

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Márlisson Octávio da Silva Rêgo

**ESTABELECIMENTO DE ALGORITMOS PARA DIAGNÓSTICO E VIGILÂNCIA
DOS VÍRUS DAS HEPATITES A e E NO LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE
PÚBLICA DO ESTADO DO AMAPÁ**

Macapá

2015

PPGVS/INCQS
FIOCRUZ
2015

Márlisson Octávio da Silva Rêgo

**ESTABELECIMENTO DE ALGORITMOS PARA DIAGNÓSTICO E VIGILÂNCIA
DOS VÍRUS DAS HEPATITES A e E NO LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE
PÚBLICA DO ESTADO DO AMAPÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Vigilância Sanitária do Instituto da Nacional de
Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre
em Vigilância Sanitária

Orientadores: Jaqueline Mendes de Oliveira
Antônio Eugênio Castro Cardoso
Almeida

Macapá

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Rêgo, Márlisson Octavio da Silva

Estabelecimento de algoritmos para diagnóstico e vigilância dos vírus das hepatites A e E no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá. / Márlisson Octavio da Silva Rêgo – Macapá: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

67 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Orientadores: Jaqueline Mendes de Oliveira, Antônio Eugênio Castro Cardoso Almeida

1. Hepatite A. 2. Hepatite E. 3. Doenças Transmitidas pela Água. 4. Determinação. 5. Técnicas Imunoenzimáticas. 6. Vigilância Sanitaria. I. Título

Algorithms establishment for diagnosis and monitoring of hepatitis A and E viruses in the Central Laboratory of Public Health of the State of Amapá

Márlisson Octavio da Silva Rêgo

ESTABELECIMENTO DE ALGORITMOS PARA DIAGNÓSTICO E VIGILÂNCIA DOS
VÍRUS DAS HEPATITES A e E NO LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA
DO ESTADO DO AMAPÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas (Doutora)
Instituto Evandro Chagas

Gonzalo José Bello Betancor (Doutor)
Instituto Oswaldo Cruz

Silvia Maria Lopes (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Jaqueline Mendes de Oliveira (Doutora) - Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz

Antônio Eugênio Castro Cardoso Almeida (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico esse trabalho e todo meu esforço
ao Meu Senhor e Meu Deus, pois com
Ele tudo é possível!

AGRADECIMENTOS

Ao Meu Deus todo Poderoso que agradeço por me sustentar nos momentos mais difíceis e através Dele ter conseguido encontrar forças para persistir nessa caminhada tão conturbada.

A minha família: minha amada esposa Margarida Machado e meu amado filho Samuel Octávio, que são meus principais incentivadores e representam o alicerce da minha vida.

Aos meus pais Otavio Rêgo e Maria do Socorro Rêgo e ao irmão Márzio Rêgo que me apoiaram em todas as minhas decisões e sempre me motivaram a continuar a traçar os caminhos de minha vida.

Ao meu inesquecível e amado irmãozinho Michael Paulo da Silva Rêgo que sempre me motivou e me dava motivos para tentar ser sempre uma pessoa melhor. Estarei sempre “Perplexo!!!” meu irmão!!!!

A minha querida tia e colega de trabalho Dra. Sônia Chaves que sempre me orientou e me estendeu a mão em muitos momentos complicados dessa caminhada.

Aos amigos, Dr. Marcelo, Carlos e Sarah Salvador, do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, por toda amizade, apoio, carinho e ensinamentos durante o tempo que permaneci nessa renomada instituição.

Aos queridos amigos de trabalho dos Laboratórios de Virologia do LACEN-AP e do Laboratório Diagnose Análises Clínicas que direta e indiretamente me deram suporte nos momentos mais cansativos e preocupantes.

Aos amigos, em especial Lindomar dos Anjos, Márcia Cavalcante, Margarete, Carlos André Oeiras, Alex Gaia, Rute Maria e Aldenilson Pinheiro que muito me motivaram e ajudaram em momentos difíceis para o termino de meu trabalho.

A todos os colegas e amigos da Turma de Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária pela convivência e partilha dos momentos alegres, nervosos e sempre felizes ao final de cada módulo.

Agradeço também a toda equipe da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pelas disciplinas ofertadas, pelo potencial intelectual dos docentes, pelo excelente conteúdo programático, e por ter tido o privilégio de fazer parte do seleto grupo de discentes.

Ao Governo do Estado do Amapá (GEA), Secretaria de Estado da Saúde (SESA), Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN/AP), Escola de Administração Pública

(EAP/AP) e ao Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz.

A Dra. Ivanate Amanajas, Diretora Presidente do LACEN-AP, que com muito esforço e dedicação, conseguiu durante sua gestão transformar um sonho em realidade: Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária.

A Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira, o meu especial e eterno agradecimento. A senhora que mesmo com toda sua exigência sempre me acolheu com carinho e amizade. Ao final dessa dissertação só posso agradecer a Deus por tê-la colocado em minha vida e me dado tantos ensinamentos, foram ele pessoais e profissionais. Minha querida orientadora lhe agradecer pelo acolhimento nos momentos que estive no Rio para parte prática, pela grande paciência e principalmente pelo aprendizado proporcionado durante esses anos de estudo. Meu muito Obrigado!!!!!!

RESUMO

As infecções pelos vírus da hepatite A (HAV) e da hepatite E (HEV) permanecem como importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Ambos são transmitidos primariamente pela via fecal-oral, ingestão de água/alimentos contaminados, frequentemente associados a amplos surtos epidêmicos de veiculação hídrica. No Brasil, uma transição de alta para média endemicidade para a hepatite A tem sido observada com base em estudos de soroprevalência por faixa etária. Contudo, existem grupos populacionais que não foram beneficiados pelos recentes avanços econômicos que resultaram em melhoria das condições de saneamento. Localizado na região Norte, onde as condições de higiene e saneamento da população são em geral precárias, o estado do Amapá exhibe as mais altas taxas de incidência da infecção por HAV. No que diz respeito à hepatite E, não há dados disponíveis, uma vez que o algoritmo adotado para diagnóstico laboratorial de rotina não inclui a pesquisa dos marcadores sorológicos. Visando a implementação, no LACEN-AP, da metodologia aplicada no diagnóstico e vigilância laboratorial das hepatites virais agudas, um estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar (i) um método in-house para detecção de HAV RNA por RT-Nested PCR e ii) testes imunoenzimáticos comerciais para detecção de anticorpos das classes IgM e IgG específicos para HEV. A população de estudo incluiu 171 casos suspeitos de hepatite viral aguda recebidos no LACEN-AP, durante o período de março a dezembro de 2014. A viremia pode ser evidenciada pela detecção do HAV RNA em 59,06% das amostras (101/171) enquanto que pelo método imunoenzimático 55,55% (95/171) dos casos suspeitos tiveram o diagnóstico confirmado pela detecção do marcador sorológico anti-HAV IgM. A taxa de positividade para o HAV RNA foi mais alta entre as amostras reagentes para o anti-HAV IgM (70,5%) do que em amostras não reagentes para este marcador sorológico (44,7%). Por outro lado, 36,58% das amostras negativas para o HAV RNA tiveram resultado reagente para o anti-HAV IgM. A combinação desses 2 marcadores levou a um incremento do número de casos confirmados laboratorialmente, de 55 (55,5%) para 129 (75,4%). Houve predominância de indivíduos menores de 20 anos de idade (100/129), dos quais 43,4% estavam na faixa etária de 1 a 9 anos e 34,1% entre 10 e 19 anos. A maioria dos casos de hepatite A aguda (110/171) ocorreu nos bairros localizados em áreas alagadas (áreas de ressaca). Todas as amostras analisadas foram negativas para os marcadores anti-HEV IgM e IgG, de onde se presume que o HEV não esteja circulando nesta localidade, visto que as condições favoráveis à transmissão de vírus entéricos estão presentes como evidenciado pela alta endemicidade da hepatite A na população estudada.

Palavras-chave: Hepatite A, Hepatite E, veiculação hídrica, Macapá-AP.

ABSTRACT

Hepatitis A virus (HAV) and hepatitis E virus (HEV) infections remain as important causes of morbidity and mortality worldwide. Both viruses are transmitted primarily *via* fecal-oral route, through the ingestion of contaminated water/food, and are frequently associated to waterborne outbreaks, usually with high attack rates. In Brazil, a transition from high to moderate endemicity of HAV infection has been observed as indicated by age-related seroprevalence studies. However, there are population groups that are not benefited from the recent economic and sanitation improvements. The Northern state of Amapá where the hygiene and sanitation conditions are poor, displays the highest incidence rates of HAV infection. With regard to hepatitis E, no data is available, since the algorithm adopted for routine laboratory diagnosis does not include search of serological markers of infection with HEV. For the implementation, in LACEN-AP, of the methodology applied to diagnosis and laboratory surveillance of acute viral hepatitis, a study was conducted with the objective of assessing (i) an in-house method for HAV RNA detection by RT-nested PCR, and ii) commercial enzyme immunoassays for antibodies of the IgM and IgG specific for hepatitis E virus (HEV). The study population included 171 suspected cases of acute viral hepatitis prospectively referred to LACEN-AP during the period from March to December 2014. The viremia may be evidenced by the detection of HAV RNA in 59.06% of samples (101/171) while the enzyme immunoassay method 55.55% (95/171) of suspected cases had the diagnosis confirmed by serological detection of anti-HAV IgM marker. The positivity rate for HAV RNA was highest among the positive samples for anti-HAV IgM (70.5%) than in negative for this serological marker samples (44.7%). Moreover, 36.58% of samples negative for HAV RNA were positive result for IgM anti-HAV. The combination of these two markers has led to an increase in the number of laboratory confirmed cases, 55 (55.5%) 129 (75.4%). There was a predominance of children under the age of 20 subjects (100/129), of which 43.4% were aged 1-9 years and 34.1% between 10 and 19 years. Most cases of acute hepatitis A (110/171) occurred in neighborhoods located in flooded areas (surf areas). All analyzed samples were negative for anti-HAV IgM and IgG markers, where it is assumed that HEV is not circulating in this location, because conditions favorable to the transmission of enteric viruses are present as evidenced by high endemic hepatitis A in population studied.

Palavras chaves: Hepatitis A, Hepatitis E, waterborne, Macapá-AP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema representativo da organização do genoma do vírus da hepatite A.....	15
Figura 2	Esquema representativo da organização do genoma e das proteínas do vírus da hepatite E.....	17
Figura 3	Parte de mapa sobre ressacas elaboradas pelo geoprocessamento da SEMA-AP.....	20
Figura 4	Distribuição percentual de casos confirmados de hepatite A por região no Brasil.....	22
Figura 5	Distribuição geográfica dos genótipos do HEV.....	23
Figura 6	Marcadores sorológicos para diagnóstico de infecção pelo HAV.....	26
Figura 7	Marcadores para diagnóstico da Hepatite E.....	28
Figura 8	Estado do Amapá e municípios.....	33
Figura 9	Distribuição de amostras clínicas obtidas de casos suspeitos de hepatite viral aguda de acordo com o bairro de residência no município de Macapá-AP, 2014.....	44

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Percentual de domicílios atendidos por rede de esgoto sanitário no Brasil-2008.....	19
Quadro 2	Aspectos clínicos e epidemiológicos das hepatites A e E.....	30
Quadro 3	Preparo das misturas de reação de PCR para detecção do HAV (sequências-alvo correspondentes à região VP1/2A)	39
Quadro 4	Preparo da mistura de reação de One-Step PCR para detecção do HEV (sequências-alvo correspondentes às regiões ORF1 e ORF2).....	40
Quadro 5	Preparo das misturas de reação de Nested PCR para detecção do HEV (sequências-alvo correspondentes às regiões ORF1 E ORF2).....	41
Tabela 1	Dados sociodemográficos dos indivíduos com suspeita de hepatite viral aguda. LACEN – AP, 2014.....	42
Tabela 2	Comparação entre os resultados dos métodos RT-PCR e imunoensaio, para detecção dos marcadores anti-HAV IgM e HAV RNA, na confirmação laboratorial da hepatite A aguda. LACEN – AP, 2014.....	46
Tabela 3	Perfil dos marcadores anti-HAV IgM e HAV RNA para o vírus da hepatite A em indivíduos com suspeita de hepatite viral aguda. LACEN – AP, 2014.....	47
Tabela 4	Distribuição dos casos confirmados de hepatite viral aguda de acordo com características sociodemográficas. LACEN – AP, 2014.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransaminase
anti-HAV	Anticorpos específicos para o vírus da hepatite A
anti-HAV IgG	Anticorpos IgG específicos para o vírus da hepatite A
anti-HAV IgM	Anticorpos IgM específicos para o vírus da hepatite A
anti-HEV	Anticorpos específicos para o vírus da hepatite E
anti-HEV IgG	Anticorpos IgG específicos para o vírus da hepatite E
anti-HEV IgM	Anticorpos IgM específicos para o vírus da hepatite E
AST	Aspartato aminotransaminase
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNC	Doença de notificação compulsória
ELISA	Teste imunoenzimáticos para detecção de anticorpos
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
HAV	Vírus da hepatite A
HEV	Vírus da hepatite E
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IgG	Imunoglobulinas da classe G
IgM	Imunoglobulinas da classe M
IME	Imunomicroscopia eletrônica
LACEN-AP	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá
mL	mililitro
°C	Grau Celsius
µl	Micro litro(s)
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PNI	Programa Nacional de Imunização
POP	Procedimento Operacional Padrão
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
RT-Nested PCR	Reação de Transcrição reversa seguida de Nested PCR
UF	Unidade Federativa
VIGEP-AP	Vigilância Epidemiológica do Estado do Amapá

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 HISTÓRICO.....	14
1.2 OS AGENTES ETIOLÓGICOS.....	15
1.2.1 O vírus da hepatite A.....	15
1.2.2 O vírus da hepatite E.....	16
1.3 MODOS DE TRANSMISSÃO.....	17
1.3.1 Áreas de Ressacas.....	19
1.4 EPIDEMIOLOGIA.....	20
1.4.1 Padrões de endemicidade do HAV.....	20
1.4.2 Padrões de endemicidade do HEV.....	22
1.5 APRESENTAÇÕES CLÍNICAS.....	24
1.5.1 Aspectos clínicos da hepatite A.....	24
1.5.2 Aspectos clínicos da hepatite E.....	24
1.6 DIAGNOSTICO LABORATORIAL.....	25
1.7 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	28
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	33
4.2 MÉTODOS	34
4.2.1 Testes sorológicos	34
4.2.1.1 Detecção de anticorpos específicos HAV IgM.....	34
4.2.1.2 Detecção de anticorpos específicos HEV IgM e IgG.....	35
4.2.1.3 Teste complementar para confirmação da reatividade anti-HEV.....	36
4.2.2 Testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos.....	37
4.2.2.1 Extração de ácidos nucleicos.....	37
4.2.2.2 Reação de transcrição reversa.....	38
4.2.2.3 Nested PCR para detecção do HAV.....	38
4.2.2.4 One-step RT PCR para detecção do HEV.....	40
4.2.2.5 Nested PCR para detecção do HEV.....	41

4.3 ANÁLISE DE DADOS E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS.....	42
4.4 ASPECTOS ÉTICOS.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS.....	43
5.2 INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA.....	45
5.2.1 Detecção de anticorpos específicos para o vírus da hepatite A (HAV).....	45
5.2.2 Detecção de anticorpos específicos para o vírus da hepatite E (HEV).....	45
5.3 INVESTIGAÇÃO VIROLÓGICA.....	46
5.3.1 Detecção do vírus da hepatite A.....	46
5.3.2 Detecção do vírus da hepatite E.....	50
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÕES.....	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
APÊNDICE 1.....	63
APÊNDICE 2.....	65

1 INTRODUÇÃO

As hepatites virais são doenças infecciosas causadas por diferentes agentes etiológicos com tropismo primário pelo tecido hepático, tendo o homem como único reservatório importante e apresentando características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais distintas. A sua distribuição é universal, com variações de acordo com os agentes determinantes e tendo como principais vírus: A, B, C, D e E. Os vírus B, C e D são transmitidos mais frequentemente por via sexual, parenteral, percutânea e vertical e os vírus da hepatite A e E são transmitidos primariamente pela via fecal-oral (GOMES et al, 2012)

As hepatites virais passaram a ser consideradas doença de notificação compulsória (DNC) a partir de 8 de dezembro de 2003, quando foi publicada pelo Ministério da Saúde do Brasil a Portaria nº 2325 que definiu a relação de DNCs para o território nacional. Os vírus das hepatites A e E representam a principal causa de hepatite viral aguda em todo o mundo, principalmente em regiões com níveis precários de saneamento e higiene (CRUZ et al, 2009).

