toxicol Pathol* 53:413–420. doi:10.1078/0940-2993-00212
12. Hammit LL, Bulkow L, Hennessy TW, Zanis C, Snowball M, Williams JL, Bell BP, McMahon BJ (2008) Persistence of antibody to hepatitis A virus 10 years after vaccination among children and adults. *J Infect Dis* 15:1776–1782. doi:10.1086/593335
13. Jiang YJ, Liao GY, Zhao W, Sun MB, Qian Y, Bian CX, Jiang SD (2004) Detection of infectious hepatitis A virus by integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 97:1105–1112. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02413.x
14. Jothikumar N, Cromeans TL, Sobsey MD, Robertson BH (2005) Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Appl Environ Microbiol* 71:3359–3363. doi:10.1128/AEM.71.6.3359-3363.2005
15. Sánchez G, Populaire S, Butot S, Putallaz T, Joosten H (2006) Detection and differentiation of human hepatitis A strains by commercial quantitative real-time RT-PCR tests. *J Virol Methods* 132:160–165. doi:10.1016/j.jviromet.2005.10.010
16. Yuki N, Matsumoto S, Tadokoro K, Mochizuki K, Kato M, Yamaguchi T (2006) Significance of liver negative-strand HCV RNA quantitation in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 44:302–309. doi:10.1016/j.jhep.2005.10.014
17. Gaspar AM, Vitral CL, Yoshida CF, Schatzmayr HG (1992) Primary isolation of a Brazilian strain of hepatitis A virus (HAF-203) and growth in a primate cell line (FRhK-4). *Braz J Med Biol Res* 25:697–705

18. De Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, Luz SL, Silva LA, Jesus MS, da Silva NM, Gaspar AMC (2007) Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res* 41:1169–1176. doi:[10.1016/j.watres.2006.11.029](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.029)
19. De Chastonay J, Siegl G (1987) Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology* 157:268–275. doi:[10.1016/0042-6822\(87\)90269-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90269-8)
20. Anderson DA, Ross BC, Locarnini SA (1988) Restricted replication of hepatitis A virus in cell culture: encapsidation of viral RNA depletes the pool of RNA available for replication. *J Virol* 62:4201–4206
21. Agnès F, Crance JM, Lévêque F (1994) Separate detection of the two complementary RNA strands of hepatitis A virus. *J Virol Methods* 49:323–330. doi:[10.1016/0166-0934\(94\)90147-3](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)90147-3)
22. Chaves RL, Graff J, Normann A, Flehmig B (1994) Specific detection of minus strand hepatitis A virus RNA by Tail-PCR following reverse transcription. *Nucleic Acids Res* 25:1919–1920. doi:[10.1093/nar/22.10.1919](https://doi.org/10.1093/nar/22.10.1919)
23. Takeda Y, Ashida M, Hamada C (1996) Growth of hepatitis A virus in murine cells. *Acta Virol* 40:201–208
24. Schmitz G, Dotzauer A (1998) Proof of hepatitis A virus negative-sense RNA by RNA/DNA-hybrid detection: a method for specific detection of both viral negative- and positive-strand RNA species. *Nucleic Acids Res* 26:5230–5232. doi:[10.1093/nar/26.22.5230](https://doi.org/10.1093/nar/26.22.5230)
25. Giachetti C, Semler BL (1991) Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J Virol* 65:2647–2654
26. Novak JE, Kirkegaard K (1991) Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* 65:3384–3387
27. Barton DJ, Morasco BJ, Flanagan JB (1999) Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 73:10104–10112
28. Racaniello VR (2001) Picornaviridae: their viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE (eds) *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 796–838
29. Mourani S, Dobbs SM, Genta RM, Tandon AK, Yoffe B (1994) Hepatitis A virus-associated cholecystitis. *Ann Intern Med* 120:398–400
30. Cho MW, Ehrenfeld E (1991) Rapid completion of the replication cycle of hepatitis A virus subsequent to reversal of guanidine inhibition. *Virology* 180:770–780. doi:[10.1016/0042-6822\(91\)90090-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90090-X)