



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

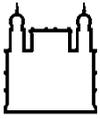
**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA  
O DIAGNÓSTICO E ESTUDO DE PREVALÊNCIA DA HEPATITE A**

Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro*

## **AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA O DIAGNÓSTICO E ESTUDO DE PREVALÊNCIA DA HEPATITE A**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

R484 Ribeiro, Camilla Rodrigues de Almeida

Avaliação da utilização de ensaio imunocromatográfico para o diagnóstico e estudo de prevalência da Hepatite A / Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro. – Rio de Janeiro, 2015.

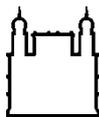
xxiv, 86 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 67-80

1. Teste rápido imunocromatográfico. 2. Anticorpos para Hepatite A.  
3. Surtos. 4. Estudos epidemiológicos. I. Título.

CDD 616.3623



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro

Avaliação da utilização de ensaio imunocromatográfico para o diagnóstico e estudo de prevalência da hepatite A

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula

**Aprovada em: 23/12/2015**

#### **BANCA EXAMINADORA:**

**Dra. Livia Melo Villar (Presidente) – IOC/Fiocruz - RJ**

**Dra. Flavia Barreto dos Santos – IOC/Fiocruz -RJ**

**Dra. Renata de Mendonca Campos – UFRJ -RJ**

#### **SUPLENTES:**

**Dra. Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues – IOC/Fiocruz - RJ**

**Dra. Claudia Lamarca Vitral - UFF/RJ**

Rio de Janeiro, 23 de dezembro de 2015

Aos meus pais, Aginaldo (*in memoriam*) e Sandra.

Minha eterna gratidão!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por nunca se cansar de me dar as melhores pistas para que eu consiga traçar meu caminho.

À minha querida Mãe, por todos os sacrifícios feitos, pelo amor, carinho, dedicação incondicional, por ser minha mãe e nunca enfraquecer na luta que sempre foi tão grande, por ser uma guerreira.

As minhas irmãs, Carla e Carollina, minhas princesas, meus anjos, meus amores incondicionais por toda minha vida. Agradeço por estarem sempre presentes, seja nas alegrias ou na tristeza; agradeço-lhes pela confiança e por acreditarem em meu potencial, sempre me incentivando a lutar pelos meus sonhos;

Gostaria de deixar um agradecimento especial à minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula, por saber de verdade o que é ser uma orientadora, por saber respeitar as escolhas de seus alunos e por manter-se sempre na função de educadora. Muito obrigada por ter me dado a oportunidade de trabalhar com aquilo que me identifico e muito obrigada pela confiança, paciência, orientação e amizade. Vocês é um exemplo de dedicação. Muito Obrigada!

Aos professores da PGBP, por compartilharem seus conhecimentos comigo e contribuírem fortemente para minha formação acadêmica.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida durante esses dois anos.

Àos membros da banca examinadora por aceitar me argüir.

Aos colegas do Pré-Universitários Oficina do Saber – UFF, graças a eles comecei a traçar minha trajetória, me apaixonei pela sala de aula e pela arte de ensinar.

Gostaria de agradecer a todos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV), alunos, técnicos, pesquisadores e funcionários. Quero agradecer a todos do laboratório, pois cada contribuição, por menor que possa ter parecido, tenho certeza que foi grandiosa na sua intenção. Muito obrigado a todos pela compreensão e paciência, por terem me acolhido, pelas dicas e pela ajuda na realização dos experimentos.

Às minhas amigas do laboratório, as que continuam e as que saíram para traçar outras trajetórias, as Ousadas da Virologia, Vanessa Cristine, Amanda Lopes e Andreza Salvio, minhas companheira científicas e minhas amigas, por estarem sempre solícitas a me ajudar, por compartilharem grandes vitórias e por sempre torcerem por mim.

Aos meus queridos amigos de mestrado: Kate, Thaiane, Larissa, Klécia, Mariana, Oscar, Diogo e Pedro.

A todos os professores da Faculdade de Formação de Professores (FFP) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), todos de alguma forma contribuíram para minha formação e com certeza para o meu futuro como professora.

Aos meus amigos, que sempre estavam à disposição, pra rir, pra chorar, pra sair, pra aconselhar, pra amar, pra brigar, pra absolutamente tudo que eu precisasse. A festa é sempre por conta deles, por eles e por causa deles. Com vocês minha trajetória foi mais alegre, mais leve, mais divertida. Vocês são pra toda vida: Helena Vargas, Taiane Medeiros, Mariana Pimenta, Monique Costa e Aline Loureiro. Um amigo sempre será um tesouro!

Um agradecimento especial ao meu melhor amigo: Felipe Steinhagem, ser amigo não é coisa de um dia. São gestos, palavras, sentimentos que se solidificam no tempo e não se apagam jamais. O amigo revela, desvenda, conforta. É uma porta sempre aberta em qualquer situação. O amigo na hora certa, é sol ao meio dia, estrela na escuridão. O amigo é bússola e rota no oceano, porto seguro da tripulação. O amigo é o milagre do calor humano que Deus opera no coração. Obrigada, amigo!

Aos meus amigos de escola: Carlos, Daniele e Jaqueline(*in memoriam*), vocês fizeram parte de uma linda etapa da minha vida, infelizmente Jaque não está mais aqui conosco, deixou um imenso vazio e uma saudade sem fim.

Gostaria de agradecer aos meus alunos, que dão sentido ao que realizo todos os dias. Espero que no futuro, aquela aula ajude em uma decisão, aquele texto sirva de inspiração e aquele exemplo traga a coragem para seguir em frente.

A você, que espero passar o resto dos meus dias, obrigada por sempre acreditar no meu potencial e comemorar comigo as minhas conquistas. Te amo, Jonatan Melo. Venho te agradecer para sempre por ter estado junto a mim, ter construído comigo sonhos bonitos, erguido uma fortaleza de coisas significantes que fizeram de nós dois eternos apaixonados.

Enfim, tenho que agradecer por estar viva e ter andado por onde andei e ter vivido tudo o que vivi e ser exatamente como sou.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A (fonte: CDC, 1998)...	03
Figura 1.2. Estrutura geral do HAV (VP1, azul; VP2, verde; VP3, vermelho). Adaptado de: Wang <i>et al.</i> , 2014.....	04
Figura 1.3. Organização do genoma do HAV e processamento da poliproteína. RNA genômico contém uma única fase de leitura aberta (ORF) que codifica uma poliproteína, a qual é proteoliticamente processada pela protease 3C (triângulos vermelhos). Existem também sítios que são clivados por protease celulares (seta) ou por mecanismo ainda desconhecido (losango preto). Este processamento leva a produção das proteínas estruturais (capsídeo) e não estruturais (complexo de replicação do RNA viral) (Martin e Lemon, 2006).....	05
Figura 1.4. Visão geral do ciclo de replicação do HAV. (a) O vírus se liga aos hepatócitos via interação com seu receptor celular (b) Liberação do RNA no citoplasma. (c) Tradução da poliproteína. (d) Processamento da poliproteína através de uma série de clivagens. (e) As proteínas não-estruturais formam o complexo de replicação em membranas intracelulares e ligam-se a porção 3' do RNA, iniciando a síntese da cópia de sentido negativo. (f) Algumas dessas cópias servem como molde para a síntese de múltiplas cópias do RNA positivo. (g) Algumas dessas novas fitas positivas são recicladas para nova síntese de RNA ou tradução. (h) Outras moléculas são empacotadas pelo capsídeo recém formado. (i) Eliminação das partículas virais através da membrana apical do hepatócito (Martin e Lemon, 2006).....	09
Figura 1.5. Cinética imunológica, bioquímica e virológica durante a infecção causada pelo HAV (Fonte: De Paula 2012).....	12
Figura 1.6. Distribuição geográfica dos padrões de endemicidade da hepatite A.(Fonte: adaptado de Jacobsen e Wiersma 2010).....	16
Figura 1.7. Padrão epidemiológico da hepatite A no Brasil de acordo com seus níveis de endemicidade nas macro-regiões brasileiras (Ximenes <i>et al.</i> , 2014).....	18
Figura 1.8. Distribuição percentual de casos confirmados de hepatite A segundo região de residência. Brasil, 1999-2011 (Brasil, 2012).....	19
Figura 1.9. Forma farmacêutica, apresentação e composição da vacina contra hapatite A. Fonte:Ministério da Saúde, 2013.....	21
Figura 1.10. Esquema de imunocromatografia de fluxo vertical (Posthuma-Trumpie <i>et al.</i> , 2009).....	25
Figura 1.11. Esquema de imunocromatografia de fluxo lateral em formato de sanduíche (Posthuma-Trumpie <i>et al.</i> , 2009).....	25

Figura 1.12. Esquematização do corte lateral do ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral (Chan, 2003).....	26
Figura 4.1. Esquema do princípio do conjunto de reagentes ETI-AB-HAVK PLUS (Diasorin, Itália) para anti-HAV total.....	33
Figura 4.2. Resultado não reagente.....	37
Figura 4.3. Resultado reagente para hepatite A aguda.....	38
Figura 4.4. Resultado reagente para infecção passada por hepatite A.....	38
Figura 4.5. Resultado reagente para infecção aguda e infecção passada por hepatite A.....	39
Figura 5.1. Detecção do RNA do HAV através da amplificação região VP1/2A por nested-PCR em amostras de soro do grupo IV. PM: Peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, CA, USA); CN: controle negativo e CP: controle positivo.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Descrição das sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região VP1/2A do genoma do HAV (de Paula et al., 2002).....	42
Tabela 4.2. Valores de Kappa.....	45
Tabela 5.1. Painel de referência do teste rápido para detecção de Anti-HAV IgM em amostras com sorologia confirmada.....	46
Tabela 5.2. Painel de referência do teste rápido para detecção de Anti-HAV IgG em amostras com sorologia confirmada.....	47
Tabela 5.3. Avaliação da detecção de IgM e IgG anti-HAV em cada grupo estudado pelo teste rápido e EIE.....	49
Tabela 5.4. Grau de concordância segundo os valores Kappa para cada grupo estudado..	50
Tabela 5.5. Valores de acurácia do teste rápido de detecção de anti-HAV IgM/IgG em comparação aos resultados obtidos no Elisa em amostras de soro em cada grupo estudado	52
Tabela 5.6. Avaliação da reprodutibilidade dos teste rápido com as amostras Anti-HAV IgG e IgM.....	54
Tabela 5.7. Avaliação da repetitividade do teste rápido com as amostras Anti-HAV IgG e IgM.....	55
Tabela 5.8. Avaliação do limite de detecção do teste rápido para Anti-HAV IgG e IgM em comparação ao EIE.....	56

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1. Resultados por teste realizado com as amostras provenientes do surto.....	52
Gráfico 5.2. Resultados por teste realizado com as amostras de casos esporádicos.....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS= Síndrome da imunodeficiência adquirida

ALT = Alanina aminotransferase

AST =Aspartato transferase

Anti-HAV = Anticorpo contra HAV

AW1 = *Washer buffer 1*

AW2 =*Washer buffer 2*

BSA= Albumina sérica bovina

CDC = *Centers for Disease Control and Prevetion*

*cDNA*= DNA complementar

CEP =Comitê de ética e pesquisa

*C T* = *Threshold cycle*

SSPF = sangue seco em papel de filtro

DNase = Desoxirribonuclease

*dNTP* = desoxirribonucleotídeos trifosfatos

ELISA = Ensaio Imunoenzimático (EIA)

EUA= Estado Unidos da América

FDA =*Food and Drugs Administration*

FIOCRUZ= Fundação Oswaldo Cruz

HAV= Vírus da hepatite A

HAV-RNA = RNA do vírus da hepatite A

HBsAg = Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBV = Vírus da hepatite B

HEV = Vírus da hepatite E

HIV = Vírus da imunodeficiência humana

Igs = Imunoglobulina

IgA=Imunoglobulina A

IgG = Imunoglobulina G

IgM = Imunoglobulina M

IL-29 =Interleucina IL-29

IM =via intramuscular

IOC =Instituto Oswaldo Cruz

IV= via intravenosa

Kb = Kilobases

LDTV= Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia

MS =Ministério da Saúde do Brasil

MSM= Homens que fazem sexo com homens

NC = Não codificante

nt = Nucleotídeos

OMS =Organização Mundial de Saúde

ORF – Fase Aberta de Leitura

pb = Pares de bases

PCR = Reação em cadeia da polimerase

pH = Potencial hidrogeniônico IRES = Sítio interno de ligação ribossomal (IRES)

Poli-A = Poliadenilato

RFLP = Polimorfismo de tamanhos dos fragmentos de restrição

RNA = Ácido Ribonucleico

RNAm = RNA mensageiro

RNase = Ribonuclease

RNasin = inibidor de RNA

RT-PCR = Transcrição reversa- reação em cadeia da polimerase

SINAN= Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TCLE =Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TMB= Tetrametilbenzidina

VPg = Proteína do vírion ligada ao genoma

WHO = *World Health Organization*

## LISTA DE SINAIS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

$\mu\text{l}$  = Microlitro

$\mu\text{M}$  = Micromolar

$g$  = Força G

Log = Logaritmo

mg = Miligrama

ml = Mililitro

mM = Milimolar

N = Normal

nm = Nanômetro

u/  $\mu\text{l}$  = unidades por microlitro

V = Volt

$^{\circ}\text{C}$  = Graus célcus.

% = porcentagem

log = Logarítimo

cópias por/mL = cópias por mL

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE SINAIS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS</b> .....	xvi
<b>RESUMO</b> .....	xx
<b>ABSTRACT</b> .....	xxii
<b>I.INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1. Hepatites Virais.....	01
1.2. Enquadramento Histórico da Hepatite A.....	01
1.3. O Vírus da Hepatite A (HAV): Classificação e estrutura.....	02
1.3.1. Organização genômica e proteínas do vírus.....	03
1.3.2. Ciclo de multiplicação e replicação viral.....	07
1.4. Formas de transmissão da hepatite A.....	09
1.5. Patogênese da infecção e aspectos clínicos da Hepatite A.....	11
1.6. Resposta imunológica ao vírus.....	14
1.7. Epidemiologia.....	15
1.8. Profilaxia e Prevenção.....	19
1.9. A vacina contra hepatite A.....	19
1.10. Diagnóstico laboratorial da hepatite A.....	21
1.10.1 Imunocromatografia.....	24
<b>II.RELEVÂNCIA DO ESTUDO</b> .....	27
<b>III.OBJETIVOS</b> .....	29
3.1. Objetivo Geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
<b>IV.METODOLOGIA</b> .....	30
4.1. Aspectos éticos da pesquisa.....	30
4.2. População de estudo.....	30
4.3. Critérios de inclusão e exclusão.....	30
4.4. Coleta das Amostras.....	31
4.5. Marcadores sorológicos e dados clínicos.....	31

4.6. Confecção do painel de referência com amostras com sorologia confirmada para Hepatite A.....	31
4.7. Ensaio Imunoenzimáticos (EIE).....	31
4.7.1. Detecção de anti-HAV total por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	31
4.7.1.1. Detecção de anti-HAV total por ensaio imunoenzimático ELISA ETI-AB-HAVK PLUS (Diasorin, Itália).....	32
4.7.1.2. Detecção de anti-HAV total por ensaio imunoenzimático ELISA Biokit (Biokit, S.A. Barcelona, Espanha).....	33
4.7.2. Detecção de anti-HAV IgM por ensaio imunoenzimático (EIE).....	34
4.8. Ensaio imunocromatográfico (teste rápido).....	36
4.9. Detecção do RNA viral.....	39
4.9.1. Extração do RNA viral em amostras de soro (Kit Qiamp viral RNA mini, Qiagen)	39
4.9.2. Síntese do DNA complementar (cDNA).....	40
4.9.3. PCR qualitativo (Reação em cadeia da polimerase).....	40
4.9.3.1. Amplificação da região VP1/2A do RNA do HAV.....	40
4.10. Avaliação da reprodutibilidade e repetitividade do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM ( <i>Standard Diagnostics</i> , Coreia).....	42
4.11. Avaliação do limite de detecção do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM ( <i>Standard Diagnostics</i> , Coreia).....	42
4.12. Avaliação da reatividade cruzada do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM ( <i>Standard Diagnostics</i> , Coreia.....	43
4.13. Avaliação do teste rápido para detectar resposta vacinal.....	43
4.14. Avaliação do desempenho do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM.....	43
4.15. Análise dos dados.....	45
<b>V.RESULTADOS</b> .....	46
5.1. Painel de referência com amostras com sorologia confirmada para Hepatite A.....	46
5.2. Epidemiologia descritiva das populações de estudo.....	47
5.3. Avaliação do estado sorológico (IgM e IgG anti-HAV).....	47
5.4. Avaliação da sensibilidade, especificidade e dos valores preditivos positivo e negativo do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM.....	49
5.5. Detecção do RNA do HAV.....	52
5.6. Avaliação da reprodutibilidade e repetitividade do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM.....	54

5.7.	Avaliação do limite de detecção do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM..	55
5.8.	Avaliação da reatividade cruzada do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM..	55
5.9.	Avaliação de resposta vacinal pelo teste rápido.....	56
<b>VI.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO I.</b>	<b>.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO II.</b>	<b>.....</b>	<b>84</b>

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Avaliação da utilização de ensaio imunocromatográfico para o diagnóstico e estudo de prevalência da hepatite A**

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

CAMILLA RODRIGUES DE ALMEIDA RIBEIRO

O diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite A (HAV) através de testes de alta sensibilidade e especificidade pode levar um diagnóstico mais precoce e mais preciso, melhorando o prognóstico da doença. Deve também ser mencionado que um diagnóstico mais preciso pode tornar estudos epidemiológicos mais confiáveis e servir de base para a produção de programas de controle e erradicação mais efetivos. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de um teste imunocromatográfico em surtos e estudos epidemiológicos de prevalência, triagem de candidatos para programas de vacinação e detecção de resposta imunológica pós-vacinação. Para este fim, 342 amostras provenientes de quatro grupos diferentes foram analisadas: (I) amostras de doadores de sangue ( $n= 96$ ), (II) amostras de indivíduos vacinados contra a hepatite A ( $n= 46$ ), amostras de surtos de hepatite A (III) ( $n= 103$ ) e (IV) amostras de casos esporádicos de hepatite A ( $n= 97$ ). Estas amostras foram submetidas ao teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM e todos os resultados do teste rápido foram comparados com os resultados do ensaio imunoenzimático para HAV (EIA), que é o padrão ouro para detectar anticorpos contra o HAV. Os resultados obtidos para o grupo I mostraram que, 33,3% (32/96) das amostras foram reagentes para anti-HAV IgG utilizando o teste rápido e 67,7% (65/96) foram reagentes para IgG anti-HAV por ELISA. No grupo II, 71,7% (33/46) das amostras foram reagentes para anti-HAV IgG por ELISA e nenhuma amostra do grupo II anti-HAV reagente por ELISA (0/33) foi reagente no teste rápido. Os grupos III e IV foram testados para a presença de anti-HAV IgG e anticorpos anti-HAV IgM. Em relação a anti-HAV IgG, no grupo III 60,1% (62/103) e 81,5% (84/103) foram reagentes pelo teste rápido e em ELISA, respectivamente. Para anticorpos anti-HAV IgM, 45,6% (47/103) e 47,5% (49/103) das amostras foram reagentes através do teste rápido no ELISA, respectivamente. Para o grupo IV, sobre a avaliação de anticorpos IgG anti-HAV, 61,8% (60/97) foram reagentes pelo teste rápido, e 75,2% (73/97) foram reagentes no ELISA e para os anticorpos anti-HAV IgM, 45,3 % (44/97) das amostras foram reagentes no teste rápido, e 46,9% (46/97) foram reagentes no ELISA. A sensibilidade e especificidade do teste rápido no grupo I para detecção de anticorpos anti-HAV IgG foram 49,23% e 100%, respectivamente.

No grupo III, em relação ao IgM anti-HAV a sensibilidade e especificidade foram 95,92% e 100%, respectivamente e para IgG anti-HAV a sensibilidade e especificidade foram 78,79% e 21,62%, respectivamente. No grupo IV, em relação ao IgM anti-HAV a sensibilidade e especificidade foram 93,48% e 98,04%, respectivamente e para IgG anti-HAV a sensibilidade e especificidade foram 79,45% e 91,67%, respectivamente. O nível de concordância de acordo com o índice Kappa (k) foi considerado fraco nos grupos I e III, e bom no grupo IV ambos testados para o marcador IgG anti-HAV. Os grupos testados com o marcador IgM anti-HAV, obtivemos uma concordância boa para o grupo IV e excelente para o grupo III. Na testagem das amostras dos grupos III e IV por *nested*-PCR, para o grupo III obtivemos 47,5% (49/103), 45,5% (47/103) e 100,0% (103/103) das amostras reagentes por ELISA anti-HAV IgM, teste rápido e *nested*-PCR. Em relação ao grupo IV, obtivemos 46,9% (46/97) das amostras reagentes no ELISA, 45,3% (44/97) de amostras reagentes no teste rápido e 40,2% (39/97) das amostras com resultado reagente por *nested*-PCR. Em conclusão, o teste provou ser adequado para a detecção de anticorpos IgM anti-HAV, indicando sua aplicabilidade para o diagnóstico da hepatite A em surtos e casos esporádicos. No entanto, o baixo desempenho do teste rápido para detecção de IgG anti-HAV demonstrou que o mesmo precisa ser aprimorado para os estudos sobre detecção de infecção passada e resposta à vacinação.

Palavras-chave: teste rápido imunocromatográfico, anticorpos para hepatite A, surtos , estudos epidemiológicos

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Evaluation of an immunochromatographic assay for diagnosis and prevalence study of hepatitis A

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

CAMILLA RODRIGUES DE ALMEIDA RIBEIRO

The diagnosis of infection by the hepatitis A virus (HAV) through high sensitivity and specificity tests can lead an earlier and more accurate diagnosis, improving the prognosis of the disease. It should also be mentioned that a more precise diagnosis can become more reliable epidemiological studies and as a basis for the production of more effective control and eradication programs. The aim of this study was to evaluate an immunochromatographic test in outbreaks and epidemiological studies of prevalence, screening candidates for vaccination and post-vaccination surveillance programs. For this purpose, 342 samples from patients of four different groups were analyzed: (I) samples from blood donors ( $n=96$ ), (II) samples from individuals vaccinated for hepatitis A ( $n=46$ ), (III) samples from hepatitis A outbreaks ( $n=103$ ) and (IV) samples from sporadic cases of hepatitis A ( $n=97$ ). These samples were submitted to the rapid test SD BIOLINE HAV IgG/IgM and all results of the rapid test were compared to the results of HAV enzyme immunoassay (EIA) that is the gold standard to detect antibodies against HAV. The results obtained for the group I showed that, 33.3% (32/96) were positive for anti-HAV IgG using the rapid test and 67.7% (65/96) were positive for IgG anti-HAV by EIA. At group II, 71.7% (33/46) of the samples were positive for anti-HAV IgG by EIA and none of them (0/33) was reactive by rapid test. Groups III and IV were tested for the presence of anti-HAV IgG and anti-HAV IgM antibodies. Regarding anti-HAV IgG antibodies, at the group III 60.1% (62/103) and 81.5% (84/103) were positive by the rapid test and in EIA, respectively. For IgM anti-HAV antibodies, 45.6% (47/103) and 47.5% (49/103) of the samples were positive through the rapid test in EIA, respectively. For the group IV, regarding the evaluation of anti-HAV IgG antibodies, 61.8% (60/97) were positive by the rapid test, and 75.2% (73/97) were positive on EIA and for antibodies anti-HAV IgM, 45.3% (44/97) of the samples were positive to the rapid test, and 46.9% (46/97) were positive in EIA. The sensitivity and specificity of a rapid test for group I for detection of anti-HAV IgG antibodies were 49.23% and 100%, respectively. In group III, for IgM anti-HAV sensitivity and specificity were 95.92% and 100%, respectively, and anti-HAV-IgG the sensitivity and specificity were 78.79% and 21.62%, respectively. In group IV, in relation to anti-HAV IgM sensitivity and specificity were 93.48% and 98.04%, respectively, and anti-HAV-IgG the sensitivity and specificity were 79.45% and 91.67%, respectively. The level of

agreement according to the Kappa index (k) was considered weak in groups I and III, and IV group good at both tested for anti-HAV IgG marker. The groups tested with anti-HAV IgM marker, we obtained a good agreement for the IV and excellent group for the group III. In testing of samples from groups III and IV by nested-PCR, for the group III obtained 47.5% (49/103), 45.5% (47/103) and 100.0% (103/103) of the samples ELISA reagents for IgM anti-HAV, rapid test and nested PCR. Regarding the group IV, it obtained 46.9% (46/97) of samples in ELISA reagents, 45.3% (44/97) of the rapid test reagents samples and 40.2% (39/97) of samples result reagent by nested-PCR. In conclusion, the test proved to be suitable for the detection of anti-HAV IgM antibodies, indicating their applicability for the diagnosis of hepatitis A outbreaks and sporadic cases. However, the poor performance of the rapid test for anti-HAV IgG detection showed that it needs to be improved for studies on past infection detection and response to vaccination.