A América Latina, e em particular o Brasil, era considerada uma área de risco para hepatite A segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (FERREIRA, SILVEIRA, 2004). De acordo com o último Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais (Ministério da Saúde, 2012), nos últimos dez anos, a taxa de incidência da hepatite A vem decrescendo no país desde o ano de 2006, quando se registraram 9,1 casos por 100 mil habitantes e no ano de 2010, a taxa verificada foi de apenas 3,6 casos da doença por 100 mil habitantes. Em relação às regiões, a Norte apresentou a maior taxa (11,8), seguida pela região Sul (4,3), região Centro Oeste (4,0), região Nordeste (3,7), e região Sudeste (1,4). (<http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>). No entanto, em algumas áreas endêmicas 100% das pessoas investigadas apresentam anticorpos IgG (anti-HAV IgG), indicativos de exposição prévia ao vírus comprovando a alta disseminação da doença (GOMES et al, 2012).

Outro importante agravo à saúde pública são as infecções causadas pelo vírus da hepatite E (HEV), que representa uma importante causa de hepatite viral aguda, insuficiência hepática fulminante, cirrose e outras complicações clínicas. Este vírus tem causado grandes surtos epidêmicos na Ásia, na África e na América Latina, onde há relatos da detecção e caracterização de cepas do HEV em países como Argentina, Bolívia, Venezuela, Uruguai e Brasil (ECHEVARRÍA et al, 2013; MIRAZO et al, 2014).

1.1 HISTÓRICO

As hepatites virais têm sido descritas desde a antiguidade. Existem referências à ocorrência de casos de doença icterica na China há mais de 5.000 anos e de surtos em populações na Babilônia há mais de 2.500 anos. Segundo escritos de Hipócrates, que viveu no século IV antes de Cristo, a icterícia teria provavelmente origem infecciosa e o acúmulo de líquido no abdômen seria consequência da cronicidade da doença no fígado (FONSECA, 2010).

Nos séculos seguintes, as epidemias de icterícia tornaram-se frequentes e coincidiam com períodos de guerra que comprometiam seriamente as condições sanitárias. Daí a origem dos termos “icterícia de campanha”, em uso desde a Idade Média e “doença do soldado”, de introdução mais recente (KUNTZ, KUNTZ, 2002). Durante a Segunda Guerra mundial estima-se que cerca de dezesseis milhões de pessoas foram acometidas e, embora não se conhecesse o agente etiológico envolvido, as evidências sugeriam que se tratava de uma doença infecciosa causada por vírus que podia se apresentar com formas clínicas e epidemiológicas diferentes e que se transmitiam por contato pessoal provavelmente por via fecal-oral (hepatite infecciosa). Na ocasião utilizaram-se os termos hepatite A, para a doença que se transmitia por via fecal-oral (hepatite infecciosa), e hepatite B, para aquela transmitida por via parenteral (hepatite sérica) (FONSECA, 2010). Tinha-se uma ideia clara sobre a etiologia viral, mas não se havia segurança se os vírus eram os mesmos, até que finalmente Feinstone e cols. conseguiram visualizar por imunomicroscopia eletrônica (IME), em amostras de fezes de pacientes portadores de hepatite infecciosa na fase aguda (SILVA, 2005), o vírus da hepatite A (HAV).

Dez anos depois da identificação do vírus da hepatite A, um novo vírus - o vírus da hepatite E - foi visualizado por IME nas fezes de um voluntário previamente infectado com material fecal obtido de pacientes com suspeita de hepatite de transmissão entérica inicialmente classificada como hepatite não- A, não- B (BALAYAN et al, 1983). No entanto, a primeira grande epidemia causada por este vírus de veiculação hídrica, que na época havia sido erroneamente atribuída ao HAV, ocorreu em Nova Delhi (Índia), entre 1955 e 1956 (VISHWANATHAN, *apud* CHANDRA et al, 2008). Posteriormente, a análise retrospectiva dos soros armazenados desta epidemia, não demonstrou a presença de marcadores sorológicos específicos para a hepatite A (nem para a hepatite B). Esta nova doença foi durante muitos anos conhecida como hepatite não- A, não- B e assim aumentaram as evidências da existência

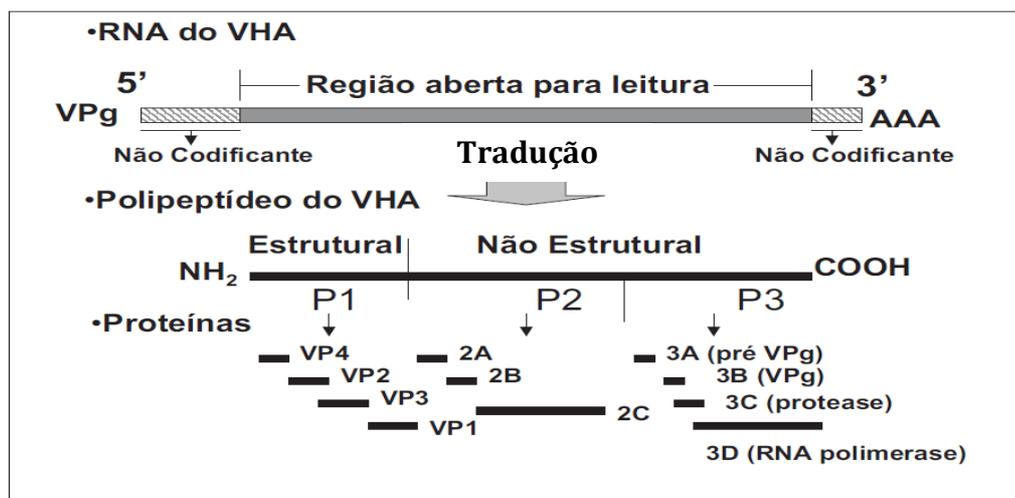
de uma nova forma de hepatite viral, transmitida pela água que mais tarde se passou a ser designada como Hepatite E (PURCELL, EMERSON, 2001).

1.2 OS AGENTES ETIOLÓGICOS

1.2.1 O vírus da hepatite A

O HAV está classificado na família *Picornaviridae*, sendo o representante único do gênero *Hepatovirus* (MINOR, 1991). Apresenta um nucleocapsídeo icosaédrico não envelopado, medindo de 27 nm a 32 nm de diâmetro. O genoma é constituído de ácido ribonucleico (RNA), com aproximadamente 7,5 Kb, linear, de fita simples e polaridade positiva. Esse genoma é dividido em três regiões conforme descrito na Figura 1: a região 5' não codificante, uma fase de leitura aberta (ORF, do inglês "Open Reading Frame") longa, que codifica para as proteínas estruturais VP2, VP3 e VP1, que compõem o capsídeo viral. Os segmentos P2 e P3 da ORF codificam para as proteínas não estruturais necessárias para a replicação do HAV (MARTIN, LEMON, 2006).

Figura 1. Esquema representativo da organização do genoma do vírus da hepatite A



Fonte: Adaptado de PEREIRA, GONÇALVES (2003).

Em estudos de avaliação da variação genética entre as amostras, a região VP1/2A, é a região que apresenta variabilidade. Existem sete genótipos, o I (IA e IB), II, III (IIIA e IIIB), IV, V, VI e VII, sendo que as amostras pertencentes a um mesmo genótipo têm pelo menos 85% de identidade na sequência de bases. Os genótipos mais frequentemente encontrados nas infecções humanas são dos tipos I e III (PEREIRA, GONÇALVES, 2003). Uma característica importante deste vírus é que o mesmo permanece infectante após o congelamento (SEYMOUR, APPLETON, 2001), mas por outro lado, desinfetantes a base de aldeídos são bastante eficientes para inativar o vírus, assim como irradiação ultravioleta e formalina (LEMON, 1992).

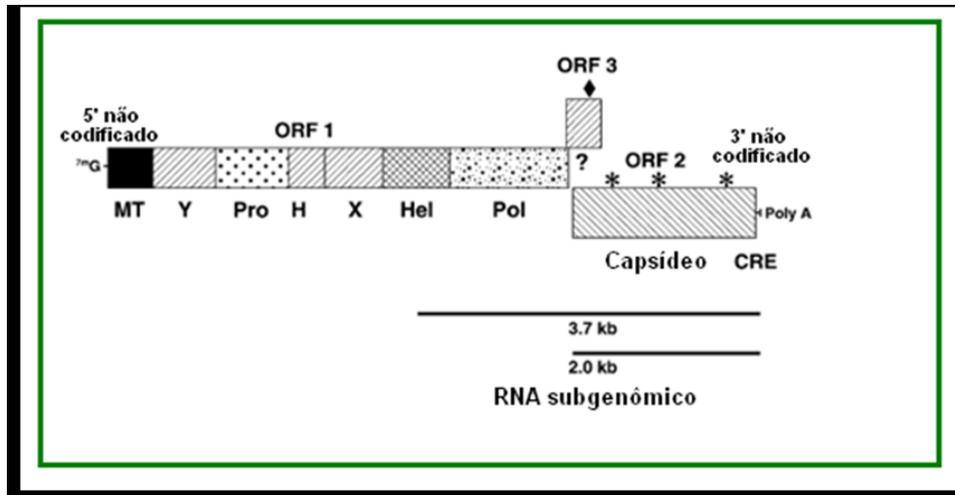
1.2.2. O vírus da hepatite E

O vírus da hepatite E atualmente é classificado como único membro da Família *Hepeviridae*, gênero *Hepevirus* (EMERSON, 2005). Os vírions do HEV são pequenos, não envelopados, com 30-34 nm de diâmetro e capsídeo com simetria icosaédrica. O genoma do HEV, conforme Figura 2, consiste em uma molécula de RNA fita simples, de sentido positivo e com aproximadamente 7,2 Kb. Essa molécula é limitada em uma das extremidades pela região 5', que contém a estrutura CAP, e na outra extremidade pela região 3', que possui uma cauda poli (A). Este genoma possui três sequências abertas de leitura (ORF1, ORF2, ORF3), que originam proteínas estruturais e não estruturais do vírus (TAM et al, 1991).

No citoplasma celular, a ORF1 localizada próxima à extremidade 5' do RNA genômico é traduzida para produzir uma poliproteína que, após clivagem, origina as proteínas não estruturais com atividade enzimática envolvidas na replicação, transcrição e processamento das proteínas (EMERSON, PURCELL, 2007b). Moléculas de RNA mensageiro subgenômico são transcritas da cópia negativa do RNA para produzir as proteínas da ORF2 e ORF3. A ORF2, localizada próxima da porção 3' do genoma, codifica assim a proteína do capsídeo viral, que contém epítomos imunogênicos indutores de anticorpos neutralizantes que constituem um alvo para o desenvolvimento de vacinas (MENG, 2010b). A proteína da ORF3 não é necessária para a replicação do vírus, montagem do vírion ou para infecção em cultivo celular (EMERSON, PURCELL, 2007b). As funções dessa proteína ainda não estão bem definidas, mas existem três funções propostas: i) promoção de sobrevivência celular, ii) ação moduladora de resposta imune durante a fase aguda da infecção, iii)

promoção da secreção de uma proteína imunossupressora que pode agir na vizinhança da célula infectada (OKAMOTO, 2007).

Figura 2. Esquema representativo da organização do genoma e das proteínas do vírus da hepatite E



Fonte: (PURCELL, EMERSON, 2008)

São conhecidos até o momento quatro genótipos. O genótipo 1 é encontrado em amostras de origem humana, da Ásia e da África; o genótipo 2 é proveniente do México (amostra protótipo) e do continente africano (Chad e Nigéria); o genótipo 3 que inclui amostras de origens humana e animal procedentes da Europa, Ásia, Oceania, América do Sul e América do Norte (EUA); e o genótipo 4 que também agrega vírus de origem humana e animal provenientes da China, Japão, Taiwan e alguns países europeus, como Alemanha, França e Bélgica (SANTOS et al., 2013).

1.3 MODOS DE TRANSMISSÃO

A distribuição mundial da hepatite A apresenta diferentes níveis de endemicidade e está diretamente relacionada com as condições sanitárias e socioeconômicas da população. O HAV é transmitido por via fecal-oral e tem como principal modo de transmissão o contato próximo com pessoas infectadas e a ingestão de alimentos ou água contaminada. O vírus é excretado nas fezes dos indivíduos infectados, que na fase aguda da infecção podem eliminar até 10^{11} partículas virais por grama de fezes. Condições precárias de higiene e saneamento

facilitam a transmissão do vírus devido à alta resistência do HAV em ambiente aquático sendo frequentemente associado a surtos (BOSCH *et al.*, 1991), o que é muito facilitado pela precariedade da Rede de Abastecimento de água (taxa de 50 – 69,9%) e da Rede de Esgoto Sanitário no Estado do Amapá (taxa de 3,8%) de população atendida, conforme o Quadro 1 (IBGE, 2010).

O vírus da hepatite E, assim como o vírus da hepatite A, apresenta como o principal modo de transmissão para os genótipos 1 e 2 a ingestão de água contaminada. Os indivíduos contaminados eliminam o vírus entericamente durante a fase aguda da doença e contribuem para manutenção do vírus no ambiente com uma quantidade de vírus excretada chegando a 10^8 cópias de genoma por miligramas de fezes (TEO, 2007). Por outro lado, os genótipos 3 e 4 do vírus, circulam zoonoticamente entre o homem e outros mamíferos, principalmente suínos, roedores e animais domésticos como aves. Esses animais representam prováveis fontes de contágio ao homem caracterizando uma doença zoonótica transmitida a partir de um reservatório animal (MENG, 2011).

Quadro 1: Percentual de domicílios atendidos por rede de esgoto sanitário no Brasil- 2008

Grandes Regiões e Unidades da Federação	População atendida (%)	Grandes Regiões e Unidades da Federação	População atendida (%)
Brasil	40,0		
Norte	2,8	Sergipe	23,2
Rondônia	1,7	Bahia	21,7
Acre	8,4	Sudeste	63,6
Amazonas	1,8	Minas Gerais	52,4
Roraima	12,0	Espírito Santo	32,3
Pará	2,7	Rio de Janeiro	54,0
Amapá	3,5	São Paulo	75,3
Tocantins	1,3	Sul	26,1
Nordeste	17,7	Paraná	31,4
Maranhão	7,8	Santa Catarina	13,4
Piauí	3,7	Rio Grande do Sul	27,7
Ceará	20,2	Centro-Oeste	33,1
Rio Grande do Norte	12,3	Mato Grosso do Sul	10,3
Paraíba	22,8	Mato Grosso	12,4
Pernambuco	21,1	Goiás	30,6
Alagoas	10,1	Distrito Federal	87,7

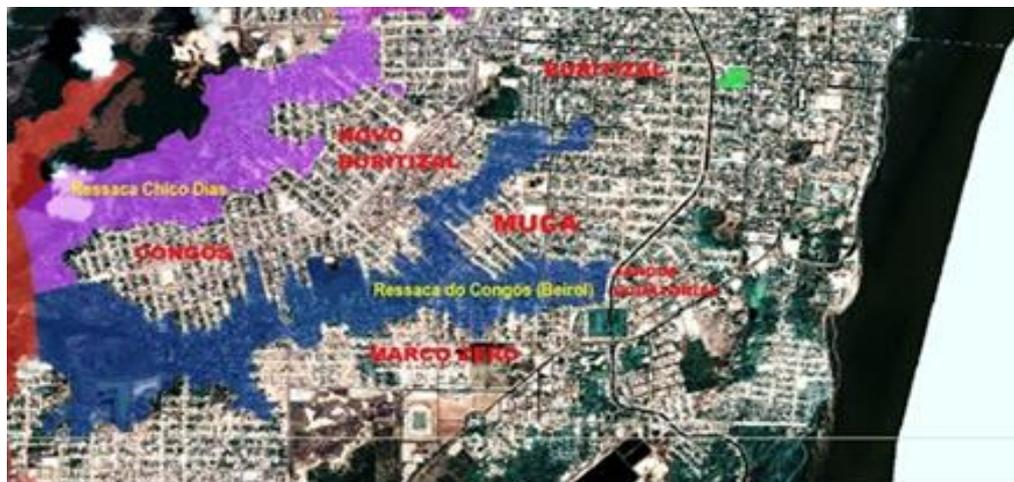
Fonte: IBGE, 2010.