**Keywords:** Rapid immunochromatographic test, hepatitis A antibodies, outbreak, epidemiological studies

# **I.INTRODUÇÃO**

## **1.1.Hepatites Virais**

As Hepatites virais são as causas mais importante de doença hepática no mundo inteiro. Hepatite viral é uma infecção sistêmica caracterizada por manifestações predominantemente decorrentes de lesão e disfunção hepática, é causada por diferentes agentes etiológicos, de distribuição universal (Ferreira e Silveira, 1997). Seis vírus são reconhecidos como agentes etiológicos das diferentes hepatites virais humanas: os vírus das hepatites A (HAV), B (HBV), C (HCV), D ou Delta (HDV) e E (HEV) e G (HGV) (Nunes *et al.*, 2010).

A patologia causada pelos vírus das hepatites tem como decorrência a lesão do fígado acarretando o aparecimento clássico dos sintomas ictericos e a liberação das enzimas hepáticas. Os indivíduos infectados tornam-se transmissores antes mesmo de desenvolverem alguma sintomatologia, o que facilita a transmissão dos vírus (Babinski *et al.*, 2008).

## **1.2.Enquadramento Histórico da Hepatite A**

A história das hepatites virais é antiga, remontando, provavelmente, aos primórdios da civilização. Relatos de ocorrência de icterícia epidêmica são encontrados desde o período anterior à era cristã, descritos inicialmente por Hipócrates (400 a.C.), sendo porém mais documentados durante os séculos XVII e XVIII na Europa (Melnik, 1995). Na Idade Média, o aparecimento das epidemias de icterícia estavam geralmente associadas a catástrofes naturais ou a períodos de guerra que ameaçavam seriamente as condições sanitárias (Hollinger e Emerson, 2007).

Durante as Guerras, devido a superpopulação, as más condições de higiene e a má distribuição de redes de esgoto, o número de casos de hepatites virais, de provável transmissão fecal-oral, supostamente causadas pelo vírus da hepatite A, ganhou proporções pandêmicas, acometendo milhares de soldados e civis. Estima-se que nesse período aproximadamente 15 milhões de indivíduos estavam infectados com o HAV (Paul e Gardner,

1950; Fonseca, 2010). Por muito tempo, a hepatite A foi denominada de “icterícia catarral”, devido às obstruções biliares causada pela doença. Apenas em 1931, admitiu-se que o agente causador da enfermidade era um vírus (Krugman *et al.*, 1959).

Na década de 1940, identificou-se mais de um agente viral para as epidemias de icterícia e em 1947, McCallum estabeleceu a existência de duas formas de hepatite: a “hepatite infecciosa”, hoje conhecida como hepatite A, e a “icterícia sérica”, hoje conhecida como hepatite B (Fonseca, 2010).

Entre 1964 e 1966, Krugman e seus colaboradores, realizando um estudo de infecção experimental em uma instituição de crianças demonstraram a principal via de disseminação da doença. Neste estudo, chegou-se a conclusão que existiam dois agentes distintos provocando hepatite nas crianças, sendo um agente com período de incubação menor e via de transmissão fecal-oral, esse agente hoje conhecido como vírus da hepatite A (HAV) causava uma doença muito similar à então chamada hepatite infecciosa. O outro agente, que possuía um período de incubação maior, causava uma hepatite semelhante a hepatite sérica, e hoje é conhecido como vírus da hepatite B (HBV) (Krugman *et al.*, 1967).

A partir de amostras de fezes e soro de voluntários infectados, Feinstone e colaboradores, em 1973, conseguiram pela primeira vez, visualizar através de imunomicroscopia eletrônica as partículas virais esféricas do HAV. Todos os pacientes que demonstravam tais partículas nas fezes foram testados e obtiveram resposta sorológica para este antígeno, sugerindo finalmente a etiologia da hepatite A. Em 1979, Provost e Hilleman conseguiram propagar o vírus em cultura celular, o que possibilitou o desenvolvimento de testes para o diagnóstico da doença e o desenvolvimento da vacina (Fonseca, 2010).

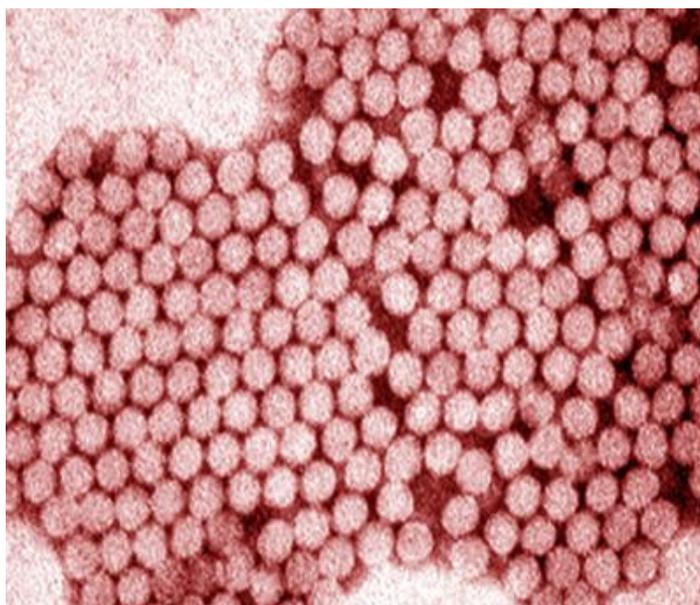
### **1.3. O Vírus da Hepatite A (HAV): Classificação e estrutura**

O HAV pertence à família *Picornaviridae* devido as suas características morfológicas e organização do seu genoma e dentro desta família estão incluídos três gêneros, *Rinovírus*, *Enterovírus* e *Hepatovírus*. O HAV é o único membro do gênero *Hepatovírus* devido a importantes diferenças que ele possui em relação aos outros membros da família. Ao contrário

dos outros, o HAV possui uma composição estrutural única, requer um longo período de adaptação para crescer em cultura celular, replica-se lentamente, raramente produz efeito citopático, possui resistência a temperatura e drogas que são eficazes contra outros picornavírus, é resistente a pH baixo e não reage com anticorpos anti-enterovírus (Cuthbert *et al.*, 2001; Nainan *et al.*, 2006; Yong e Son, 2009; Vaughan *et al.*, 2013).

### 1.3.1. Organização genômica e proteínas do vírus

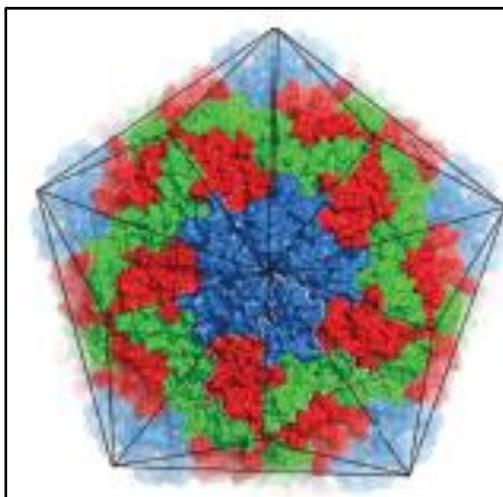
O HAV é um vírus de RNA fita simples de polaridade positiva, portanto, pronto para a tradução, não-envelopado com tamanho de 27 a 32 nanômetros (nm) de diâmetro, com um capsídeo de simetria icosaédrica (**Figura 1.1**).



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

O capsídeo icosaédrico dos diferentes picornavírus é composto por 12 pentâmeros e compreende várias cópias das proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4. Na partícula viral do HAV, a principal proteína constituinte do capsídeo é a VP1 (**Figura 1.2**). Recentemente, tem sido sugerido que não só o capsídeo maduro, mas também os produtos intermediários do processamento proteolítico desempenham papéis importantes no ciclo de multiplicação do

HAV (Vaughan *et al.*, 2013). Estudos mostraram que o HAV é composto por 30% de ácido nucleico e 70% de proteína (Stapleton e Lemon, 1987; Lemon, 1994; Koff *et al.*, 1998).

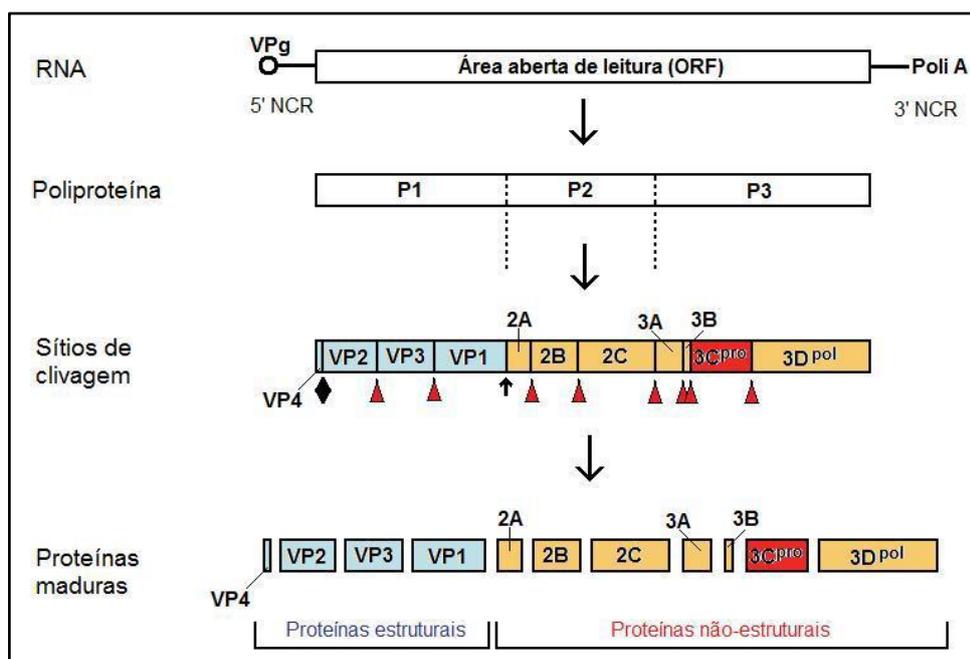


**Figura 1.2.** Estrutura geral do HAV (VP1, azul; VP2, verde; VP3, vermelho). Adaptado de: Wang *et al.*, 2015.

O genoma do HAV é formado por uma cadeia de RNA com 7,5 quilobases (Kb) e como todos os genomas dos picornavírus, pode ser dividido em três regiões, sendo, a primeira uma região não codificante na extremidade 5' (5' NC) de 732 a 740 nucleotídeos, que representa a sequência mais conservada do genoma viral, e possui uma proteína covalentemente ligada (VPg), ao invés de uma estrutura CAP. Esta região contém uma extensa estrutura secundária, onde está inserido o sítio interno de ligação para o ribossomo (IRES), responsável por dar início ao processo de tradução do RNA viral (Cuthbert, 2001; Yong e Son, 2009). A segunda região representa a única sequência de leitura aberta (ORF) que codifica todas as proteínas virais estruturais e não-estruturais correspondendo a maior parte do genoma, e uma terceira região não codificante na extremidade 3' (3' NC) com 40 a 80 nucleotídeos com uma cauda poliadenilada, envolvida com o fim do processo de tradução e da replicação do RNA (Costa-Mattioli *et al.*, 2003; Pereira e Gonçalves, 2003; Vaughan *et al.*, 2013).

A única fase de leitura aberta (ORF) do genoma, codifica uma poliproteína de aproximadamente 250 kDa, que é clivada pela protease 3C, em precursores P1, P2 e P3. A partir de P1 são obtidas as principais proteínas estruturais que vão formar o capsídeo viral,

VP1, VP2 e VP3. A quarta proteína (VP4) é essencial para a formação dos vírions, mas não está presente nas partículas maduras. A clivagem das regiões P2 e P3 leva a produção de proteínas não-estruturais envolvidas no processo de replicação viral, na síntese de RNA e formação dos vírions. A região P2 codifica a proteína 2A, que atua como uma proteína precursora do capsídeo e na morfogênese viral, a 2B que está relacionada com a estabilidade da membrana e 2C que possui atividade de helicase (Cohen *et al.*, 2002). O segmento P3 contém as proteínas 3A, 3B, 3C e 3D. A proteína 3A denominada pré-VPg, ancora a proteína 3B no HAV-RNA. A proteína 3B (VPg) desempenha um papel de iniciador (*primer*), e está envolvida na iniciação da síntese do RNA viral. A proteína 3C tem atividade de protease, e é responsável pela maioria das clivagens no interior da poliproteína. A proteína 3D é considerada uma RNA polimerase RNA dependente, essencial no ciclo replicativo do vírus (Cuthbert *et al.*, 2001; Costa-Mattioli *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2013) (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Organização do genoma do HAV e processamento da poliproteína. RNA genômico contém uma única fase de leitura aberta (ORF) que codifica uma poliproteína, a qual é clivada pela protease 3C (triângulos vermelhos). Existem também sítios que são clivados por protease celulares (seta) ou por mecanismo ainda desconhecido (losango preto). Este processamento leva a produção das proteínas estruturais (capsídeo) e não estruturais (complexo de replicação do RNA viral) (Martin e Lemon, 2006).

A estrutura antigênica do vírus possui um número restrito de epítomos de sobreposição que se combinam para formar um único local antigênico dominante conservado e, como resultado disso, todos os isolados de diferentes partes do mundo, pertencem a um único sorotipo. Esses epítomos são formados por aminoácidos localizados em mais de uma proteína do capsídeo (Stapleton e Lemon, 1987; Ping *et al.*, 1988; Ping e Lemon, 1992; Nainan *et al.*, 1992). O sítio antigênico dominante do HAV é composto por resíduos de VP1 e VP3 (Mattioli *et al.*, 1995). Um segundo sítio antigênico é o sítio de ligação da glicoforina, na qual o HAV pode se ligar aos eritrócitos, levando à hemaglutinação. Este processo é otimizado em pH ácido, mas fica prejudicado em pH fisiológico. Isto sugere que o HAV evoluiu para escapar da ligação aos eritrócitos e, conseqüentemente, da eliminação do organismo (Sánchez *et al.*, 2004; Costafreda *et al.*, 2012).

Apesar desta uniformidade antigênica, o HAV exibe diversidade genética suficiente para definir diferentes genótipos e subgenótipos que apresentam uma distribuição geográfica específica. Sete genótipos, I a VII, foram inicialmente identificados utilizando sequências da junção das regiões VP1/2A, mas recentemente foram reclassificados em seis genótipos, I a VI, com base em sequências derivadas a partir da região VP1 completa. Os genótipos foram definidos pelas sequências, diferindo um do outro por pelo menos 15% de variação de nucleotídeos e os subgenótipos diferem por 7,0-7,5% de variação de nucleotídeos. Os genótipos I-III têm sido associados com infecções em seres humanos, enquanto os genótipos IV-VI são de origem símia (Nainan *et al.*, 2006; Yong e Son, 2009; Vaughan *et al.*, 2013). A maioria das cepas humanas são do genótipo I, que é dividido em dois subgenótipos, A e B (De Paula *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2013). Recentemente, um novo subgenótipo C foi proposto para o genótipo I (Vaughan *et al.*, 2013).

Os genótipos e subgenótipos do HAV apresentam uma distribuição geográfica particular. Em todo o mundo, o genótipo I é o mais prevalente, com o subgenótipo IA sendo mais comum do que IB. Isolados do genótipo II foram inicialmente identificados na França em 1979 e na Serra Leoa. No entanto, a detecção desse genótipo é raramente relatada. O genótipo III tem uma distribuição global e estirpes pertencentes a esse genótipo foram identificadas em países da Ásia e Europa, bem como em Madagáscar e EUA (Vaughan *et al.*, 2013).

### 1.3.2.Ciclo de multiplicação e replicação viral

O que ocorre com o vírus no aparelho digestivo após a ingestão, ainda não está bem estabelecido. O vírus é absorvido podendo infectar células epiteliais da mucosa digestiva onde prolifera, logo após cai na corrente sanguínea e chega aos hepatócitos, pela circulação portal e pela circulação sistêmica. O processo de internalização da partícula viral ocorre através de endocitose mediada por receptor e está pode ser inibida por bloqueadores de acidificação endossomal como a cloroquina. Estes receptores são glicoproteínas integrais de ligação presente na superfície da célula, denominados HAVcr-1/TIM-1 (*hepatitis A virus cellular receptor 1/T cell immunoglobulin domain and mucin-like domain containing molecule 1*) (Kaplan *et al.*, 1996; Tami *et al.*, 2007; Vaughan *et al.*, 2013).

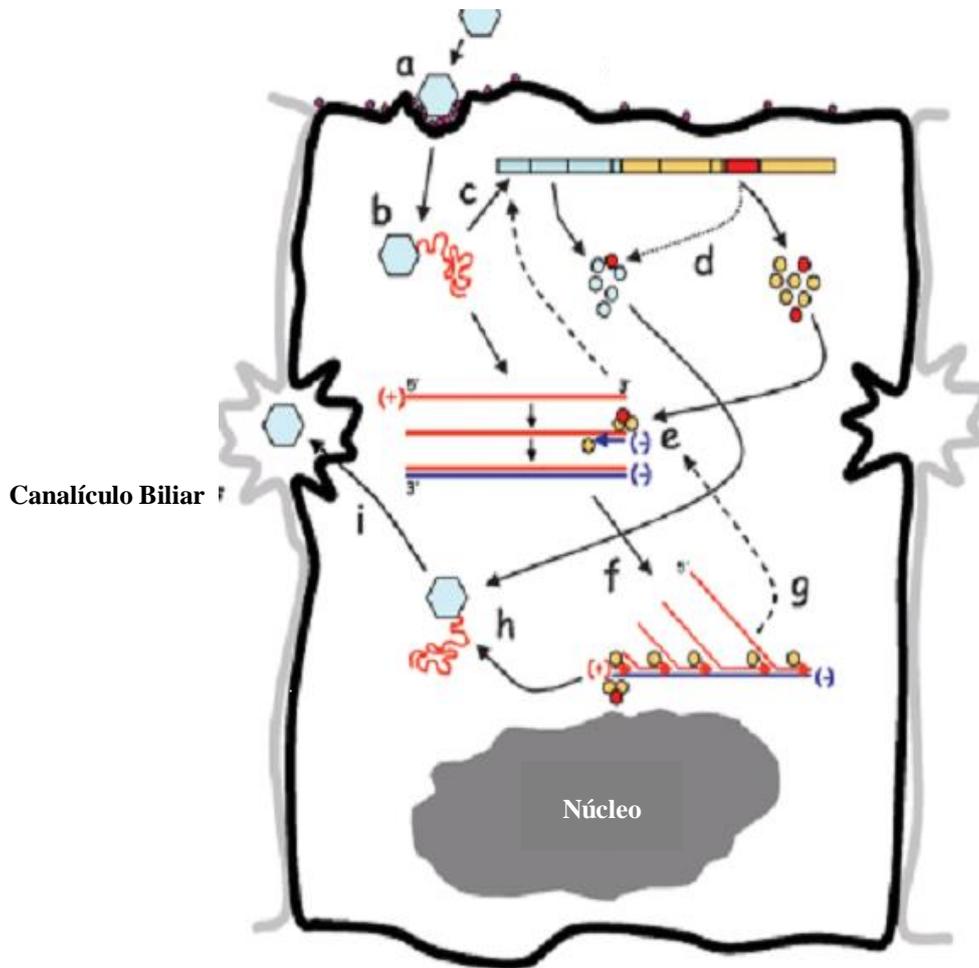
Os dados atuais indicam que a replicação do HAV ocorre somente em hepatócitos e células epiteliais gastrointestinais *in vivo*, embora a infecção em cultura de células e em linhagens celulares de replicação fora dos hepatócitos seja bem documentada (Cuthbert *et al.*, 2001). O vírus também é eliminado na saliva, na maioria dos pacientes com hepatite A, e observou-se títulos semelhantes aos do soro (Amado *et al.*, 2010).

O vírus penetra na célula hospedeira, e através de mudanças desencadeadas pelo ambiente citoplasmático, ele perde o capsídeo viral (desnudamento) promovendo a liberação do RNA viral no interior do citoplasma, este pode agir diretamente como RNAm. A síntese da poliproteína começa a partir do direcionamento do RNA viral ao ribossomo pelo sítio interno de ligação ribossomal (IRES) situado na região 5' NC do genoma, sendo responsável pelo início da tradução, que ocorre por um processo independente de CAP (Yong e Son, 2009). A maioria dos picornavírus afeta a síntese de proteínas da célula hospedeira para promover uma tradução mais eficiente do seu RNAm viral. Este processo é mediado pela clivagem proteolítica do fator de iniciação 4G (*eukaryotic translation initiation factor 4G* ou eIF4G), induzindo assim um desligamento completo da tradução do RNAm da célula hospedeira (Redondo *et al.*, 2012). Entretanto, ao contrário de outros picornavírus, a tradução de proteínas virais do HAV se inicia na presença do fator de iniciação G4 intacto (Borman e Kean, 1997). Desta forma, o HAV tem que competir com o hospedeiro pelo uso da

maquinaria celular, fato que explica sua replicação lenta em cultura celular e a ausência de efeito citopático (Lemon *et al.*, 1992; Totsuka e Moritsugu, 1999; Pintó *et al.*, 2007).

O RNAm viral será então traduzido na poliproteína descrita anteriormente que após uma série de clivagens dará origem as proteínas não-estruturais e estruturais do HAV (Martin e Lemon, 2006). Além disso, o RNA genômico serve de intermediário para a síntese de um RNA complementar de polaridade negativa. Esse por sua vez serve de molde para a síntese de novas moléculas de RNA de polaridade positiva, catalisada principalmente pela RNA polimerase RNA dependente. Uma vez que as proteínas estruturais já foram formadas no citoplasma da célula, inicia-se o processo de formação da partícula viral, podendo ou não conter o RNA viral infeccioso (partícula defectiva), a partir de então, o vírus inicia o processo de evasão da célula, geralmente sem causar a lise celular (Cuthbert *et al.*, 2001; Vaughan *et al.*, 2013) **(Figura 1.4)**.

As partículas virais aparecem na bile e sangue, presumivelmente, sendo liberadas através da membrana apical do hepatócito para o canalículo biliar e através da membrana basolateral para a circulação sanguínea. O mecanismo de liberação e secreção viral é desconhecido, mas claramente não é dependente da destruição das células, uma vez que altos títulos virais estão presentes nas fezes antes de haver qualquer evidência de necrose dos hepatócitos. Devido a alta carga viral eliminada nas fezes, é nesta fase que ocorre o pico da infectividade (Cuthbert *et al.*, 2001; Pereira e Gonçalves, 2003; Vaughan *et al.*, 2013).



**Figura 1.4.** Esquema representativo do ciclo de replicação do HAV. (a) O vírus se liga aos hepatócitos via interação com seu receptor celular (b) Liberação do RNA no citoplasma. (c) Tradução da poliproteína. (d) Processamento da poliproteína através de uma série de clivagens. (e) As proteínas não-estruturais formam o complexo de replicação em membranas intracelulares e ligam-se a porção 3' do RNA, iniciando a síntese da cópia de sentido negativo. (f) Algumas dessas cópias servem como molde para a síntese de múltiplas cópias do RNA positivo. (g) Algumas dessas novas fitas positivas são recicladas para nova síntese de RNA ou tradução. (h) Outras moléculas são empacotadas pelo capsídeo recém formado. (i) Eliminação das partículas virais através da membrana apical do hepatócito (Adaptado de Martin e Lemon, 2006).

#### 1.4. Formas de transmissão da hepatite A

A principal via de transmissão do HAV é pela via fecal-oral, incluindo o contato pessoa-a-pessoa e a ingestão de alimentos ou água contaminados por fezes de indivíduos infectados. As rotas comumente relatadas de origem alimentar associada a hepatite

A provem de mariscos, legumes e frutas, onde o consumo de marisco seria responsável por 50% dos casos de hepatite A transmitidas por alimentos (Yong e Son, 2009). O HAV é estável à temperatura ambiente por uma semana e a pH baixo (1,0) e sua inativação em alimentos requer o aquecimento a 85°C durante um minuto e a desinfecção de superfícies é feita através do contato com uma diluição de 1:100 de hipoclorito de sódio durante um minuto (Scholz *et al.*, 1989). Estas características do vírus explicam a sua capacidade de sobreviver no ambiente e ser transmitida por alimentos contaminados e água potável. Resistência a pH ácido e detergentes também explicam a sua capacidade de transitar através do trato gastrointestinal e do trato biliar (Martin e Lemon, 2006).

A água não tratada pode ser um veículo de disseminação de vírus e bactérias. O Ministério da Saúde, através da Portaria nº518/2004, que define sobre a vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabelece a utilização de testes com bactérias do grupo coliforme como indicador específico de contaminação fecal e recomenda que a concentração de cloro residual livre, que indica a capacidade residual de desinfecção da água, seja 2,0 mg/L (Brasil, 2005). No entanto, o HAV possui resistência ao tratamento com cloro (WHO, 2000b) e persiste por mais tempo no ambiente do que as bactérias entéricas. Deste modo, os padrões bacteriológicos não são úteis para avaliar a qualidade virológica de qualquer tipo de água (Bosh, 1998).

A transmissão da hepatite A também pode estar associada à prática homossexual (Katz *et al.*, 1997; De Paula *et al.*, 2012), porém altas taxas de soroprevalência da infecção pelo HAV são associadas com o contato oral-anal independente da orientação sexual (Cuthbert, 2001). Em raras ocasiões, a infecção também pode ser transmitida através de transfusão de sangue ou hemoderivados provenientes de doadores infectados durante a viremia (De Paula *et al.*, 2012).

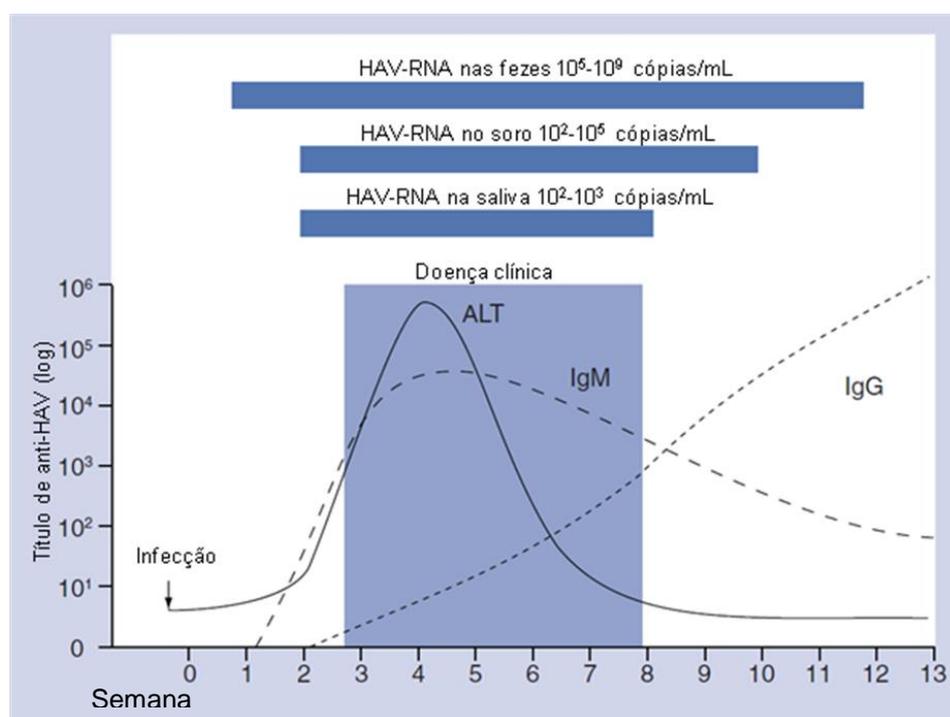
A transmissão pessoa-pessoa também é um importante modo de transmissão responsável por diversos surtos de hepatite A (Robertson *et al.*, 2000, De Paula *et al.*, 2002, Villar *et al.*, 2002). Surtos de hepatite A no ambiente intradomiciliar também representam um problema de saúde pública, exigindo a investigação da etiologia e medidas de ação rápida para controlar a infecção. Os surtos de hepatite A também têm sido associados com alimentos crus, como moluscos bivalves contaminados, salada ou frutas, e alimentos cozidos que são muitas vezes contaminados pela água com fezes em sua área de cultivo ou durante a preparação através do contato com superfícies contaminadas por resíduos fecais ou

manipuladores de alimentos infectados (Yong e Son, 2009). Existe uma relevante transmissão do HAV no ambiente doméstico, o que apoia a necessidade da implementação da vacina contra hepatite A, não só em crianças, mas também em contatos domiciliares suscetíveis, como meio de evitar a propagação da doença e reduzir o impacto da mesma sobre os indivíduos suscetíveis em contato com pessoas infectadas (Lima, 2014). Devido a importância de surtos de hepatite A no ambiente intradomiciliar, a vacinação dos contactantes de casos índice foi parte da estratégia de controle de um surto ocorrido na Argentina durante os anos de 2003-2004 (Vizzotti *et al.*, 2015).

### **1.5. Patogênese da infecção e aspectos clínicos da Hepatite A**

A hepatite A é uma doença infecciosa aguda, auto-limitada, e pode produzir efeitos que vão desde a ausência de sintomas a morte por hepatite fulminante. Os mecanismos responsáveis pela grande variedade na severidade da doença causada na infecção pelo HAV não são bem compreendidos. É geralmente aceito que os fatores de virulência associados a determinadas linhagens virais e diferentes fatores do hospedeiro, como idade, sexo e raça irão determinar os desfechos clínicos da doença (Vaughan *et al.*, 2013).

A cinética bioquímica, imunológica e virológica durante a infecção pelo HAV foram determinados na infecção experimental de primatas não humanos e na infecção natural do ser humano (**Figura 1.5**). O HAV é principalmente hepatotrópico, ele replica no fígado, produz uma viremia, e é excretado na bile e eliminado nas fezes das pessoas infectadas. As fezes podem conter até  $10^9$  virions infecciosos por grama e são a fonte primária de infecção. O pico da excreção fecal, e, portanto, da infecciosidade, ocorrem antes do aparecimento da icterícia, dos sintomas, ou da elevação das enzimas hepáticas e depois declina quando a icterícia aparece. Em comparação com adultos, crianças e bebês podem excretar o vírus por longos períodos, ou seja, até vários meses após o início da doença clínica (Nainan *et al.*, 2006). A concentração do vírus no soro é de 2 a 3 log<sub>10</sub> unidades menor que a concentração nas fezes (Cohen *et al.*, 1989; Bower *et al.*, 2000) e varia em média de  $10^3$  a  $10^5$  cópias/mL (Costa-Mattioli *et al.*, 2002b; Hussain *et al.*, 2006).



**Figura 1.5.** Cinética imunológica, bioquímica e virológica durante a infecção causada pelo HAV (Fonte: De Paula 2012).

A hepatite A pode ser dividida em quatro fases clínicas: (a) período de incubação, (b) fase pré-ictérica ou período prodrômico, (c) fase ictérica e (d) fase de convalescência. O período de incubação ou pré-clínico dura cerca de 10 a 50 dias, com média de 30 dias após o contato com o vírus. Neste período, a infecção permanece assintomática, mesmo quando a replicação do vírus e a transmissibilidade são uma grande preocupação (Cuthbert, 2001; WHO, 2000b).

A fase prodrômica ou pré-ictérica dura em geral de 5 a 15 dias, podendo se prolongar por semanas e é caracterizada pelo aparecimento dos primeiros sintomas inespecíficos, tais como perda de apetite, fadiga, anorexia, náusea, vômitos, dor abdominal, febre, diarreia e colúria (WHO, 2000b). Essas manifestações não podem ser distinguidas daquelas que ocorrem em outras infecções virais, e se não houver desenvolvimento de ictéria o diagnóstico será feito através da constatação dos níveis elevados das enzimas séricas e dos testes sorológicos (Pereira e Gonçalves, 2003).

A fase icterica possui uma duracao variada, podendo ser de 4 a 29 dias, esta fase e caracterizada pela deposicao de bilirrubina na pele e mucosa, que assumem coloracao amarelada e geralmente, tambem ocorre coluria e hipocolia nesta fase. Podem ocorrer hepatomegalia dolorosa em 85% dos casos e esplenomegalia em 15% dos casos. Tambem podem ocorrer manifestacoes extra-hepaticas como hemolise, colecistite acalculosa e falencia renal aguda (Cuthbert, 2001). Complicacoes neurolgicas, tais como, Sindrome de Guillian Barré, meningite asséptica, meningoencefalite e manifestacoes hematologicas como anemia aplásica e hemolítica, tambem ja foram relatadas (Pereira e Gonçaves, 2003; Fernández *et al.*, 2006).

A viremia ocorre dentro de 1 a 2 semanas após a exposicao ao HAV e persiste ao longo do periodo de elevacao das enzimas do figado. A liberacao do virus nas fezes dura de 3 a 6 semanas durante o periodo de incubacao, se estendendo para os primeiros dias da doenca, seguido por aumento das enzimas hepaticas e aparecimento dos anticorpos (Nainan *et al.*, 2006).

No periodo de convalescencia os sintomas clinicos desaparecem gradativamente, sendo encontradas apenas algumas alteracoes enzimaticas (Silva, 2003). A resolucao da doenca e lenta, porém a recuperacao do paciente e completa (WHO, 2000b). Não há nenhuma evidencia de doenca hepatica crônica ou de infeccao persistente. No entanto, 15 a 20% dos pacientes podem ter a doenca prolongada ou reincidente com a duracao de 6 meses, e o HAV pode ser detectado no soro desses pacientes de 6 a 12 meses após a infeccao. O quadro clinico do paciente está diretamente relacionado à idade. Em criançãs menores de 6 anos apenas 10% apresentam icterícia, já criançãs acima de 6 anos em média 45% apresentaram icterícia e, em adultos em média 75% podem apresentar icterícia (Ferreira e Silveira, 2004). Alguns adultos infectados não apresentam qualquer sintoma, enquanto outros podem experimentar doenca leve gripal, hepatite fulminante, ou insuficiencia hepatica aguda grave (Poovorawan *et al.*, 2013).

Em raras ocasiões, a infeccao pelo HAV pode resultar em hepatite fulminante, isto é, insuficiencia hepatica aguda com encefalopatia e coagulopatia. Pacientes com doenca hepatica crônica têm um risco aumentado de desenvolver esse tipo de hepatite (Rezende *et al.*, 2003; Nainan *et al.*, 2006). Além disso, outros fatores que pre-dispõem ao desenvolvimento da hepatite fulminante incluem a idade, doenca hepatica subjacente, co-infeccao com outros

vírus hepatotrópicos e a ingestão de paracetamol. A mortalidade é rara e mais frequente em pacientes com mais de 50 anos. O número de casos de hepatite A fulminante em crianças parece estar aumentando e vários casos já foram relatados na Argentina (Conference Report, 2010) e no Brasil (Santos *et al.*, 2009).

## **1.6.Resposta imunológica ao HAV**

O HAV induz tanto a resposta imune humoral como celular, sendo ambas essenciais no mecanismo de defesa e eliminação da infecção. A imunologia da hepatite A é importante por dois motivos: pelo desenvolvimento de testes diagnósticos que confirmam a infecção pelo HAV depende da produção de anticorpos neutralizantes gerados pela resposta humoral e pela manifestação da doença que, com o surgimento dos sinais clínicos está fortemente associada com a resposta imune celular (Cuthbert, 2001).

Uma resposta imune humoral às proteínas estruturais do HAV ocorre antes do início dos sintomas. Os anticorpos da classe IgM (anti-HAV IgM) são os mais precoces, nas infecções naturais e/ou nas experimentais, aparecendo junto com as primeiras manifestações clínicas, entretanto podendo aparecer no fim da primeira semana da doença. Esses anticorpos persistem na maioria dos pacientes, por até 4 meses; poucos casos podem ter IgM persistente por até um ano. Geralmente as manifestações clínicas desaparecem antes do desaparecimento da IgM. Os anticorpos IgG (anti-HAV IgG) aparecem após a primeira semana de doença e persistem provavelmente por toda a vida, ainda que em títulos mais baixos, gerando memória sorológica (Pereira e Gonçalves, 2003; Nainan *et al.*, 2006). Os anticorpos IgA (anti-HAV IgA) também aparecem precocemente e desaparecem em alguns meses, porém sua participação na resistência à infecção não é conhecida. Ao contrário de outros membros da família *Picornaviridae*, o HAV parece não provocar uma resposta imune intestinal eficaz (Stapleton *et al.*, 1991).

Os anticorpos neutralizantes reconhecem um número pequeno de epítopos nos fragmentos altamente conservados VP1 e VP3 e, possivelmente VP2, todos constituindo proteínas do capsídeo (Walker *et al.*, 2015). Anticorpos contra proteínas não-estruturais do HAV também são produzidos, embora o seu papel na manutenção da imunidade seja provavelmente menos importante do que o de anticorpos para os antígenos da capsídeo,

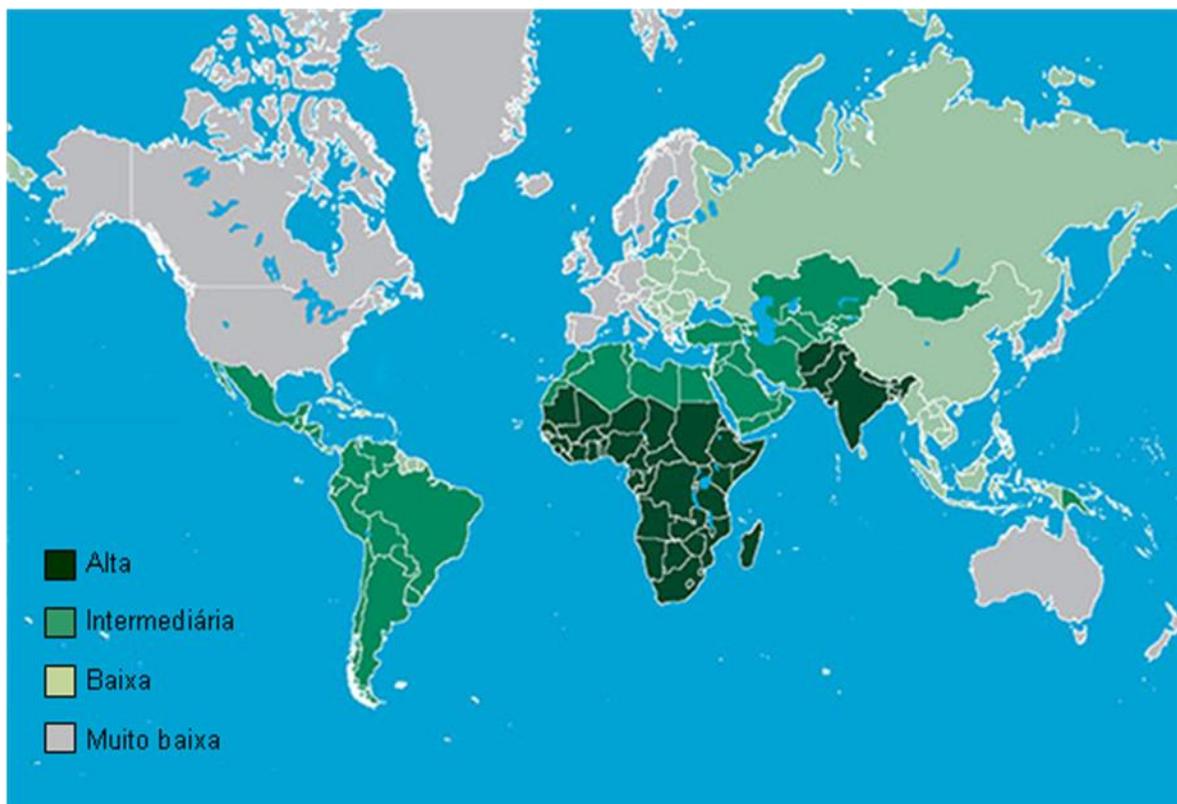
devido à sua baixa concentração e falta de capacidade de neutralização. Os anticorpos para as proteínas não estruturais foram detectados em seres humanos e chimpanzés infectados experimentalmente, mas estão ausentes em indivíduos vacinados (Nainan *et al.*, 2006).

A resposta imune celular contra o HAV é guiada principalmente pelos linfócitos T CD8+ citotóxicos, que atacam e destroem as células infectadas. A ausência de casos de doença crônica em humanos indica que esse tipo de resposta é eficiente no reconhecimento e combate ao vírus. Apesar da sua importância na eliminação do vírus, a resposta imune mediada por célula é relatada como a causa do dano hepatocelular na doença aguda e consequentemente dos sintomas relacionados (Cuthberth, 2001; Vaughan *et al.*, 2013).

## **1.7.Epidemiologia**

As hepatites virais têm distribuição universal e a magnitude dos diferentes tipos varia de acordo com cada região. A sua importância deve-se ao elevado número de indivíduos atingidos em todo o mundo e pelo risco de complicações das formas agudas e crônicas (Brasil, 2008).

O HAV é o mais frequente causador de hepatite aguda no mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que 1,5 milhões de casos clínicos de HAV ocorram globalmente a cada ano. No entanto, evidências sorológicas sugerem que dezenas de milhões de novas infecções ocorrem anualmente (Vaughan *et al.*, 2013). Quatro padrões principais de infecção pelo HAV podem ser descritos com base na prevalência de anticorpos anti-HAV totais por idade, que resultam em traços característicos da epidemiologia da hepatite A, incluindo taxas de doença e de transmissão predominante, estes variam de alta endemicidade para muito baixa, onde os níveis se correlacionam com o status da economia, saneamento ambiental, condições socioeconômicas e higiênicas de cada área geográfica (Vital *et al.*, 1998; Yong e Son, 2009) (**Figura 1.6**).



**Figura 1.6.** Distribuição geográfica dos padrões de endemicidade da hepatite A.(Fonte: adaptado de Jacobsen e Wiersma 2010).

A incidência da hepatite A varia muito de país para país e está associada a fatores sócio-econômicos que impactam na qualidade do saneamento e acesso à água potável. Em países onde as condições sanitárias são precárias, a maioria das crianças se infecta antes de completar um ano de idade e a infecção tende a ser assintomática. Nessas áreas, a população jovem e/ou adulta já está imune à doença. Nos países desenvolvidos, onde as condições higiênico-sanitárias são melhores e não há contato com o vírus durante a infância, os indivíduos adultos são susceptíveis e desenvolvem a infecção sintomática, o que pode levar à ocorrência de surtos de hepatite A, entre a população geral. Nos países em transição, como o Brasil, onde vem ocorrendo uma mudança no perfil epidemiológico da doença, devido a melhorias de saneamento e saúde pública, está ocorrendo uma queda na infecção pelo HAV durante a primeira infância e um deslocamento da infecção para faixas etárias mais elevadas, como adultos e adolescentes, acarretando um aumento na morbidade e mortalidade da doença (Yong e Son, 2009; Brasil, 2012; Vaughan *et al.*, 2013).

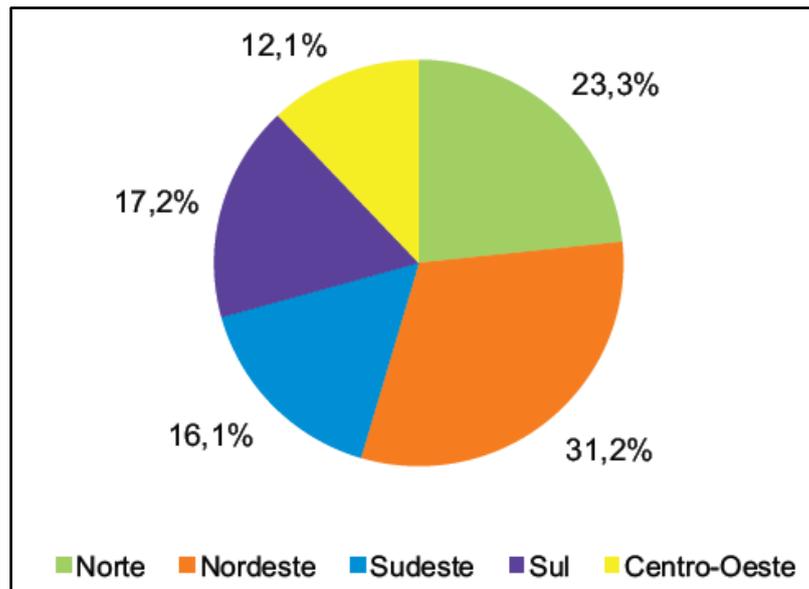
Existem diversas características no Brasil em termos geográficos, climáticos, econômicos e de origem étnica da população e todas essas diferenças interferem na epidemiologia das

doenças (Clemens *et al.*, 2000). Vários estudos de soroprevalência tem demonstrado uma queda de anticorpos anti-HAV na população brasileira. Um estudo realizado no Rio de Janeiro, envolvendo duas populações diferentes, demonstrou que a soroprevalência de anticorpos anti-HAV em crianças menores de 5 anos, que era de 98,1% em 1978, diminuiu para 7,8%, em 1995. Um Inquérito de base populacional sobre a soroprevalência das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C, realizado entre 2004 e 2009, envolvendo indivíduos de 5 a 69 anos residentes das 27 capitais brasileiras evidenciou que o país encontra-se em fase de transição quanto ao padrão epidemiológico da hepatite A, apresentando áreas de endemicidade intermediária (Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Distrito Federal) e áreas de baixa endemicidade (Sudeste e Sul) (Brasil, 2012). Um estudo publicado por Ximenes e colaboradores (2014) demonstrou que o risco de infecção pelo HAV foi maior para crianças e adolescentes até à idade dos 25 anos nas regiões de endemicidade intermediária, sendo a idade média de infecção de 13,8 anos nas áreas de endemicidade intermediária e 19,4 anos nas áreas de baixa endemicidade. Esses resultados suportam a mudança de prevalência em direção a níveis de endemicidade intermediária e baixa no Brasil, com a conseqüente mudança do risco de infecção para faixas etárias mais elevadas (**Figura 1.7**).

A maior parte dos casos registrados no período de 1999 a 2011, foi nas Regiões Nordeste (31,2%) e Norte (23,3%) e segundo dados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) foram registrados 138.305 casos confirmados de hepatite A no Brasil (Brasil, 2012) (**Figura 1.8**).



**Figura 1.7.** Padrão epidemiológico da hepatite A no Brasil de acordo com seus níveis de endemicidade nas macro-regiões brasileiras (Adaptado de Ximenes *et al.*, 2014).



**Figura 1.8.** Distribuição percentual de casos confirmados de hepatite A segundo região de residência. Brasil, 1999-2011 (Brasil, 2012).

## 1.8. Profilaxia e prevenção

Todas as decisões relativas à prevenção da hepatite A devem considerar a imunobiologia da doença e as principais vias de transmissão. As medidas de controle mais eficazes devem evitar a contaminação fecal das mãos, alimentos, água ou outras fontes por indivíduos infectados antes de sua doença clínica tornar-se evidente. Assim, a medida de controle mais crítica é a lavagem das mãos adequadamente após as evacuações e antes de preparar alimentos, e evitar práticas de trabalho que facilitam a contaminação das mãos ao cuidar de crianças menores de 2 anos. A importância destas medidas não pode ser subestimada, porque a higiene pessoal das crianças é muitas vezes difícil de controlar, devem ser impedidos os contatos próximos com seus companheiros suscetíveis durante as 2 primeiras semanas da doença ou, pelo menos, uma semana após o início da icterícia (Hollinger e Emerson, 2007).

## 1.9.A vacina contra hepatite A

A hepatite A pode ser prevenida pela utilização da vacina específica contra o vírus. A primeira vacina contra hepatite A começou a ser comercializada em 1992. Desde então, várias vacinas de vírus inteiros inativados foram disponibilizadas. Vírus adaptados em cultura de células (atenuados) são produzidos por crescimento em fibroblastos humanos, purificados e inativados por formalina (Brasil, 2005; Brasil, 2012; Ott *et al.*, 2012). Estão disponíveis no mercado duas vacinas eficazes contra a hepatite A compostas por vírus inativados por formalina que são a HAVRIX® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgica) e a VAQTA® (Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA) (Werzberger *et al.*, 1992).

Nos países de alta endemicidade, programas de vacinação em larga escala contra a hepatite A não são recomendados, visto que a infecção é assintomática em crianças menores de 5 anos de idade e gera imunidade de longa duração. Em países de endemicidade intermediária onde uma proporção relativamente grande da população adulta é suscetível ao HAV, e onde a hepatite A representa um ônus significativo em saúde pública, a OMS recomenda que a vacinação infantil em larga escala possa ser considerada como um complemento à educação em saúde e ao saneamento básico. Em regiões de baixa endemicidade, a vacinação é indicada para indivíduos com maior risco de infecção, como os viajantes para áreas de endemicidade alta ou intermediária. (Vaughan *et al.*, 2013).