1.3.1 Áreas de Ressacas

As condições de esgoto no Estado do Amapá possuem uma particularidade quando se observa a presença de áreas de ressacas nos municípios de Macapá e Santana. O termo ressaca é usado regionalmente para designar um ecossistema típico da zona costeira do Amapá que se caracteriza como áreas encaixadas em terrenos quaternários, que se comportam como

reservatórios naturais de água. Caracterizam-se como um ecossistema complexo e distinto, sofrendo os efeitos da ação das marés, por meio de uma intrincada rede de canais e igarapés, do ciclo sazonal das chuvas, apresentando por isso, uma estação de cheia (janeiro a junho) e outra de seca (agosto a dezembro) (NERI, 2004). No texto da Lei Ambiental Nº 948/98 do Município de Macapá, as ressacas são definidas como: “bacias de acumulação de águas, influenciadas pelo regime de marés, de rios e drenagens pluviais” possuindo vários bairros que circulam as áreas de ressacas (NERI, 2004). Na Figura 3 vários bairros como Congós, Novo Buritizal, Buritizal, Muca e Marco Zero estão ao redor de uma área de ressaca conhecida como “Ressaca do Congós”. As condições de saneamento básico, nessas áreas, são incipientes e apresentam um abastecimento de água bastante restrito, e grande parte desses domicílios são abastecidos por poços ou por meio de ligações clandestinas que muitas vezes por intermédio de vazamentos entram em contato direto com a água poluída. Essas áreas apresentam toda uma condição favorável para o comprometimento da qualidade da água de consumo, da higiene pessoal e doméstica, favorecendo a transmissão das doenças infecciosas e de veiculação hídrica como as hepatites A e E (NERI, 2004).

Figura 3: Parte de mapa sobre ressacas elaboradas pelo geoprocessamento da SEMA-AP



Fonte: <http://castelorogeter.blogspot.com.br/2013/04/bairros-de-macapa-o-muca.html>

1.4 EPIDEMIOLOGIA

1.4.1 Padrões de endemicidade do HAV

O HAV é o principal responsável por quadros de hepatite aguda viral em crianças (BATRA et al, 2002) e também por 75% de todos os casos de hepatite viral no mundo. Essa doença apresenta distribuição mundial, ocorrendo com maior frequência em locais onde o desenvolvimento socioeconômico é baixo. Os países em desenvolvimento apresentam elevada incidência da doença, sendo que a maioria da população sofre a infecção precocemente, na primeira década de vida (LUIZ et al, 2003). Em regiões menos desenvolvidas, as pessoas são expostas ao vírus em idades precoces, apresentando formas subclínicas ou anictéricas em crianças com idade pré-escolar. A transmissão poderá ocorrer 15 dias antes do aparecimento dos sintomas até sete dias após o início da icterícia (BRASIL, 2005).

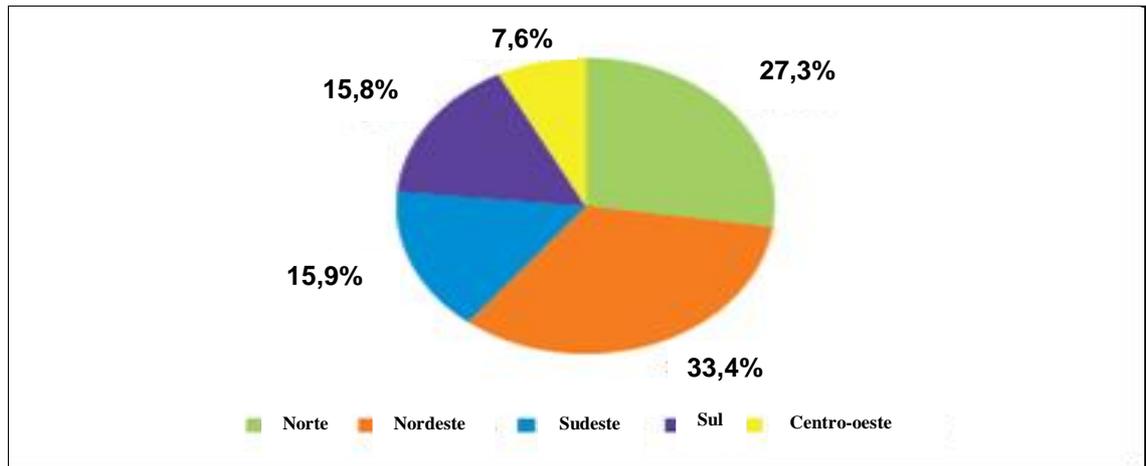
Cerca de 1,5 milhão de casos clínicos de hepatite A ocorre em todo o mundo anualmente, mas a taxa de infecção é provavelmente dez vezes maior. A taxa de incidência está fortemente relacionada com indicadores socioeconômicos e ao acesso a água potável. A associação de risco de infecção pelo HAV com os padrões de higiene, saneamento, expressão da doença e a imunidade ao longo da vida determinam os diferentes padrões de infecção os quais são alta, intermediária e baixa endemicidade (FRANCO et al, 2012).

Áreas de alta endemicidade incluem a maior parte da África, Ásia, América Central e do Sul. As regiões de endemicidade intermediária ocorrem em países com melhores condições sanitárias, onde a incidência é intermediária e a maioria dos casos ocorre no final da infância e início da adolescência. Nessas regiões a hepatite aguda sintomática é mais frequente representando risco para os suscetíveis não vacinados e surtos epidêmicos podem ocorrer devido à contaminação acidental de alimentos e água. As áreas de baixa endemicidade incluem os países desenvolvidos, tais como a América do Norte, países da Europa ocidental, Austrália e Japão (FRANCO et al, 2012).

A hepatite A continua sendo uma preocupação em nível de saúde pública no Brasil e no mundo, tanto pelo número de indivíduos atingidos, como pela possibilidade de complicação das formas agudas. Uma importante característica das hepatites virais é sua distribuição heterogênea nas diferentes regiões brasileiras, dadas às especificidades dos agentes etiológicos, mecanismos de transmissão e evolução clínica (www.aids.gov.br/sites/default/files/Metas_hepatites.pdf). Em algumas regiões houve uma mudança de endemicidade de alta para média, e isto se deve ao desenvolvimento econômico nos últimos anos que resultou em melhorias no padrão sanitário, como por exemplo, nas regiões nordeste, sul e sudeste do Brasil. Entretanto, a região norte continua exibindo um padrão de alta endemicidade (FRANCO et al, 2012).

No ano de 2010, foi notificado o quantitativo de 6.884 casos de Hepatite A no Brasil e a maioria dos qual na Região Nordeste (33,4%) e na Região Norte (27,3%) seguidos pelas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (BRASILa, 2012), conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4 - Distribuição percentual de casos confirmados de hepatite A por região no Brasil



Fonte: Boletim Epidemiológico hepatites virais 2010 - Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS.

Com relação à taxa de incidência por 100.000 habitantes nas Unidades Federativas do Norte (UF), constata-se que o Estado do Amapá tem a maior taxa segundo dados do ano de 2010 (37,8) e dentre as capitais da região Norte, no mesmo ano, observaram-se as maiores taxas de incidência de casos de hepatite A por 100.000 habitantes em Boa Vista/RR (31,3) seguida por Macapá/AP (22,4), Manaus/AM (15,1) e Palmas/TO (12,3) (BRASILa, 2012).

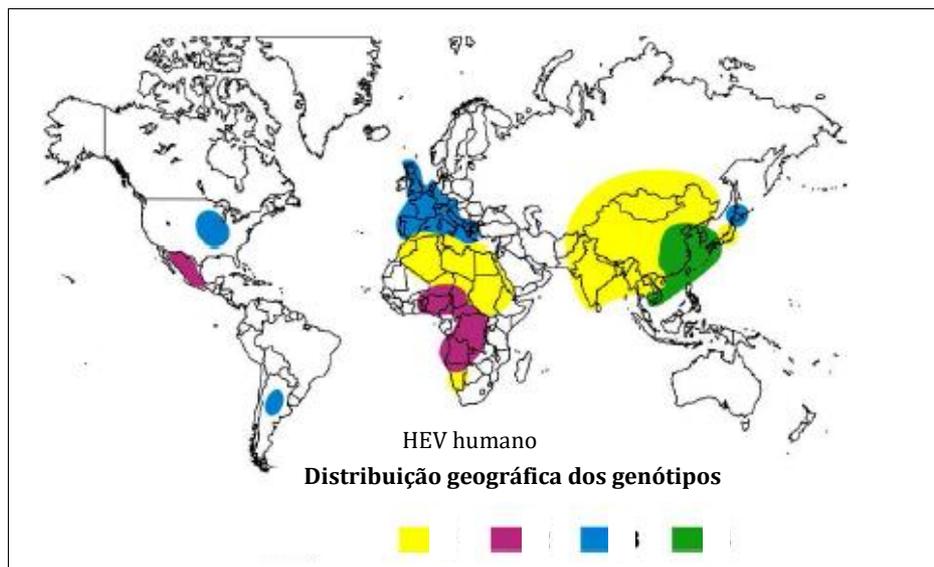
1.4.2 Padrões de endemidade do HEV

A infecção pelo HEV é mais comum em países em desenvolvimento, onde a infraestrutura de saneamento básico é inadequada ou inexistente. Sua distribuição geográfica no planeta é dependente das condições socioeconômicas, sendo prevalente em áreas em desenvolvimento, tais como África, Índia, México e Oriente Médio (SANTOS et al, 2013).

Conforme mostra a Figura 5 a distribuição e as epidemias de hepatite E associadas ao genótipo 1 foram relatadas no Sudeste e Centro Asiático, Norte, Leste e Oeste da África (BRYAN et al., 2002). O genótipo 2 foi descrito no México e em epidemias da África

Central. O genótipo 3 foi encontrado na América do Norte e do Sul, em regiões da Europa e do Japão e um aumento significativo no relato de casos autóctones associados ao genótipo 3 tem sido descritos em alguns países da Europa, Oceania e das Américas do Norte e do Sul (SCHLAUDER et al., 2000). O genótipo 4 foi descrito na China, Japão, Taiwan e Vietnã (PURCELL; EMERSON, 2008).

Figura 5: Distribuição geográfica dos genótipos do HEV



Fonte: PURCELL; EMERSON, 2008

No Brasil, mesmo com ambiente favorável para replicação e manutenção do vírus, nunca foram descritos surtos de hepatite E, mas estudos de soroprevalência demonstraram a evidência de anticorpos anti-HEV em diferentes grupos populacionais, como por exemplo: em mineiros na Bacia Amazônica (6,1%), em pacientes submetidos à hemodiálise em São Paulo (4,9%) e em 29% dos casos de hepatite viral aguda em Salvador na Bahia (TRINTA et al, 2001). No Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais/Fiocruz-RJ, entre janeiro de 1994 a dezembro de 1996, foram diagnosticados 147 casos de hepatite viral aguda não A-C, com prevalência de anti-HEV de 2,1%. No Rio de Janeiro, foi observada prevalência de 2,4% para anti-HEV na comunidade de Manguinhos e estudos realizados com usuários de drogas não-injetáveis e injetáveis, também deste estado, revelaram prevalências de 6,5% e 11,8%, respectivamente (TRINTA et al, 2001).

De acordo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, entre os anos de 1999 e 2009, foram registrados 810 casos de hepatite E. No entanto, é provável que esse número de casos notificados baseado no critério de definição de caso apenas na detecção de anticorpos

IgM e/ou IgG) não represente a real incidência da hepatite E no país, levando em consideração a falta de um algoritmo apropriado à definição de caso de hepatite E aguda (BRASILa, 2012).

1.5 APRESENTAÇÕES CLÍNICAS

1.5.1 Aspectos clínicos da hepatite A

As manifestações clínicas da hepatite A na fase pré-ictérica são caracterizadas por mal-estar, cefaléia, febre baixa, fadiga intensa, mialgia, náuseas, artralgia, vômitos, dor abdominal e inapetência. O desenvolvimento de icterícia e colúria ocorrem dentro de uma a duas semanas após o início do período prodrômico em um número superior a 90% dos pacientes, porém, ressalta que, na fase da convalescença, a icterícia começa a desaparecer, mas pode persistir de quatro a seis semanas. O período de incubação da doença é em torno de 15 a 45 dias e o de transmissão ocorre desde a 2^a semana antes do início dos sintomas, até o final da 2^a semana de doença (SILVA, 2001). A doença é geralmente autolimitada com recuperação clínica e bioquímica completa em cerca de 60% dos doentes em dois meses e em quase 100% dos doentes em seis meses (COTTER, 2003).

1.5.2 Aspectos clínicos da hepatite E

Do mesmo modo que nas hepatites agudas ocasionadas por outros vírus hepatotrópicos, na hepatite E há uma elevação importante das aminotransaminases que decairão lentamente nas semanas seguintes. As bilirrubinas podem estar elevadas, com predomínio de sua forma conjugada (SILVA, 2011). A hepatite E apresenta-se, geralmente, de forma aguda e autolimitada, sua gravidade pode variar desde a forma inaparente até a fulminante. Os sinais e sintomas, assim como nas outras hepatites virais, incluem: icterícia, colúria, dor localizada no quadrante superior direito do abdome acompanhada de náuseas, vômitos e febre (KAMAR et al, 2008).

Em regiões endêmicas para os genótipos 1 e 2, a doença tem sido associada a uma alta incidência de formas sintomáticas entre as mulheres grávidas, as quais apresentam maior risco de desenvolvimento de hepatite fulminante resultando em uma alta taxa de mortalidade. As gestantes infectadas podem apresentar complicações obstétricas, tais como eclampsia e hemorragia, com ou sem insuficiência hepática aguda, geralmente resultando em aborto espontâneo. Apenas os genótipos tipos 1 e 2 parecem estar implicados na alta taxa de mortalidade durante a gravidez, mas com um mecanismo ainda desconhecido. O genótipo 3 pode causar infecções mais prolongadas, no qual o HEV RNA persiste no soro e/ou fezes por até 6 meses após a infecção em pacientes imunocomprometidos, como por exemplo, nos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e indivíduos transplantados podendo levar à cirrose nesses pacientes (ABRAVANEL et al, 2013).

1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

No diagnóstico das hepatites virais agudas, independente da etiologia, os exames inespecíficos mais significativos são: exame de urina (urinálise), avaliação das fezes, hemograma, aferição das aminotransferases e das enzimas de origem canalicular, dosagem da bilirrubina, realização de provas de coagulação do sangue, mensuração da albumina e da velocidade de hemossedimentação (GOMES et al, 2012).