O Programa Nacional de Imunizações (PNI) ampliou o Calendário Nacional de Vacinação em 2014, com a introdução da vacina inativada para hepatite A segundo a PORTARIA Nº 2, DE 18 DE JANEIRO DE 2013. O Ministério da Saúde introduziu o esquema vacinal com dose única no calendário nacional de vacinação para crianças a partir de 12 meses até menores de 2 anos (1 ano, 11 meses e 29 dias), que começou a ser disponibilizada em janeiro de 2014 (Ministério da Saúde, 2013).

A mesma estratégia de dose única também foi adotada na Argentina em junho de 2005. Essa estratégia de dose única foi escolhida com base na elevada resposta imunológica que pode ser alcançada nos indivíduos vacinados em 4-6 semanas após a primeira dose; a proteção de longa duração induzida pela resposta de memória imunológica e, por último, a expectativa de que, esta estratégia interromperia a transmissão, não só em crianças, mas em outras faixas etárias, devido a proteção de rebanho que tem sido documentada em outros países, além da Argentina (Vizzotti *et al.*, 2015).

As vacinas inativadas para hepatite A provaram estar entre as mais imunogênicas, seguras e bem toleradas. Todas são semelhantes em termos de proteção contra o vírus e seus efeitos colaterais. Aproximadamente 100% das pessoas desenvolvem níveis protetores de anticorpos contra o vírus no prazo de um mês após uma única dose da vacina (Ministério da Saúde, 2013). A vacina é apresentada em cartuchos com 1 ou 10 frascos-ampolas contendo em cada frasco-ampola uma dose de 25 U/0,5 mL para uso em crianças (**Figura 1.9**).

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

**Figura 1.9.** Forma farmacêutica, apresentação e composição da vacina contra hepatite A. Fonte: Ministério da Saúde, 2013.

A análise de custo-efetividade de diferentes estratégias de vacinação nos Estados Unidos revelou que a triagem para IgG anti-HAV foi menos dispendiosa do que a vacinação, quando a prevalência de anti-HAV IgG excedeu 35% e o custo do teste sorológico foi menor que 25 dolares (~ R\$100,00) (Saab *et al.*, 2000). Até o momento, não há nenhum estudo sobre custo-efetividade da vacinação no Brasil. Recomenda-se a aplicação da vacina a grupos de risco, segundo os critérios do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde (2005), 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.

### 1.10. Diagnóstico laboratorial da hepatite A

O diagnóstico bioquímico das hepatites virais é estabelecido por testes de função hepática, principalmente pelos níveis séricos de enzimas hepáticas intracelulares alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (AST) que são marcadores de agressão

hepatocelular, e pela determinação dos níveis séricos de bilirrubina. Apesar de serem indicadores sensíveis do dano do parênquima hepático, o diagnóstico clínico e bioquímico não são específicos para diferenciar o tipo de hepatite. Os exames específicos para o diagnóstico do tipo de infecção são os sorológicos e os de biologia molecular (Cuthbert *et al.*, 2001; Brasil, 2005).

O HAV pode ser mantido em vários tipos de células de origem humana e não-humana, incluindo células primárias e secundárias de rim de macaco verde Africano (Daemer *et al.*, 1981) e células de rim de macacos *Rhesus* (FRhK-4) (Flehmig, 1980). Diferentemente da maioria dos picornavírus, o HAV de origem humana requer um longo período de adaptação antes de crescer em cultura de células, e uma vez adaptado, produz uma infecção persistente e se tornam atenuados (Feinstone *et al.*, 1983). O HAV replica em cultura celular sem sinais citopáticos de infecção, fato que determina a utilização de testes imunológicos ou moleculares para detectar o vírus em cultura (Siegl *et al.*, 1984).

A resposta imune humoral tem o papel importante no diagnóstico da infecção pelo HAV e na diferenciação da hepatite A a partir de outros tipos de hepatite viral. O diagnóstico sorológico para a hepatite A é feito através da presença de anticorpos imunoglobulina M (IgM), contra o HAV (anti-HAV IgM) que pode ser detectado no soro por um período de 10 a 16 semanas, com pico entre a quarta e sexta semana, confirmando a infecção recente pelo vírus. Os anticorpos IgG anti-HAV (anti-HAV IgG) aparecem logo depois de IgM, persistem durante anos após a infecção e conferem imunidade por toda a vida (Nainan *et al.*, 2006).

Nos testes sorológicos, a presença de anticorpos da classe IgM é fundamental para realizar o diagnóstico da infecção aguda (Cuthbert, 2001), composta principalmente de anticorpos contra proteínas do capsídeo. Diversos métodos têm sido utilizados para detectar as classes de anticorpos vírus-específicos, incluindo radioimunoensaio (Purcell *et al.*, 1976), ligação imunoquímica (Huang *et al.*, 1979), ensaio imunoenzimático (EIA) (Delem, 1992), imunoblotting (Wang *et al.*, 1996) e teste rápido (Lee *et al.*, 2010). 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. (Stapleton, 1995). O ELISA IgM anti-HAV é disponível comercialmente (Poddar *et al.*, 2002).

Infecções prévias pelo HAV já resolvidas ou mesmo contato do hospedeiro com o vírus são diagnosticadas pela presença de IgG anti-HAV no soro. No entanto, testes comerciais competitivos detectam anticorpos totais (anticorpos IgG e IgM) circulantes. A associação da presença de anticorpos anti-HAV totais e a ausência de anticorpos IgM anti-HAV pode ser usada para diferenciar uma infecção passada de uma infecção recente (Nainan *et al.*, 2006). A detecção de anticorpos IgG anti-HAV também é bastante utilizada em estudos de prevalência da infecção pelo HAV na população (De Paula, 2012).

O diagnóstico através da amplificação do material genético 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), e tem um papel importante no diagnóstico precoce da infecção, visto que o RNA viral está presente no sangue antes do início das elevações das enzimas hepáticas e do aparecimento dos anticorpos para o HAV. A detecção do HAV RNA também pode ser útil para elucidar casos de hepatite aguda de etiologia desconhecida (Amado *et al.*, 2008; De Paula, 2012). Embora a carga viral do HAV seja mais elevada em amostras de fezes, a detecção, quantificação e genotipagem do RNA viral são realizadas principalmente em amostras de soro, devido à presença de inibidores nas fezes que podem interferir na detecção do material genético do vírus, tais como os sais biliares, produtos de degradação da hemoglobina e polissacarídeos complexos que podem interferir com o sistema enzimático utilizado para amplificação (De Paula, 2012).

O diagnóstico molecular pode basear-se na amplificação da região 5' não codificante (5'NC), e nas regiões VP1, VP3 ou VP1/2A. A região 5'NC é a região mais conservada do vírus e é utilizada para detecção do genoma do HAV, enquanto que as regiões da VP1, VP3 e VP1/2A são usadas para detecção do RNA viral e para o estudo da variabilidade genética. Para confirmar o diagnóstico, é recomendado a amplificação de mais de uma região do genoma (Costa-Mattioli *et al.*, 2002a; De Paula *et al.*, 2002; De Paula, 2012).

Mais recentemente, a PCR em tempo real vem sendo utilizada para detecção e quantificação do HAV em amostras biológicas e ambientais. Este método melhora a precisão e sensibilidade da PCR tradicional, por adição de uma sonda marcada com fluorescência de modo que o gene alvo possa ser detectado e quantificado sem verificação subsequente. Entre

as várias estratégias de PCR quantitativos disponíveis, aqueles com base na monitorização em tempo real da reação de amplificação são os mais precisos (Villar *et al.*, 2007). As reações de amplificação por PCR em tempo real para o HAV são baseadas na amplificação de um fragmento altamente conservado da região 5' NC do genoma e podem ser utilizadas para quantificar o RNA viral no soro, saliva, fezes, águas ambientais e cultura de células (De Paula *et al.*, 2007).

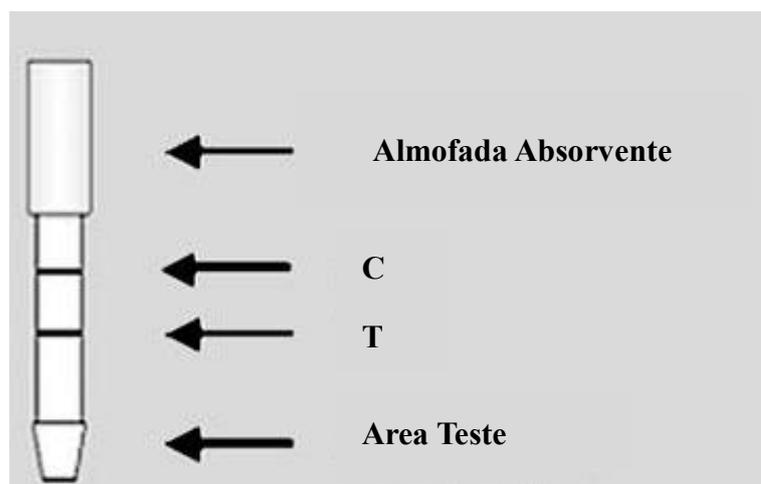
A PCR em tempo real permite o estudo da carga viral e o conhecimento dos acontecimentos durante a infecção, especialmente sobre a duração da viremia e a detecção de HAV em fluido oral, amostras de fezes e soro por um período muito mais longo do que o inicialmente descrito para outras metodologias. A detecção do intermediário replicativo (cadeia negativa) do HAV por PCR em tempo real é útil para monitorizar a replicação viral *in vitro* e *in vivo* (Costa-Mattioli *et al.*, 2002b; De Paula, 2012).

A técnica de sequenciamento de ácidos nucleicos pode ser realizada para confirmar a especificidade da PCR, para identificar e genotipar o vírus. O sequenciamento de ácidos nucleicos de regiões selecionadas do genoma do HAV, como a região VP1/2A e a região VP1 completa, também tem sido utilizado para determinar relações genética entre os isolados (De Paula *et al.*, 2004a; Nainan *et al.*, 2006; Toyoda *et al.*, 2009).

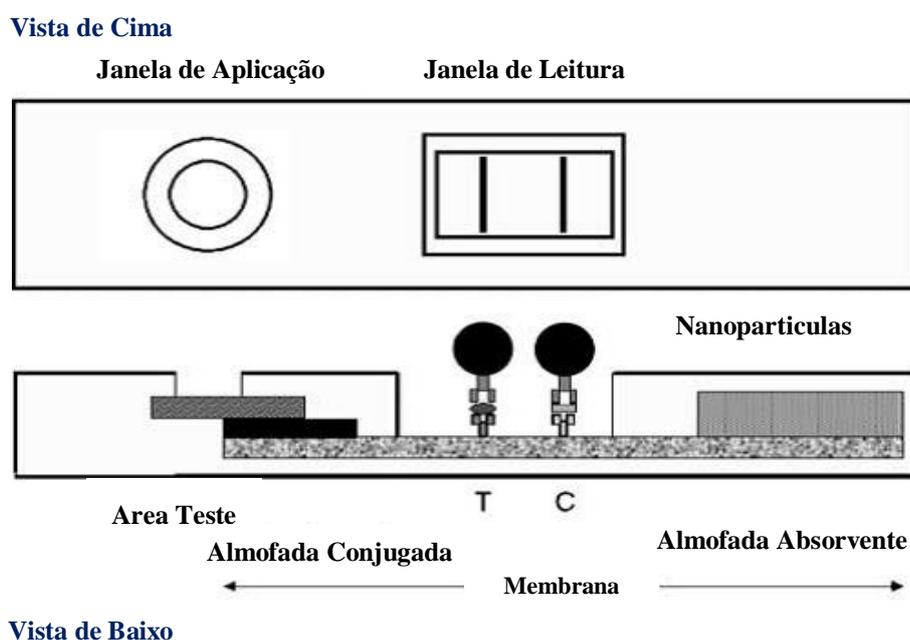
### **1.10.1. Imunocromatografia**

Os testes imunocromatográficos ou testes rápidos, também chamados de ensaios de fluxo lateral ou ensaios de fita, são utilizados para análises qualitativas e semi-qualitativas na detecção de diferentes patógenos e substâncias como hormônios e pesticidas (Van *et al.*, 1993; Chiao *et al.*, 2004).

Geralmente, os testes rápidos apresentam metodologia simples, utilizando antígenos virais fixados em um suporte sólido (membranas de celulose ou *nylon*, látex, micropartículas ou cartelas plásticas) e são acondicionados em embalagens individualizadas, permitindo a testagem individual das amostras. Podem haver variações de formato dos testes imunocromatográficos, podendo ser de fluxo vertical (**Figura 1.10**), fluxo lateral (**Figura 1.11**), entre outros (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009).



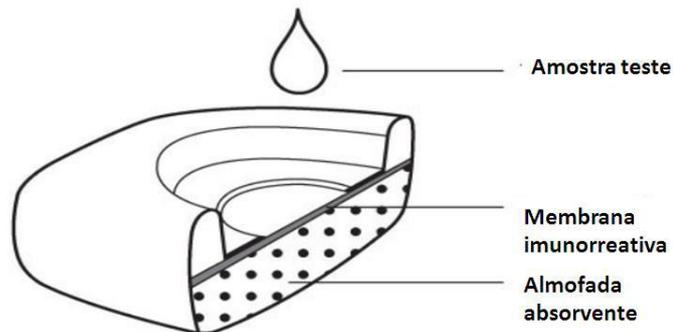
**Figura 1.10.** Esquema de imunocromatografia de fluxo vertical (Adaptado de Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009).



**Figura 1.11.** Esquema de imunocromatografia de fluxo lateral em formato de sanduíche (Adaptado de Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009).

No presente trabalho foi utilizado um ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral que consiste em uma membrana de nitrocelulose ou de nylon na qual estão imobilizados antígenos contra o HAV, uma membrana absorvente, que está sob a membrana de nitrocelulose e um conjugado que geralmente é composto de ouro coloidal ligado a anticorpos anti-HAV

(imunoglobulinas) (**Figura 1.12**). Quando a amostra e a solução tampão são colocados no local indicado na membrana, os anticorpos da amostra fluem lateralmente pela membrana, onde se inicia a ligação com o conjugado, e prosseguem em direção à área de teste (T). Na área T, o complexo anticorpo-conjugado se liga aos antígenos do vírus, formando uma linha (ou banda) colorida (Chan, 2003).



**Figura 1.12.** Esquematização do corte lateral do ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral (Chan, 2003).

## II. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Mundialmente, a infecção pelo HAV é a forma mais comum de hepatite aguda (Martin e Lemon, 2006). A falência hepática fulminante é uma complicação causada por este vírus, e embora rara ocorrendo com frequência, de 0,5% a 1% dos casos, apresenta uma taxa de mortalidade de até 80% dos casos não transplantados (O'grady *et al.*, 1993). No entanto, esta taxa vem aumentando devido a mudanças no perfil epidemiológico, principalmente em países em desenvolvimento, nos quais a doença vem se deslocando para idades mais avançadas aumentando o risco de morbidade e mortalidade (Weitz e Siegl, 1985; Tanaka, 2000).

No Brasil, a doença era altamente endêmica, porém, atualmente, devido às melhorias nas condições de saneamento básico e de programas de higiene e saúde, houve um aumento no número de indivíduos suscetíveis e, conseqüentemente, na ocorrência de surtos em uma faixa de idade que é preocupante, pois a doença tende a ser mais grave em idades mais elevadas. Sendo a vacina contra hepatite A introduzida no Brasil e disponibilizada apenas para crianças com menos de 2 anos, os adultos jovens continuariam suscetíveis à infecção, o que aumenta potencialmente o risco de surtos.

O diagnóstico rápido dos indivíduos infectados pode evitar a transmissão pessoa-pessoa e auxiliar nas medidas de prevenção e controle. Até o momento, apenas um ensaio imunocromatográfico (teste rápido) está disponível para detecção de anticorpos anti-HAV no Brasil. A avaliação deste teste rápido para o diagnóstico da hepatite A, bem como a análise do seu desempenho para a detecção dos anticorpos anti-HAV IgM e IgG tem grande importância na liberação rápida de resultados especialmente em surtos, detecção de pessoas que tiveram contato com pacientes infectados, além de estudos de prevalência em áreas remotas, em estudos de campo, em laboratórios pequenos e populações de risco. A simplicidade e rapidez de execução do teste possibilita ao usuário o imediato conhecimento de sua reatividade sorológica para o HAV, além disso os testes rápidos não necessitam de equipamento específico para sua realização e podem ser usados em locais remotos, onde a infra-estrutura para implantação de um laboratório não é possível, proporcionando o aumento do acesso a populações específicas que, de outra forma, teriam dificuldade ou mesmo, impossibilidade de realizar testes para o diagnóstico da infecção pelo HAV.

A detecção da infecção através de testes com alta sensibilidade e especificidade pode significar um diagnóstico mais precoce e preciso, melhorando o prognóstico da enfermidade. Deve-se citar também que um diagnóstico mais preciso pode tornar estudos epidemiológicos mais confiáveis e servirem de base para a confecção de programas de controle e erradicação de patologias mais eficazes.

Com base na mudança do perfil epidemiológico da hepatite A e na distribuição mundial da doença, novos ensaios rápidos e práticos devem ser desenvolvidos para facilitar o diagnóstico dessa patologia, evitando assim sua transmissão. Entretanto, essas novas tecnologias devem manter a qualidade (sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, valores preditivos). Nesse contexto, o presente trabalho visa avaliar o desempenho de um teste imunocromatográfico para diagnóstico da hepatite A e estudos de prevalência.

### **III.OBJETIVOS**

#### **3.1.Objetivo geral:**

Avaliar o desempenho de um ensaio imunocromatográfico (teste rápido) para o diagnóstico e estudo de prevalência da hepatite A em diferentes populações.

#### **3.2.Objetivos específicos:**

Confeccionar um painel de referência composto por amostras positivas e negativas para hepatite A caracterizadas frente a testes de diagnóstico disponíveis comercialmente (ELISA);

Avaliar parâmetros como reprodutibilidade, repetitividade, sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo de teste rápido para detecção de anti-HAV IgM e anti-HAV IgG em amostras de soro;

Avaliar o desempenho do teste rápido em amostras de soro provenientes de indivíduos doadores de sangue, surtos, casos esporádicos e indivíduos vacinados.

## **IV.METODOLOGIA**

### **4.1.Aspectos éticos da pesquisa**

O presente trabalho foi submetido à apreciação do comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Fiocruz (Plataforma Brasil) e aprovado, CAEE 06109812.4.0000.5248. Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para formalizar a participação como voluntários consensuais no projeto.

### **4.2.População de estudo**

Após a avaliação do desempenho do teste, 4 grupos com total de 329 amostras foram testadas para avaliar se o teste rápido pode substituir o ensaio imunoenzimático no diagnóstico da hepatite A. Todas as amostras foram testadas utilizando o teste rápido em comparação com os testes imunoenzimáticos de dois fabricantes diferentes (ETI-AB-HAVK PLUS (Diasorin, Itália) e Biokit (Biokit, S.A. Barcelona, Espanha).

O grupo I ( $n=96$ ) foi composto por amostras proveniente de doadores de sangue. O grupo II ( $n= 46$ ) foi composto de amostras de pacientes vacinados para hepatite A apenas com uma única dose da vacina. O grupo III ( $n=103$ ) foi composto por amostras provenientes de surtos de hepatite A que ocorreram no Rio de Janeiro. O grupo IV ( $n=97$ ) foi composto de amostras de casos esporádicos de pacientes acompanhados rotineiramente no Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais/ IOC-Fiocruz.

### **4.3.Critérios de inclusão e exclusão**

Foram avaliadas somente as amostras que apresentaram dados referentes às variáveis sexo (Feminino/Masculino) e idade, que foram adquiridos após o consentimento dos indivíduos participantes do estudo por meio de questionários realizados durante a coleta das amostras. As amostras de pacientes co-infectados com hepatite B, C ou E foram excluídas do estudo.

#### **4.4. Coleta das Amostras**

Foram coletadas por punção venosa 5mL de sangue periférico de cada indivíduo em tubos tipo vacutainer (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) para a obtenção das amostras de soro. Após centrifugação a 3.500rpm por 5 minutos, o plasma foi separado e congelado a -20° C.

#### **4.5. Marcadores sorológicos e dados clínicos**

Todas as amostras foram testadas para os marcadores anti-HAV IgM (DiaSorin, EUA), HBsAg (Biomerieux, França), anti-HBc IgM (BioKit, Spain), anti-HBc (BioKit, Spain), anti-HCV (DiaSorin, Italian) e anti-HEV (BioKit, Spain), como triagem para exclusão e inclusão de amostras no estudo. Os casos de co-infecção com outros agentes de etiologia viral foram descartados do estudo.

#### **4.6. Confecção do painel de referência com amostras com sorologia confirmada para Hepatite A**

Para a confecção do painel de referência do teste rápido foram utilizadas 20 amostras com sorologia positiva para hepatite A (anti-HAV IgM e IgG reagentes), todas as amostras foram testadas por testes imunoenzimáticos (ELISA), sendo as amostras IgG reagentes testadas em 2 diferentes testes imunoenzimáticos (DiaSorin, EUA e BioKit, Spain), e apenas as amostras concordantes em ambos os testes foram incluídas nos resultados. Os testes rápidos foram realizados de acordo com as instruções descritas acima.

#### **4.7. Ensaios Imunoenzimáticos (EIE)**

##### 4.7.1. Detecção de anti-HAV total por ensaio imunoenzimático (ELISA)

As amostras de soro de todos os grupos foram submetidas à testes imunoenzimáticos comerciais para anticorpos anti-HAV totais, utilizando os *kits* comerciais ETI-AB-HAVK

PLUS (Diasorin, Itália) e Biokit (Biokit, S.A. Barcelona, Espanha). Estes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.7.1.1. Detecção de anti-HAV total por ensaio imunoenzimático ELISA ETI-AB-HAVK PLUS (Diasorin, Itália)

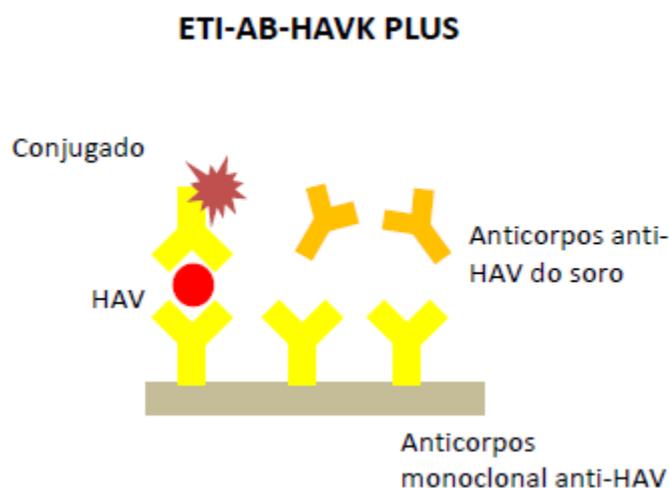
- Princípio do teste:

Este é um teste competitivo para a determinação de anticorpos contra o vírus da hepatite A, baseado na competição entre o anti-HAV presente na amostra e anticorpos monoclonais anti-HAV de camundongo conjugados com peroxidase sensibilizados em uma placa de poliestireno de 96 poços (**Figura 4.1**).

- Procedimento do teste:

Inicialmente, foram aplicados à placa 50 µL do tampão de incubação (contendo IgG murina não-específica) disponibilizado pelo conjunto de reagentes. Esta solução foi aplicada em todos os poços da placa com exceção do poço destinado ao branco. Posteriormente, foram adicionados 50 µL do calibrador (IgG anti-HAV humana + soro fetal bovino) em triplicata e 50 µL do controle positivo e negativo do teste. As amostras a serem testadas foram adicionadas em seus respectivos poços em volume de 50 µL. Em seguida, 50 µL da solução de neutralização (HAV humano inativado + soro/plasma humano não reativo para anti-HAV + albumina sérica bovina-BSA) disponibilizado pelo conjunto de reagentes foram adicionados em cada orifício da placa com exceção do poço correspondente ao branco. A reação foi incubada por duas horas a 37°C. Após a incubação, a placa foi lavada cinco vezes com 300 µL do tampão de lavagem (tampão PBS + Tween®20) diluído em 1:25 em água destilada. Foram adicionados a todos os poços da placa (com exceção do branco) 100 µL do conjugado enzimático (anticorpos monoclonais anti-HAV de camundongo conjugado com *horseradish*-peroxidase (HRP) + BSA) diluído em 1:50 no diluente do conjugado (soro/plasma humano não reativo para anticorpos anti-HAV + soro fetal bovino) disponibilizado pelo teste. A placa foi incubada por uma hora a 37°C. Após a incubação, a reação foi novamente lavada por cinco vezes com 300 µL do tampão de lavagem. Em cada orifício foram dispensados 100 µL do cromógeno/substrato (tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio) em todos os poços da placa e, em seguida, a reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente

(25°C). Para que a reação da enzima sobre o substrato fosse interrompida, 100 µL da solução de parada (solução de ácido sulfúrico a 0,4 N) foram aplicadas a cada poço da placa. Em seguida, foi realizada a mensuração da absorbância da solução contida em cada poço em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 450 nm. Após o cálculo da média do calibrador e do ponto de corte, a presença ou ausência de anti-HAV total foi determinada em cada amostra por comparação dos valores de absorbância da amostra com o valor de ponto de corte. O valor do ponto de corte foi calculado de acordo com a fórmula: ponto de corte =  $Calx$ , sendo  $Calx$  a média dos calibradores. As amostras desconhecidas com os valores de absorção abaixo do ponto de corte foram consideradas reativas para os anticorpos anti-HAV. As amostras desconhecidas com os valores de absorção acima do ponto de corte foram consideradas não reativas.