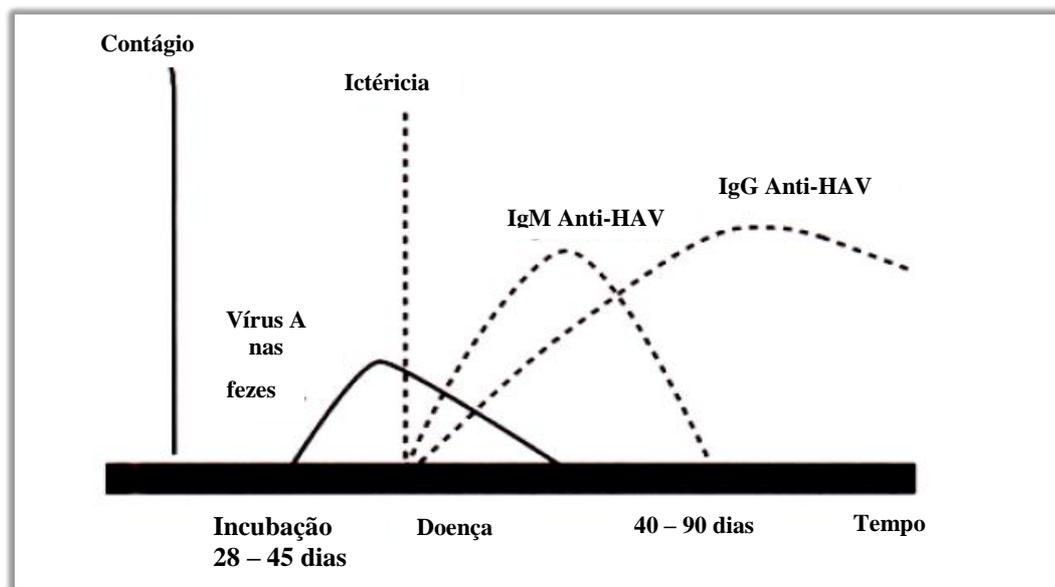
No exame de urina deve-se observar que a bilirrubinúria que precede a icterícia, o urobilinogênio se encontra ausente no pico da icterícia e no exame de fezes pode ocorrer esteatorreia moderada. No caso do hemograma sempre observar leucopenia, com linfopenia e neutropenia, sendo que até 30% dos pacientes podem apresentar linfocitose atípica, contexto no qual o diagnóstico diferencial com a mononucleose infecciosa (ocasionada pelo vírus Epstein-barr) deverá ser considerado. As aminotransferases: aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) elevam-se no período prodrômico, com níveis de 10 vezes acima. Em geral, os níveis de ALT são superiores aos de AST, do limite superior da normalidade atingindo o nível máximo no início da fase ictérica e posteriormente decrescem e normalizam-se em seis meses nos casos que evoluem sem cronificação e observa-se uma oscilação nas hepatites que evoluem para uma cronificação. As enzimas de origem canalicular que incluem a fosfatase alcalina e a gamaglutamil transferase apresentam uma alteração, mas, em geral, com menor intensidade que a observada nas aminotransferases. Os níveis de

bilirrubinas se elevam durante a fase icterica, atingindo níveis máximos, extremamente variáveis, geralmente nas formas colestáticas, com leve predomínio da fração direta sobre a indireta (GOMES et al, 2012).

Em relação ao diagnóstico específico, o marcador IgM para o vírus da hepatite A deve ser o primeiro a ser solicitado na suspeita clínica de infecção pelo vírus, sendo encontrado no soro de todos os indivíduos infectados recentemente e caracterizando o marcador da fase aguda da infecção. Este marcador torna-se positivo no início do quadro clínico, desaparecendo após três meses conforme a Figura 6. O anti-HAV IgG é indicativo de infecção passada e está presente na fase de convalescença e na resposta vacinal que persiste indefinidamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Existem também ensaios sorológicos disponíveis comercialmente que podem detectar o anti-HAV Total (tanto anticorpos IgG e IgM) e neste caso a presença de anticorpos anti-HAV Total e a ausência de anti-HAV IgM pode ser utilizado para diferenciar entre infecções passadas e atuais (GOMES et al, 2012).

Os testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos pela técnica de transcrição reversa seguida de amplificação de sequências genômicas do HAV pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) constituem o método mais sensível do que os testes imunoenzimáticos, principalmente em se tratando de amostras ambientais ou de alimentos (NAINAN et al., 2006).

Figura 6: Marcadores sorológicos para diagnóstico de infecção pelo HAV.



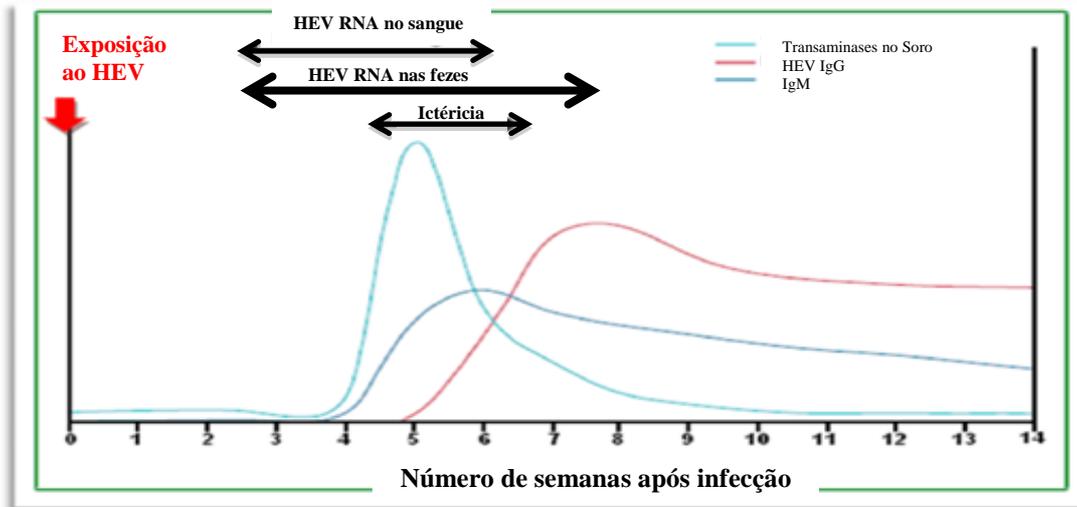
Fonte: BRANDÃO-MELO et al (2001).

As provas laboratoriais para o diagnóstico específico da infecção pelo HEV incluem testes sorológicos para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG, além de testes moleculares para detecção do genoma do vírus nas fezes e no soro (MUSHAHWAR, 2008). Anticorpos anti-HEV IgM atingem níveis séricos máximos de detecção durante as quatro primeiras semanas, decaindo normalmente três meses após o início dos sintomas (TICEHURST et al, 1992). Os testes imunoenzimáticos para detecção de anticorpos (ELISA) são os mais utilizados no diagnóstico sorológico da infecção pelo HEV. A maioria dos conjuntos comerciais disponíveis utiliza antígenos recombinantes derivados de diferentes cepas do vírus. Os testes que utilizam antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos correspondentes aos epítomos imunodominantes da região ORF2 do HEV têm demonstrado uma maior reprodutibilidade em laboratório do que os testes baseados na combinação de antígenos ORF2 e ORF3 (MENG et al, 2002).

De modo geral, os testes imunoenzimáticos apresentam maior valor preditivo quando aplicados a estudos epidemiológicos em regiões endêmicas. Em países não endêmicos, os testes imunoenzimáticos para detecção de anti-HEV podem apresentar variações quando observados os diferentes kits quanto a sensibilidade e, conseqüentemente, nas estimativas de soroprevalência (MENG et al, 2002). A Figura 7 apresenta a evolução dos marcadores para o diagnóstico da hepatite E.

As taxas de soroprevalência relatadas em países desenvolvidos têm mostrado variações entre 0,26% e 31%, o que pode ser explicado pelos diferentes testes diagnósticos utilizados, pelas condições epidemiológicas locais, pelas cepas circulantes e também pela presença ou ausência de outras espécies susceptíveis. Os resultados obtidos por estes testes imunoenzimáticos podem ser imprecisos nas análises de situação epidemiológica tornando-se a detecção do RNA do HEV a metodologia mais confiável para diagnosticar infecções agudas de modo a avaliar e monitorar a presença do vírus em populações de risco (BENDALL *et al*, 2010). O período de viremia curto em alguns pacientes pode explicar as infecções assintomáticas ou anictéricas e a discrepância entre a falta de manifestações clínicas e a soroprevalência relativamente alta em países desenvolvidos (DALTON et al, 2008).

Figura 7: Marcadores para diagnóstico da Hepatite E



Fonte: (DALTON et al, 2008).

1.7 PREVENÇÃO E CONTROLE

A melhoria do saneamento e as medidas de higiene são fundamentais, considerando que a principal forma de transmissão é a fecal-oral. As hepatites A e E têm como medidas mais eficazes de prevenção a disponibilização de água potável, em quantidade suficiente no domicílio. Também é de fundamental importância a educação da população quanto às boas práticas de higiene, com ênfase na lavagem das mãos; as medidas de saneamento básico, como água tratada e esgoto; orientação de creches, pré-escolas e instituições fechadas para adoção de medidas rigorosas de higiene; cozimento adequado de mariscos, frutos do mar e desinfecção (uso de cloro) nos alimentos crus, como frutas e verduras (BRASILb, 2010).

A profilaxia da hepatite E em áreas endêmicas inclui evitar consumir alimentos crus ou mal cozidos, especialmente produtos de origem suína onde existe circulação do HEV (genótipo 3 ou 4). Orientações aos profissionais que trabalham com suínos quanto a lavagem correta das mãos após a manipulação dos animais ou seus dejetos (GOMES et al, 2012).

Além de medidas de controle específicas, as ações de educação em saúde, tanto para o desenvolvimento da capacidade técnica dos profissionais envolvidos como para a orientação da comunidade em geral sobre as hepatites virais e sua prevenção devem ser continuamente implementadas entre esses grupos e assim proporcionar um melhor entendimento sobre prevenção dessas doenças (BRASIL, 2010b).

As vacinas de hepatite A tem sido disponibilizadas comercialmente desde a década de 1990. As vacinas inativadas provaram estar entre as mais imunogênicas, seguras e bem toleradas. Aproximadamente 100% das pessoas desenvolveram níveis protetores de anticorpos contra o vírus no prazo de um mês após a dose da vacina. O Sistema Único de Saúde vinha disponibilizando a vacina nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIE) com indicações apenas para situações específicas (GOMES et al, 2012), mas a partir do ano de 2014, o Programa Nacional de Imunização (PNI) vem ampliando o calendário nacional de vacinação com a introdução da vacina adsorvida para hepatite A (inativada). O Ministério da Saúde introduziu no calendário nacional de vacinação esta vacina para crianças a partir de 12 meses até menores de 2 anos (1 ano, 11 meses e 29 dias) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

No Quadro 2, as principais características clínicas e epidemiológicas das hepatites A e E são apresentadas de forma a se observar as principais diferenças entre essas duas doenças assim como características em comum.

Quadro 2 – Aspectos clínicos e epidemiológicos das hepatites A e E

	HAV	HEV
Ocorrência	Global	Genótipo 3: Global Genótipos 1 e 2: África e México Genótipos 1 e 4: África e Ásia
Via de transmissão	Fecal-oral: ingestão de água ou alimentos contaminados	Genótipos 1 e 2: Fecal-oral Genótipos 3 e 4: Zoonótica contato ocupacional ou ingestão de carne crua ou mal cozida de suínos e outros reservatórios animais
Período de incubação (dias)	30 dias (15-50 dias)	40 dias (15-64 dias)
Apresentação clínica	Icterícia, mal-estar, cefaleia, dor abdominal, colúria e hepatomegalia. Níveis séricos das aminotransaminases hepáticas e bilirrubina, em geral, elevados.	
Curso clínico	Autolimitada. Evolução para hepatite aguda fulminante (rara)	Em geral, autolimitada. Pode evoluir para hepatite aguda fulminante (gestantes infectadas por HEV genótipo 1; portadores de outras hepatopatias)
Cronicidade	Não	Progressão para hepatite crônica (associada ao genótipo 3): pacientes imunocomprometidos
Mortalidade	0,1-2%	0,5-4% (até 20% grávidas infectadas por HEV genótipo 1 durante o terceiro trimestre de gestação)
Diagnóstico laboratorial	Sorologia: anti-HAV IgM	Sorologia: anti-HEV IgM Métodos moleculares: HEV RNA
Prevenção e Controle	Saneamento e melhoria da qualidade da água e das condições de higiene; Evitar o consumo de carne crua ou mal cozida (suínos e outros reservatórios animais);	
	Vacinação a partir de 12 meses de idade (duas doses)*	Vacinação (regiões endêmicas)**

Fonte: (AUTOR, 2015). *No Brasil o Programa Nacional de Imunizações (PNI)/MS preconiza a vacinação universal de crianças entre 12 e 23 meses de idade (dose única) (BRASIL, 2014); **Uma vacina recombinante foi registrada na China, em 2011 (WHO, 2105).

2 JUSTIFICATIVA

A falta de saneamento básico tem causado impacto à saúde das populações principalmente nas comunidades mais carentes. O Estado do Amapá enfrenta esta triste realidade, com apenas 3,5% de saneamento básico, concentrado principalmente na capital Macapá, onde parte significativa da população vive próxima a áreas de ressaca utilizando fossas sanitárias, muitas vezes construídas ao lado de poços de água que, utilizados como fonte de abastecimento alternativa, propiciam a transmissão de patológicos entéricos.

Levando-se em consideração, o ponto de vista clínico e epidemiológico as infecções causadas pelos vírus da hepatite A (HAV) e da hepatite E (HEV) apresentam similaridades e considerando-se que o algoritmo laboratorial atualmente adotado pela maioria dos laboratórios de saúde pública não inclui a análise sorológica para a detecção de marcadores sorológicos específicos para o HEV, o presente estudo propõe o estabelecimento de um novo algoritmo para o diagnóstico diferencial e a vigilância laboratorial das hepatites virais de transmissão entérica A e E, no Lacen-AP.

O estabelecimento da metodologia para investigação desses dois agravos, no LACEN-AP, deverá contribuir para o esclarecimento de surtos de hepatites agudas de veiculação hídrica, para a identificação de fatores de risco locais e para a elucidação de casos de hepatite aguda de etiologia desconhecida.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Estabelecer, aprimorar e aplicar, no LACEN-AP, métodos e procedimentos para o diagnóstico e a vigilância laboratorial das hepatites virais A e E.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Detectar o vírus da hepatite A, por método de biologia molecular, em amostras de soro criopreservadas obtidas de indivíduos envolvidos em surtos epidêmicos ou casos esporádicos de hepatite viral aguda;
- b) Investigar a presença de marcadores sorológicos indicativos de infecção prévia/recente pelo vírus da hepatite E em amostras de soro obtidas aleatoriamente de indivíduos envolvidos em surtos epidêmicos e de casos esporádicos de hepatite aguda;
- c) Elaborar o procedimento de envio e recebimento de amostras (surtos e casos esporádicos) para diagnóstico etiológico das hepatites virais agudas A e E;
- e) Elaborar o algoritmo para a detecção de marcadores sorológicos e moleculares dos vírus da hepatite A e E.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

No presente estudo foram utilizadas amostras de soro obtidas de 171 indivíduos residentes no Estado do Amapá, com suspeita clínica de hepatite viral aguda (surto ou casos avulsos, esporádicos) procedentes dos municípios de Macapá, Mazagão e Santana.

Localizado no extremo norte do Brasil, o Estado do Amapá é um dos estados mais preservados, com 143.453,7 km² de extensão territorial, distribuídos em 16 municípios. O estado faz fronteiras com a Guiana Francesa (Norte) e Suriname (Nordeste); divisa com o Estado do Pará, separado pelo Rio Amazonas (Sul e Oeste) e o Oceano Atlântico (Leste). Segundo o censo de 2010, a população estimada no estado em 2013 foi de aproximadamente 734.996 habitantes e densidade demográfica de 4,69 habitantes/km² (IBGE, 2011). Entre os 16 municípios formadores do estado, temos a cidade de Macapá, sua capital, o município de Santana situado a 15 km a Sul-Oeste de Macapá e Mazagão a 14 km a Sul-Oeste de Santana conforme Figura 8.

Figura 8: Estado do Amapá e municípios



Fonte: <http://www.coisaspraver.com/2012/08/mapa-do-amapa-para-imprimir-e-colorir.html>

As amostras (ou casos suspeitos) foram encaminhadas de várias unidades de saúde para o LACEN-AP por meio da Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica do Estado ou amostras encaminhadas pela unidade de origem, no período de março a dezembro de 2014. Todos os pacientes foram devidamente cadastrados no Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) no Serviço de Atendimento e Recebimento de Amostras do LACEN-AP, conforme instruções de serviço e critérios de aceitação de amostras.

No ato da colheita de sangue ou do recebimento das amostras no setor de triagem do LACEN-AP, as amostras de soro eram fracionadas em duas alíquotas, uma destinada à detecção de marcadores sorológicos e outra preservada para posterior pesquisa de ácidos nucléicos. De acordo com o procedimento operacional padrão adotado pelo LACEN-AP, as alíquotas de soro eram acondicionadas em microtubos de polipropileno (volume de 1 mL), resistentes a baixas temperaturas e armazenadas à -20°C (testes sorológicos) e à -70°C (testes biomoleculares) até serem processadas. Para a seleção das amostras foram escolhidas as que estavam devidamente cadastradas do GAL e com quantidade suficiente para as análises e devidamente armazenadas nas temperaturas adequadas.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Testes sorológicos

4.2.1.1 Detecção de anticorpos específicos HAV IgM

No Laboratório de Sorologia do Serviço de Virologia - LACEN-AP, as amostras de soro foram submetidas à imunoensaio baseado na tecnologia de eletroquimioluminescência (processo envolvendo reações químicas que geram luminescência a partir de um estímulo elétrico), utilizando o complexo ruténio + tripropilamina (TPA). A etapa de detecção do produto quimioluminescente final é realizada no equipamento Cobas® E411 (Roche, EUA), conforme as instruções técnicas e operacionais descritas no manual para utilização do fabricante.

4.2.1.2 Detecção de anticorpos específicos HEV IgM e IgG.

Para detecção qualitativa dos anticorpos anti-IgM e IgG específicos para o vírus da hepatite E foram utilizados os conjuntos para diagnóstico *RecomWell HEV IgM e RecomWell HEV IgG*, Mikrogen Diagnostik (Neuried, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. O princípio do teste e os procedimentos de ensaio são os mesmos, tanto para o teste de HEV IgM como para o de IgG alterando-se apenas os controles e os conjugados (que são exclusivos para cada um desses ensaios).

Princípio do teste: Nesse tipo de imunoenensaio, do tipo sanduíche indireto, os antígenos recombinantes (baseados nos genótipos 1 e 3) ligados à fase sólida (placa de microtitulação) são capazes de detectar anticorpos específicos para todos os genótipos do HEV (por reatividade cruzada, também são detectados os genótipos 2 e 4). Anticorpos (imunoglobulinas de classe IgM e/ou IgG) presentes na amostra ligam-se especificamente aos antígenos na fase sólida. Após incubação, os anticorpos não ligados são eliminados por lavagem e, numa segunda etapa, anticorpos anti-imunoglobulina humana (IgM ou IgG) conjugados à peroxidase são adicionados; os anticorpos do conjugado não ligados são eliminados por lavagem. O complexo formado pela ligação específica entre os antígenos recombinantes e os anticorpos anti-HEV (IgM ou IgG presentes na amostra) e destes com o conjugado (anti-imunoglobulina IgM ou IgG) é detectado por reação colorimétrica catalisada pela peroxidase. A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de anticorpos específicos (anti-HEV IgM ou IgG).

Antes de iniciar o ensaio, os reagentes para diagnóstico e as amostras biológicas foram deixados em temperatura ambiente. Os controles e as amostras foram previamente diluídos (1 + 100) no tampão de diluição (10µL de amostra ou controle em 1mL de tampão de diluição). Após vigorosa homegeinização em agitador automático, 100µL das diluições de amostras e controles (negativo, positivo e o controle de “cut off” em duplicata) foram pipetados nas cavidades da microplaca. Após incubação a 37°C por 60 min, a microplaca foi lavada 4 vezes em lavadora automática, utilizando-se solução de lavagem diluída à uma concentração de 1:10. Em seguida, foram adicionados 100µL por poço da solução do conjugado, previamente diluído à 1:101 no tampão de diluição e a placa foi incubada a 37 °C por 30 min. Após lavagem da placa (4 vezes), adicionou-se 100µL por poço da solução de substrato (pronta para uso). A placa foi mantida em temperatura ambiente, descoberta porém protegida contra a luz solar direta, durante 30 min. Após esse intervalo, adicionou-se 100 µl da solução de

parada (H_3PO_4 a 24,9%, pronta para uso) e realizou-se a leitura em equipamento de fotometria para placas, a 450nm utilizando filtro de referência para comprimento onda de 650 (620-650) nm.

A interpretação dos resultados baseou-se na razão obtida entre os valores de absorbância da amostra e a média dos valores de absorbância do controle de “cut-off” (obtidos em duplicata). Para análise dos resultados, considerou-se a “zona cinza” como a faixa compreendida entre o valor de corte (média dos valores de absorbância dos controles de “cut off”) + 20% (ou, seja: “cut off” x 1,2). Assim, foram consideradas positivas as amostras cuja densidade óptica (DO) estava acima da zona cinza e negativas as que tiveram valor de DO abaixo do cut off. As amostras com valores de DO na “zona cinza” foram consideradas inconclusivas. Todas as amostras com resultado positivo ou inconclusivo foram retestadas em duplicata, utilizando-se o mesmo imunoenensaio.

4.2.1.3 Teste complementar para confirmação da reatividade anti-HEV

As amostras previamente testadas pelo método de ELISA (*RecomWell HEV IgM e RecomWell HEV IgG*) e que apresentaram resultado repetidamente positivo ou inconclusivo para anti-HEV IgM ou IgG foram submetidas ao teste *RecomLine HEV IgG/IgM*, Mikrogen Diagnostik (Neuried, Alemanha). Esse ensaio, do tipo imunoblot, emprega os antígenos recombinantes altamente purificados O2N (genótipos 1 e 3), O2C (genótipos 1 e 3), O2M (genótipo 1) e O3 (genótipos 1 e 3) imobilizados em tiras de nitrocelulose, para a detecção de anticorpos específicos para antígenos das regiões estrutural e não-estrutural do HEV. Após incubação com amostras diluídas (1:101) de soro ou plasma, os anticorpos não ligados são eliminados por lavagem e, numa segunda etapa, anticorpos anti-imunoglobulina humana (IgM ou IgG) conjugados à peroxidase são adicionados; os anticorpos do conjugado não ligados são eliminados por lavagem. Anticorpos específicos para cada antígeno (O2N, O2C, O2M e O3) são detectados por reação colorimétrica catalisada pela peroxidase. Uma reação positiva antígeno-anticorpo é identificada pelo aparecimento de bandas coloridas na tira de nitrocelulose. A intensidade da coloração das bandas é comparada a coloração apresentada pelo controle de “cut off”.

Antes de iniciar o ensaio, os reagentes para diagnóstico e as amostras biológicas foram deixados em temperatura ambiente, por 30 min. Durante esse intervalo, preparou-se o “tampão A”, adicionando-se leite magro em pó ao tampão de lavagem diluído a uma concentração de 1+9 em água deionizada, em quantidade suficiente (proporcional ao número de tiras utilizadas) para as duas etapas de lavagem e para a diluição do conjugado. Por exemplo, para 5 tiras de reação, adiciona-se 0,5g de leite em pó a 100 mL do tampão de lavagem diluído (10 mL do tampão concentrado + 90 mL de água deionizada).

As amostras (20 μ L) foram pipetadas diretamente em canaletas individuais contendo as tiras de nitrocelulose imersas em 2 mL do tampão de diluição (pronto para uso) e incubadas por 60 min à temperatura ambiente, sob agitação moderada. Após incubação, o tampão de diluição de cada canaleta foi aspirado cuidadosamente (2 vezes, utilizando-se pipeta de 1 mL), adicionando-se a cada canaleta 2 mL do tampão de lavagem (“tampão A, previamente preparado). Esse procedimento foi repetido 3 vezes, sob agitação, com intervalos de 5 min entre as lavagens. Em seguida, adicionou-se à cada canaleta 2 mL da solução do conjugado mantendo a bandeja de incubação sob agitação, por 45 min. Após lavagem (3 vezes, como anteriormente descrito), as tiras foram incubadas com 1,5 mL por canaleta da solução do substrato, por 8 minutos, sob agitação. O substrato foi aspirado e as tiras lavadas com água deionizada (3 vezes). As tiras foram retiradas, cuidadosamente, com pinça de plástico e colocadas entre papel absorvente para secar, por pelo menos 2 horas. A interpretação do perfil de reatividade foi feita segundo os critérios estabelecidos pelo fabricante. A intensidade de coloração das bandas é estimada em relação à intensidade da banda do controle de “cut off”: (-), (+/-), (+), (++) e (+++), sendo (+) equivalente à banda do controle, (+/-) intensidade abaixo do controle e (-) sem reação. O resultado do teste é determinado a partir da soma dos valores das bandas de cada antígeno recombinante, onde: O2N = 2, O2C = 4, O2M = 2 e O3 = 3; soma de pontos: ≤ 2 = negativo, 3 = inconclusivo e ≥ 4 = positivo.

4.2.2 Testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos

4.2.2.1 Extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Virologia no LACEN-AP, a partir de 140 μL de soro ou plasma, utilizando o conjunto comercial QIAamp® Viral RNA mini kit, da marca QIAGEN® (Hilden, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. Foram utilizados controles negativo (água estéril, Nuclease free) e positivo (cepa HAF-203 do HAV, adaptada a sistema de cultivo celular). O material foi devidamente armazenado em temperatura de -70°C e enviado nas condições e normas preconizados pelo Serviço de Envio de Amostras Biológicas do LACEN-AP para realização das etapas posteriores no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz na cidade do Rio de Janeiro.

4.2.2.2 Reação de transcrição reversa

A reação de transcrição reversa foi realizada a partir de 8 μL de RNA adicionados à mistura de reação constituída por 4 μL do tampão 5x Buffer; 2 μL de “Random primer” a 20 pmol/ μL , 4 μL de dNTP-mix a 2,5 mM, 1 μL de DTT a 0,1 M, 1 μL de RNAase OUT (inibidor de RNAase) e 10 U/ μL da enzima Superscript III Reverse Transcriptase® (Life Technologies) em um volume final de 20 μL . Os tubos contendo a mistura da reação e RNA foram incubados, segundo as instruções do fabricante, a 25°C por 5 min, em seguida a 50°C durante 1 hora e a 70°C , por 15 minutos.

As amostras de DNA complementar (cDNA) foram submetidas imediatamente à reação de Nested PCR para detecção do HAV. Foram utilizados 5 μL do cDNA e a alíquota restante foi mantida -70°C para posterior análise para detecção do HEV RNA.

4.2.2.3 Nested PCR para detecção do HAV

A técnica de Nested PCR para detecção de uma sequência-alvo da região VP1/2A do genoma do HAV foi realizada em duas etapas, segundo o protocolo de DE PAULA et al (2003). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na primeira etapa de PCR correspondem à região compreendida entre os nucleotídeos +2897 (direto) e -3288 (reverso) conforme previamente descrito por BOWER et al (2000). Esses oligonucleotídeos são degenerados de

modo a possibilitar a amplificação de todos os genótipos de HAV (primers universais): 5'CTATTCAGATTGCAAATTAYAAT3'(F6-direto) e 5'AAYTTCATYATTTTCATGCTCCT3' (F-reverso), sendo que Y representa C ou T. Os iniciadores internos utilizados na segunda etapa de PCR correspondem à região compreendida entre os nucleotídeos +2949 e -3192 segundo ROBERTSON et al (1992) (modificado por DE PAULA et al., 2003): 5'TATTTGTCTG TYACAGAACAATCAG 3' (F8 - direto) e 5'AGGRGGTGGAGYACTTCATTTGA 3' (F9 - reverso), onde R representa A ou G.

Na primeira etapa do ensaio de Nested PCR, 5 µL do cDNA foram adicionados à 20 µL da mistura de reação contendo os iniciadores externos (Quadro 3 : PCR1). Após 4 min a 94°C para desnaturação do DNA, foram realizados 30 ciclos à 94°C, 30 segundos; 40°C, 30 segundos e 72°C, 1 minuto, seguidos por uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Na segunda etapa do ensaio, 1 µL do produto obtido na primeira reação de PCR foram adicionados a 24 µL da mistura de reação contendo os iniciadores internos (Quadro 3: PCR2), nas mesmas condições de amplificação da primeira etapa de PCR, porém a uma temperatura de “annealing” (hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores) de 48°C.

Os produtos da amplificação (10 µL) foram analisados por eletroforese em gel de agarose à 1,5%, contendo brometo de etídio para visualização das bandas de tamanho esperado correspondente a 244 pares de base (pb).

Quadro 3 – Preparo das misturas de reação de PCR para detecção do HAV (sequências-alvo correspondentes à região VP1/2A).

	PCR-1 (µL)	PCR-2 (µL)
Água ultrapura estéril	9,5	13,5
Tampão 10X (sem magnésio)	4,0	4,0
dNTP 1,25 mM	2,5	2,5
MgCl ₂ 50mM	1,5	1,5
Iniciador direto (externo*)/(interno**) 20pmol/ µL	1,0*	1,0**
Iniciador reverso (externo*)/(interno**) 20pmol/ µL	1,0*	1,0**
Taq DNA polimerase	0,5	0,5
Volume da mistura/ amostra	20,0	24,0
Adicionar DNA (cDNA ^a ou produto da PCR-1 ^b)	5,0 ^a	1,0 ^b
Volume total	25,0	25,0

Iniciadores diretos/reversos: *F6/F7; **F8/F9, segundo DE PAULA et al., 2003

4.2.2.4 One-step RT PCR para detecção do HEV

Este método é baseado nos protocolos de WANG et al (1999) e de HUANG et al (2002), adaptado por GARDINALI e colaboradores do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, IOC/Fiocruz (comunicação pessoal), para amplificação de duas sequências-alvo, correspondentes às regiões ORF-1 e ORF2 do HEV. Para a reação de one-step PCR foram utilizadas as enzimas SuperscriptIII[®] e Platinum Taq Polimerase[®], combinadas na mesma reação. A mistura da reação foi preparada de acordo com o procedimento analítico recomendado para o kit One-Step RT-PCR[®] (Invitrogen/Life Technologies).

Dois ensaios de One-Step (ORF1 e ORF2) foram realizados, em paralelo. As duas misturas de reação foram preparadas segundo a mesma metodologia (Quadro 4) e incubadas nas mesmas condições de temperatura, com alteração apenas das temperaturas de hibridização (51°C ou 42°C) e dos respectivos pares de iniciadores externos: ORF1-F1 / ORF1-R1, para amplificação da região ORF-1 (WANG et al., 1999) ou ORF2-3156N / ORF2-3157N (HUANG et al, 2002), para amplificação da região ORF2. Os tubos contendo a mistura de reação e o RNA foram incubados em termociclador segundo o programa: 55°C, 30 minutos; 94°C, 2 minutos seguidos de 40 ciclos a 94°C, 15 segundos (desnaturação); 51°C (ORF1) ou 42°C (ORF2), 30 segundos (hibridização dos iniciadores); 68°C, 1 minuto e 68°C, 5 minutos (extensão final).