**Figura 4.1.** Esquema do princípio do conjunto de reagentes ETI-AB-HAVK PLUS (DiaSorin, Itália) para anti-HAV total.

#### 4.7.1.2. Detecção de anti-HAV total por ensaio imunoenzimático ELISA Biokit (Biokit, S.A. Barcelona, Espanha)

- Princípio do teste:

Este é um teste competitivo para a determinação de anticorpos contra o vírus da hepatite A, o ensaio é baseado na competição entre os anticorpos anti-HAV presentes na amostra e anticorpos monoclonais anti-HAV conjugados com peroxidase, quando são incubados

simultaneamente na microplaca recoberta com HAV. Após a incubação, lava-se para eliminar o material não fixado e em seguida adiciona-se uma solução de substrato enzimático e cromógeno. Esta solução desenvolverá uma cor azul quando a amostra for negativa. A cor azul passará a amarelo depois do bloqueio da reação com ácido sulfúrico. A presença de anti-HAV na amostra reduz o desenvolvimento de cor de forma proporcional a sua concentração.

- Procedimento do teste:

Primeiramente, foram reservados 6 poços para o branco e controles negativos e positivos, após foi transferido 10 µL de cada amostra e de cada controle aos poços correspondentes. Foram adicionados 100 µL de conjugado (anti-HAV monoclonal de camundongo conjugado com peroxidase) a todos os poços da placa, com exceção do branco. Todos os componentes foram incubados por uma hora a 37°C. Após a incubação, todos os poços foram lavados seis vezes com 350 µL do tampão de lavagem (Tampão de fosfato concentrado 10X + Tween®20) por poço diluído 1:10 em água destilada. Foram adicionados 100 µL do cromógeno/substrato (TMB + peróxido de hidrogênio) em todos os poços incluindo o branco e, em seguida, a reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Foram distribuídos em todos os poços da placa 100 µL da solução de bloqueio (solução de ácido sulfúrico a 1 N) e em seguida, realizou-se a mensuração da absorbância da solução contida em cada poço em espectrofotômetro em comprimento de 450 nm. Após o cálculo da média do calibrador e do ponto de corte, a presença ou ausência de anticorpos anti-HAV totais da amostra foi determinada por comparação dos valores de absorbância da amostra com o valor do ponto de corte de cada teste. O valor do ponto de corte foi calculado de acordo com a fórmula: ponto de corte =  $(CN_x + CP_x)/2$ , onde  $CN_x$  é a média dos controles negativos e  $CP_x$  a média dos controles positivos. Após dividir a absorbância da amostra pelo valor do ponto de corte, os resultados são interpretados como, amostras positivas: relação absorbância/ponto de corte  $\leq 1,0$  e negativas: relação absorbância/ponto de corte  $> 1,1$ .

#### 4.7.2. Detecção de anti-HAV IgM por ensaio imunoenzimático (EIE)

As amostras de soro foram submetidas à testes imunoenzimáticos comerciais (ELISA) da marca Biokit (Biokit, S.A. Barcelona, Espanha) para pesquisa de anticorpos anti-HAV IgM.

- Princípio do teste:

Este é um teste qualitativo de captura para detecção de anticorpos IgM específicos para o vírus da hepatite A no soro, portanto é indicado para a detecção de infecção aguda ou recente. O ensaio utilizado foi o imunoenzimático de captura de anticorpos, que utiliza uma placa de poliestireno de 96 poços previamente sensibilizada com anticorpos monoclonais de coelho anti-IgM humana.

- Procedimento do teste:

Primeiramente, todas as amostras foram diluídas 1:200 de acordo com as instruções do fabricante. Após, foram reservados 6 poços para aplicação do branco e dos controles e nos poços restantes foram aplicados 100 µL do diluente da amostra e em seguida 5 µL de cada amostra pré-diluída como descrito anteriormente. Foram distribuídos à placa 100 µL do controle positivo em 2 poços e 100 µL do controle negativo em 3 poços, ambos fornecido pelo fabricante. Todos os componentes foram incubados por duas horas a 37°C. Após a incubação, cada poço foi lavado cinco vezes com 350 µL do tampão de lavagem (Tampão de fosfato concentrado 10X + Tween®20) diluído em 1:10 em água destilada. Foram adicionados a todos os poços da placa (com exceção do branco) 100 µL do conjugado enzimático (anticorpos humanos anti-HAV + peroxidase). Em seguida, foram adicionados 50 µL do vírus da hepatite A em cada poço, exceto no branco. A reação foi incubada por uma hora a 37°C. Após a incubação, a placa foi novamente lavada por cinco vezes com 300 µL do tampão de lavagem. Por orifício foram adicionados 100 µL do cromógeno/substrato (TMB + peróxido de hidrogênio) em todos os poços incluindo o branco e, em seguida, a reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Foram distribuídos em cada poço da placa 100 µL da solução de bloqueio (solução de ácido sulfúrico a 1 N) e em seguida, foi feita a mensuração da absorbância da solução contida em cada poço em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Após o cálculo da média do calibrador e do ponto de corte, a presença ou ausência de anti-HAV IgM da amostra foi determinada por comparação dos valores de absorbância da amostra com o valor do ponto de corte de cada teste. O valor do ponto de corte foi calculado de acordo com a fórmula:  $\text{ponto de corte} = \text{CNx} + (\text{CPx}/4)$ , onde CNx é a média dos controles negativos e CPx a média dos controles positivos. Após dividir a absorbância da amostra pelo valor do ponto de corte, os resultados são interpretados como,

amostras positivas: relação absorvância/ponto de corte  $\geq 1,0$  e negativas: relação absorvância/ponto de corte  $< 0,9$ .

#### **4.8. Ensaio imunocromatográfico (teste rápido)**

No presente trabalho foi utilizado o Teste Rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM (*Standard Diagnostics*, Coreia) sob registro da ANVISA 803130400.84, com sensibilidade e especificidade de 97,6% e 98,8%, respectivamente, para detecção de IgM anti-HAV, segundo informações do fabricante. Este é um ensaio imunocromatográfico de fase sólida para a detecção rápida, qualitativa e diferencial de anticorpos IgG e IgM para o vírus da hepatite A no soro ou plasma humano.

O ensaio utiliza antígenos virais fixados em um suporte sólido que se ligam aos anticorpos específicos encontrados no soro. Cada dispositivo de teste possui como componentes, ouro conjugado (como componente principal): anticorpos monoclonais anti-HAV de camundongo conjugado com ouro coloidal ( $1 \pm 0,2 \mu\text{g}$ ), na linha Test "G" (como componente principal): anticorpos monoclonais IgG anti-humano de camundongo ( $4 \pm 0,8 \mu\text{g}$ ), na linha de teste "M" (como componente principal): anticorpos monoclonais IgM anti-humano de camundongo ( $4 \pm 0,8 \mu\text{g}$ ), e na Linha Controle (como componente principal): anticorpos anti-IgG de camundongo produzidos em cabras ( $8 \pm 1,6 \mu\text{g}$ ). O tampão de ensaio inclui 100 mM de tampão de fosfato, Tween 20 (0,1%) e azida de sódio (0,01%).

O dispositivo de teste SD Bioline HAV IgG/IgM possui 3 linhas pré-revestidas, "G" (HAV linha de teste de IgG), "M" (HAV linha de teste de IgM) e "C" (linha controle) sobre a superfície da membrana. Todas as três linhas na janela de resultados não são visíveis antes da aplicação da amostra. A "Linha Controle" é usado para controle de procedimento. A linha de controle deve sempre aparecer se o procedimento do teste for realizado adequadamente e para garantir que os reagentes estão funcionando. Linhas roxas "G" e "M" são visíveis na janela de resultados, se houver anticorpos IgG e/ou IgM suficientes para vírus da hepatite A na amostra. Se os anticorpos de IgG e/ou IgM para o vírus da hepatite A não estiverem presente na amostra, não ocorre a presença de cor em "G" e/ou "M".

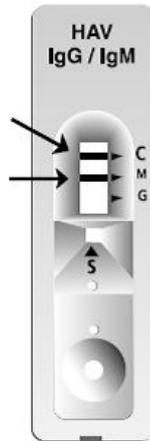
Para a realização do método, 5µL de cada amostra de soro foi aplicada ao poço de reação, seguindo-se a adição de 4 gotas do tampão de corrida que permite o fluxo lateral dos componentes liberados, propiciando a ligação dos anticorpos aos antígenos. Quando presentes, os anticorpos se unem às proteínas específicas conjugadas ao ouro coloidal e o complexo migra através da membrana, sendo capturado pelos antígenos fixados na área do teste, produzindo uma linha roxo/rosa. A amostra migra através da membrana por capilaridade produzindo uma segunda linha roxo/rosa na área de controle. Esta linha, que aparece tanto nas amostras negativas quanto nas positivas é o controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste. As reações foram desenvolvidas à temperatura ambiente (25°C) e os resultados foram lidos após três tempos diferentes de 10, 20 e 40 minutos após a adição do tampão.

Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxo/rosa na área Controle (C) e nenhuma linha nas áreas “M” ou “G” (**Figura 4.2**).



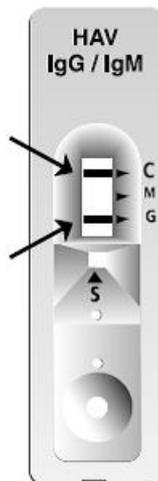
**Figura 4.2.** Resultado não reagente.

A detecção de duas linhas roxo/rosa, uma na área Controle (C) e outra área Teste "M" (HAV linha de teste de IgM) indica um resultado reagente para hepatite A aguda (**Figura 4.3**).



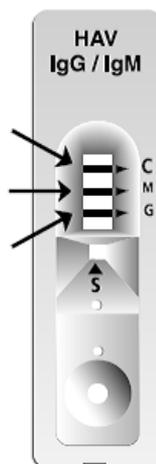
**Figura 4.3.** Resultado reagente para hepatite A aguda.

A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área Controle (C) e outra área Teste "G" (HAV linha de teste de IgG) indica um resultado reagente para infecção passada por hepatite A. (**Figura 4.4**).



**Figura 4.4.** Resultado reagente para infecção passada por hepatite A.

A detecção de três linhas roxa/rosa, uma na área Controle (C), uma na área Teste "M" (HAV IgM linha de teste) e outra área Teste "G" (HAV IgG linha de teste) indica uma infecção aguda e infecção passada por hepatite A (**Figura 4.5**).



**Figura 4.5.** Resultado reagente para infecção aguda e infecção passada por hepatite A.

Em todos os testes a intensidade da linha na área Teste (T) varia de claro a muito escura conforme a concentração de anticorpos específicos. Segundo as especificações do fabricante a linha na área Teste (T) pode ter aparência diferente da linha na área Controle (C), isto não invalida o teste.

#### **4.9. Detecção do RNA viral**

As amostras dos grupos III e IV foram submetidas a testes moleculares para a detecção do HAV RNA. Foram amplificadas a região VP1/2A do vírus. Para tal, foi necessária a extração do material genético do vírus, a transcrição reversa do RNA para DNA e a amplificação do material genético.

##### 4.9.1.Extração do RNA viral em amostras de soro (Kit Qiamp viral RNA mini, Qiagen)

O processo de extração do RNA viral foi realizado utilizando um conjunto de reagentes comercial da QIAMP RNA viral Mini Kit (Qiagen, Courbaeuf, França). Para a extração do RNA viral, 140  $\mu$ L de cada amostra foram adicionados em tubos de 1,5 mL devidamente identificados. Posteriormente, adicionou-se 500  $\mu$ L de tampão de lise com o Carrier RNA. As amostras foram, então, homogeneizadas e mantidas por 10 minutos a temperatura ambiente (25°C). Em seguida, as amostras foram brevemente centrifugadas e foram adicionados 560  $\mu$ L de etanol a 96% aos tubos. Foi transferido, após homogeneização e

centrifugação, 630 µL desta solução para a coluna do kit e submetida à centrifugação a 8.000rpm por 1 minuto a 4°C. Após a centrifugação, os tubos coletores da coluna foram descartados e novos tubos foram recolocados. O restante da solução inicial foi adicionado a coluna e os tubos foram, novamente, centrifugados a 8.000rpmXg por 1 minuto a 4°C. Em seguida, foram aplicados 500 µL solução de lavagem AW1 a cada coluna e posteriormente foram centrifugadas a 8.000rpmXg por 1 minuto. O mesmo passo foi feito com o tampão de lavagem AW2 e as amostras foram centrifugadas a 14.000rpmXg por 3 minutos. As colunas foram transferidas para um novo tubo de eluição e foram adicionados 60 µL de tampão AVE para eluir o RNA. As colunas foram, então, submetidas a centrifugação a 8.000rpmXg por 1 minuto. A coluna foi removida e descartada. O RNA foi armazenado a -20°C.

#### 4.9.2.Síntese do DNA complementar (cDNA)

Após a extração do RNA viral foi preparada a reação para a síntese do DNA complementar (cDNA). Para cada amostra (RNA viral) foi identificado um tubo de 0,5 mL, no qual seria conduzida a reação de transcrição reversa. Para a confecção da mistura da reação foram acrescentados a cada tubo: 1,0 µL de dNTP a 1,25 mM (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) (Invitrogen, CA, EUA); 4,0 µL do tampão de reação da enzima 5x SUPER SCRIPT III (Invitrogen, CA, EUA); 2,0 µL de oligonucleotídeos randômicos (*random primers*) a 20 pmol/µL (Invitrogen, CA, EUA); 0,5 µL de RNAsin (inibidor de RNA) a 20 U/µL (Invitrogen, CA, EUA); 1,5 µL de água livre de proteases DNA/RNA e 1 µL da enzima SUPER SCRIPT III a 200 U/µL (Invitrogen, Escócia). Após o preparo desta mistura, 10 µL de RNA viral foram adicionados a seus respectivos tubos de reação. A reação foi incubada no a 50°C por 1 hora e, em seguida, a 70°C durante 20 minutos para inativação da enzima. No fim da reação o material foi armazenado a -20°C.

#### 4.9.3.PCR qualitativo (Reação em cadeia da polimerase)

##### 4.9.3.1.Amplificação da região VP1/2A do RNA do HAV

O fragmento da VP1/2A do HAV foi amplificado a partir de duas reações de PCR como descrito por De Paula e colaboradores (2002). A primeira reação foi realizada utilizando

o oligonucleotídeo sense “F6” e o anti-sense “F7” e na segunda reação (*nested*-PCR) foram utilizados os oligonucleotídeos sense “F8” e anti-sense “F9” (**Tabela 4.1**).

Para a primeira reação, foi identificado um tubo de 0,5 mL para cada amostra de cDNA. Em cada tubo foram adicionados: 4,0 µL de dNTP a 1,25 mM (Invitrogen, CA, EUA); 5 µL do tampão de reação 5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega, WI, EUA); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (Promega, WI, EUA); 1,0 µL do oligonucleotídeo sense “F6” a 10 pmol/µL (Invitrogen, CA, EUA); 1,0 µL do oligonucleotídeo anti-sense “F7” a 10 pmol/µL (Invitrogen, CA, EUA); 7 µL de água livre de proteases DNA/RNA e 0,5 µL da enzima GoTaq® Hot Start Polymerase a 5 U/µL (Promega, WI, EUA). Após a confecção da mistura da reação foram adicionados a cada tubo 5 µL do cDNA correspondente. A reação foi submetida à desnaturação inicial do cDNA a 94°C por 4 minutos e 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 40 °C para que ocorresse a hibridização dos oligonucleotídeos, 1 minuto a 72°C para extensão, seguido de um ciclo de 7 minutos a 72°C para a extensão final.

Na segunda reação de PCR (*nested*-PCR) foi utilizado um novo tubo de 0,5 mL para cada amostra. Foram adicionados em cada tubo de reação: 4µL de dNTP a 1,25 mM (Invitrogen, CA, EUA); 5 µL do tampão de reação 5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega, WI, EUA); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (Promega, WI, EUA); 1,0 µL do oligonucleotídeo sense “F8” a 10 pmol/µL (Invitrogen, CA, EUA); 1,0 µL do oligonucleotídeo anti-sense “F9” a 10 pmol/µL (Invitrogen, CA, EUA); 11 µL de água livre de proteases DNA/RNA e 0,5 µL da enzima GoTaq® Hot Start Polymerase a 5 U/µL (Promega, WI, EUA). A cada tubo de reação foram adicionados 2 µL do produto correspondente da primeira reação da PCR. A segunda reação foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos e 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C para que ocorresse a hibridização dos oligonucleotídeos e 1 minuto a 72°C para extensão, seguido de um ciclo de 7 minutos a 72°C para a extensão final.

Para confirmar a amplificação, o produto da segunda reação de PCR (*nested*) foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% de agarose com 0,5% de brometo de etídio). Em cada orifício do gel foram aplicados 8,0 µL do produto da segunda reação de PCR acrescidos de 2,0 µL de tampão da amostra comercial 6x Blue/Orange Loading Dye (Promega, WI, EUA). Um orifício do gel foi reservado para aplicação de 8 µL padrão de peso

molecular 100 bp DNA Ladder (10x diluído em tampão de amostra) (Invitrogen, CA, EUA). Após aproximadamente 45 minutos de corrida a 85 volts, o produto amplificado foi submetido à luz ultravioleta na presença de brometo de etídeo para a visualização das bandas de DNA de 243 pares de bases. Em seguida, o produto da segunda reação da PCR foi armazenado à -20°C.

**Tabela 4.1.** Descrição das sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região VP1/2A do genoma do HAV (De Paula *et al.*, 2002)

Oligonucleotídeo	Posição no genoma	Sequência
F6	2897	CTATTCAGATTGCAAAATTAYAAT
F7	3288	AAYTTCATYATTTTCATGCTCCT
F8	2949	TATTTGTCTGTYACAGAACAATCAG
F9	3192	AGGRGGTGGAAGYACTTCATTTGA

#### **4.10. Avaliação da reprodutibilidade e repetitividade do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM (Standard Diagnostics, Coreia)**

A repetitividade e reprodutibilidade foram verificadas através da utilização de amostras com sorologia positiva para hepatite A, cinco amostras IgM positivas e cinco amostras IgG positivas. Foram utilizadas amostras de uma mesma alíquota testadas em três dias consecutivos para avaliar a reprodutibilidade e em triplicata para avaliar a repetitividade, ambas observadas por um único operador. Todas as reações desenvolveram-se à temperatura ambiente e os resultados foram lidos após três tempos diferentes de 10, 20 e 40 minutos após a adição do tampão.

#### **4.11. Avaliação do limite de detecção do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM (Standard Diagnostics, Coreia)**

Para determinar o limite de detecção do ensaio imunocromatográfico foram utilizadas amostras com sorologia positiva para hepatite A, cinco amostras IgM positivas e cinco

amostras IgG positivas. As amostras foram diluídas de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  e testadas através do teste rápido em comparação com o ensaio imunoenzimático (ELISA) que é o padrão ouro para o diagnóstico da hepatite A. Todas as reações para o teste rápido desenvolveram-se à temperatura ambiente de 25°C e os resultados foram lidos após três tempos diferentes de 10, 20 e 40 minutos após a adição do tampão.

#### **4.12. Avaliação da reatividade cruzada do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM (Standard Diagnostics, Coreia)**

Investigou-se a presença de outros agentes infecciosos poderia interferir nos resultados do teste rápido, para isso foram utilizadas 20 amostras (5 de cada) de pacientes com HBsAg (hepatite B), anti-HCV (hepatite C), anti-dengue e anti-HIV positivas. Os resultados dos testes rápidos foram realizados de acordo com as instruções descritas acima.

#### **4.13. Avaliação do teste rápido para detectar resposta vacinal**

O grupo II foi utilizado para avaliação da detecção da resposta vacinal, foram utilizadas 46 amostras de soro de indivíduos soronegativos para anti-HAV em teste imunoenzimático comercial para pesquisa inicial do marcador IgG realizado após coleta de amostra clínica. Foram excluídos deste teste indivíduos soropositivos para anti-HAV IgG ou que tinham história de vacinação contra hepatite A. As amostras obtidas foram acompanhadas durante 3 momentos: momento 0 (T0): (no momento da aplicação da 1ª dose da vacina – pré vacinal), momento 1 (T1): (no momento da aplicação da 2ª dose da vacina – 6 meses após 1ª dose), momento 2 (T2): (8 meses após a 2ª dose) e momento 3 (T3): (24 meses após a segunda dose). A análise das amostras foi feita no momento T1, 6 meses após 1ª dose da vacina contra hepatite A, uma vez que o esquema de dose única é o preconizado pelo PNI.

#### **4.14. Avaliação do desempenho do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM**

Apenas as amostras com perfil sorológico definido (anti-HAV reagente ou não reagente) foram incluídas na avaliação do desempenho dos testes. As amostras com sorologia indeterminada pelos dois testes de ELISA utilizados foram excluídas da presente análise.

Os resultados de cada teste rápido foram comparados com os resultados de testes de referência (ELISA). O desempenho do teste rápido foi avaliado com base nos seguintes parâmetros:

- Sensibilidade (Sens): proporção de todos os pacientes com a doença que apresentam resultados positivos quando o teste em particular é utilizado, sendo calculada através das seguinte fórmula:  $\text{Sensibilidade} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FN}$
- Especificidade (Esp): proporção de todos os indivíduos sem a doença que apresentam resultados negativos quando o teste em particular é utilizado, sendo calculada através das seguinte fórmula:  $\text{Especificidade} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FP}$
- Valores preditivos: precisão de um teste em prever uma doença, sendo dividido em valor preditivo positivo (VPP) calculado através das seguintes fórmula:  $\text{Valor Preditivo Positivo} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FP}$  e valor preditivo negativo (VPN) sendo calculado através das seguinte fórmula:  $\text{Valor Preditivo Negativo} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FN}$

Onde:

**VP** – Verdadeiramente Positivo

**VN** – Verdadeiramente Negativo

**FP** – Falso Positivo

**FN** – Falso Negativo

Para avaliar a concordância entre e os resultados apresentados pelo teste rápido com os resultados de testes de referência (EIA), procedemos à análise de tabelas de contingência e cálculo do índice Kappa, de acordo com Fleiss (1973) (**Tabela 4.2**).

**Tabela 4.2.** Valores de Kappa

Valor de Kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,40	Fraca
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Excelente
1	Perfeita

#### **4.15. Análise dos dados**

As informações clínicas, epidemiológicas, resultados dos testes sorológicos e dos testes rápidos foram incluídas em um banco de dados (Access 2000, Microsoft Inc., EUA) para análises posteriores. Para a avaliação de parâmetros relacionados ao desempenho do teste (sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo), foram utilizados os Programas MedCalc e GraphPad Prism 5.0.

## V.RESULTADOS

### 5.1. Painel de referência com amostras com sorologia confirmada para Hepatite A

Para avaliar o desempenho do teste rápido frente a amostras com sorologia confirmada para hepatite A foi feito um painel com 10 amostras anti-HAV IgM positivas e 10 amostras anti-HAV IgG positivas. Nenhuma das amostras, para ambos os marcadores demonstraram resultados positivos após 20 minutos, tempo preconizado pela bula do teste, apenas após 40 minutos foram obtidas 5 amostras (5/10) positivas para anti-HAV IgM e 5 amostras (5/10) positivas para anti-HAV IgG (Tabela 5.1 e 5.2).