Quadro 4 – Preparo da mistura de reação de One-Step PCR para detecção do HEV (sequências-alvo correspondentes às regiões ORF1 e ORF2)

Água ultrapura estéril	11 µL
2x Reaction Mix	25 µL
(20 pmol/µL)	1 µL
ORF2-R1/ ORF2-3157N (20 pmol/µL)	1 µL
Superscrit III/Platinum Taq mix	2 µL
Volume da mistura/amostra	40 µL
Adicionar RNA	10 µL
Volume total/amostra	50 µL

Iniciadores externos diretos e reversos para amplificação da região *ORF1: ORF1-F1 e ORF1-R1 (WANG et al,1999) ou da região **ORF2: ORF2-3156N e ORF2-3157N (HUANG et al, 2002)

4.2.2.5 Nested PCR para detecção do HEV

Na segunda etapa do ensaio, 3 μL dos produtos obtidos na reação de One-Step PCR foram adicionados a 47 μL de cada uma das misturas de reação de Nested PCR (preparadas previamente, em paralelo) para amplificação das regiões ORF-1 (WANG et al., 1999) ou ORF2 (HUANG et al, 2002), respectivamente. As misturas de reação foram preparadas segundo a mesma metodologia (Quadro 5) e incubadas nas mesmas condições de temperatura, com alteração apenas das temperaturas de hibridização (51°C ou 42°C) e dos respectivos pares de iniciadores internos ORF1-F2 / ORF1-R2, para amplificação da região ORF-1 (WANG et al., 1999) ou ORF2-3158N / ORF2-3159N, para amplificação da região ORF2 (HUANG et al, 2002).

Quadro 5 – Preparo das misturas de reação de Nested PCR para detecção do HEV (sequências-alvo correspondentes às regiões ORF1 E ORF2)

	Volume (μL)
Água ultrapura estéril	33,5
Tampão 10X (sem magnésio)	5,0
dNTP 10 mM	4,0
MgCl ₂ 50mM	2,0
Iniciador interno direto: (ORF1*) ou (ORF2**) 20pmol/ μL	1,0
Iniciador interno reverso: (ORF1*) ou (ORF2**) 20pmol/ μL	1,0
Platinum Taq DNA Polymerase	0,5
Volume da mistura/ amostra	47,0
Adicionar DNA (cDNA ^a ou produto da PCR-1 ^b)	3,0 ^a
Volume total	25,0

Iniciadores internos diretos e reversos para amplificação da região *ORF1: ORF1-F2 e ORF1-R2 (WANG et al,1999) ou da região **ORF2: ORF2-3158N e ORF2-3159N (HUANG et al, 2002)

4.3 ANÁLISE DE DADOS E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Dados sociodemográficos, clínicos, sorológicos e virológicos foram codificados e registrados em banco de dados (Excel). A análise dos resultados sorológicos seguiu os critérios de reatividade de cada teste comercial, com base nos respectivos valores de corte. A interpretação do perfil sorológico e virológico foram realizadas segundo os critérios e procedimentos analíticos adotados pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Programa BioEstat versão 5.0 pelos testes estatísticos não paramétricos de Qui-Quadrado e Odds Ratio e Meta-Análise Várias Proporções (pw combinado).

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

A investigação sorológica foi conduzida no LACEN-AP, que compõe a Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde, em atendimento as solicitações de diversas instituições de saúde pública para confirmação laboratorial de casos suspeitos (surto e casos esporádicos) de hepatite viral aguda, sem que houvesse necessidade de aprovação formal junto a comitê de ética.

A investigação virológica foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, no escopo do projeto de pesquisa intitulado “Hepatites de Transmissão entérica A e E e herpes vírus associados a casos agudos e fulminantes”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Parecer N^o 440.614).

5 RESULTADOS

Foram analisadas amostras de sangue (soro) obtidas de 171 indivíduos encaminhados ao Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN-AP), para diagnóstico sorológico de hepatite viral aguda, durante o período de 11 de março a 22 de dezembro de 2014. As amostras biológicas ou os pacientes foram encaminhados ao LACEN-AP por demanda espontânea, pela Vigilância Epidemiológica do Estado (VIGEP) ou a partir das unidades de saúde de Macapá.

5.1 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

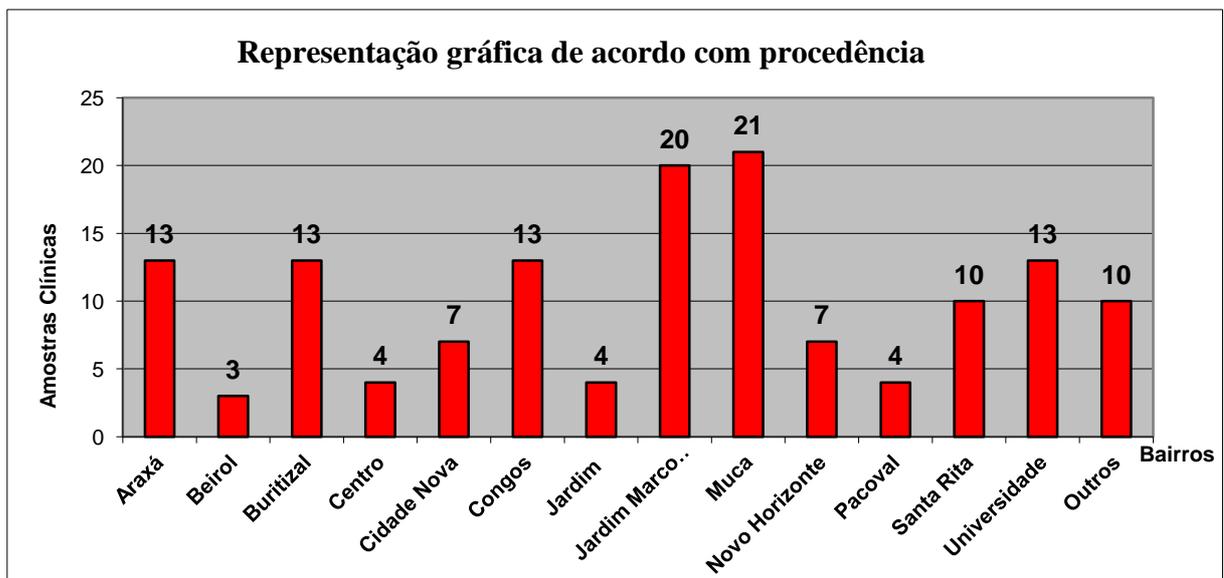
Das 171 amostras que compõem este estudo, 142 (83%) foram obtidas de indivíduos residentes no município de Macapá, capital do Amapá. Foram também incluídas 29 amostras procedentes dos municípios de Mazagão (20/171) e de Santana (9/171). Nesta população de estudo, observou-se a predominância de indivíduos menores de 20 anos de idade (73,5%), sendo a maioria do sexo masculino (97/171). Do total de indivíduos estudados, a média de idade foi de 17 anos, variando de 1 a 78 anos. (Tabela 1). A Figura 9 mostra a distribuição dos casos suspeitos procedentes da cidade de Macapá de acordo com o bairro de residência.

Tabela 1 – Dados sociodemográficos dos indivíduos com suspeita de hepatite viral aguda. LACEN – AP, 2014.

	n	%
Sexo		
Masculino	97	56,7
Feminino	74	43,3
Idade (anos)		
< 10	72	42,3
10 – 19	53	31,2
20 – 29	16	9,4
30 – 39	12	7,1
40 – 49	07	4,1
50 – 59	04	2,4
≥ 60	06	3,5
Cidade de origem		
Macapá	142	83,0
Mazagão	20	5,3
Santana	09	11,7

Fonte: GAL, 2014

Figura 9: Distribuição das 171 amostras clínicas obtidas de casos suspeitos de hepatite viral aguda de acordo com o bairro de residência no município de Macapá-AP, 2014



Fonte: GAL, 2014.

5.2 INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA

5.2.1 Detecção de anticorpos específicos para o vírus da hepatite A (HAV)

Todas as amostras de soro, obtidas de 171 casos suspeitos de hepatite viral aguda, foram analisadas prospectivamente no Serviço de Virologia do LACEN-AP, durante o período de março a dezembro de 2014. De acordo com o procedimento laboratorial de rotina adotado no LACEN-AP, as amostras foram submetidas ao Imunoensaio por Eletroquimioluminescência (Roche) automatizado (Cobas E411) para detecção de anticorpos da classe IgM específicos para o vírus da hepatite A (anti-HAV IgM). A investigação laboratorial mostrou que 55,55% (95/171) das amostras de soro foram reagentes para o marcador anti HAV IgM.

5.2.2 Detecção de anticorpos específicos para o vírus da hepatite E (HEV)

Setenta e duas amostras de soro criopreservadas, selecionadas aleatoriamente entre os 171 casos suspeitos de hepatite viral aguda, foram analisadas para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG específicos para o vírus da hepatite E. Duas amostras apresentaram resultados reagentes para anti-HEV IgM e uma apresentou resultado inconclusivo para o anti-HEV IgG (não coincidentes respectivamente). Esta amostra apresentou valor de densidade óptica situado entre faixa correspondente ao valor de corte + 2 desvios-padrão, caracterizando “zona cinza”.

As três amostras, inicialmente positivas pelo método imunoenzimático (conjuntos diagnósticos *RecomWell HEV IgM* e *RecomWell HEV IgG*), foram retestadas em duplicata, conforme recomendado pelo fabricante. No reteste para anti-HEV IgM, ambas as amostras apresentaram resultados repetidamente reagentes. A amostra com resultado inicial inconclusivo para anti-HEV IgG revelou-se não-reagente nesta segunda análise. Um teste complementar do tipo imunoblot, foi utilizado para confirmação da suposta reatividade anti-HEV IgM mas nenhuma das duas amostras apresentou resultado positivo para este marcador sorológico.

5.3 INVESTIGAÇÃO VIROLÓGICA

5.3.1 Detecção do vírus da hepatite A

No presente estudo, alíquotas criopreservadas de todas as amostras de soro (independente do resultado sorológico) foram submetidas à metodologia de RT-Nested PCR (transcrição reversa seguida de Nested PCR) para detecção do vírus da hepatite A (HAV RNA). A viremia foi evidenciada pela detecção do HAV RNA em 59,06% das amostras (101/171). Destas, 67 (66,3%) foram também positivas para o marcador sorológico anti-HAV IgM. Excluídas as 29 amostras em que a RT-Nested PCR resultou inconclusiva, houve coincidência dos resultados sorológico e virológico em 65,49% (93/142) dos casos, dos quais 72,04% (67/93) eram concomitantemente positivos e 27,95% (26/93) coincidentemente negativos para ambos os marcadores.

Em comparação com o método sorológico (imunoensaio por quimioluminescência), a técnica de RT-Nested PCR (região alvo VP1/2A do HAV) apresentou maior taxa de positividade (59,06% vs. 55,55%). O coeficiente de correlação Kappa demonstrou uma concordância de 0,261 entre os dois métodos (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação entre os resultados dos métodos RT-PCR e imunoensaio, para detecção dos marcadores anti-HAV IgM e HAV RNA, na confirmação laboratorial da hepatite A aguda. LACEN – AP, 2014.

		Anti-HAV IgM (imunoensaio)		
		Positivo	Negativo	Total
HAV RNA (RT-PCR)	Positivo	67 (0,47)	34 (0,24)	101 (0,71)
	Negativo	15 (0,11)	26 (0,18)	41 (0,29)
	Total	82 (0,58)	60 (0,42)	142 (100)

Kappa= 0,261

A Tabela 3 mostra o perfil dos marcadores sorológico e virológico dos casos suspeitos de hepatite viral aguda obtidos a partir da detecção dos marcadores anti-HAV IgM e HAV RNA, pelos métodos de imunoensaio e de RT-PCR, respectivamente. Observa-se que, dentre as 95 amostras reagentes para o anti-HAV IgM, 67 (70,5%) apresentaram positividade concomitante para o HAV RNA. É importante destacar que 34 (44,7%) das 76 amostras previamente identificadas como não-reagentes para o marcador sorológico anti-HAV IgM apresentaram positividade para o HAV RNA. Por outro lado, entre as 95 amostras que tiveram resultado reagente para o anti-HAV IgM, 15 (15,8%) foram negativas para o HAV RNA. Vinte e nove (29) amostras apresentaram resultado inconclusivo pelo método de RT-Nested PCR, entre as quais 13 foram reagentes e 16 não-reagentes para o anti-HAV IgM, pelo método de imunoensaio por eletroquimioluminescência.

Tabela 3 – Perfil dos marcadores anti-HAV IgM e HAV RNA para o vírus da hepatite A em indivíduos com suspeita de hepatite viral aguda. LACEN – AP, 2014.

Sorológico (imunoensaio)	Virológico (RT-PCR)	N	%
Anti-HAV IgM	HAV RNA		
Reagente	Detectado	67	70,5
Reagente	Não detectado	15	15,8
Reagente	Inc/Ind*	13	13,7
Anti-HAV IgM (+)		95	100
Não reagente	Detectado	34	44,7
Não reagente	Não detectado	26	34,2
Não reagente	Inc/Ind*	16	21,1
Anti-HAV IgM (-)		76	100

*Inc/ind = resultado inconclusivo ou indeterminado.

Efetivamente, o diagnóstico de hepatite A aguda pode ser confirmado para 129 (75,44%) dos 171 casos suspeitos, a partir dos resultados obtidos utilizando os métodos sorológicos (imunoensaio) e de biologia molecular (RT-Nested PCR). Com base nos resultados negativos obtidos concomitantemente por sorologia e RT-Nested PCR, o

diagnóstico de hepatite A aguda foi excluído em 15,2% (26/171) dos casos. No entanto, 16 amostras não-reagentes para o anti-HAV IgM apresentaram resultado inconclusivo pelo método de RT-PCR.

Em comparação com o método sorológico (imunoensaio por quimioluminescência), a técnica de RT-Nested PCR (região alvo VP1/2A do HAV) apresentou maior taxa de positividade (59,06% vs. 55,55%). A análise entre os resultados obtidos desses métodos de diagnóstico utilizados na investigação dos casos de hepatites virais revelou que não houve diferenças significativas entre as duas metodologias ($p=0,5846$).

Excluídas as 29 amostras em que a RT-Nested PCR resultou inconclusiva, houve coincidência dos resultados sorológico e virológico em 65,49% (93/142) dos casos, dos quais 72,04% (67/93) eram concomitantemente positivos e 27,95% (26/93) coincidentemente negativos para ambos os marcadores.

Na Tabela 4, observa-se que a maioria dos casos suspeitos A aguda eram procedentes do município de Macapá (142/171), dos quais 117 (82,4%) tiveram confirmação laboratorial. Os bairros Jardim Marco Zero, Muca, Congós e Buritizal — localizados nas chamadas “áreas de ressaca” — registraram a ocorrência de 67 casos suspeitos, dos quais 57 (85,1%) tiveram confirmação laboratorial. Os fatores sexo e faixa etária não demonstraram significância como fatores de risco para a ocorrência dos casos de hepatite, enquanto que a localização quanto ao bairro de residência apresentou significância (nos bairros Araxá e Universidade $p= < 0,05$) para a ocorrência de casos reagentes. Chama atenção à baixa frequência (18,8% a 33,3%) de confirmação laboratorial entre nas amostras procedentes dos bairros Novo Horizonte e Beírol (Macapá) e de Igarapé-Banha e Travessa da Olaria (Mazagão). Deste último, todos os casos suspeitos (dois adultos, duas crianças) apresentavam registro de residência em um mesmo endereço e em apenas um dos casos (32 anos, sexo masculino) o diagnóstico foi confirmado pela detecção do HAV RNA.

Tabela 4 – Distribuição dos casos confirmados de hepatite viral aguda de acordo com características sociodemográficas. LACEN – AP, 2014

	n	Infecção por HAV		OR (IC 95%)	p
		n	%		
Sexo					
Masculino	97	74	76,3	1,1 (0,5516-2,2398)	0,9074
Feminino	74	55	74,3		
Idade (anos)					
< 10	72	56	77,8		X ² =0,08
10 – 19	53	44	83,0	1,1 (0,2656-4,7893)	p=0,8316
20 – 29	16	13	81,2	0,88 (0,2088-3,7626)	p=0,8316
30 – 39	12	07	58,3	1,05 (- -)	p=0,6665
40 – 49	07	04	57,1	0,95 (- -)	p=0,6665
50 – 59	04	01	25,0	0,1667 (- -)	p=0,5186
≥ 60	06	04	66,7	6,0 (- -)	p=0,5186
Bairro (Município)					
(Macapá – AP)					
Jardim Marco Zero*	20	19	95,0		ns ^e
Muca*	21	17	81,0		ns
Araxá	13	13	100		p=< 0.05
Universidade	13	13	100		p=< 0.05
Congós*	13	12	92,3		ns
Buritizal*	13	09	69,2		ns
Santa Rita	10	09	90,0		ns
Cidade Nova	07	07	100		ns
Jardim I	04	03	75		ns
Pacoval	04	03	75,0		ns
Centro	04	02	50,0		ns
Beirol	03	01	33,3		ns
Novo Horizonte	07	02	28,6		ns
Outros ^a	10	07	70,0		ns
subtotal	142	117	82,4		p _t =0,0005
(Mazagão-AP)					
Igarapé-Banha ^b	16	03	18,8	0,6923 (- -)	p=0,6750
Travessa da Olaria ^c	04	01	25,0	1,4444 (- -)	p=0,6750
subtotal	20	04	20,0		
(Santana-AP)					
Vários ^d	09	08	88,9		
Total	171	129	75,4		

* Bairros localizados em áreas de ressaca; ^aOito bairros (Macapá-AP), um caso por bairro; ^btrês casos confirmados e quatro inconclusivos por RT-PCR, porém apenas uma amostra apresentou sorologia positiva; ^cum caso confirmado por RT-PCR, a amostra apresentou sorologia negativa; ^dseis bairros (Santana-AP); ^enão tiveram significância realizada pelo método Meta-Análise (várias proporções combinadas).. Fonte: (AUTOR, 2015).

5.3.2 Detecção do vírus da hepatite E

Duas amostras, que apresentaram resultados repetidamente reagentes para o anti-HEV IgM pelo método imunoenzimático foram submetidas à técnica de One step RT-PCR para amplificação de sequências alvo das regiões ORF-1 e ORF-2 do HEV. Nenhuma dessas amostras apresentou viremia detectável. No entanto, deve-se destacar que ambas tiveram resultados sorológico e/ou virológico compatível com infecção recente pelo vírus da hepatite A (HAV).

6 DISCUSSÃO

Os vírus das hepatites A (HAV) e E (HEV), de transmissão primariamente fecal-oral, têm sido responsáveis por surtos epidêmicos e casos esporádicos de hepatite viral aguda em diferentes regiões do mundo, notadamente nas áreas onde o saneamento básico é precário ou inexistente. No Brasil, estudos têm demonstrado uma tendência à mudança do padrão de alta para média endemicidade para o HAV como consequência do desenvolvimento econômico e da melhoria dos padrões de higiene e saneamento. No entanto, as regiões Norte e Nordeste continuam exibindo um padrão de alta endemicidade da hepatite A e as mais altas taxas de incidência entre as macrorregiões brasileiras (BRASIL, 2010a; FRANCO, 2012).

No presente estudo, uma investigação laboratorial baseada na pesquisa de marcadores sorológicos e virológicos do HAV e do HEV confirmou a alta incidência de casos de hepatite A aguda e uma provável baixa endemicidade para a hepatite E no Estado do Amapá. A análise incluiu casos suspeitos de hepatite viral aguda referenciados, por demanda espontânea, ao LACEN-AP para confirmação laboratorial.

De acordo com o procedimento vigente, adotado pelo LACEN-AP em consonância com o protocolo do Ministério da Saúde para investigação das hepatites virais agudas, é realizada inicialmente a pesquisa do marcador sorológico anti-HAV IgM e, tendo sido excluída a presença de infecção aguda pelo HAV, a investigação prossegue com a pesquisa dos marcadores de fase aguda HBsAg e anti-HBc IgM, da hepatite B, e do anti-HCV para a hepatite C, caso haja possível história de exposição a este agente. No entanto, um número significativo de casos permanece com a etiologia desconhecida. No presente estudo, a investigação laboratorial incluiu a pesquisa virológica (HAV RNA e HEV RNA) e dos marcadores sorológicos anti-HEV IgM e IgG.

Em comparação com o método sorológico (imunoensaio por eletroquimioluminescência), a técnica de RT-Nested PCR parece apresentar maior taxa de positividade para confirmação laboratorial de casos de hepatite A aguda (59,06 vs. 55,55%). No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa e a análise de concordância de Kappa demonstrou uma fraca correlação entre esses dois métodos ($p_{\text{Kappa}} = 0,261$).

Algumas amostras apresentaram resultado inconclusivo pelo método de RT-Nested PCR. Esta limitação do método é em grande parte devido ao aparecimento de bandas inespecíficas, o que dificulta a interpretação dos resultados. O método empregado para

amplificação de uma sequência alvo curta da região VP1/2A, que é a região de escolha para a genotipagem do HAV (ROBERTSON et al., 1992), baseia-se no protocolo modificado por PAULA e cols. (2002). É provável que a ocorrência de amplificação inespecífica seja decorrente da utilização de *primers* degenerados e das baixas temperaturas de anelamento.

Observou-se, ainda, que a frequência de detecção do HAV RNA foi mais alta entre as amostras reagentes para o anti-HAV IgM (70,5%) do que entre as amostras não reagentes para este marcador sorológico (44,7%). Por outro lado em 15,8% das amostras negativas para o HAV RNA foi observado resultado reagente para o anti-HAV IgM. No presente estudo, utilizou-se o sistema Cobas® E411 (Roche, EUA) para a detecção de anticorpos de classe IgM específicos para o HAV, por eletroquimioluminescência. Dentre os métodos sorológicos atualmente disponíveis para o diagnóstico laboratorial de rotina, o imunoensaio por eletroquimioluminescência é a tecnologia utilizada na execução dos imunoensaios que proporciona a mais elevada sensibilidade analítica para o diagnóstico precoce de infecções que apresentam períodos de incubação curtos. Por outro lado, apresentam menor especificidade (98,8%), o que poderia levar a resultados falso-positivos (ROCHE, 2005). Deve-se destacar, ainda, que 44,7% das amostras previamente identificadas como não-reagentes para o marcador sorológico anti-HAV IgM apresentaram positividade para o HAV RNA.

A interpretação de tais resultados, a princípio discrepantes, exige uma análise criteriosa dos dados clínicos que, no presente estudo foi dificultada pela falta de dados referentes à data de início dos sintomas. É provável que o perfil anti-HAV IgM Reagente com HAV RNA não detectável corresponda ao período de janela imunológica da infecção. No entanto, deve-se levar em consideração que a amostragem pode ter selecionado não apenas casos suspeitos sintomáticos, mas também contactantes assintomáticos, em que a colheita da amostra para diagnóstico laboratorial tenha ocorrido ainda no período de incubação. Os resultados obtidos neste estudo permitem verificar que a combinação desses dois marcadores levou a um incremento do número de casos confirmados laboratorialmente, de 95 (55%) para 129 (75,4%).

Entre os casos confirmados de hepatite A aguda, observou-se a predominância de indivíduos menores de 20 anos de idade (100/129), dos quais 43,4% estavam na faixa etária de 1 a 9 anos e 34,1% entre 10 e 19 anos. A elevada prevalência de hepatite A, nos primeiros 10 anos de vida (quando a infecção é em geral assintomática) é uma característica das populações de baixo nível socioeconômico e condições higiênico-sanitárias precárias. Na população estudada, a alta incidência de casos de hepatite A aguda em crianças e adolescentes é preocupante, considerando-se a possibilidade, mesmo que rara, de evolução para a

insuficiência hepática aguda (hepatite fulminante) como demonstrado em estudo realizado na Argentina por ASSIS et al (2002) que evidenciou o vírus da hepatite A como o agente etiológico em 64% dos casos de hepatite aguda, em crianças, que evoluíram para insuficiência hepática fulminante, na qual o único tratamento disponível é o transplante de fígado.

As doenças de veiculação hídrica emergiram como um dos principais problemas de Saúde Pública nos últimos 25 anos (FRANCO, 2007). Os serviços de água tratada e de esgoto são de grande importância à saúde e bem-estar da população, sendo os serviços de saneamento básico, considerados essenciais à vida e com fortes impactos sobre o meio ambiente (IPEA, 2005). Segundo o IBGE (2002), na cidade de Macapá, 42.635 domicílios tem acesso à água de abastecimento público distribuída pela Companhia de Água e Esgoto do Estado do Amapá (CAESA) enquanto que em 33.533 domicílios a forma de abastecimento é feita por poços ou nascentes. Assim, aproximadamente 44% dos domicílios não tem acesso à água tratada, tendo assim que fazer uso de fontes alternativas de água para consumo humano. (LIMA, 2013).

No que se refere ao risco de exposição ambiental a agentes patogênicos de veiculação hídrica na população estudada, a maioria dos casos de hepatite A aguda ocorreram em bairros um pouco afastados do centro comercial da cidade (com sistema de abastecimento de água precário e desprovidos de sistema de esgoto) ou localizados em áreas alagadas que sofrem influência da maré, conhecidas como áreas de ressaca, como é o caso dos bairros Jardim Marco Zero, Muca, Congos e Buritizal.

As fontes de contaminação antropogênica em águas subterrâneas são em geral diretamente associadas a despejos domésticos, industriais e ao chorume oriundo de aterros de lixo que contaminam os lençóis freáticos com microrganismos patogênicos (LIMA, 2013). Situadas nas regiões urbanas e peri-urbanas de Santana-AP, assim como em Macapá as áreas de ressaca estão sendo impactadas pela ocupação humana desordenada, com a construção de moradias, aterramento, queimadas, despejo de resíduos sólidos e dejetos. É, portanto, previsível que o impacto na qualidade da água nessas áreas favoreça a disseminação de agentes patogênicos de transmissão entérica (LIMA, 2013), dentre eles provavelmente o vírus da hepatite A.

Nesse tipo de cenário epidemiológico, a circulação simultânea de outros vírus de transmissão entérica, dentre os quais se inclui o vírus da hepatite E (HEV), não seria meramente especulativa. No entanto, nenhum caso recente de infecção (ou coinfeção) aguda por HEV foi identificado na presente investigação. Nem tampouco se verificou evidências da circulação deste vírus (presença de anticorpos anti-HAV IgG) nesta amostragem. De 72

amostras testadas, nenhuma apresentou resultado positivo para o anti-HEV IgG, marcador sorológico sugestivo de infecção passada ou de exposição prévia ao HEV. Mesmo reconhecendo que o tamanho da amostra não permita estimar a prevalência deste marcador na população, presume-se que o HEV não esteja circulando nesta localidade, visto que as condições favoráveis à transmissão de vírus entéricos estão presentes como evidenciado pela alta endemicidade do vírus da hepatite A no Estado do Amapá.

Os resultados dessa investigação estão em concordância com o de outros estudos soropidemiológicos de populações urbanas e rurais das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, os quais verificaram baixas taxas de prevalência (4%; 2,3%; 2,4%) para o HEV, por exemplo, indivíduos expostos a suínos (SILVA et al., 2012), doadores de sangue (BORTOLIERO et al., 2006) e comunidades carentes do Rio de Janeiro (SANTOS DC et al., 2002). Recentemente, baixas prevalências de anti-HEV (<1% a 4%) foram também observadas em duas comunidades ribeirinhas da Amazônia (comunicação pessoal, dados não publicados).

Contudo, é importante salientar que o HEV pode exibir padrões de endemicidade heterogêneos em áreas e populações específicas, como por exemplo, em comunidades de assentamento agrícola, como observado nesse mesmo estudo que vem sendo conduzido por pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, IOC/Fiocruz e por VITRAL e cols (2012), onde valores de prevalência mais altos (12% -14%) foram detectados em áreas rurais no Acre e em Rondônia.

Com base nesses estudos, em que os dados de soroprevalência apontam para um perfil de baixa endemicidade para a hepatite E, tanto na Amazônia como em outras regiões do Brasil, alguns autores tem relatado resultados conflitantes que sinalizam a existência de fatores de risco de exposição heterogêneos e ainda não esclarecidos. Portanto, os resultados da investigação de marcadores sorológicos e virológicos do HEV obtidos nesta primeira avaliação não devem ser interpretados de forma a reduzir a relevância da vigilância epidemiológica deste agravo. Estudos posteriores incluindo um número representativo de amostras são necessários.

A proposta de inclusão dos marcadores sorológicos anti-HEV IgM e anti-HEV IgG ao algoritmo para diagnóstico diferencial das hepatites virais de transmissão entérica, conforme apresentado no APÊNDICE 2, poderia contribuir para a elucidação de casos inconclusivos ou não investigados, no Estado do Amapá. Com a adição desse novo algoritmo, um novo procedimento de coleta e armazenamento de amostra também deverá ser implementado (APÊNDICE 1) com orientações para o fracionamento das amostras em duas alíquotas: uma

destinada ao Laboratório de Virologia, para a pesquisa dos marcadores sorológicos e uma segunda alíquota, que deverá ser armazenada para a pesquisa de marcadores virológicos, seguindo os requisitos preconizados pelo Manual de IATA.

7 CONCLUSÕES

- 1) Uma alta incidência de casos de hepatite A aguda tiveram confirmação laboratorial com a detecção de marcadores sorológicos (anti-HAV IgM) e virológicos (HAV RNA);
- 2) A maioria dos casos de hepatite A aguda ocorreu em áreas de ressaca da periferia de Macapá, desprovidas de saneamento básico;
- 3) A técnica de RT-Nested PCR apresentou maior sensibilidade que o método sorológico na confirmação laboratorial de casos de hepatite A aguda;
- 4) O HAV RNA foi detectado com maior frequência em concomitância com o anti-HAV IgM do que na ausência deste marcador sorológico;
- 5) A combinação dos marcadores sorológico (anti-HAV IgM) e virológico (HAV RNA) resultou no aumento do número de casos de hepatite A confirmados laboratorialmente;
- 6) Os marcadores sorológicos (anti-HEV IgG e IgM) e virológico (HEV RNA) do vírus da hepatite E não foram detectados na população deste estudo.

8 REFERÊNCIAS

ABRAVANEL, F. et al. **Hepatitis E Virus**. *Medecine et maladies infectieuses* 43 (2013) 263-270.

ASSIS, S. B. et al. **Prevalência da infecção pelos vírus das hepatites A e E em escolares de município da Amazônia Matogrossense**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(2):155-158, jan-fev, 2002.

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá,Pará, 2007.

BALAYAN, M. S. et al. **Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route**. *Intervirology*. 1983;20(1):23-31.

BATRA, Y. et al. **Vaccination against hepatitis A virus may not be required for schoolchildren in northern India: results of a seroepidemiological survey**. *Bull World Health Organ*. 2002;80:728-31.

BENDALL, R. et al. **Comparision of two commercially available anti-HEV IgG Kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries**. *Journal Med Virol*. 2010; 82: 799-805.

Boletim Epidemiológico-Hepatites Virais. Disponível em http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/51820/boletim_epidemiologico_hepatites_virais_2012_ve_12026.pdf. Acesso em: 01 jun.2014.

BORTOLIERO, A. L., et al. **Seroprevalence for Hepatitis E Virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the regional blood bank of Londrina, state of Paraná, Brazil**. *Revista Inst. Medicina Tropical*. São Paulo, 48(2):87-92, Março-Abril, 2006.

BOSCH, J. et al. **Autoimmune hepatitis with fatal outcome**. *Journal of Pediatrics*, 118: 823-824, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)80058-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(05)80058-7).

BOWER W.A., NAINAN O.V., HAN X., MARGOLIS H.S. **Duration of viremia in hepatitis A virus infection**. *J Infect Dis* 2000;182:12-7.