**Tabela 5.1.** Painel de referência do teste rápido para detecção de Anti-HAV IgM em amostras com sorologia confirmada

Anti-HAV IgM						
Amostras	Resultados Elisa BioKit	DO	DO/CO	Resultados Teste Rápido		
				10'	20'	40'
1	1	1.638	3.592	0	0	1
2	1	2.504	5.491	0	0	1
3	1	2.375	5.208	0	0	1
4	1	2.694	5.907	0	0	0
5	1	2.662	5.837	0	0	0
6	1	2.663	5.839	0	0	0
7	1	2.630	5.767	0	0	0
8	1	2.210	4.846	0	0	0
9	1	2.581	5.660	0	0	1
10	1	2.529	5.546	0	0	1

**Tabela 5.2.** Painel de referência do teste rápido para detecção de Anti-HAV IgG em amostras com sorologia confirmada

Anti-HAV IgG								
Amostras	Resultados Elisa Diasorin	Resultados Elisa BioKit	DO	DO/CO	Resultados Teste Rápido			
					10'	20'	40'	
11	1	1	0.040	0.016	0	0	0	
12	1	1	0.037	0.014	0	0	0	
13	1	1	0.028	0.011	0	0	0	
14	1	1	0.029	0.011	0	0	0	
15	1	1	0.027	0.010	0	0	1	
16	1	1	0.029	0.011	0	0	1	
17	1	1	0.030	0.012	0	0	1	
18	1	1	0.031	0.012	0	0	0	
19	1	1	0.024	0.004	0	0	1	
20	1	1	0.019	0.007	0	0	1	

## 5.2. Epidemiologia descritiva das populações de estudo

Amostras ( $n= 342$ ) de indivíduos com diferentes perfis sorológicos para hepatite A foram avaliadas, esta população foi dividida em quatro grupos. O grupo I ( $n=96$ ) de amostras proveniente de doadores de sangue foi composto por indivíduos de ambos os sexos com idade entre 16 e 69 anos.

O grupo II ( $n= 46$ ) foi composto de amostras de indivíduos vacinados para hepatite A, sendo 21 (45,65%) do sexo masculino e 25 (54,34%) do sexo feminino, com média de idade de 20,71 (18,0 – 25,0 anos). O grupo III ( $n=103$ ) foi composto por amostras provenientes de surtos de hepatite A que ocorreram no Rio de Janeiro, sendo 43 (41,74%) do sexo masculino e 59 (57,28%) do sexo feminino, com média de idade de 31,21 anos (2,0 – 70,0 anos). O grupo IV ( $n=97$ ) foi composto de amostras de casos esporádicos provenientes do Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais/ IOC –Fiocruz, sendo 44 (45,36%) do sexo masculino e 53 (54,63%) do sexo feminino, com média de idade de 23,04 anos (1,0 – 37,0 anos).

## 5.3. Avaliação do estado sorológico (IgM e IgG anti-HAV) nos grupos estudados

Todas as amostras biológicas ( $n = 342$ ) foram testadas utilizando o teste rápido para averiguar a presença de anticorpos anti-HAV os resultados foram comparados com os resultados de três ensaios imunoenzimáticos (ELISA) diferentes. Para todos os grupos testados o teste t demonstrou um valor de  $p < 0.0001$ , indicando que os resultados foram significativos.

Para o grupo I (amostras de doadores de sangue) e o grupo II (amostras de indivíduos vacinados), foi testada a presença de anticorpos Anti-HAV IgG, segundo os resultados obtidos para o grupo I, 33,3% (32/96) foram reagentes para IgG anti-HAV com a utilização do teste rápido e 67,7% (65/96) foram reagentes para IgG anti-HAV com a utilização do EIE. Para o grupo II, 71,7% (33/46) das amostras foram positivas para IgG anti-HAV utilizando o EIA, neste grupo apenas as amostras que foram reagentes no EIE foram testadas com o teste rápido, dessas nenhuma (0/33) foi reagente.

Para o grupo III (amostras de surto) e IV (amostras de casos esporádicos), foi avaliada a presença de anticorpos Anti-HAV IgG e Anti-HAV IgM. Em relação a avaliação dos anticorpos Anti-HAV IgG, o grupo III obteve os seguintes resultados no teste rápido 60,1% (62/103) e no EIE 81,5% (84/103) e em relação a avaliação dos anticorpos Anti-HAV IgM, 45,6% (47/103) das amostras foram reagentes no teste rápido e 47,5% (49/103) das amostras foram reagentes no EIE.

Para o grupo IV, em relação a avaliação dos anticorpos Anti-HAV IgG, 61,8% (60/97) foram reagentes no teste rápido, e 75,2% (73/97) foram reagentes no EIE e em relação a avaliação dos anticorpos Anti-HAV IgM, 45,3% (44/97) das amostras foram reagentes no teste rápido, e 46,9% (46/97) foram reagentes no EIE (**Tabela 5.3**).

**Tabela 5.3.** Avaliação da detecção de IgM e IgG anti-HAV em cada grupo estudado pelo teste rápido e EIE

Anticorpos Anti-HAV	Total de amostras	EIE amostras reagentes (%)	Teste rápido amostras reagentes (%)
<b>Grupo I</b>			
IgG	96	65 (67.7%)	32 (33.3%)
<b>Grupo II</b>			
IgG	46	33 (71.7%)	0 (0.0%)*
<b>Grupo III</b>	103		
IgM		49 (47.5%)	47 (45.6%)
IgG		84 (81.5%)	62 (60.1%)
<b>Grupo IV</b>	97		
IgM		46 (46.9%)	44 (45.3%)
IgG		73 (75.2%)	60 (61.8%)

Grupo I: doadores de sangue; Grupo II: indivíduos vacinados para hepatite A; Grupo III: amostras de surto e Grupo IV: amostras de casos esporádicos.

\* No grupo II apenas as amostras positivas no EIA foram avaliadas pelo teste rápido para análise da resposta vacinal.

#### 5.4. Avaliação da sensibilidade, especificidade e dos valores preditivos positivo e negativo do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM

Para avaliar a concordância dos resultados entre os dois testes foi utilizado a estatística Kappa (K). Para a população total, o valor de Kappa foi igual a 0,93 em relação a detecção de anticorpos anti-HAV IgM e 0,32 para o anticorpos anti-HAV IgG, demonstrando desempenhos excelente e fraco, respectivamente.

Para o grupo I o valor de K foi de 0,38 demonstrando fraco desempenho. Para o grupo III em relação a detecção de anticorpos anti-HAV IgM o valor de K foi de 0,96 com nível de concordância considerado excelente, e para detecção de anticorpos IgG o valor de K foi de 0,0045, nível de concordância considerado fraco. Para o grupo IV em relação a detecção de anticorpos anti-HAV IgM o valor de K foi de 0,67 com nível de concordância considerado bom, e para detecção de anticorpos IgG o valor de K foi de 0,60, nível de desempenho considerado bom (**Tabela 5.4**).

**Tabela 5.4.** Grau de concordância segundo os valores Kappa para cada grupo estudado

	Valor de Kappa	Nível de Concordância
População total-		
IgM	0,93	Excelente
IgG	0,32	Fraca
<b>Grupo I -</b> IgG	0,38	Fraca
<b>Grupo III -</b> IgM	0,96	Excelente
IgG	0,0045	Fraca
<b>Grupo IV -</b> IgM	0,67	Boa
IgG	0,60	Boa

Grupo I: doadores de sangue; Grupo III: amostras de surto e Grupo IV: amostras de casos esporádicos.

Os parâmetros de validade intrínseca do teste rápido foram avaliados por grupo utilizando o programa GraphPad Prism 5. Para todos os grupos testados o teste t demonstrou um valor de  $p < 0.0001$ , indicando que os resultados foram significativos. Para população total em relação a detecção de anticorpos anti-HAV IgM foi obtida uma sensibilidade de 94,74% (IC 95%; 88,14 - 98,27), especificidade de 99,05% (IC 95%; 94,81- 99,98), valor preditivo positivo de 98,90% (IC 95%; 94,03 - 99,97) e valor preditivo negativo de 95,41% (IC 95%; 86,62- 98,49). Para detecção de anticorpos anti-HAV IgG foi obtida uma sensibilidade de 69,61% (IC 95%; 62,80 - 75,84), especificidade de 66,30% (IC 95%; 55,70 - 75,83), valor preditivo positivo de 82,08% (IC 95%; 75,54 - 87,49) e valor preditivo negativo de 49,59% (IC 95%; 40,46 - 58,75).

Para o grupo I foi obtida uma sensibilidade de 49% (IC 95%; 0,3 - 0,6), especificidade de 100% (IC 95%; 0,8 - 1,0), valor preditivo positivo de 100,00% (IC 95%; 89,11 - 100) e valor preditivo negativo de 48,44% (IC 95%; 35,75 - 61,27).

No grupo III em relação a detecção de anticorpos Anti-HAV IgM, foi observado uma sensibilidade de 95% (IC 95%; 0,8 - 0,9), especificidade de 100% (IC 95%; 0,9 - 1,0), valor preditivo positivo de 100,00% (IC 95%; 92,45 - 100) e valor preditivo negativo de 96,43% (IC 95%; 87,69 - 99,56). Em relação a detecção de anticorpos Anti-HAV IgG, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 78% (IC 95%; 0,6 - 0,8) e 21% (IC 95%; 0,09 - 0,3), respectivamente e os valores preditivos positivo e negativo foram de 64,20% (IC 95%; 52,77- 74,55) e 36,36% (IC 95%; 17,20 - 59,34), respectivamente.

No grupo IV em relação a detecção de anticorpos Anti-HAV IgM, o valor da sensibilidade foi de 93% (IC 95%; 0,8 - 0,9), da especificidade foi de 98% (IC 95%; 0,8 - 0,9), do valor preditivo positivo foi de 97,73% (IC 95%; 87,98 - 99,94) e do valor preditivo negativo foi de 94,34% (IC 95%; 84,34 - 98,82). Em relação a detecção de anticorpos Anti-HAV IgG, os valores de sensibilidade foram de 79% (IC 95%; 0,6 - 0,8), especificidade de 91% (IC 95%; 0,7 - 0,9), valor preditivo positivo de 96,67% (IC 95%; 88,47 - 99,59) e valor preditivo negativo de 59,46% (IC 95%; 42,10 - 75,25) (**Tabela 5.5**).

**Tabela 5.5.** Valores de desempenho do teste rápido para detecção de anti-HAV IgM/IgG em comparação aos resultados obtidos no EIE em amostras de soro em cada grupo estudado

<b>Grupos/Populações</b>	<b>VP</b>	<b>FN</b>	<b>VN</b>	<b>FP</b>	<b>Sens (%)</b> <b>(IC 95%)</b>	<b>Esp (%)</b> <b>(IC 95%)</b>	<b>VPP (%)</b> <b>(IC 95%)</b>	<b>VPN (%)</b> <b>(IC 95%)</b>
População geral (n=296)								
IgM	90	5	104	1	94,74 (88,14-98,27)	99,05 (94,81-99,98)	98,90 (94,03-99,97)	95,41 (86,62-98,49)
IgG	142	62	61	31	69,61 (62,80-75,84)	66,30 (55,70-75,83)	82,08 (75,54-87,49)	49,59 (40,46-58,75)
<b>Grupo I</b>								
Doadores de sangue (n=96)	32	33	31	0	49,23 (36,60-61,93)	100,00 (88,78-100)	100,00(89,11-100)	48,44 (35,75-61,27)
<b>Grupo III</b>								
Amostras de surto - IgM (n=103)	47	2	54	0	95,92 (86,02-99,50)	100,00 (93,40-100)	100,00(92,45-100)	96,43 (87,69-99,56)
Amostras de surto- IgG (n=103)	52	14	8	29	78,79 (66,98-87,89)	21,62 (9,82-38,21)	64,20 (52,77-74,55)	36,36 (17,20-59,34)
<b>Grupo IV</b>								
Casos esporádicos - IgM (n=97)	43	3	50	1	93,48 (82,10-98,36)	98,04 (89,55-99,95)	97,73 (87,98-99,94)	94,34 (84,34-98,82)
Casos esporádicos - IgG (n=97)	58	15	22	2	79,45 (68,38-88,02)	91,67 (73,00-98,97)	96,67 (88,47-99,59)	59,46 (42,10-75,25)

VP= Verdadeiro Positivo; FN= Falso Negativo; VN= Verdadeiro Negativo; FP= Falso Positivo; Sens= sensibilidade; Esp= especificidade; VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo. IC – Intervalo de Confiança, P<0,0001.

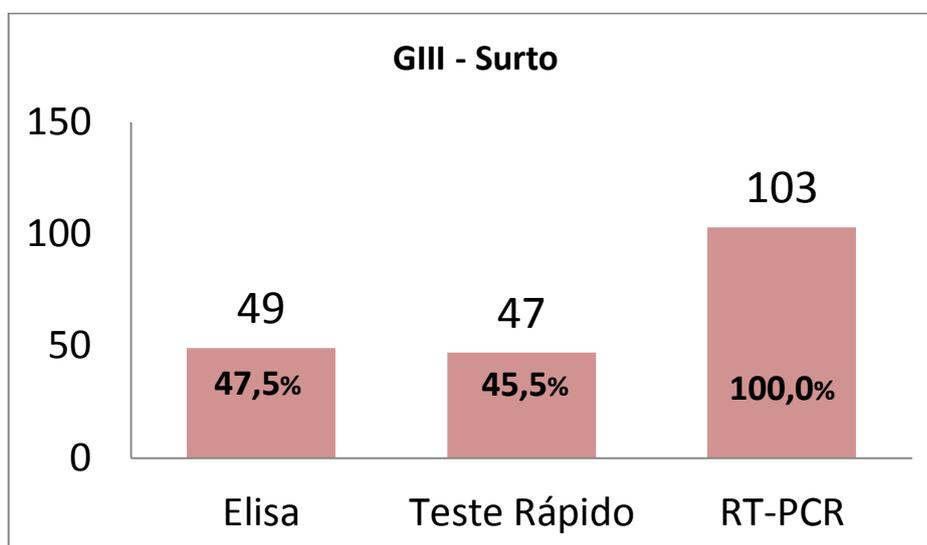
\*O grupo II foi utilizado apenas para os testes de avaliação da resposta vacinal

### 5.5. Detecção do RNA do HAV

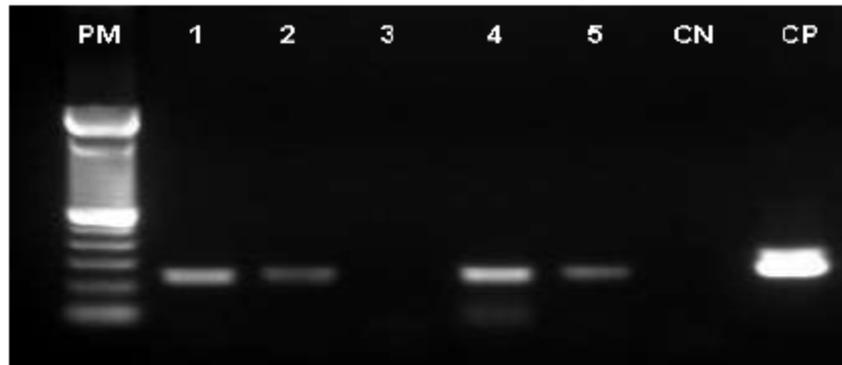
As amostras de soro incluídas nos grupos III e IV foram testadas para a presença do RNA do HAV por *nested*-PCR a partir da amplificação dos genes da região da junção da VP1/2A (243 bp).

No grupo III, amostras de surto, 100,0% (103/103) das amostras foram reagentes por *nested*-PCR através da amplificação da região VP1/2A. Todas as amostras reagentes pelo teste rápido (47/103) foram reagentes por *nested*-PCR, ou seja, continham o RNA viral. (Gráfico 5.1).

**Gráfico 5.1.** Resultados por teste realizado com as amostras provenientes do surto

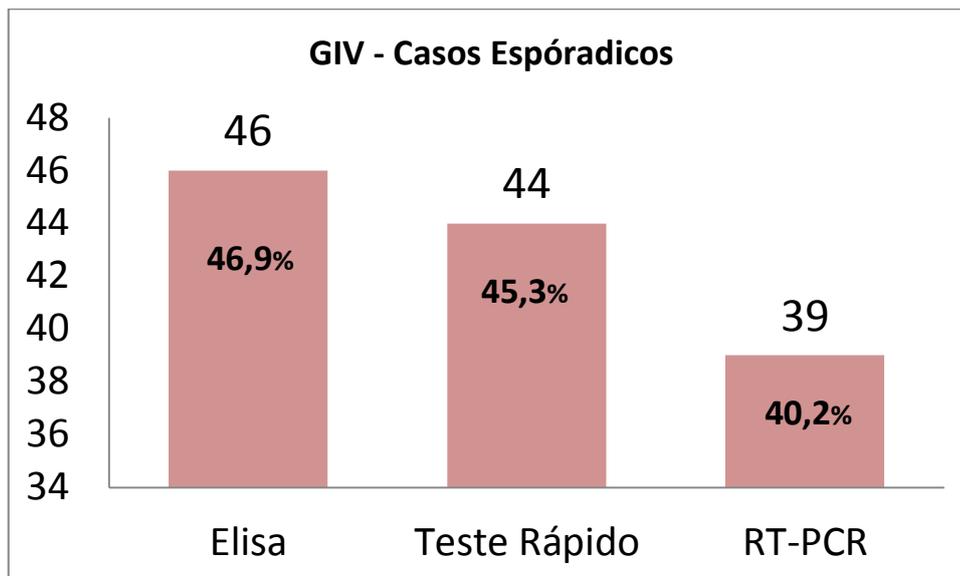


No grupo IV, amostras de casos esporádicos, 40,2% (39/97) das amostras demonstraram resultados reagentes por *nested*-PCR através da amplificação da região VP1/2A e das 44 amostras reagentes pelo teste rápido, 75% (33/44) também foram reagentes por *nested*-PCR (Figura 5.1 e Gráfico 5.2).



**Figura 5.1.** Detecção do RNA do HAV através da amplificação região VP1/2A por nested-PCR em amostras de soro do grupo IV. PM: Peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, CA, USA); CN: controle negativo e CP: controle positivo.

**Gráfico 5.2.** Resultados por teste realizado com as amostras de casos esporádicos



### 5.6. Avaliação da reprodutibilidade e repetitividade do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM

Para avaliar a reprodutibilidade as amostras foram testadas em três dias diferentes. A tabela 5.1 demonstra a avaliação da reprodutibilidade do teste rápido. Nas amostras anti-HAV IgG nenhuma das cinco amostras foi positiva em vinte minutos, tempo preconizado pela bula do teste, todas as amostras que foram reagentes demonstraram este resultado em quarenta minutos e não houve concordância nos resultados em relação aos dias em que as amostras foram testadas. A amostra R1 foi reagente nos três dias, as amostras R2 e R4 foram reagentes em dois dos três dias testado, a amostra R3 foi reagente em apenas um dia e a amostra R5 não foi reagente.

Para as amostras anti-HAV IgM apenas duas das cinco amostras testadas foram reagentes em vinte minutos (R8 e R10) as outras três amostras foram reagentes apenas em quarenta minutos. A amostra R6 foi reagente em dois dos três dias testado, as amostras R7, R8 e R10 foram reagentes nos três dias testados e a amostra R9 não foi reagente em nenhum dia testado (**Tabela 5.6**).

**Tabela 5.6.** Avaliação da reprodutibilidade dos teste rápido com as amostras Anti-HAV IgG e IgM

Amostra	Anti- HAV IgG			Amostra	Anti- HAV IgM		
	Tempo (minutos)				Tempo (minutos)		
	10'	20'	40'		10'	20'	40'
R1	0	0	3	R6	0	0	2
R2	0	0	2	R7	0	0	3
R3	0	0	1	R8	0	1	2
R4	0	0	2	R9	0	0	0
R5	0	0	0	R10	0	2	1

Para avaliar a repetitividade foram testadas cinco amostras Anti-HAV IgG e anti-HAV IgM positivas em triplicata (**Tabela 5.7**). Para anti-HAV IgG, em todas as amostras somente em quarenta minutos se observou resultados positivos, as amostras R1, R2 e R4 foram

reagentes nas três triplicatas, para a amostra R3 apenas uma das triplicatas foi reagente e a amostras R5 não apresentou nenhuma das triplicatas reagente.

Para anti-HAV IgM, todas as triplicatas das amostras R6, R7, R8 e R10 foram reagentes, entretanto apenas em quarenta minutos. Todas as triplicatas da amostra R9 não foram reagentes.

**Tabela 5.7.** Avaliação da repetitividade do teste rápido com as amostras Anti-HAV IgG e IgM

Anti- HAV IgG				Anti- HAV IgM			
Amostra	Tempo (minutos)			Amostra	Tempo (minutos)		
	10'	20'	40'		10'	20'	40'
R1	0	0	3	R6	0	1	3
R2	0	0	3	R7	0	3	3
R3	0	0	1	R8	0	2	3
R4	0	0	3	R9	0	0	0
R5	0	0	0	R10	0	3	3

Os resultados dos ensaios realizados para verificação da repetitividade e da reprodutibilidade do teste rápido foram discordantes, com isso encontramos 60% de repetitividade e 20% reprodutibilidade para detecção de anticorpos Anti-HAV IgG, e 80% de repetitividade e 20% reprodutibilidade para detecção de anticorpos Anti-HAV IgM.

### 5.7. Avaliação do limite de detecção do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM

Para a detecção de anticorpos anti-HAV IgG o limite de detecção foi de  $10^{-10}$  no Elisa e  $10^{-2}$  no teste rápido, e para anticorpos anti-HAV IgM, o limite de detecção foi de  $10^{-2}$  no Elisa e  $10^{-3}$  no teste rápido (**Tabela 5.8**).

**Tabela 5.8.** Avaliação do limite de detecção do teste rápido para Anti-HAV IgG e IgM em comparação ao EIE

Anti-HAV IgG			Anti-HAV IgM		
Amostra	Elisa	Teste Rápido	Amostra	Elisa	Teste Rápido
1	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-2</sup>	6	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>
2	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-2</sup>	7	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
3	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-2</sup>	8	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
4	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-2</sup>	9	Não Detectável	Não Detectável
5	10 <sup>-10</sup>	Não Detectável	10	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>

### 5.8. Avaliação da reatividade cruzada do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM

Para avaliar a presença de reatividade cruzada no teste rápido com outros patógenos, 20 amostras (5 de cada) com sorologia para HBsAg (hepatite B), anti-HCV (hepatite C), anti-dengue e anti-HIV foram testadas no teste rápido SD BIOLINE e nenhuma amostra demonstrou reatividade cruzada com o teste rápido para hepatite A.

### 5.9. Avaliação de resposta vacinal pelo teste rápido

Para avaliação da resposta vacinal foram utilizados soros de indivíduos vacinados (grupo II) coletados após a 1<sup>o</sup> dose da vacina contra hepatite A. A média dos valores de DO/CO por EIE das amostras de soro foi de 0,10 (0,01 – 0,71). Todas as amostras que foram reagentes no EIA ( $n= 33$ ) foram submetidas ao teste rápido e nenhuma dessas amostras testadas foi reagente.

## VI. DISCUSSÃO

A hepatite A é uma das mais antigas doenças conhecidas pelo homem, sendo endêmica no Brasil, com a prevalência sendo maior na região Norte, quando comparada às regiões Sul e Sudeste, por apresentarem condições socioeconômicas diferentes, e uma infraestrutura mais precária fornecida a população (Assis, *et al.* 2002). A hepatite A atinge principalmente crianças, pelo fato da doença estar interligada com condições sanitárias adequadas e de higiene, porém diversos estudos soroepidemiológicos vêm demonstrando uma redução na prevalência de anticorpos anti-HAV na população brasileira devido as melhorias sanitárias que vem ocorrendo principalmente nos grandes centros urbanos. Com isto, tem ocorrido um crescimento no número de crianças soro negativas para hepatite A, e um deslocamento da doença para idades mais avançadas, tendo cada vez mais adultos susceptíveis, aumentando o risco de morbidade e mortalidade, pois nesta faixa a doença tende a ser mais grave (Tanaka, 2000; Ferreira e Silveira, 2006; Ministério da Saúde, 2009; Jacobsen e Wiersma 2010; Vitral *et al.* 2012).

Os testes rápidos têm apresentado bom desempenho para o diagnóstico laboratorial de HIV (Zelin *et al.* 2008), HBV (Cruz *et al.*, 2015) e HCV (Scalioni *et al.*, 2014), aumentando desta forma a identificação de indivíduos infectados por estes vírus. Entretanto, um dos problemas da utilização dos testes rápidos para o diagnóstico de doenças infecciosas está relacionado à qualidade e desempenho do teste (Gray *et al.* 2004). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar um teste rápido (SD Bioline HAV IgM/IgG (*Standard Diagnostics*, Coreia) em diferentes populações.