BRANDÃO-MELLO, C. E., MENDES, C.G.F., PERNAMBUCO, C.D. **Diagnóstico imunossorológico das hepatites virais** - Hepatites, 2 ed., capítulo 2, Rio de Janeiro, RJ, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **A, B, C, D, E de hepatites para comunicador**. Brasília: série F. Comunicação e Educação em saúde, 2005.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008**. Rio de Janeiro 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **HEPATITES VIRAIS: desafios para o período de 2011 a 2012**. Brasília, 2010.

BRYAN, J.P. et al. **Epidemic of hepatitis E in a military unit in Abbotabad, Pakistan**. Am J Trop Med Hyg.v.67, n.6, p.662-668, 2002.

CHANDRA, V., et al. **Molecular Biology and pathogenesis of hepatitis E virus**. J Biosci. 2008; 33: 451.

CIACCIA, M. C. C. et al. **Aspectos epidemiológicos e sorológicos da hepatite A em crianças e adolescentes na cidade de Santos: estudo transversal**. Sao Paulo Medical Journal online. 2012, vol.130, n.4, pp. 230-235. ISSN 1516-3180.

CORDOVA, C. M. M. et al. **Serology for Hepatitis E vírus in pregnant women: clinically important or unnecessary?**. RBAC 2007 vol. 39, n.4, p.269-273.

COTTER, J. **Hepatites víricas**. Núcleo de Gastreenterologia dos Hospitais Distritais, p 43-52 junho, 2003.

CRUZ, C. R. B., et al. **Comparação do perfil epidemiológico das hepatites B e C em um serviço público de São Paulo**. Arq Gastroenterol. v.46, n.4, p.225-229, 2009.

DE PAULA, V. S.; VILLAR, L. M.; GASPAR, A. M. C. **Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples**. Braz J Infect Dis v.7 n.2, p.135-141, 2003.

FEINSTONE, SM.; KAPIKIAN, AZ.; PURCELL, RH. **Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness**. Science, 182: 1026-1028, 1973.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. **Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção.** Revista Brasileira de Epidemiologia. vol.7 nº 4 São Paulo Dec. 2004.

FONSECA, J. C. F. **Histórico das hepatites virais.** Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43 (3):322-330, mai-jun,2010.

FRANCO, E. et al. **Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries.** World J Hepatol 2012 march 27; 4 (3):68-73. ISSN 1948-5182.

GARDINALI, N.R.; BARRY, A.F.; SILVA, P.F. et al. **Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds.** Res. Vet. Sci., v.93, p.1515-1519, 2012.

GOMES, A. P. et al. **Viral hepatitis: clinical approach with emphasis on A and E viroses.** Rev Bras Clin Med. São Paulo, 2012 mar-abr;10(2):139-46.

GOMES, M. A. C. et al. **Hepatite A: soroprevalência e fatores associados em escolares de São Luís (MA), Brasil.** Revista Brasileira de Epidemiologia, vol.14 nº.4 São Paulo Dec. 2011.

HEPATITES VIRAIS: desafios para o período de 2011 a 2012. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Metas_hepatites.pdf>. Acesso em: 01 jun.2014.

HUANG, Y. W., et al. **Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo.** J Virol. vol 81, n.6, p.3018-3026, 2007

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** <www.ibge.gov.br/>

IPEA. **Saúde e Saneamento no Brasil.** Brasília. P. 24, 2005.

KAMAR, N. et al. **Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients.** N Engl Journal Medicine. p. 811-817, 2008.

KUNTZ E., KUNTZ HD. **Hepatology, Principles and Practice,** Springer-Verlag, Berlim, Heidelberg, New York 2002.

LEMON, S.M. **Inactivated hepatitis A virus vaccines.** *Hepatology*, v.15, p.1194-1197, 1992.

LIMA, D.C.I. **Caracterização do Abastecimento Público de Água Potável no Município de Macapá.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Amapá. Macapá, 2013.

LUIZ, R.R. et al. **The relation between anti-hepatitis A virus antibodies and residence water access in Rio de Janeiro, Brazil.** *Int J Hyg Environ Health*. Vol 206, p.575-582, 2003

MARTIN, A.; LEMON, S. M. **Hepatitis A virus: From discovery to vaccines.** *Hepatology*, 43(2), suppl 1: S163-S172, 2006.

MELNICK, J. L. **History and Epidemiology of hepatitis A vírus.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 171, p. S2-S8, 1995.

MENG, X. J. **Recent advances in Hepatitis E Virus.** *J Viral Hepat.* v.17, n.3, p.153-161, 2010.

MENG, X. J.. **Hepatitis E vírus; Animal reservoirs and zoonotic risk.** *Vet Microbiol.* Vol 140, p.256-265, 2010b.

MENG, X. J. et al. **Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries.** *Journal Clin Microbiol.* vol40, p. 117-122, 2002.

MENG, X. J. **From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety.** *Virus Res* 161, 23-30 2011.

MINOR, P.D. **Picornaviridae.** In: Francki RIB. Fauquet CM, Knudson DL, Brown F, eds.

MIRAZO, S. et al. **Indigenous Hepatitis E Virus Genotype 1 Infection, Uruguay.** *Emerging Infectious Diseases* < www.cdc.gov/eid>, vol. 20, nº 1, January 2014.

MUSHAHWAR I.K. **Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention.** *J Med Virol.* v.80, n.4, p.646-658, 2008.

NAINAN, O.V. et al. **Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach.** *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2006. Vol 19, n.1, p. 63–79, 2006.

NERI, S.H.A. **A utilização das ferramentas de geoprocessamento para identificação de comunidades expostas a Hepatite A nas áreas de ressacas dos municípios de Macapá e Santana/AP.** Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciências em Engenharia Civil pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004.

OKAMOTO, H. **Genetic variability and evolution of hepatitis E virus.** *Virus Res.* 127, p. 216–228, 2007.

PAULA, V. S. et al. **Characterization of Hepatitis A Virus Isolates From Subgenotypes .** *Journal of Medical Virology* 66:22-27. Rio de Janeiro, 2002.

PEREIRA, F. E. L.; GONÇALVES, C. S. **Hepatitis A.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36 (3): 387-400, mai-jun, 2003.

PURCELL, R.H., EMERSON, S.U. **Animal models of hepatitis A and E.** *ILAR J.* 42, p.161-177, 2001.

PURCELL, R. H.; EMERSON, S. U. **Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease.** *J Hepatol.* 48, p.494-503, 2008

ROBERTSON B. H., JANSEN R. W., KHANNA B., et al. **Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions.** *J Gen Virol.* 73, p.1365-77, 1992.

SANTOS D. C., et al. **Seroepidemiological Markers of Enterically Transmitted Viral Hepatitis A and E in Individuals Living in a Community Located in the North Area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(5):* 637-640, July 2002.

SANTOS, D. L.; FILHO, E. F. O.; PINTO, M. A. **Hepatite E no Brasil e no Mundo: Revisão de Literatura.** *Veterinária e Zootecnia.* p. 9-18, setembro, 2013.

SCHLAUDER, G.G. et al. **Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina.** *J Infect Dis.* v.182, n.1, p.294-297. 2000.

SELVES, J. et al. **Hepatitis E virus: A new entity.** *Ann Pathol* 30, 432-438 2010.

SEYMOUR, I. J.; APPLETON, H. **Foodborne viruses and fresh produce.** *Journal of Applied Microbiology,* v. 91, n. 5, p. 759-773, 2001.

SIEGL, G.; WEITZ, M.; KRONAUER, G. **Stability of hepatitis A virus.** Intervirology. V. 22, n.4, p.218-26.1984.

SILVA, A.C. **Manifestações clínicas das hepatites virais.** In: Coelho, H.S.M.C., Hepatites, 2ª. ed., capítulo 3, 2001, Rio de Janeiro, Brasil, Rubio.

SILVA, A.C. **Padronização da Detecção Molecular (RT-PCR) do Vírus da Hepatite A.** 2005, 13. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2005.

SILVA, S. M. T. **Prevalência de anticorpos contra o vírus da Hepatite E (HEV) em indivíduos expostos a suínos de regiões rurais de Mato Grosso, Brasil.** Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

SILVA S. M. T., et.al. **Prevalence of hepatitis e virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, vol. 107(3): 33,8-341, May, Rio de Janeiro, 2012.

TAM, A.W.; SMITH, M.M.; GUERRA M.E.; HUANG, C.C.; BRADLEY, D.W.; FRY, K.E.; REYES, G. R.. **Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome.** Virology, v.185, p. 2110–2131. 1991.

TICEHURST , J. et al. **Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis in Pakistan: serologic responses and pattern of virus excretion.** J Med Virol. vol.36, n.2, p. 84-92. 1992.

TRINTA, K. S. et al. **Hepatitis E vírus infection in selected Brazilian populations.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96 (1): 25-29 2001

VIEIRA, C. B. et al. **Vírus Entérico na Lagoa Rodrigo de Freitas.** Oecologia Australis, 16(3): 540-565, setembro 2012.

VITRAL, C. L., et al. **Hepatitis A and E seroprevalence and associated risk factors: a community-based cross-sectional survey in rural Amazonia.** BMC Infectious Diseases, p 2-9, 2014.

YEH, CH., et al. **Identification of NV-F virus in hepatocellular carcinoma.** J Med Virol, v.79, p.92-96, 2002.

APÊNDICE 1



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

POP 3.04.02.84

Revisão 0

Folha 63 / 69

Título: **COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS, SEPARAÇÃO, RECEBIMENTO E ARMAZENAMENTO PARA CASOS SUSPEITOS DE HEPATITE AGUDA VIRAL**

Revisão: 0 Data: 01/10/2015 Motivo: Elaboração de procedimento

Elaborado por: Márlisson Octávio da S. Rêgo Farmacêutico-Bioquímico Aprovado por: Júlia Marques Farmacêutica-Bioquímica

Executante da atividade: Técnicos de Laboratório

Hora/frequência de execução: À cada cliente.

Prazo de execução: De acordo com o ensaio.

Local de execução: Sala de colheita ou setor de triagem do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-AP).

Resultado esperado: Amostra obtida com alto grau de confiabilidade

Materiais necessários: **Materiais usados na colheita de sangue**

- Álcool a 70%.
- Algodão em bolas.
- Agulhas (estéril): vacutainer e descartável.
- Adaptador
- Braçadeira
- Bandagem anti-séptica
- Coletor de material perfurocortante
- Coletor de descarte de agulhas
- Coletor de lixo infectante
- Coletor de lixo comum
- Cadeira de coleta
- Estante para tubos de Hemólise
- Gazes
- Maca
- Scalp
- Seringa (s) descartável (is) diversas
- Torniquete de trava (Garrote)
- Tubo de coleta a vácuo

Materiais de expediente na coleta

- Etiqueta – Identificação
- Ficha cadastrada e Identificada
- Lápis demográfico
- Pincel de Retro projetor

Outros materiais

- Caixa térmica para transporte

EPI necessários:	Jalecos limpos, luvas descartáveis, gorro, máscara, óculos de proteção ou protetor facial.
Condições Ambientais :	Temperatura Ambiente entre 22°C – 26° C
Cuidados especiais:	Todos os servidores que estiverem escalados para a coleta de amostras de sangue devem utilizar todos os EPI's.
Documentos complementares:	POP de Cadastro do Paciente, coleta de Amostras Biológicas, e Recebimento de Amostra Biológica de Coleta Interna e Externa.

Procedimento para colheita de sangue por punção venosa

- Se o paciente estiver em condições de mobilidades normais sentá-lo confortavelmente em cadeira com descanso para o braço, deixando-o acessível para a coleta. Caso não esteja, coletar com o paciente deitado ou em cadeira de rodas quando necessário;
- Antes de iniciar a coleta, lavar as mãos colocar luvas, se a coleta for a vácuo rosquear a agulha no suporte;
- Colocar o torniquete (garrote), para que as veias fiquem mais calibrosas;
- Fazer a assepsia do local com algodão embebido em álcool 70 %;
- Em seguida, puncionar a veia e coletar o sangue;
- A pressão do torniquete não deve ser mantida mais que 60 segundos, porque produz aumentos na concentração de células sanguíneas;
- Se a coleta for com seringa, colocar o sangue, cuidadosamente nos tubos próprios, deixando escorrer suavemente pela parede interna do tubo, desprezar a agulha no recipiente próprio para perfuro cortantes;
- No caso de amostras enviadas ao Lacen-AP provenientes das unidades de saúde, encaminha-las ao setor de Recebimento de amostras onde serão devidamente cadastrada e logo em seguida enviadas ao Serviço de Triagem.

Colheita da amostra, separação ou fracionamento e encaminhamento ao Serviço de Virologia

- Colher 10 mL de sangue total sem anticoagulante;
- Encaminhar os tubos para o Serviço de Triagem;
- Aguardar alguns minutos para que ocorra a coagulação do sangue e a retração do coágulo, evitando a formação de fibrina e hemólise da amostra. No caso de amostras já coletadas, observar se estão devidamente separadas e não apresentando hemólise;
- Centrifugar o tubo com sangue entre 2.500 e 3.000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro (sobrenadante);
- Dividir o soro em duas alíquotas de aproximadamente 1 mL uma para testes sorológicos e outra para testes de biologia molecular. Usar microtubos de polipropileno resistentes a baixas temperaturas e livres de RNase;
- Manter as alíquotas de soro à -20⁰ C (testes sorológicos) e à -70⁰ C (testes de biologia molecular).

APÊNDICE 2



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

POP 3.04.02.85

Revisão **0**

Folha **65 / 69**

Título: **FLUXOGRAMA PARA DIAGNÓSTICO DE CASO SUSPEITO DE HEPATITE AGUDA VIRAL**

Revisão: 0 Data: 01/10/2015 Motivo: Elaboração de procedimento

Elaborado por: Márlisson Octávio da S. Rêgo
Farmacêutico-Bioquímico Aprovado por: Júlia Marques
Farmacêutica-Bioquímica

Referências:	Manual de Hepatites Virais, 2010.
Executante da atividade	Farmacêuticos e Biomédicos responsáveis pelo serviço de diagnóstico das Hepatites virais.
Hora/freqüência de execução:	À cada cliente.
Prazo de execução:	De acordo com cada ensaio.
Local de execução:	Serviço de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública.
Resultado esperado:	Diagnóstico realizado em tempo hábil.

1-Definição:

A hepatite aguda viral é, em geral, causada por vírus hepatotrópicos (os vírus das hepatites A, B, C, D e E), embora outros vírus tais como citomegalovírus, Epstein Barr, herpes, febre amarela e dengue possam também causar infecção sistêmica e acometer o fígado. Os vírus da hepatite A (HAV) e da hepatite E (HEV) são transmitidos por via fecal-oral e causam, ambos, infecção aguda autolimitada com manifestações clínicas que variam desde casos subclínicos à insuficiência hepática aguda (hepatite fulminante). O vírus da hepatite B pode ser transmitido pelas vias parenteral (exposição à sangue ou outros fluidos corporais infecciosos), sexual, vertical (perinatal) ou horizontal, enquanto os vírus C e D (Delta) são transmitidos principalmente pela via parenteral. Os vírus B, C e D podem causar hepatite crônica com progressão para a cirrose e/ou ao carcinoma hepático.

2-Requisitos:

- As amostras biológicas ou pacientes encaminhados ao LACEN por intermédio da Vigilância Epidemiológica do Estado ao LACEN-AP devem estar acompanhados de pedido médico com solicitação de diagnóstico e ficha de investigação epidemiológica devidamente preenchida;

- Considera-se caso suspeito de hepatite viral aguda o paciente que desenvolveu icterícia de modo súbito (recentemente) apresentando ou não outros sinais e sintomas, tais como febre, mal-estar, náuseas, vômitos, mialgia, colúria e hipocolia fecal.

LUXOGRAMA PARA HEPATITE AGUDA VIRAL