No Brasil, os testes rápidos vem sendo empregados como testes de triagem (sífilis e hepatites virais) ou confirmatórios (sífilis e HIV), conforme algoritmos publicados nas Portarias SVS/MS Nº 29, de 17 de dezembro de 2013 (sobre o diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV), nº. 3.242, de 30 de dezembro de 2011 (sobre o diagnóstico sorológico da sífilis) e Ofício Circular nº. 76/2011 – DHRV/DST-AIDS-HV/SVS/MS (sobre os testes rápidos para hepatites B e C). Para esses mesmo agentes infecciosos o Ministério da Saúde dispõe de fluxogramas que indicam as melhores estratégias de testagem realizadas em locais que permitam o fornecimento do resultado durante o período da visita do indivíduo (consulta médica, atendimento em Centro de Testagem e Aconselhamento - CTA, atendimento em

domicílio, atendimento em unidade de testagem móvel, organização não governamental etc.) (Ministério da Saúde, 2013). Porém, para a hepatite A ainda não há nenhuma nota técnica ou portaria que regulamente o uso de testes rápidos para o diagnóstico ou mesmo as melhores estratégias de testagem.

O estabelecimento do diagnóstico laboratorial precoce da infecção pelo HAV é de grande importância para guiar a implementação de medidas de controle que visem à prevenção de surtos. Até o presente momento, apenas um ensaio imunocromatográfico (teste rápido) está disponível para detecção de anticorpos anti-HAV no Brasil, e poucos estudos locais que avaliem o desempenho desse teste estão disponíveis. Um estudo realizado por Flosi (2015) avaliou a sensibilidade do teste rápido SD Bioline para o anti-HAV IgM, utilizando 307 amostras nos diferentes cursos clínicos da infecção pelo HAV e encontrou uma sensibilidade que variou de 63 a 88,9% dependendo da fase clínica da infecção, sendo na fase intermediária I, com amostras dos pacientes que apresentaram icterícia de oito a 15 dias anteriores à realização do teste onde a maior sensibilidade foi encontrada. No entanto, o método padrão-ouro utilizado nesse trabalho foi o Architect (Abbott, Alemanha), que se baseia em um sistema automatizado de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (*Chemoluminescent Microparticle Immunoassay* ou CMIA).

Várias razões podem contribuir para as diferenças na sensibilidade e na especificidade entre as amostras analisadas utilizando o mesmo kit. A primeira razão são as características da amostra, se foi uma amostra obtida durante um período de surto, se foi feita a partir de pacientes suspeitos de estarem infectados com hepatite A, por terem tido contato com algum doente ou consumido água ou alimentos contaminados com o HAV ou apresentarem sintomas agudos da infecção ou a partir de um indivíduo saudável, se trata-se de uma amostra fresca ou armazenada, e as condições de armazenamento ou de tratamento da amostra. A segunda razão é que a sensibilidade e especificidade do método do teste pode variar, dependendo da sensibilidade e especificidade do método comparativo.

A concordância de resultados dentro de um mesmo laboratório se constitui em uma medida da precisão, avaliando a capacidade das reações de fornecerem o mesmo resultado para uma dada amostra. A reprodutibilidade intrateste dos resultados são ferramentas, para o

controle de qualidade interno das reações, atestando assim a qualidade na execução dos ensaios e, avaliando a precisão destas reações (Hulley *et al.*, 2003).

Neste estudo, a variável a ser comparada foi o resultado de exames sorológicos, todos eles expressos de forma dicotômica como reagente ou não reagente. Há diversas maneiras de verificar a concordância de resultados entre leituras de um mesmo evento ou comparar métodos diagnósticos diferentes, e assim, estimar a discordância na sua aferição. No presente estudo, foi avaliada a reprodutibilidade intraobservador, sendo este o grau de concordância entre resultados de um mesmo laboratório e a repetitividade intra-teste sendo realizada em ensaios em replicata (ao mesmo tempo) (Hulley *et al.*, 2003).

No presente trabalho para o teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM foi encontrada uma taxa de 60% de repetitividade e 20% reprodutibilidade para detecção de anticorpos Anti-HAV IgG, e 80% de repetitividade e 20% reprodutibilidade para detecção de anticorpos Anti-HAV IgM. Resultados obtidos por Smith e colaboradores (2011) na análise de 3 diferentes testes rápidos de detecção de anti-HCV em amostras de sangue e fluido oral testado por 3 operadores, a reprodutibilidade e repetitividade teve 100% de concordância. Em um outro estudo publicado por Scalioni e colaboradores (2014) para avaliação da reprodutibilidade e repetitividade de dois testes rápidos para detecção de anti-HCV dos fabricantes WAMA Imuno-Rápido HCV (WAMA Diagnóstica) e Bioeasy HCV Rapid Test (Bioeasy Diagnóstica Ltda), com amostras anti-HCV reagentes e não-reagentes também foi alcançado 100% de concordância entre os resultados de cada teste rápido. Demonstrando assim um melhor desempenho em relação a reprodutibilidade e repetitividade dos testes rápidos para outras hepatites virais.

O tempo preconizado pela bula do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM, para interpretação dos resultados é de 20 minutos, no presente estudo os resultados foram lidos após três tempos diferentes de 10, 20 e 40 minutos após a adição do tampão, a fim de determinar o tempo ótimo necessário para leitura dos mesmos. Para o anticorpo anti-HAV IgG, apenas após 40 minutos foi possível a leitura de resultados reagentes, para o anticorpo anti-HAV IgM o tempo de 20 minutos foi suficiente para a interpretação dos resultados. Um teste rápido para a detecção do anticorpo IgM para o vírus Chikungunya do mesmo fabricante do teste avaliado no nosso estudo (SD Bioline CHIK IgM (Standard Diagnostic, Coreia)),

também conduziu a leitura dos resultados em tempos diferentes. O tempo de determinação dos resultados recomendado pelo fabricante para o teste rápido SD Bioline CHIK IgM é de 10 minutos, as amostras foram avaliadas em 10, 15 e 20 minutos. O aumento do tempo de 10 a 20 minutos para o teste rápido SD Bioline CHIK IgM resultou num aumento significativo na sensibilidade de 50,8% para 68,2% (Kosasih *et al.*, 2012). Nossos resultados demonstram que, para detecção de anti-HAV IgM, o tempo preconizado pelo fabricante foi o suficiente para a interpretação dos resultados. No entanto, o mesmo tempo não foi suficiente para a detecção de anticorpos anti-HAV IgG.

A análise do limite de detecção do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM pelo método de diluição das amostras conhecidamente reagentes para a detecção dos dois marcadores em comparação ao EIE demonstrou resultados discordantes. Para anticorpos anti-HAV IgG o limite de detecção do teste rápido foi de  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ , e o do teste padrão ouro (EIE) foi de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Para os anticorpos anti-HAV IgM, o limite de detecção no teste rápido foi de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ , similar e/ou um título maior em relação ao padrão ouro que foi de  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ . Resultados similares aos encontrados no nosso estudo foram encontrados por Lee e colaboradores (2010), utilizando o mesmo teste rápido para o anticorpo anti-HAV IgM, onde com o teste rápido pode-se detectar o anti-HAV IgM numa titulação de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  quando comparado ao teste MEIA AxSYM HAVAB-M 2.0 (Abbott Laboratory, USA) que conseguiu detectar o anti-HAV IgM a uma diluição máxima de  $10^{-3}$ .

Nosso estudo também avaliou um fator de interferência importante no controle laboratorial de resultados verdadeiros positivos e negativos para a detecção de anticorpos anti-HAV que é a reação cruzada com outros agentes infecciosos. Uma vez que o teste é um imunoensaio rápido baseado em captura para a detecção de anticorpos para o HAV, foi importante verificar se alguma reatividade cruzada pode ser gerada por amostras infectadas com outros agentes infecciosos.

Um estudo que avaliou a reatividade cruzada do teste SD Bioline HCV (SD Bioline, Korea) utilizando cinco amostras HBsAg, cinco amostras anti-HBs positivas, quatro amostras anti-HIV positivos, cinco amostras de fator reumatóide positivas e dez amostras de doentes com mieloma múltiplo, também obtiveram o mesmo resultado, ou seja, ausência de reatividade cruzada (Kim *et al.*, 2013).

O desempenho do teste rápido avaliado no presente estudo variou de acordo com a população estudada, isso pode ser dependente da distribuição dos títulos de anticorpos nas amostras utilizadas para análise.

Na população total de amostras testadas para esse marcador, o valor de Kappa (K) foi de 0,32, nível de concordância considerado fraco e foi obtida uma sensibilidade de 69,61%, especificidade de 66,30%, valor preditivo positivo de 82,08% e o valor preditivo negativo de 49,59. Nosso estudo observou uma baixa concordância do teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM com os testes imunoenzimáticos para o diagnóstico de anticorpos anti-HAV IgG de infecção passada e para a avaliação da resposta humoral após a vacinação contra a hepatite A. Em outro estudo também foi observado essa baixa concordância desse mesmo teste rápido em comparação com os testes imunoenzimáticos para o diagnóstico de anti-HAV IgG e para a avaliação da resposta vacinal, situações nas quais os títulos de IgG são mais baixos. A diferença pode ter ocorrido devido ao fato de que os ensaios imunoenzimáticos para a hepatite A são ensaios competitivos e detectam anti-HAV total, enquanto que o teste rápido detecta IgM e IgG separadamente [De Paula VS, dados não publicados].

Nossos resultados são similares a um estudo que utilizou um painel de 184 amostras de soro de indivíduos com suspeita de dengue, para avaliar o teste rápido dengue Duo Cassette (Panbio, Australia) em comparação com o Dengue IgG capture ELISA (Dia. Pro, Italy), que obteve uma sensibilidade de 48,59% (IC 95%; 40,13-57,12), especificidade de 76,19% (IC 95%; 60,55-87,95), valor preditivo positivo de 87,34% (IC 95%; 77,95-93,76) e valor preditivo negativo de 30,48% (IC 95%; 21,87-40,22), ficou demonstrado que para a detecção de IgG o teste de ELISA é mais sensível que o teste imunocromatográfico (Naz *et al.*, 2014).

Ao compararmos os resultados nos grupos testados para o marcador IgM, podemos observar que obtivemos resultados semelhantes de taxa de detecção entre o teste rápido e o ELISA nos dois grupos testado para esse marcador. Para o Grupo III obtivemos 47,5% de amostras reagentes no ELISA e 45,6% de amostras reagentes no teste rápido, nesse grupo obtivemos uma sensibilidade de 95%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100,00% e valor preditivo negativo de 96,43%. Para o Grupo IV os resultados foram similares, com 46,9% de amostras reagentes no ELISA e 45,3% de amostras reagentes no

teste rápido, o valor da sensibilidade foi de 93%, da especificidade foi de 98% , o valor preditivo positivo foi de 97,73% e o valor preditivo negativo foi de 94,34%.

A sensibilidade e a especificidade do teste rápido para detecção de anti-HAV IgM na população total foi de 94,74% e 99,05%, respectivamente, os valores preditivo positivo e negativo foram de 98,90% e 95,41%, respectivamente. O valor de Kappa (K), para o anti-HAV IgM foi de 0,93, nível de concordância considerado excelente.

Resultados similares foram obtidos por Lee e colaboradores (2010) que demonstram 100% de especificidade e sensibilidade do mesmo teste rápido utilizado no presente estudo, quando utilizado frente a 150 amostras de soro IgM anti-HAV positivas e 75 negativas provenientes de indivíduos saudáveis. Um outro estudo que avaliou 485 amostras de pacientes com hepatite A, casos suspeitos de hepatites virais agudas, contactantes intradomiciliares e indivíduos que realizaram os testes como triagem durante surtos ocorridos no período foram analisadas simultaneamente pelo o teste rápido SD Bioline e pelo método CMIA para anti-HAV IgM e na comparação entre os dois métodos foi encontrada uma sensibilidade de 90,4% e especificidade de 96,9% (Flosi, 2015).

Outros estudos também avaliaram a sensibilidade e especificidade de testes do mesmo fabricante do teste utilizado no presente estudo. Kim e colaboradores (2013), investigando as características do desempenho do teste rápido SD Bioline HCV (Standard Diagnostics, Coreia), utilizando 100 amostras de soro anti-HCV reagentes e 100 amostras não reagentes, obtiveram uma sensibilidade e especificidade de 78,8% e 100%, respectivamente e um valor kappa de 0,83. Em um estudo realizado na Indonésia, com 132 amostras de indivíduos com infecção recente confirmada pelo vírus Chikungunya e 74 amostras de indivíduos com dengue ou doença febril não-dengue e não-chikungunya, a sensibilidade do teste rápido SD Bioline CHIK IgM (Standard Diagnostic, Coreia) foi de 50,8%, e a especificidade de 89,2% (Kosasih *et al.*, 2012). Um outro estudo na Tailândia relatou uma taxa de 37% de sensibilidade para o SD Bioline CHIK IgM quando calculada em comparação com a detecção da infecção por ELISA IgM ou PCR (Rianthavorn *et al.*, 2010).

A avaliação de outro teste rápido SD BIOLINE Dengue Duo (Standard Diagnostics, Kyonggi-do, Korea), utilizando 50 amostras de soros pareados, com uma coleta feita durante a fase febril aguda e uma durante a fase de convalescença e com a confirmação da infecção

usando EIE IgM como padrão-ouro, o teste rápido demonstrou uma sensibilidade de 75,6% e especificidade de 97,1%. A porcentagem do valor preditivo positivo e negativo desse mesmo teste rápido foi avaliada como 97,1% e 75%, respectivamente (Tontulawat *et al.*, 2011).

Nossos resultados demonstram que o teste rápido é bastante eficiente para detectar aqueles indivíduos que estão com infecção ativa para detecção de anti-HAV IgM, e deste modo poderiam ser beneficiados com o encaminhamento precoce para o tratamento e acompanhamento diagnóstico. Em uma revisão sobre hepatite A publicada em 2012 por De Paula foi relatado que o teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM foi muito útil para a investigação de surtos, situação na qual o paciente apresenta altos títulos de anticorpos IgM anti-HAV. Surtos de hepatite A vem ocorrendo em comunidades brasileiras, tais como escolas públicas e creches. Os inquéritos sorológicos de alguns desses surtos têm relatado que apesar do baixo nível socioeconômico dos indivíduos envolvidos nestes surtos notificados, mais de 50% das pessoas com idade inferior a vinte anos eram suscetíveis à infecção pelo HAV antes do surto. Em epidemias envolvendo crianças menores de 5 anos de idade, apenas 16% eram anti-HAV positivas antes do surto (Vital *et al.*, 2008). A existência de áreas de endemicidade intermediária para infecção pelo HAV pode levar a surtos como foi descrito nos últimos anos no Rio de Janeiro (Villar *et al.*, 2002, de Paula *et al.*, 2003, Morais *et al.*, 2006). Em um estudo publicado por Santos e colaboradores (2008), 64% dos casos agudos de hepatite A ocorreu em indivíduos na faixa dos 20 anos, o que sugeriu que este grupo representa um maior risco de adquirir a infecção pelo HAV.

No nosso estudo também foi realizado a testagem das amostras dos grupos III e IV por *nested*-PCR através da amplificação da região VP1/2A do HAV. No grupo III, amostras de surto, obtivemos 47,5% (49/103), 45,5% (47/103) e 100,0% (103/103) das amostras positivas por ELISA anti-HAV IgM, teste rápido e *nested*-PCR, respectivamente. Nesse grupo a amplificação do RNA viral por PCR foi o método mais sensível. Estudos demonstram que a detecção por PCR do RNA do HAV tem um papel importante no diagnóstico precoce da infecção, especialmente no período de janela imunológica durante surtos e em casos de hepatite aguda de etiologia desconhecida. A detecção do RNA do HAV antes da soroconversão de anti-HAV IgM pode ser utilizada como um método diagnóstico precoce durante surtos de hepatite A. Testes de detecção do RNA viral também pode ser úteis para

elucidar casos de hepatite aguda de etiologia desconhecida (De Paula *et al.*, 2004b e De Paula, 2012).

Um estudo realizado para avaliar um teste imunocromatográfico disponível comercialmente para detecção do antígeno NS1 e do anticorpos IgM, SD BIOLINE Dengue Duo rapid test (Standard Diagnostics, Coreia), em comparação com outros métodos laboratoriais existentes, como semi-nested PCR e ELISA IgM para confirmação da infecção, utilizando 237 soros provenientes de indivíduos em fase aguda, demonstrou que a porcentagem de amostras de DENV-positivas por semi-nested PCR, teste rápido NS1/IgM e ELISA IgM foi de 46% (109/237), 67% (159/237) e 57% (135/237), respectivamente (Tontulawat *et al.*, 2011). Os resultados desse estudo são similares aos encontrados no nosso em relação ao grupo IV, amostras de casos esporádicos, onde obtivemos 46,9% (46/97) das amostras reagentes no ELISA, 45,3% (44/97) de amostras reagentes no teste rápido e 40,2% (39/97) das amostras com resultado positivo por *nested*-PCR através da amplificação da região VP1/2A. Esses resultados podem ser devido as amostras do grupo IV serem de indivíduos no final da infecção ou no início da fase convalescente, onde os títulos de RNA viral no soro já declinaram ou são indetectáveis pela PCR convencional.

Os ensaios rápidos são muito utilizados como ferramentas de triagem nos países em desenvolvimento, o Consórcio Internacional para Segurança do Sangue (ICBS) realizou um estudo para avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes rápidos utilizados para detecção de anticorpos para o vírus da hepatite C e descobriu que a maioria dos testes rápidos tem menor sensibilidade do que os métodos convencionais utilizados no laboratório (Scheiblauer *et al.*, 2006). No entanto, ensaios rápidos têm algumas vantagens, eles são fáceis de executar, não requerem equipamento caro ou pessoal experiente, e os resultados podem ser obtidos imediatamente. Eles têm o potencial de proporcionar uma melhor acessibilidade e flexibilidade em vários cenários clínicos.

Portanto, de modo geral, o teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM utilizado no nosso estudo se mostrou sensível e específico para utilização no diagnóstico da hepatite A, através da detecção de anticorpos Anti-HAV IgM em surtos e casos esporádicos. Com isso, o teste rápido, pode ser uma alternativa para o diagnóstico da hepatite A no Brasil, em casos

esporádicos e de surto, pois apresenta maior facilidade operacional, além de especificidade e sensibilidade semelhantes ao ensaio imunoenzimático comercial.

Os dados obtidos no presente estudo de avaliação poderão contribuir para a realização de avaliações de custo-efetividade de testes diagnósticos para hepatite A, fornecendo estimativas de sensibilidade e especificidade para inclusão em modelos, fortalecendo assim a tomada de decisão sobre a implantação desse método diagnóstico nos serviços de saúde e para a construção de fluxogramas que indicam as melhores estratégias de testagem utilizando o teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM.

## VII. CONCLUSÕES

O teste rápido SD Bioline HAV IgM/IgG demonstrou possuir reprodutibilidade de 20% para ambos os marcadores; No entanto, o teste demonstrou uma melhor repetitividade em relação a detecção de IgM (80%) e na detecção de IgG demonstrou uma repetitividade de 60%; revelando assim, que o teste possui uma maior confiabilidade de resultados quando a mesma amostra é testada em dias diferentes.

O limite de detecção do teste rápido para anticorpos anti-HAV IgG foi menor ( $10^{-2}$ ) em relação ao teste padrão-ouro ( $10^{-10}$ ) e para anticorpos anti-HAV IgM o teste rápido demonstrou limites de detecção iguais ( $10^{-2}$ ) ou superiores ( $10^{-3}$ ) ao padrão-ouro;

O teste rápido não demonstrou reatividade cruzada com outros agentes infecciosos, como HBV, HCV, Dengue e HIV, sendo considerado um teste com especificidade para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite A;

O teste rápido demonstrou ter uma taxa de detecção similar comparada ao EIE para o marcador IgM e uma taxa de detecção menor comparada ao EIE para o marcador IgG;

Os níveis de concordância utilizando o índice Kappa (k) foram considerados de fracos a bons nos grupos I e III testados para o marcador IgG e de excelentes a bons em relação ao marcador IgM para os grupos III e IV, respectivamente;

A sensibilidade e a especificidade do teste rápido para detecção de anti-HAV IgM foram maiores do que para a detecção de anti-HAV IgG;

Em todas as amostras de surto o HAV-RNA foi detectado em todas as amostras (100%), demonstrando que a detecção molecular foi fundamental nesse grupo para o diagnóstico precoce do vírus no período de janela imunológica;

O teste apresentou melhor desempenho para o diagnóstico da hepatite A em casos de surtos e casos esporádicos para detecção de anticorpos IgM, porém para detecção de infecção passada e resposta vacinal o teste não foi adequado.

**VIII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Amado, L.A., Marchevsky, R.S., De paula, V.S., Hooper, C., Freire, M. da S., Gaspar, A.M., et al., 2010. Experimental hepatitis A vírus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (macaca fascicularis): Evedence of actives extrahepatic site of HAV replication. *Int j exp pathol* 91(1), p. 87-97.

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. *Journal of Virol Methods* p. 74-80.

Arshi, N., Danish, Z., Samina, N.M., Muhammad, N., Bijon, K., Tahir, S.S., 2014. Evaluation of efficacy of various immunochromatographic rapid tests for dengue diagnosis. *Pak J Med Sci* 30(1): 166–171.

Assis, S.B., Souto, F.J.D., Fontes, C.J.F., Gaspar, A.M.C., 2002. Prevalence of hepatitis A and E virus infection in school children of an Amazon municipality in Mato Grosso State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* p.155-158.

Babinski, C.E., Nunes, E.M.A., Locatelli, R., Mella Junior, S.E., 2008. Prevalência de infecção pelo vírus da hepatite A, hepatite B e hepatite C, no município de Maringá, norte do Paraná, no período de 2001 A 2004. *Revista Saúde e Pesquisa* v. 1, n. 2, p. 117-124.

Borman, A.M., Kean, K.M., 1997. Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology* 237(1):129-136.

Bosh, A., 1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Internatinal Microbiology* v.1, n.3, p.191-196.

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.

BRASIL., 2012. Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. *Ministério da Saúde*, Ano III - nº 1.

- BRASIL., 2008. Hepatites virais: o Brasil está atento. 3ª ed. – Brasília: Ministério da Saúde.
- BRASIL., 2005. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. *Portaria do Ministério da Saúde n° 518/2004*. Brasília, DF.
- CDC - Center of Disease Control and Prevention. 1998. Summary of notifiable diseases, United States. *MMWR* 47:1-92.
- CDC (Centers For Disease Control And Prevention), 2009. Surveillance for acute viral hepatitis – United States. Surveillance Summaries. *Morb. Mortal. Wkly Rep* 58(SS23), 2007.
- Cha, Y.J., Park, Q., Kang, E.S., Yoo, B.C., Park, K.U., Kim, J.W., *et al.*, 2013. Performance evaluation of the OraQuick hepatitis C virus rapid antibody test. *Ann Lab Med* 33(3):184-9.
- Chan, H.K.W., 2003. Rapid Diagnostic Device, Assay And Multifunctional Buffer. *Wo Pat* 03/012443 A2. 13.
- Chiao, D.J., Shyu, R.H., Hu, C.S., Chiang, H.Y., Tang, S.S., 2004. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 25;809(1):37-41.
- Clemens, S.A.C., Fonseca, J.C., Azevedo, T., Cavalcanti, A., Silveira, T.R., Castilho, M.C., *et al.*, 2000. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(1):1-10.
- 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(15):7495-505.
- Cohen, J.I., Ticehurst, J.R., Feinstone, S.M., Rosenblum, B., 1987. Purcell, R. H. Hepatitis A virus cDNA and its RNA transcripts are infectious in cell culture. *J virol* 61: 30035-3039.

- Cohen, J.I., Feinstone, S., Purcell, R.H., 1989. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J Infect Dis* 160: 887-890.
- Conference Report., 2010. Hepatitis A and E: Update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 28: 583-588.
- Costafreda, M.I., Ribes, E., Franch, A., Bosch, A., Pintó, R.M., 2012. A single mutation in the glycoprotein A binding site of hepatitis A virus enhances virus clearance from the blood and results in a lower fitness variant. *J Virol* 86(15):7887-7895.
- Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Perez-Bercof, R., Casane, D., Colina, R., *et al.*, 2002a. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol* 76(18), 9516–9525.
- Costa-Mattioli, M., Monpoeho, S., Nicand, E., Aleman, M.H., Billaudel, S., Ferre, V., 2002b. 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., 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.
- Cruz, H.M., Scalioni, L.P., de Paula, V.S., da Silva, E.F., Rodrigues do Ó, K.M., Milagres, F. A. P., 2015. Evaluating HBsAg rapid test performance for different biological samples from low and high infection rate settings & populations. *BMC Infectious Diseases* 15:548.
- Cuthbert, J.A., 2001. Hepatitis A: Old and New. *Clinical Microbiology Reviews* Vol. 14, p. 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(1): 388-393.

Delem, A.D., 1992. Comparison of modified HAVAB and ELISA for determination of vaccine-induced anti-HAV response. *Biologicals* 20(4):289-91.

De Paula, V.S., 2012. Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virol* 7(5), p. 461–472.

De Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Villar, L.M., Luz, S.L., Silva, L.A., Jesus, M.S., *et al.*, 2007. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Research* Vol. 41, p.1169 – 1176.

De Paula, V.S., Lu, L., Niel, C., Gaspar, A.M.C., Robertson, B.H., 2004a. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol* 73:378-383.

De Paula, V.S., Villar, L.M., Morais, L.M., Lewis-Ximenez, L.L., Niel, C., Gaspar, A.M., 2004b. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. *J. Clin Virol* 29(4), 254–259.

De Paula, V.S., Saback, F.L., Gaspar, A.M., 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., Baptista, M.L., Lampe, E., Niel, C., Gaspar, A.M., 2002. Characterization of Hepatitis A Virus Isolates From Subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology* 66:22±27.

Feinstone, S.M., Daemer, R.J., Gust, I.D., Purcell, R.H., 1983. Live attenuated vaccine for hepatitis A. *De Biol Stand* 54: 429-432.

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

Flehmgig, B., 1980. Hepatitis A-virus in cell culture: I. propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4). *Me Microbiol Immunol* 168(4): 239-248.

Fernández, M.I.C., Garcia, C.E.S., Ferreira, W.G., 2006. Actualidad em hepatitis por vírus A. *Revista Panamericana de Infectologia* v.8, n.2, p. 9-16.

Ferreira, C.T., Silveira, T.R., 2006. Viral hepatitis prevention by immunization. *Jornal de Pediatria* Rio de Janeiro, v. 82, n. S3, p. S55-S66.

Ferreira, C.T., Silveira, T.R., 2004. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol* 7(4):473-87.

Ferreira, C.T., Silveira, T.R., 1997. Hepatites virais: atualização. *Jornal de Pediatria* Vol. 73, Nº6.

Fleiss, J.L., 1973. Statistical methods for rates and proportions. New York: *John Wiley & Sons*, 223p.

Fonseca, J.C.F., 2010. Histórico das hepatites virais. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(3):322-330.

Flosi, T.G., 2015. Aplicabilidade clínica de um teste imunocromatográfico para o diagnóstico rápido da hepatite A. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] – Instituto Oswaldo Cruz.

Gray, J.W., 2004. Infectious disease and point-of-care testing. In: Price CP, St John A, Hicks JM, editors. Point of care testing. 2nd edition *AACC Press* 36:361-374.

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.

Huang, S.N., Lorenz, D., Gerety, R.J., 1979. Electron and immunoelectron microscopic study on liver tissues of marmosets infected with hepatitis A virus. *Lab. Invest* 41(1): 63-71.

Hulley, S.B., Martin, J.N., Cummings, S.R., 2003. Planejando as Medições: Precisão e Acurácia .In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica* Porto Alegre: Editora ARTMED; 374p.

Hussain, Z., Das, B.C., Husain, S.A., Polipalli, S.K., Ahmed, T., Begum, N., *et al.*, 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.

Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28(41):6653-7.

Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y., Feinstone, S. M., 1996. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *Embo J* 15(16):4282-96.

Katz, M.H., Hsu, L., Wong, E., Liska, S., Anderson, L., Janssen, R.S., 1997. Soroprevalence of and risk factors for factors for hepatitis A infections among young homosexual and bisexual men. *The Journal of Infectious Diseases* v.175, n.5, p. 1225-1229.

Kim, M.H., Kang, S.Y., Lee, W.I., 2013. Evaluation of a new rapid test kit to detect hepatitis C virus infection. *J Virol Methods* 193(2):379-82.

Koff, R.S., 1998. Hepatitis A. *Lancet* 351(9116):1643-9.

Kosasih, H., Widjaja, S., Surya, E., Hadiwijaya, S.H., Butarbutar, D.P., Jaya, U.A., *et al.*, 2012. Evaluation of two IgM rapid immunochromatographic tests during circulation of Asian lineage Chikungunya virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 43(1):55-61.

Kosack, C.S., Nick, S., Shanks, L., 2014. Diagnostic accuracy evaluation of the ImmunoFlow HCV rapid immunochromatographic test for the detection of hepatitis C antibodies. *J Virol Methods* 204:6-10.

Krugman, S. J., Giles, P., Hammond, J., 1967. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 200: 365–373.

Krugman, S., Ward, R., Giles, J.P., Bodansky, D., Jacobs, A. M., 1959. Infectious hepatitis: detection of virus during the incubation period and in clinically inapparent infection. *N Engl J Med* 261: 729–734.

Lee, H.J., Jeong, H.S., Cho, B.K., Mi-Jeong, J., Ji-Ha, K., An-Na L., *et al.*, 2010. Evaluation of an immunochromatographic assay for the detection of anti-hepatitis A virus IgM. *Viol J* 7, 164.

Lemon, S.M., Barclay, W., Ferguson, M., Murphy, P., Jing, L., Burke, K., *et al.*, 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(1):285-95.

Lemon, S.M., 1994. Inactivated hepatitis A vaccines. *JAMA* 271(17):1363-4.

Lima, L.R., De Almeida, A.J., Tourinho, R., Hasselmann, S., Ximenez, L.L.L., De Paula, V.S., 2014. Evidence of Hepatitis A Virus Person-to-Person Transmission in Household Outbreaks. *PLOS ONE* Vol 9.

Martin, A., Lemon, S.M., 2006. Hepatitis A Virus: From Discovery to Vaccines. *Hepatology* Vol. 43, No. 2, Suppl. 1.

Mattioli, S., Imberti, L., Stellini, R., Primi, D., 1995 Mimicry of the immunodominant conformation-dependent antigenic site of hepatitis A virus by motifs selected from synthetic peptide libraries. *J Virol* 69(9):5294-5299.

Melnik, J.L., 1995. History and epidemiology of hepatitis A virus. *The Journal of Infectious Diseases* v. 171, p. S2-S8,.

Ministério da Saúde., 2013. Informe técnico da introdução da vacina adsorvida Hepatite A (inativada). Brasília.

Ministério da Saúde/SVS-SINA., 2009. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. [on line]. Brasil. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>.

Ministério da Saúde., 2005. A, B, C, D, E de hepatites para comunicadores. Brasília, DF.

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

Nainan, O.V., Xia, G., Vaughan, G., Margolis, H.S., 2006. Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach. *Clinical microbiology reviews* Vol. 19, No. 1, p. 63–79, J.

Nainan, O.V., Brinton, M.A., Margolis, H.S., 1992. Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus. *Virology* 191(2):984-7.

Naz, A., Zahid, D., Murky, S.N., Nadeem, M., Sil, B.K., Shamsi, T.S., 2014. Evaluation of efficacy of various immunochromatographic rapid tests for dengue diagnosis. *Pak J Med Sci* 30(1):166-171.

Novais, M.C., Pires-Alves, M., 2014. PCR em Tempo Real. *Revista Tecnológica Ciência e Desenvolvimento* Ed. 33.

Nunes, H.M., Soares, M.C.P., Brito, E.M.F., Alves, M.M., Souza, O.S.C., Borges, A. M. *et al.*, 2010. Prevalência de infecção pelos vírus das hepatites A, B, C e D na demanda de um hospital no Município de Juruti, oeste do Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude;* 1(2):105-111.

O'grady, J.G., Schalm, S.W., Williams, R., 1993. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 342 (8866): 273-5.

Ott, J.J., Irving, G., Wiersma, S. T., 2012. Long-term protective effects of hepatitis A vaccines. A systematic review. *Vaccine* 31 3–11.

- Paul, J.R., Gardner, H.T., 1950. Endemiologic aspects of hepatitis in U. S. troops in Germany 1946-1950. *Am J Med* 8(5): 565-80.
- Pereira, F.E.L., Gonçalves, C.S., 2003. Hepatite A. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(3):387-400.
- 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(21):8281-5.
- 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(4):2208-16.
- Pintó, R.M., Alegre, D., Domínguez, A., El-Senousy, W.M., Sánchez, G., Villena, C., *et al.*, 2007. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiol Infect* 135(2):270-3.
- Poddar, U., Thapa, B. R., Prasad, A., Singh, K., 2002. Changing spectrum of sporadic acute viral hepatitis in Indian children. *J Trop Pediatr* 48(4): 210-213.
- Poovorawan, K., Chattakul, P., Chattakul, S., Thongmee, T., Theamboonlers, A., Komolmit, P., *et al.*, 2013. The important role of early diagnosis and preventive management during a large-scale outbreak of hepatitis A in Thailand. *Pathog Glob Health* 107(7):367-72.
- Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., Amerongen, A., Van Amerongen A., 2009. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Biochemistry* v. 393, n. 2, p. 569-82.
- 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., Wong, D.C., Moritsugu, Y., Dienstag, J.L., Routenberg, J.A., Boggs, J.D.A., 1976. Microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. *J. Immunol* 116(2): 349-356.

Redondo, N., Sanz, M.A., Steinberger, J., Skern, T., Kusov, Y., Carrasco, L., 2012. Translation directed by hepatitis A virus IRES in the absence of active eIF4F complex and eIF2. *PloS One* 7(12):e52065.

Rezende, G., Roque-Afonso, A. M., Samuel, D., Gigou, M., Nicand, E., Ferre, V., *et al.*, 2003. Viral and Clinical Factors Associated With the Fulminant Course of Hepatitis A Infection. *Hepatology* Vol. 38, No. 3.

Rianthavorn, P., Prianantathavorn, K., Wuttirattanakowit, N., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., 2010. An outbreak of chikungunya in southern Thailand from 2008 to 2009 caused by African strains with A226V mutation. *Int J Infect Dis* 141 (suppl 3): e161-5.

Robertson, B.H., Averhoff, F., Cromeans, T.L., Han, X., Khoprasert, B., Nainan, O.V., *et al.*, 2000. Genetic relatedness of hepatitis A virus isolates during a community-wide outbreak. *J Med Virol* 62: 144-150.

Saab, S., Martin, P., Yee, H.F.Jr., 2000. A simple cost-decision analysis model comparing two strategies for hepatitis A vaccination. *Am J Med* 109:241-244.

Sánchez, G., Aragonès, L., Costafreda, M. I., Ribes, E., Bosch, A., Pintó, R. M., 2004. Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycophorin A of the erythrocyte membrane. *J Virol* 78(18):9807-9813.

Santos, D.C.M., Martinho, J.M.S.G., Pacheco-Moreira, L.F., Araújo, C.C.V., Oliveira, B.C.E.P.D., Lago, B.V., 2009. Fulminant Hepatitis Failure in Adults and Children from a Public Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*; 13(5):323-329.

Santos, D.R., Villar, L.M., De 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(3):254-8.

Santos, M.V., Lopes, M.H., 1997. Vacina inativada contra a Hepatite A: Revisão da literatura e considerações sobre o uso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* Uberaba, v. 30, n. 2, p. 145-157.

Scalioni, L.P., Cruz, H.M., de Paula, V.S., Miguel, J.C., Marques, V.A., Villela-Nogueira, C.A., 2014. Performance of rapid hepatitis C virus antibody assays among high- and low-risk populations. *Journal of Clinical Virology* 60 200–205.

Scheiblaue, H., El-Nageh, M., Nick, S., Fields, H., Prince, A., Diaz, S., 2006. Evaluation of the performance of 44 assays used in countries with limited resources for the detection of antibodies to hepatitis C virus. *Transfusion* 46:708-18.

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

Siegl, G., De Chastona, Y. J., Kronauer, G., 1984. Propagation and assay of hepatitis A virus in vitro. *J. Virol. Methods* 9(1): 53-67.

Silva, L.C., 2003 Aspectos clínicos e diagnósticos das hepatites por vírus e por outras causas. In: Silva, L.C. *Hepatites Agudas e Crônicas* 3. Ed. São Paulo, p. 135-148.

Silva, P. C., Vitral, C.L., Barcellos, C., Kawa, H., Gracie, R., Rosa, M.L.G., 2007. Hepatite A no Município do Rio de Janeiro, Brasil: padrão epidemiológico e associação das variáveis sócio-ambientais. Vinculando dados do SINAN aos do Censo Demográfico. *Cad Saúde Pública* Rio de Janeiro, 23(7):1553-1564.

Smith, B.D., Drobeniuc, J., Jewett, A., Branson, B.M., Garfein, R.S., Teshale, E., *et al.*, 2011. Evaluation of three rapid screening assays for detection of antibodies to hepatitis C virus. *J Infect Dis* 204(6):825-31.

Stapleton, J.T., 1995. Host immune response to hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.*, 171 Suppl 1: S9-S14.

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(1): 7-11.

Stapleton, J.T., Lemon, S.M., 1987. Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on hepatitis A virus. *J Virol* 61(2):491-8.

Tami, C., Silberstein, E., MAnangeeswaran, M., Freeman, G. J., Umetsu, S. E., Dekruyff, R. H., *et al.*, 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(7):3437-46.

Tanaka, J., 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in latin America. *Vaccine* 18: 57-60.

Tontulawat, P., Pongsiri, P., Thongmee, C., Theamboonlers, A., Kamolvarin, N., Poovorawan, Y., 2011. Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, anti-dengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42(3):570-8.

Totsuka, A., Moritsugu, Y., 1999. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology* 42(2-3):63-8.

Toyoda, H., Kumada, T., Kiriya, S., Sone, Y., Tanikawa, M., Hisanaga, Y., *et al.*, 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.

Van, A.A., Wichers, J.H., Berendsen, L.B.J.M., Timmermans, A.J.M., Keizer, G.D., Van Doorn, A.W.J., *et al.*, 1993. Colloidal carbon particles as a new label for rapid immunochemical test methods - Quantitative computer image-analysis of results. *Journal of Biotechnology* v. 30, p. 185-195.

Vaughan, G., Goncalves Rossi, L. M., Forbi, J. C., De Paula V. S., Purdy. M. A., Xia, G., *et al.*, 2013. Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect Genet Evol* 21, p.227-243.

Villar, L.M., De Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Guimarães, F.R., Ferreira, F.F., Shubo, T.C., et al., 2007. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal compilation: The Society for Applied Microbiology* 45, p.168–173.

Villar, L.M., Esteves da Costa, M.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.

Vitral, C.L., Ospina, F.L., Artimos, S., Melgaço, J.G., Cruz, O.G., De Paula, V.S., et al., 2012. Declining prevalence of hepatitis A virus antibodies among children from low socioeconomic groups reinforces the need for the implementation of hepatitis A vaccination in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(5):652-8.

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

Vitral, C.L., Yoshida, C.F.T., Lemos, E.R.S., Teixeira, C.S., Gaspar, A.M.C., 1998. Age-specific Prevalence of Antibodies to Hepatitis A in Children and Adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of Prevalence to Environmental Factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, Vol. 93(1): 1-5.

Vizzotti, C., Pippo, T., Urueña, A., Altuna, J., Palópoli, G., Hernández, M.L., et al., 2015. Economic analysis of the single-dose immunization strategy against hepatitis A in Argentina. *Vaccine* 7;33, Suppl 1:A227-32.

Walker, C.M., Feng, Z., Lemon, S.M., 2015. Reassessing immune control of hepatitis A virus. *Curr Opin Virol* 11:7-13.

Wang, X., Ren, J., Gao, Q., Hu, Z., Sun, Y., Li, X., et al., 2015. Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature* Doi: 10.1038/nature13806.

Wang, C.H., Tschén, S.Y., Flehmig, B., 1996. Quantitative determination of immune response against hepatitis A virus capsids after natural infection. *Vaccine* 14(4):355-6.

Weitz, M., Siegl, G., 1985. Variation among hepatitis A virus strains. I. Genomic variation detected by T1 oligonucleotide mapping. *Virus Res* 4:53-67.

Werzberger, A., Mensch, B., Kuter, B., Brown, L., Lewis, J., Sitrin, R., *et al.*, 1992. A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. *New England Journal of Medicine* Waltham, v. 327, n. 7, p. 453- 457.

WHO., 2000a. Hepatitis A vaccine: WHO position paper. *Weekly epidemiological record* Geneva, v,75, n. 15, p. 37-44.

WHO., 2000b. World Health Organization. Hepatitis A. p. 1-36. Disponível em <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscredc/en/>. Acesso em: 20 de agosto de 2014.

Yong, H.T., Son, R., 2009. Hepatitis A virus – a general overview. *International Food Research Journal* 16: 455-467.

Yong, H. T., Son, R., 2000. Hepatitis A virus – a general overview. *International Food Research Journal* 16: 455-467.

Ximenes, R.A., Martelli, C.M., Amaku, M., Sartori, A.M., De Soárez, P.C., Novaes, H.M., *et al.*, 2014. Modelling the Force of Infection for Hepatitis A in an Urban Population-Based Survey: A Comparison of Transmission Patterns in Brazilian Macro-Regions. *PLoS One* 20;9(5):e94622.

Zelin, J., Garrett, N., Saunders, J., Warbourton, F., Anderson, J., Moir, K., 2008. An evaluation of the performance of OraQuick® ADVANCE rapid HIV-1/2 test in a highrisk population attending genitourinary clinics in East London, UK. *International Journal of Sexually Transmitted Diseases & Acquired Immunodeficiency Syndrome* 19:665-667.

## ANEXO I – COMITÊ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Investigação de surtos de hepatite A associados à transmissão intradomiciliar

**Pesquisador:** Vanessa Salete de Paula

**Área Temática:** Área 9. A critério do CEP.

**Versão:** 2

**CAAE:** 06109812.4.0000.5248

**Instituição Proponente:** Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 135.261

**Data da Relatoria:** 29/10/2012

**Apresentação do Projeto:**

A hepatite A constitui um dos principais problemas de saúde pública no Brasil. Nos últimos anos têm se verificado um aumento de surtos epidêmicos devido ao grande número de adultos susceptíveis à infecção graças à melhoria das condições de saneamento básico e abastecimento de água, o que dificulta o contato com o vírus na infância.

Por se tratar de uma doença onde a transmissão se dá pela via fecal-oral, a transmissão pessoa-pessoa é muito facilitada, especialmente quando há contato pessoal íntimo e prolongado dos doentes com indivíduos susceptíveis à infecção. Este fato, atrelado a ausência de boas práticas higiênicas e ao compartilhamento de objetos no ambiente domiciliar, podem corroborar para o desenvolvimento de ambiente propício para a disseminação da doença, o que vem sendo relatado em muitos artigos para outros agravos.

O presente estudo tem como objetivo realizar a investigação de surtos de hepatite A associados à transmissão intradomiciliar, para isso, pacientes do ambulatório de Hepatites Virais da FIOCRUZ, com etiologia comprovada por sorologia para a infecção causada pelo vírus da Hepatite A, serão convidados a participar do estudo juntamente com os seus familiares. Os indivíduos que aceitarem a participar do estudo e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido serão submetidos à coleta de sangue.

O RNA viral será extraído para realização da genotipagem viral por sequenciamento a fim de caracterizar molecularmente os isolados envolvidos nos surtos. A comprovação da transmissão pessoa-pessoa do caso primário aos seus contactantes será realizada através da homologia de

Endereço: Av. Brasil 4036 Sala 705

Bairro: Marunhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: etca@focruz.br

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC

sequências obtidas do HAV-RNA. Será realizado também a quantificação das partículas virais presentes nas amostras utilizando o Real Time PCR a fim de determinar a taxa de transmissão do HAV. Os dados obtidos com esse estudos poderão ser úteis para reiterar a necessidade da implementação da vacina de hepatite A no calendário de vacinação como uma forma eficaz de prevenir e interromper surtos, causando impacto na incidência geral da doença no país.

**Objetivo da Pesquisa:**

Investigar surtos intradomiciliares de hepatite A que ocorreram/ocorrerão no Rio de Janeiro.

Realizar a investigação epidemiológica dos surtos intradomiciliares;

Estabelecer a taxa de transmissão do HAV entre os casos primários e os contactantes;

Determinar a caracterização molecular do HAV-RNA em indivíduos expostos a surtos intradomiciliares;

Comprovar a transmissão pessoa-a-pessoa através da determinação do genótipo e homologia das seqüências nucleotídicas, e

Correlacionar as seqüências nucleotídicas encontradas com cepas do HAV seqüenciadas disponíveis no GenBank.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os possíveis riscos e desconfortos para os pacientes são aqueles relacionados com a coleta de sangue que serão minimizados por uma coleta realizada dentro das normas de biossegurança. Poderá haver pequenos hematomas, sangramento coagulado no local da punção venosa o que é comum na coleta de sangue.

Benefícios:

Os pacientes que participarem do estudo poderá obter o benefício pessoal de ser informado sobre o estado imunológico, a possível forma transmissão do vírus da hepatite A, além de estar contribuindo para o progresso da pesquisa científica sobre a hepatite A.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos e devidamente fundamentado. É do Grupo III, e, portanto, não necessita de submissão à CONEP antes de ser iniciado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Nessa segunda versão do projeto, a pesquisadora responsável incluiu os documentos solicitados no primeiro parecer.

**Recomendações:**

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade

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

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC

indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

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

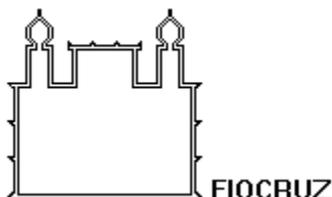
RIO DE JANEIRO, 31 de Outubro de 2012

---

**Assinador por:**  
**José Henrique da Silva Pilotto**  
**(Coordenador)**

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

## ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conforme a Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12 de dezembro de 2012)

Instituição; Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Projeto de Pesquisa: Hepatites de transmissão entérica e herpes vírus associados a casos agudos e fulminantes

Pesquisador: Dra Vanessa Salete de Paula, PhD. – Matrícula/MS:1555973

Eu-----  
e/ou meu responsável-----

fomos convidados a participar de um estudo que visa otimizar o diagnóstico das hepatites entéricas e dos herpes vírus relacionados ao quadro de hepatite aguda e fulminante. Estamos sendo informados de que existem diversos tipos de hepatite, sendo que a hepatite fulminante é uma forma rara da doença, na qual os sintomas são mais intensos e com consequências mais graves.

Fui informado que o objetivo deste trabalho será diagnosticar e caracterizar molecularmente as hepatites de transmissão entérica e herpes vírus associados a casos agudos e fulminantes. Para isto, será coletado 5 mL de sangue por punção venosa com auxílio de técnicos especializados. Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou edema no local.

No material coletado será realizada a pesquisa das hepatites entéricas e herpes vírus, dos anticorpos contra esses vírus e dos genes envolvidos na resposta a estas infecções, com a finalidade de compreendermos melhor os mecanismos de defesa contra estes. Estou sendo informado (a) que receberei o laudo dos exames e posso não ter benefício imediato dos resultados desta pesquisa, mas este trabalho pode esclarecer problemas relacionados a formas agudas e fulminantes das hepatites. Caso seja diagnosticado uma forma aguda mais severa das hepatites virais ou herpes serei encaminhado (a) a um ambulatório especializado de hepatologia da rede pública para acompanhamento.

Recebemos também informações de que as amostras que estão sendo fornecidas deverão ser armazenadas para que possam ser adequadamente utilizadas no decorrer da pesquisa e que as mesmas poderão ser utilizadas para pesquisas futuras. Recebemos as orientações de que temos a liberdade de participar ou não da pesquisa, sem que haja qualquer prejuízo no caso de não aceitarmos participar. A participação no estudo é voluntária e eu poderei me retirar a qualquer momento.

Declaro ter recebido informações a respeito deste estudo e autorizo o autor do projeto a utilizar uma amostra do material para realização de exames para hepatite e herpes para otimização do diagnóstico, a fim de esclarecer a etiologia da doença. Os resultados desta pesquisa será me fornecido de maneira confidencial, e será utilizados para publicação científica com sigilo da nossa identidade.

Caso tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento sobre o estudo você pode entrar em contato o pesquisador responsável ou com o comitê de ética:

Vanessa Salete de Paula - Pavilhão Helio e Peggy Pereira 2º andar, fone 2562 1876

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos-CEP Fiocruz-IOC  
Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz  
Avenida Brasil, 4.036 - S. 705 (Expansão)  
Manguinhos - Rio de Janeiro/RJ - CEP: 21.040-360  
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Assinatura do paciente -----

RG -----

Assinatura do responsável -----

RG -----

Vanessa Salete de Paula

Assinatura do pesquisador responsável

Data: -----

Testemunha 1:

Testemunha 2: