

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

FABÍOLA SOUZA FIACCADORI

⋮

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE A
EM INDIVÍDUOS COM SUSPEITA DE HEPATITE,
NA CIDADE DE GOIÂNIA, GOIÁS:
DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS E SUBGENÓTIPOS VIRAIS**

Orientadora:
Prof^a Dr^a Célia Maria de Almeida Soares
Co-orientadora:
Prof^a Dr^a Divina das Dôres de Paula Cardoso

Tese de Doutorado

GOIÂNIA – GO, 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

FABÍOLA SOUZA FIACCADORI

⋮

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE A
EM INDIVÍDUOS COM SUSPEITA DE HEPATITE,
NA CIDADE DE GOIÂNIA, GOIÁS:
DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS E SUBGENÓTIPOS VIRAIS**

Orientadora:

Prof^a Dr^a Célia Maria de Almeida Soares

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a Divina das Dôres de Paula Cardoso

Tese de Doutorado submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Tropical, na área de concentração de Microbiologia.

Auxílio Financeiro: CNPq Processo nº 141043/2003-2

GOIÂNIA – GO, 2006

DEDICATÓRIA



Aos amores da minha vida, Papai, Mamãe,
Fratello, Titia Maria, Meu Grande Amor.
Pelo amor que nos une. Por tudo o que
construímos juntos. Pelos momentos que
ainda viveremos!



AGRADECIMENTOS



Agradecimentos...

Este é, após anos de trabalho, um momento prazeroso e dos mais desejados! Durante todos estes mesmos anos, minha incansável Mestra esteve a me ensinar a escrever, sempre me cobrando textos breves, claros e objetivos. Quem me conhece deve estar imaginando... “Que trabalho ela teve!”. É bem verdade que objetividade com as palavras não é meu ponto forte: adoro escrever e florear! Entretanto, seu esforço vem dando resultados. Se estou agora a escrever meus agradecimentos, é por que findei mais esta etapa com este trabalho acadêmico. Refletindo sobre isso percebi que apenas este breve texto, o de agradecimentos, poderia ser feito diferente de um texto de caráter científico, ou seja, menos sucinto e objetivo, e mais a minha maneira: escrevendo e floreado. Pois para este tipo de texto, não existem regras, limites, padrões, mas sim, sentimentos. Alguma dúvida da minha escolha?

Mas habituada que estou às regras, comecei por uma pesquisa, desta vez não bibliográfica, mas biográfica. Esta me indicou que na verdade, havia apenas um único, mas essencial agradecimento a fazer: a um **Ser** de bondade, beleza, poder e amor incomensuráveis, Ao Qual devo tudo o que sou e tenho! Minhas fontes justificam este agradecimento individual uma vez que foi este Ser que me deu o que de mais importante tenho, a vida!

Mas não estando Ele satisfeito, deu-me de presente uma família. Não qualquer uma, não, mas **A Família**, A Melhor!!! Um **pai**, fisicamente presente por pouco tempo, mas o suficiente para deixar marcas de um amor simplesmente especial, por toda a vida. Uma **mãe** forte, corajosa, determinada, esteio e porto seguro, o coração da família que transborda amor e doação. Um **irmão**, que é minha paixão e um anjo enviado para cuidar de mim. **Titia Maria**, segunda mãe, com seu cuidado, carinho e dedicação sem fim.

Após um tempo, ele trouxe mais um, que chamo de **meu amor**, porque veio ao mundo para ser meu e completar o pedaço de mim que faltava, e comigo formar outra

família. E foi assim, com estes seres abençoados me rodeando, protegendo e mimando, que fui crescendo e construindo uma história de vida. Vida esta que após profundas análises atrevo-me a definir como vitoriosa. Minhas fontes corroboram esta conclusão, pois elas relatam sim alguns momentos de dor e dificuldades, mas com percentual significativamente menor do que o encontrado em relação aos momentos de alegria, paz e felicidade.

Lendo os relatos, observei que para obter este resultado, o Ser responsável pela minha vida permaneceu e permanece continuamente em atividade, introduzindo novos elementos essenciais para a construção destes momentos. **Tios, primos, amigos de infância, amigos de adolescência, amigos da faculdade, amigos da vida**, cada um se fez presente em algum momento importante, com um colo, um abraço, uma bronca, uma brincadeira, um passeio, uma palavra.

Quando comecei a virar gente grande, também fui presenteada com um estágio no **Laboratório de Virologia aqui no IPTSP**, onde tive a chance de aprender não só muito, mas tudo o que sei profissionalmente. Foi neste instituto que tive a oportunidade de conhecer profissionais de extrema competência e que foram determinantes para meu aprendizado, incluindo todo o **quadro de funcionários e professores**, em especial **as professoras Regina e Wília**. Ainda dentro do laboratório, ganhei vários **amigos**, pessoas de ouro que, em um espírito de comunidade, estão sempre a me amparar e apoiar, em especial meus amigos de todo dia, **Aninha, Meg e Rodrigo**.

Também foi nesta instituição que conheci a **professora Divina, a minha“prófi”**. Ela que lá me colocou e desde então cuidou para que eu não saísse! Tenho imenso orgulho por ser sua aluna, sua cria, tendo-a como mais uma mãe que ganhei de presente, pois não só me ensinou a ser pesquisadora e professora – meu grande sonho profissional, mas esteve sempre presente com seu carinho e cuidado maternal. Tem sido por todo este tempo expressivo exemplo de profissionalismo, competência, dedicação e integridade, despertando em mim a mais profunda admiração.

Mesmo com tanta qualidade e competência, fui presenteada ainda com outra professora orientadora, **professora Célia**, de gabarito e sabedoria inquestionáveis, que com seu apoio e confiança possibilitou a realização deste trabalho e a concretização de um sonho. Difícil conseguir ter uma orientadora do nível de uma dessas duas professoras, agora

ter duas, realmente é presente Dele! Com esta oportunidade, fiz também **amigos no Laboratório de Biologia Molecular**, colegas sempre pacientes e dispostos a me auxiliar e apoiar, em especial, **Juliana**.

Ao longo dos anos, todas estas pessoas deixaram, de alguma forma, um pedacinho de suas vidas comigo, ao se fazerem presentes na minha. Foram estes pedacinhos que sofreram uma reação de polimerização num ciclo de mais de 27 anos. O produto final: a minha história de vida, que vista agora assim, em retrospecto, me traz a sensação de humilde satisfação.

E por todas estas companhias e momentos com os quais fui presenteada, não tenho outro agradecimento a fazer a não ser a Ti Senhor Deus, pela benção de ser sua filha e de ter Tua mão protetora a me guardar, olhar, proteger, guiar e iluminar. Mas como filha mimada que sou, além de agradecer faço mais um pedido, de que me permita, alguma dia, conseguir agradecer e retribuir todos os pedacinhos que me foram cedidos ao longo da vida, e para começar...

...MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. HEPATITE VIRAL.....	01
1.2. VÍRUS DA HEPATITE A.....	02
1.2.1. HISTÓRICO.....	02
1.2.2. CLASSIFICAÇÃO E MORFOLOGIA.....	03
1.2.3. ESTRUTURA GENÔMICA E PROTÉICA.....	04
1.2.4. VARIABILIDADE GENÔMICA DO VHA.....	06
1.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE A.....	07
1.4. ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE A.....	10
1.5. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VHA.....	11
1.5.1. TRANSMISSÃO.....	11
1.5.2. SOROPREVALÊNCIA.....	12
1.5.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS GENÓTIPOS E SUBGENÓTIPOS DO VHA.....	14
1.6. PREVENÇÃO E CONTROLE DA HEPATITE A.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	19

4. ARTIGO I.....	20
5. ARTIGO II.....	25
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS



Arg	Arginina
cDNA	DNA complementar
COEP-UFG	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás
CsCl	Cloreto de césio
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DTT	Ditiotreitrol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIE	Ensaio imunoenzimático
GBV-C	vírus GB-C
<i>HAV</i>	<i>Hepatitis A virus</i> (vírus da hepatite A)
<i>HBV</i>	<i>Hepatitis B virus</i> (vírus da hepatite B)
<i>HCV</i>	<i>Hepatitis C virus</i> (vírus da hepatite C)
IME	Imunomicroscopia eletrônica
KCl	Cloreto de Potássio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Quadro de Leitura Aberta)
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia pela Polimerase)
RNA	Ácido ribonucléico
<i>RT</i>	<i>Reverse Transcription</i> (Transcrição Reversa)

RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia pela Polimerase pós Transcrição Reversa)
SENV	vírus SEN
ssRNA	<i>single strand</i> RNA (RNA fita simples)
TTV	vírus TT
U	Unidade
UDI	Usuário de drogas injetáveis ilícitas
VHA	Vírus da hepatite A
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VHD	Vírus da hepatite D
VHE	Vírus da hepatite E

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS**INTRODUÇÃO**

- Figura 1 Micrografia eletrônica de partículas do VHA 04
- Figura 2 Esquema representando o genoma do VHA e as proteínas estruturais e não estruturais. 05

ARTIGO I

- Figure Hepatitis A virus positivity considering viral infection markers by collection year. 22
- Table I Hepatitis A virus (HAV) positivity considering the viral infection markers in relation to the samples 22
- Table II Hepatitis A virus positivity considering serological and molecular markers in relation to age, stratified by year 23

ARTIGO II

- Quadro I Dados referentes à comparação das seqüências de nucleotídeos dos 45
isolados analisados neste estudo, com seqüências depositadas em banco
de dados, utilizando o programa BLAST N.
- Figura 1 Árvores filogenéticas utilizando seqüências provenientes de isolados 49
VHA. - 1A. Método de Neighbor-Joining; 1B. Método de máxima
parsimônia; 1C. Método de máxima verossimilhança.
- Quadro II Genótipos dos isolados de VHA em relação à data de coleta 50
- Figura 2 Comparação entre as seqüências preditas de aminoácidos relativa à 51
junção VP1/2A dos isolados do VHA do Estado de Goiás. Os
aminoácidos que apresentaram alterações estão indicados em negrito. Os
subgenótipos IA e IB estão indicados à direita.

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite A (VHA) constitui um problema de saúde pública em todo o mundo. O presente estudo teve como objetivos determinar a prevalência da infecção aguda pelo VHA, em 703 pacientes com suspeita clínica na cidade de Goiânia – Goiás, bem como identificar os genótipos e subgenótipos do vírus circulantes na região. Neste sentido, amostras de soro desses indivíduos foram analisadas pelo ensaio imunoenzimático para a detecção do anti-VHA-IgM, observando-se índice de positividade de 46,4% (326/703). Das 703 amostras de soro, 588 e adicionalmente 22 amostras de fezes foram analisadas por *RT-PCR*, para detecção do RNA-VHA, sendo observados índices de positividade de 13,1% (77/588) e 54,5% (12/22), respectivamente. Como um todo, foi detectado um alto índice de positividade da infecção pelo VHA na região (51,9%), muito embora com declínio significativo deste índice durante o período de estudo. Para genotipagem, o produto de amplificação gênica de 18 amostras de soro foi submetido à reação de seqüenciamento da região relativa à junção VP1/2A do genoma do VHA. Seqüências de 168 nucleotídeos foram obtidas, e após análise, os 18 isolados foram classificados como genótipo I, sendo dez deles subgenótipo IA e oito subgenótipo IB. Este estudo confirma a ampla circulação do VHA em Goiânia, sendo ainda o primeiro a relatar a ocorrência de ambos subgenótipos (IA e IB) no Estado de Goiás e, neste sentido, demonstra a necessidade de informações adicionais a respeito da epidemiologia molecular de amostras circulantes do VHA na Região Centro-Oeste e nas demais regiões brasileiras.

Palavras-chave: Vírus da hepatite A; Prevalência; Genótipos

ABSTRACT

Hepatitis A virus (HAV) infection is a public health problem worldwide. The present study aimed to determine the acute HAV infection prevalence in 703 patients with clinical signs from Goiânia-Goiás, as well as to identify the HAV genotypes and subgenotypes circulating in the region. In this way, serum samples were tested for anti-HAV-IgM by enzyme immunoassay and 46.4% (326/703) were positive. Of the 703 serum samples, 588 and in addition, 22 fecal samples were analyzed by RT-PCR, for HAV RNA detection, with positivity indices of 13.1% (77/588) and 54.5% (12/22), respectively. It was observed a high index of HAV infection positivity in the region (51.9%), although with a significant decline during the period of study. For the genotyping, the amplification product of 18 serum samples was submitted to genomic sequencing reaction of the VP1/2A junction region of the HAV genome. Sequences of 168 nucleotides were obtained and analyzes showed that the 18 isolates were genotype I, with ten subgenotype IA and eight subgenotype IB. This study underscores the extent of HAV circulation in Goiânia and, this is the first report of the occurrence of both subgenotypes (IA e IB) in Goiás state and, in this way, shows the necessity of additional information about the molecular epidemiology of HAV samples circulation in West-Central Region and in the other Brazilian regions.

Key-Words: Hepatitis A virus; Prevalence; Genotypes

1. INTRODUÇÃO

1.1. HEPATITES VIRAIS

As hepatites virais podem ser causadas por diferentes tipos de vírus, embora o termo seja comumente reservado para aqueles agentes que têm o fígado como órgão alvo. A importância dessa doença não se limita apenas ao grande número de pessoas infectadas, mas também ao que se refere à evolução da infecção, que pode passar da forma aguda para a crônica, podendo evoluir para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (Ferreira & da Silveira 2004).

Nos últimos 50 anos ocorreram significativos progressos em termos da identificação e caracterização dos vírus causadores de hepatites. Neste sentido, as hepatites virais podem ser classificadas em termos das vias principais de transmissão dos agentes, incluindo a via fecal-oral, que tem os vírus das hepatites A e E (VHA e VHE) como causadores, e a parenteral, cujos representantes são os vírus das hepatites B (VHB), C (VHC) e D (VHD). Adicionalmente, outros vírus vêm sendo tentativamente relacionados à síndrome, os quais foram denominados vírus GB-C (GBV-C), vírus TT (TTV) e vírus SEN (SENV), tendo também como principal via de transmissão, a parenteral (Koike 2001, Menon 2002, Ferreira & da Silveira 2004).

1.2. VÍRUS DA HEPATITE A

1.2.1. HISTÓRICO

As evidências de uma doença com característica de icterícia remontam séculos, existindo relatos de icterícia epidêmica desde o tempo de Hipócrates, há mais de 2000 anos (Zuckerman 1970 apud Ross et al. 1991, Zuckerman 1983 apud Hollinger & Ticehurst 1996, Menon 2002). O termo “hepatite infecciosa” foi inicialmente designado por Cockayne (1912), sendo posteriormente denominada de hepatite A. Os primeiros relatos de surtos da hepatite infecciosa foram provenientes da Europa, nos séculos XVII e XVIII, sendo o primeiro em Minorca, em 1745 (Cockayne 1912).

No século XX, foram realizados estudos objetivando a identificação do agente causador da infecção, bem como a sua caracterização. Em 1923, Blumer sugeriu que a infecção era transmitida pelo contato pessoa a pessoa e, após a Segunda Guerra Mundial, evidências apontaram uma etiologia viral para a doença. No entanto, suspeitava-se também de uma segunda forma de hepatite infecciosa, a qual diferia da primeira por apresentar um período maior de incubação (Voegt 1942 apud Hollinger & Ticehurst 1996). Finalmente, com base principalmente em diferenças epidemiológicas observadas entre essas duas formas de hepatites, MacCallum (1947) introduziu os termos hepatite A e hepatite B para designar a hepatite infecciosa e hepatite sérica ou por soro homólogo, respectivamente. Estudos realizados por Krugman et al. (1967) permitiram diferenciar as duas formas de hepatite, a partir de diferenças clínicas, epidemiológicas e imunológicas. Denominou-se

então de MS-1, o agente causador da hepatite infecciosa que tinha como via principal de transmissão a fecal-oral e com curto período de incubação. Esse agente (MS-1) foi utilizado para inoculação em voluntários humanos (Krugman et al. 1967), possibilitando a identificação, por imunomicroscopia eletrônica, de uma partícula viral nas fezes dos indivíduos infectados, que foi então admitida como o vírus da hepatite A (VHA) (Feinstone et al. 1973).

A identificação do VHA foi um passo fundamental para o desenvolvimento de testes sorológicos específicos para a detecção de antígeno viral e de anticorpos produzidos especificamente contra o vírus, permitindo o diagnóstico da infecção pelo agente (Bradley et al. 1977). Em 1979, Provost & Hilleman estabeleceram um sistema de cultivo celular para o VHA, o que contribuiu enormemente para o desenvolvimento da vacina.

1.2.2. CLASSIFICAÇÃO E MORFOLOGIA

O VHA pertence à família *Picornaviridae*, gênero *Hepatovirus*. A partícula viral possui diâmetro de aproximadamente 27 nanômetros (nm) e, estruturalmente, é desnuda, com capsídeo de simetria icosaédrica (Figura 1), constituído principalmente por três proteínas estruturais, VP1, VP2 e VP3, e traços de uma quarta proteína, a VP4. O VHA apresenta um coeficiente de sedimentação de 156S a 160S, e densidade de flutuação em cloreto de cério (CsCl) de 1,32 a 1,34 g/cm³. Este vírus é estável em pH ácido, permanecendo viável por cinco horas em pH 1,0, a temperatura ambiente. A antigenicidade e integridade do vírus permanecem estáveis quando o mesmo é submetido à ação de éter ou clorofórmio, quando incubado por 60 minutos a 60^o C, e ainda por vários anos se estocado

poliproteína precursora de aproximadamente 2.225 a 2.227 aminoácidos (Figura 2) (Siegl et al. 1981, Najarian et al. 1985, Weitz et al. 1986, Cohen et al. 1987).

A poliproteína é dividida em três domínios funcionais denominados P1, P2 e P3, que, por clivagens sucessivas, resultam nas diferentes proteínas virais. O domínio P1 é precursor dos domínios 1A-D, dos quais resultam as proteínas estruturais constituintes do capsídeo viral VP4 (1A), VP2 (1B), VP3 (1C) e VP1 (1D). Os domínios P2 e P3 são precursores dos domínios 2A-C e 3A-D, respectivamente, dos quais resultam as proteínas não-estruturais, necessárias para o processo de replicação viral. Funcionalmente, o domínio 3B resulta na proteína VPg que, ligada à extremidade 5' do genoma, tem a função de iniciador de transcrição. O produto do domínio 3C tem atividade de protease, enquanto que o produto do domínio 3D constitui a RNA polimerase do vírus (Palmenberg 1990, Totsuka & Moritsugu 1999, Yokosuka 2000).

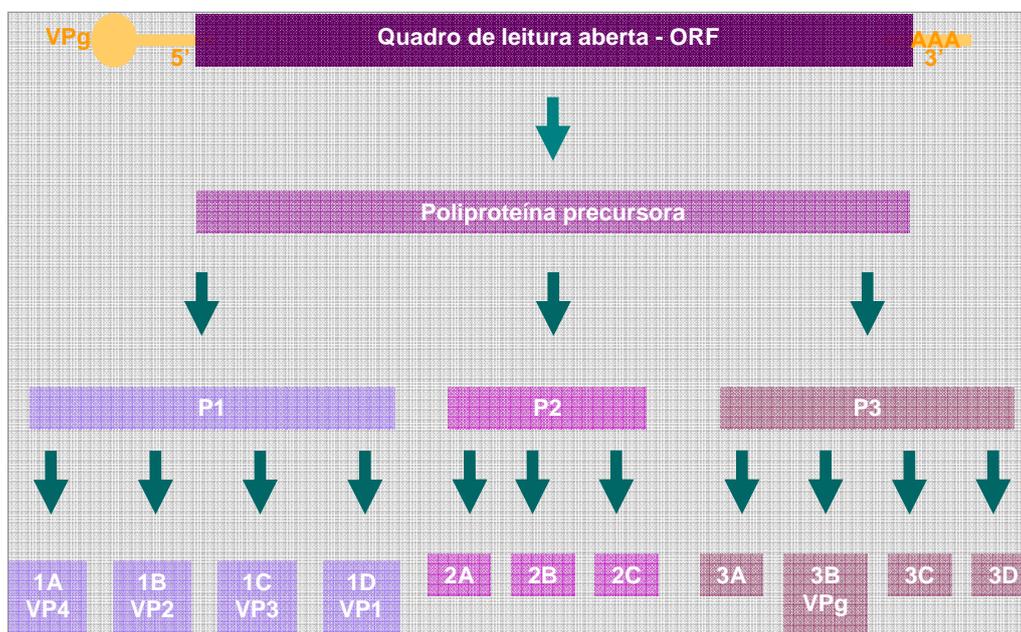


Figura 2. Esquema representando o genoma do VHA e suas proteínas estruturais e não-estruturais (Liberto et al. 2002, com modificações).

1.2.4. VARIABILIDADE GENÔMICA DO VHA

O VHA apresenta um único sorotipo, o que impede a diferenciação de isolados do vírus por métodos sorológicos (Rakela et al. 1976, Lemon & Binn 1983, Melnick 1992). Não obstante essa estabilidade antigênica, o VHA apresenta variabilidade genômica, tendo sido definidos seis genótipos virais (Lu et al. 2004). Essas variantes virais têm sido identificadas por seqüenciamento de diferentes regiões do genoma, incluindo as codificantes das regiões carboxi-terminal da proteína VP3 (Jansen et al. 1990), amino-terminal da proteína VP1 (Robertson et al. 1991, 2000, Apaire-Marchais et al. 1995, De Serres et al. 1999, Arauz-Ruiz et al. 2001, Costa-Mattioli et al. 2001a, 2001b) e da junção das proteínas VP1/2A (Robertson et al. 1992, 2000, Normann et al. 1995, Taylor 1997, Bruisten et al. 2001, Byun et al. 2001, Costa-Mattioli et al. 2001a, Diaz et al. 2001).

A região carboxi-terminal da VP3 é considerada a mais conservada, a da junção VP1/2A a mais variável e a região amino-terminal VP1 de variabilidade intermediária. O estudo original de análise genotípica do VHA teve como base a comparação de uma seqüência de 168 nucleotídeos da junção VP1/2A de 152 amostras isoladas de diferentes partes do mundo (Robertson et al. 1992). Essa análise permitiu a definição de sete genótipos distintos do VHA (I – VII), os quais diferiam uns dos outros em 15 a 25% na posição das bases e ainda, quatro subgenótipos (IA, IB, IIIA, IIIB) que diferiam entre si em torno de 7,5%. Os genótipos I, II, III e VII encontravam-se associados a infecções em humanos, e os outros, a infecções em espécies símias (IV, V, VI). Nesse mesmo estudo, foi observado que as amostras humanas pertenciam, em sua maioria, aos genótipos I e III, sendo identificada apenas uma amostra como genótipo II (CF53/Berne), e outra, como

genótipo VII (SLF88). Estudo posterior, analisando a região total codificante da proteína VP1, mostrou que entre as seqüências das amostras representativas dos genótipos II (CF53/Berne) e VII (SLF88), havia uma variação mínima, sendo então sugerido que essas amostras representariam subgenótipos de um mesmo genótipo (Costa-Mattioli et al. 2002a). Outro estudo reforçou essa sugestão a partir da análise do genoma total dessas amostras. Assim, foi proposta a classificação de ambas como diferentes subgenótipos do genótipo II, sendo o isolado CF53/Berne definido como subgenótipo IIA e o isolado SLF88 como subgenótipo IIB. Dessa forma, na atualidade, o VHA é classificado em seis genótipos (I – VI) sendo que os genótipos I, II e III apresentam-se divididos em subgenótipos A e B (Lu et al. 2004).

1.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE A

Do ponto de vista clínico, a infecção pelo VHA é de caráter benigno. Em crianças, a maioria das infecções ocorre de forma assintomática ou anictérica e, nessas circunstâncias, o quadro clínico pode passar despercebido, sendo confundido freqüentemente com quadros gripais ou com perturbações digestivas transitórias. Quando sintomática, as manifestações clínicas da infecção são indistinguíveis das hepatites agudas por outros agentes, e dessa forma, o diagnóstico laboratorial se torna necessário (Ferraz et al. 1991, Pereira & Gonçalves 2003). Nesse sentido, o diagnóstico da infecção pelo VHA pode ser realizado a partir da detecção da partícula ou do RNA viral, ou a partir de anticorpos de fase aguda produzidos pelo hospedeiro (Hollinger & Ticehurst 1996).

O VHA pode ser detectado por imunomicroscopia eletrônica (IME) a partir de fezes de pacientes infectados, em função, principalmente, da alta concentração do vírus nesse espécime clínico (10^9 partículas/g) (Feinstone et al. 1973, Dienstag et al. 1975, Hollinger & Ticehurst 1996). O período de excreção do vírus inicia-se desde uma a duas semanas antes do início dos sintomas e se estende por no mínimo duas semanas após (Skinhoj et al. 1981, Tassapoulos et al. 1986), muito embora, excreção fecal prolongada tenha sido relatada (Yotsuyanagi et al. 1996, Chitambar et al. 2001).

A presença do RNA viral pode ser detectada utilizando-se a reação em cadeia pela polimerase (Polimerase Chain Reaction – PCR). Em função de sua sensibilidade, especificidade e rapidez, essa metodologia tem sido extensivamente utilizada para o diagnóstico viral. Considerando ser o genoma viral constituído de RNA, uma etapa adicional, denominada transcrição reversa (Reverse Transcription - RT), se faz necessária. Essa utiliza a enzima transcriptase reversa para sintetizar uma molécula de DNA complementar (cDNA), tendo como molde a fita de RNA do vírus (Normann et al. 1994). Dessa forma, a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (*RT-PCR*) tem sido utilizada para a detecção do RNA-VHA a partir dos espécimes clínicos fezes e soro (Tedeschi et al. 1989, Seelig et al. 1992, Yotsuyanagi et al. 1996). Por essa metodologia, pode ser observado que o período de viremia, quando da infecção pelo VHA, pode chegar até 490 dias após o início dos sintomas, com carga viral de até 10^5 cópias/mL durante a fase aguda, a qual diminui gradualmente (Fujiwara et al. 1997, Kwon et al. 2000, Buti et al. 2001, Costa-Mattioli et al. 2002b, Normann et al. 2004). Adicionalmente, estudos utilizando a PCR também demonstraram a presença do VHA em soro coletado em fase

anterior ao surgimento dos sintomas, bem como em amostras negativas para o anti-VHA-IgM, dentro do período de janela imunológica (Bower et al. 2000, de Paula et al. 2004b).

Ainda, como referido, o diagnóstico da infecção pelo VHA é rotineiramente realizado a partir da detecção de anticorpos específicos da classe IgM (anti-VHA-IgM), o que tem sido feito principalmente utilizando o ensaio imunoenzimático (EIE) (Koff 1998). Esses anticorpos são detectados desde duas semanas da fase aguda da infecção e persistem, na maioria dos casos, por cerca de três a seis meses após, e raramente até 12 meses, definindo, assim, infecção aguda ou recente pelo VHA (Bradley et al. 1977, Locarnini et al. 1977, Kao et al. 1984). Adicionalmente, dentro de uma ou duas semanas após o início dos sintomas surgem, simultaneamente ao anti-VHA-IgM, os anticorpos da classe IgG (anti-VHA-IgG). Após esse período, negativa-se o marcador IgM e o anti-VHA-IgG persiste por toda a vida do indivíduo conferindo imunidade, e sua detecção evidencia um contato pregresso com o vírus indicando infecção passada (Ferraz et al. 1991, Koff 1998).

Por outro lado, a caracterização de amostras do VHA tem sido realizada, o que tem importância, principalmente, em epidemiologia e pode, no futuro, ter também reflexos na eficácia da vacina em uso, numa possibilidade, pelo menos teórica, do surgimento de isolados resistentes à mesma (Costa-Mattioli et al. 2003). Essa caracterização é realizada por genotipagem, sendo que o principal procedimento utilizado é o seqüenciamento genômico. Muitas regiões do genoma têm sido seqüenciadas e analisadas quanto a sua variabilidade, tendo sido observado que uma região de 168pb (3024 – 3191), localizada na junção das proteínas VP1/2A, aparece como a mais variável (Robertson et al. 1992). Nesse sentido, o seqüenciamento genômico da junção VP1/2A tem sido utilizado para a identificação dos genótipos do VHA circulantes.

1.4. ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE A

A hepatite aguda pelo VHA é uma infecção autolimitada, geralmente benigna, que não evolui para a cronicidade. Entretanto, o VHA permanece como um importante agente de doença hepática em todo o mundo, sendo causa significativa de morbidade tanto nos países em desenvolvimento, como nos desenvolvidos. A manifestação clínica pelo VHA é diretamente relacionada à idade do paciente. Em crianças menores de seis anos de idade, a maioria das infecções é assintomática ou subclínica, enquanto que dentre crianças mais velhas e adultos, é mais freqüente a infecção sintomática, com quadro de icterícia ocorrendo na maioria dos casos. Em qualquer caso, o indivíduo é potencial transmissor do vírus, disseminando a infecção (Hadler et al. 1980, Lednar et al. 1985, Koff 1992).

Em casos sintomáticos, a infecção aguda pelo VHA geralmente apresenta um período prodrômico, caracterizado por sintomas inespecíficos, como anorexia, febre, fadiga, mal estar, mialgia, náusea, vômito, dentre outros, variando de alguns dias a mais de uma semana. Após esse período, pode-se seguir a fase de icterícia, acompanhada de urina escura (colúria) e fezes claras (acolia fecal). O paciente, em geral, se recupera completamente dentro de dois meses. Não obstante, embora raramente, pode ocorrer hepatite fulminante, onde necrose mais extensiva do fígado leva a falência aguda com possibilidade de morte, principalmente em indivíduos mais velhos (Akriviadis & Redeker 1989, Koff 1992, 1998, Melnick et al. 1994, Hollinger & Ticehurst 1996, Pereira & Gonçalves 2003).

1.5. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VHA

1.5.1. TRANSMISSÃO

A principal via de transmissão do VHA é a fecal-oral, utilizando como veículo, a água e alimentos contaminados por fezes contendo o vírus. Por essa razão, a transmissão é facilitada por condições de saneamento e hábitos de higiene pessoal deficientes, bem como por situações de aglomeração, como creches, escolas, prisões e acampamentos. Nessas condições, a ocorrência de surto é frequente, onde pode se iniciar por fonte comum (água, alimentos), com a continuidade da transmissão feita de pessoa a pessoa (Hadler et al. 1980, Ferreira et al. 1996, Villar et al. 2002, Fiore 2004).

O VHA produz viremia e a transmissão parenteral tem sido relatada em casos de transfusão sanguínea e entre usuários de drogas injetáveis ilícitas (UDI) (Azimi et al. 1986, Schade & Komorwska 1988, Stene-Johansen et al. 1998, Diwan et al. 2003, Gowland et al. 2004, Spada et al. 2005). Por outro lado, para os UDIs, a transmissão do VHA tem sido relatada em função do contato direto sob condições de higiene precárias ou ainda, pela ingestão oral de drogas contaminadas por fezes (Akriviadis & Redeker 1989, Villano et al. 1997, O'Donovan et al. 2001, Spada et al. 2005).

O risco de adquirir hepatite A também tem sido relacionado à atividade sexual, em função principalmente de contato oroanal, orogenital e dígito-retal (Christenson et al. 1982, Henning et al. 1995, Ochnio et al. 2001, Diamond et al. 2003).

1.5.2. SOROPREVALÊNCIA

A hepatite A é uma infecção de distribuição universal, muito embora sua prevalência seja variável e diretamente relacionada às condições de saneamento, higiênicas e socioeconômicas. Nesse sentido, diferentes padrões de endemicidade da infecção têm sido descritos em todo o mundo (Gust 1992, Jacobsen & Koopman 2004). Em áreas de alta endemicidade, cerca de 90% das crianças se tornam infectadas até os 10 anos de idade e o padrão de transmissão é o contato direto pessoa a pessoa, não sendo freqüente a ocorrência de surtos. A alta endemicidade é observada em regiões de baixo nível socioeconômico da África, Ásia, e América Latina (Vital et al. 2006, Tufenkeji 2000). Áreas com endemicidade moderada incluem outras regiões da América Latina e Ásia, e se caracterizam como regiões que apresentam surtos freqüentes, com transmissão ocorrendo por contato pessoa a pessoa e pelo consumo de água e alimentos contaminados, com incidência alta em crianças mais velhas, adolescentes e adultos jovens (Tanaka 2000, Cianciara 2000). Nos países desenvolvidos, o padrão de endemicidade do VHA é baixo, com índices maiores da infecção em adultos, uma vez que, sob condições de saneamento e higiene satisfatórias, a exposição durante a infância é minimizada permitindo que indivíduos alcancem a idade adulta susceptíveis à infecção (Cilla et al. 2006). Finalmente, tem sido admitida a condição de endemicidade muito baixa, na qual a infecção ocorre principalmente em adultos mais velhos, de forma esporádica e geralmente relacionada a viagens para áreas endêmicas. Esse padrão tem sido visto na Escandinávia (Gust 1992, Jacobsen & Koopman 2004, Vital et al. 2006).

A América Latina apresenta regiões de alta e moderada endemicidade para a infecção pelo VHA, com a mudança do padrão de alta para moderada, vista no México, República Dominicana, Chile, Venezuela, Argentina e Brasil (Tapia-Conyer et al. 1999, Clemens et al. 2000, Tanaka 2000). Essa mudança tem sido atribuída à melhoria econômica dos países com reflexo no padrão de saneamento básico. Alteração dos padrões de endemicidade da infecção de outras regiões do mundo também foi observada (Barzaga 2000, Cianciara 2000, Polz-Dacewicz et al. 2000, Sohn et al. 2000, Tufenkeji 2000, Sacy et al. 2005, Almuneef et al. 2006, Cilla et al. 2006).

No Brasil, observa-se diversidade na prevalência da infecção pelo VHA. Nesse sentido, estudos têm demonstrado uma correlação inversa entre a exposição ao VHA e o nível socioeconômico, considerando que este reflete melhorias nas condições básicas de saneamento. Assim, quanto mais baixo o nível com déficit no saneamento, maior é o índice de infecção, principalmente na infância (Vital et al. 1998, Almeida et al. 2001, de Paula et al. 2001, Assis et al. 2002, Santos et al. 2002, Zago-Gomes et al. 2005, Dinelli et al. 2006).

Em Goiás, os estudos realizados mostraram índices de soroprevalência para infecção pelo VHA variável. Assim, foram observados índices de 77,6% e 44,8% em crianças/adolescentes de escolas públicas e particulares da cidade de Goiânia, respectivamente (Hidalgo 1999), 87,5% em “meninos de/na rua” na faixa etária de sete a 10 anos de idade (Queiróz et al. 1995a) e 69,7% em crianças de creches públicas (Queiróz et al. 1995b). Também, estudo desenvolvido por Cardoso et al. (2000), considerando 466 indivíduos com suspeita clínica de hepatite, identificou um índice de positividade para o marcador de infecção recente pelo VHA (anti-VHA-IgM) de 32,6%. Estes dados demonstram a alta disseminação do VHA na região.

1.5.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS GENÓTIPOS E SUBGENÓTIPOS DO VHA

No que se refere à circulação dos genótipos do VHA, tem sido observado um padrão de transmissão endêmico em regiões como China e países da América do Sul, com a predominância de um único genótipo. Por outro lado, em alguns países da Europa, observa-se circulação simultânea de diferentes genótipos, o que indica que essas amostras sejam importadas de áreas altamente endêmicas (Robertson et al. 1992).

Mundialmente, o genótipo I é prevalente, compreendendo cerca de 80% das amostras circulantes (Robertson et al. 1992), em especial o subgenótipo IA, na Itália (Normann et al. 1995, Chironna et al. 2003), África do Sul (Taylor 1997), Holanda (Bruisten et al. 2001, Tjon et al. 2005), Coreia (Byun et al. 2001), Uruguai, Argentina e Chile (Costa-Mattioli et al. 2001a), França (Costa-Mattioli et al. 2001b), Cuba (Diaz et al. 2001), Espanha (Pina et al. 2001), Tailândia (Theamboonlers et al. 2002, Poovorawan et al. 2005), Japão (Fujiwara et al. 2003), Albânia (Gabrieli et al. 2004) e Índia (Hussain et al. 2005). O subgenótipo IB tem sido identificado principalmente na Jordânia, Austrália, Norte e Sul da África, Japão, China (Robertson et al. 1992, Taylor 1997, Chen et al. 2001, Fujiwara et al. 2003) e países da Europa (Robertson et al. 1992, Afaire-Marchais et al. 1995, Costa-Mattioli et al. 2001b, Sánchez et al. 2002, Chironna et al. 2003, 2004, Tjon et al. 2005).

Na América do Sul, o genótipo I tem sido, até o momento, o único identificado, sendo que em países como Argentina (Costa-Mattioli et al. 2001a, Mbayed et al. 2002),

Costa-Rica, El Salvador (Arauz-Ruiz et al. 2001), Uruguai, Chile (Costa-Mattioli et al. 2001a) e Cuba (Diaz et al. 2001), 100% dos isolados são subgenótipo IA.

Também no Brasil, a infecção pelo genótipo I se apresenta como sendo de caráter endêmico. Por outro lado, esse é o único país da América do Sul onde tem sido observada a circulação concomitante de ambos os subgenótipos, IA e IB em mais de um estado da federação, como Rio de Janeiro, Pernambuco e região Amazônica (de Paula et al. 2002, 2006, Devalle et al. 2003, Villar et al. 2004, 2006). Não obstante, estudo utilizando amostras provenientes dos Estados do Rio de Janeiro, Pará, Maranhão, Goiás e Minas Gerais mostrou a ocorrência apenas do subgenótipo IA (de Paula et al. 2004a).

1.6. PREVENÇÃO E CONTROLE DA HEPATITE A

A transmissão do VHA é prevenida, de maneira primária, pela adoção de medidas inespecíficas que evitem a exposição ao agente, tais como higiene pessoal com a lavagem das mãos após o uso de sanitários e antes do preparo de alimentos, higienização de utensílios e roupas e tratamento de alimentos crus. Paralelamente, se torna necessário um aprimoramento nas condições de saneamento básico, visando redução na contaminação de água. Adicionalmente, medidas de controle específicas contra a hepatite A também se fazem necessárias, as quais incluem a imunização passiva com o uso de imunoglobulinas e a imunização ativa através da vacina (Ferreira & da Silveira 2004).

A administração de imunoglobulina contra o VHA é feita via injeção intramuscular, sendo eficiente para a indução de proteção por um curto período de tempo. É recomendada para crianças menores de dois anos de idade, bem como para a proteção de indivíduos com

elevado risco de exposição à infecção como, viajantes para áreas endêmicas, trabalhadores de creches e contactantes domiciliares (Koff 1995, 1998, Ferreira & da Silveira 2004).

Imunização ativa requer a administração de vacina capaz de induzir produção de anticorpos neutralizantes para o VHA (Koff 1995). Atualmente, existem duas vacinas para a hepatite A licenciadas e comercialmente disponíveis: HAVRIX (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) e VAQTA (Merck & Company, Inc., Whitehouse Station, New Jersey). Ambas são preparadas a partir de vírus inativado por formaldeído, sendo equivalentes em termos de imunogenicidade e eficácia, podendo ser administradas em indivíduos a partir de 12 meses de idade, em duas doses (Koff 1998, Ferreira & da Silveira 2004, Fiore et al. 2006, Wasley et al. 2006).

O fato do VHA apresentar apenas um sorotipo, facilita o controle da hepatite A através da vacinação. Entretanto, como já referido, o vírus tem apresentado variação genômica e, caso ocorram maiores alterações que reflitam na produção das proteínas do vírus, variantes antigênicas que escapem à proteção vacinal podem emergir. Esse fato aponta para a necessidade do conhecimento das variantes genômicas dos vírus circulantes em cada região.



2. JUSTIFICATIVA

A infecção pelo VHA é de distribuição mundial, sendo endêmica em muitas regiões e com prevalência variando amplamente em função do nível socioeconômico e das condições de saneamento. Por outro lado, variação no padrão de endemicidade da infecção pelo VHA em diferentes regiões do mundo, como em alguns países da América Latina e em particular em alguns estados do Brasil, tem sido observada (Cianciara 2000, Tanaka 2000, Vitral et al. 2006). Além disso, tem sido observado um aumento do número de adolescentes e adultos jovens susceptíveis à infecção, com possível aumento do número de casos da doença nesse grupo etário. Dessa maneira, estudos de soroprevalência periódicos são importantes para monitoramento da infecção na população, com o possível subsídio à política de saúde pública específica.

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHA é tradicionalmente feito por detecção dos anticorpos específicos de classe IgM (anti-VHA-IgM) (Koff 1998). Não obstante, o período de viremia do VHA pode ocorrer mesmo antes do aparecimento dos sintomas e com ausência dos anticorpos de infecção aguda (anti-VHA-IgM), período de janela imunológica (Bower et al. 2000, de Paula et al. 2004b). Nesse sentido, a detecção do RNA do vírus no soro é ferramenta importante para o diagnóstico de casos de hepatite aguda pelo VHA, principalmente, quando negativos para anti-VHA-IgM.

No Brasil, não existe ainda consenso sobre os genótipos do VHA circulantes. Estudo realizado com amostras VHA provenientes das cinco regiões brasileiras mostrou que essas eram subgenótipo IA (de Paula et al. 2004a). Por outro lado, outros estudos

realizados com amostras do Rio de Janeiro, Pernambuco e região Amazônica apontaram para a circulação também do subgenótipo IB (de Paula et al. 2002, 2006, Devalle et al. 2003, Villar et al. 2004, 2006). Considerando que, no único estudo realizado com amostras da região Centro-Oeste, o subgenótipo do VHA foi definido para nove amostras, a proposição é de que outras amostras devam ser analisadas, ainda com objetivo do aumento do conhecimento a partir de estudos epidemiológicos.



3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar o perfil sorológico e molecular da infecção pelo vírus da hepatite A em indivíduos com suspeita de hepatite na cidade de Goiânia, GO, no período de 1995 a 2002.

Objetivos específicos:

1. Determinar o índice de infecção aguda pelo vírus da hepatite A nesses pacientes, utilizando método sorológico e molecular;
 2. Buscar associar a positividade para o RNA viral à presença do anticorpo de infecção aguda (anti-VHA-IgM);
 3. Relacionar a positividade para o RNA viral com o espécime clínico utilizado, fezes ou soro;
 4. Associar a positividade para o VHA às variáveis, idade, sazonalidade e ano de detecção;
 5. Identificar os genótipos / subgenótipos do VHA circulantes em Goiânia – GO, no período do estudo;
 6. Identificar, por seqüenciamento genômico e análises filogenéticas, os valores de identidade entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos entre as amostras do VHA.
-

4. ARTIGO I

**Prevalence of hepatitis A virus infection in Goiânia, Goiás, Brazil,
by molecular and serological procedures, 1995-2002.**

**Artigo publicado no periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz ,
Rio de Janeiro, Vol. 101(4): 423-426, June 2006.**



Prevalence of hepatitis A virus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, by molecular and serological procedures, 1995-2002

Fabiola Souza Fiaccadori, Célia Maria de Almeida Soares*, Ana Maria Tavares Borges, Divina das Dôres de Paula Cardoso/+

Laboratório de Virologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública *Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Rua 235, esquina com 1ª avenida s/nº, Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brasil

In this study, a total of 865 serum samples were collected between 1995 and 2002 from individuals living in Goiânia, Central Brazil, and clinically suspected of hepatitis. After exclusion of 162 samples which were positive for hepatitis B virus or hepatitis C virus, 703 samples were tested for anti-hepatitis A virus (anti-HAV) IgM antibodies by enzyme immunoassay. In addition, 588 of these samples and 22 fecal samples were analyzed by reverse transcription-nested PCR for HAV RNA detection, with positivity indices of 13.1% (77/588) and 54.5% (12/22), respectively. A similar index of viral RNA detection in anti-HAV-IgM positive or negative samples was observed in serum samples. HAV infection is a public health problem worldwide and this study underscores the extent of HAV circulation in our region.

Key words: hepatitis A virus - prevalence - anti-HAV-IgM - viral RNA - Goiânia - Brazil

Hepatitis A virus (HAV) infection is a public health problem worldwide. HAV belongs to the Picornaviridae family, Hepatovirus genus. The viral genome is a linear, positive sense, single-stranded RNA (ssRNA), of about 7.5 Kb in length (Buchen-Osmond 2003).

The endemicity of HAV infection varies between developing and developed countries. In Brazil, in recent decades, a change has been observed from high to medium endemicity for the infection (Tapia-Conyer et al. 1999, Tanaka 2000). The prevalence of hepatitis A varies greatly in different Brazilian regions, from 56% in the South and Southeast to 93% in the North region (Carrilho et al. 2005) and in the Central region, Cardoso et al. (2000) observed a HAV infection rate of 32.6%.

The HAV concentration in feces is high, extending from the incubation period until at least two weeks after the acute phase of infection (Tassapoulos et al. 1986, Koff 1998). In developing countries, HAV is transmitted mainly through the fecal-oral route, with the possibility of person-to-person transmission (Lemon 1985, Villar et al. 2002b). Viral RNA can be also detected in the peripheral blood, and in this way, parenteral transmission has been observed (Costa-Mattioli et al. 2002, Diwan et al. 2003, de Paula et al. 2004b, Gowland et al. 2004).

HAV viremia occurs even during the immunological window and thus, viral RNA detection is an important condition for the correct diagnostic of acute hepatitis cases of unknown etiology, as well as for patient monitoring. For this reason, viral RNA detection in serum, as well as in feces, has been performed through the reverse tran-

scription polymerase chain reaction (RT-PCR), using primers designed for different genome regions (Seelig et al. 1992, Buti et al. 2001, Costa-Mattioli et al. 2002).

The present study presents data supported by molecular and serological procedures concerning the prevalence of HAV infection in Goiânia, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Samples - The samples in this study were collected from 1995 to 2002 from individuals in Goiânia. The 865 individuals enrolled in this study were referred by the Goiás state public health system to the Virology Laboratory/Federal University of Goiás, because they presented clinical signs of hepatitis such as jaundice, nausea, fever or abdominal pain. The serum samples were tested for viral hepatitis (HAV, HBV, HCV). Of these samples, 162 were positive for HBV or HCV and were excluded from this study. The 703 remaining serum samples were included, as were the 22 fecal samples collected from 22 of the patients.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Goiás (COEP-UFG) - 22000000289.

Serological tests - All serum samples were tested for anti-HAV-IgM antibodies with an enzyme immunoassay test, using a commercial kit (Organon-Teknika, Boxtel/Netherlands) according to manufacturer's instructions.

Viral ssRNA extraction - For viral RNA detection we analyzed 588 serum samples that had sufficient material for this procedure and 22 fecal samples. The viral ssRNA was extracted according to the method described by Boom et al. (1990) with modifications. Briefly, buffer L6 (guanidine isothiocyanate/0.1M Tris-HCl pH6.4/0.2M EDTA pH8.0/Triton X-100), proteinase K (10 mg/ml - Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, US), ethanol and silica (Sigma, St. Louis, MO, US) were added to 400 µl of the sample. After the supernatant was discarded, the pellet

Financial support: CNPq

+Corresponding author: divina@netgo.com.br

Received 9 February 2006

Accepted 15 May 2006

was subjected to successive washings [buffer L2 (guanidine isothiocyanate/0.1M Tris-HCl pH6.4), 70% ethanol and acetone]. Finally, the pellet was resuspended in DEPC-treated water.

RT-PCR and nested PCR - RT, amplification reactions, and primers followed the protocol described by de Paula et al. (2002) with modifications. The random primer pd(N)₆ (Random Hexamer, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was added to 8 µl of RNA, followed by incubation at 65°C for 10 min. The reaction mixture was added, in a final volume of 20 µl [1X enzyme buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂)/10mM DTT/1mM of each dNTP (Invitrogen/Life Technologies)/20U Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen/Life)/200U of RT, MMLV (Invitrogen/Life)] and the reaction proceeded at 37°C for 60 min. The amplification reactions utilized primers designed for the VP1/2A junction region of the HAV genome. The first amplification reaction mixture was added to 5 µl of the cDNA in a final volume of 25 µl [1X enzyme buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl)/3 mM of MgCl₂/1.6 mM of each dNTP (Invitrogen/Life)/0.8 mM of each primer F06 (CTATT CAGATTGCAAATTAYAAT) and F07 (AAYTTCAT YATTTTCATGCTCCT)/1.5U Taq DNA polymerase (Invitrogen/Life)]. After denaturation at 94°C for 4 min, the DNA was amplified for 30 cycles: 94°C - 30 s; 40°C - 30 s; 72°C - 1 min, and 72°C for 7 min. The nested PCR was carried out with 1 µl of the first round PCR product, in a final volume of 25 µl with the internal primers F8 (TATTTGTCTGTACAGAACAATCAG) and F9 (AGGRGGTGGAAAGYACTTCATTTGA). The reaction was conducted in 40 cycles, under the same conditions as in the first amplification, except for the annealing temperature (48°C). The PCR products were loaded on a 2% agarose gel with ethidium bromide staining. Sterile Milli-Q water and HAV RNA positive serum sample, kindly provided by the Virology Department, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, were used as negative and positive controls, respectively.

Statistical analysis - The statistical analysis was performed using the Epi Info version 6 program, using the chi-squared (χ^2) test, and Fisher's exact test for proportion comparison, as well as χ^2 for a trend test to evaluate possible tendencies. Differences were regarded as significant when $p < 0.05$.

RESULTS

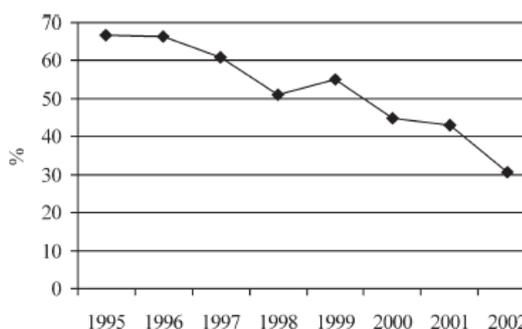
Of 703 serum samples analyzed for the anti-HAV-IgM antibody, 46.4% (326/703) were positive. Also, of 588 serum samples analyzed for HAV RNA, 13.1% (77/588)

showed positivity. In addition, of 22 fecal samples analyzed, 54.5% (12/22) were positive for viral RNA. Of positive patients, 279 were positive only to the anti-HAV-IgM, 39 were positive to viral RNA only, and 47 were positive to both markers (Table I).

The viral RNA detection rate was 14 and 12.3% for anti-HAV-IgM positive and negative patients, respectively, considering serum samples and 66.6 and 40%, respectively, based on fecal samples.

As far as age is concerned, greater HAV positivity was observed in individuals under ten years old, and this rate declined significantly as age increased (Table II).

A greater occurrence of HAV infection was noted during the summer (60.6% - $\chi^2 = 10.93$, $p < 0.05$), data not shown. However, during the period of this study, there was a decline in virus occurrence from 1995 to 2002 (χ^2 for trend test = 16.664, $p < 0.05$) (Fig.).



Hepatitis A virus positivity considering viral infection markers by collection year.

DISCUSSION

Hepatitis A occurs worldwide and is endemic to several regions. Prevalence of the disease varies widely, as a consequence of basic sanitation conditions. In this study, carried out over eight years with patients suspected of having hepatitis, the rate of HAV acute infection positivity (anti-HAV-IgM positive) was 46.4%. This result is similar to those of other studies carried out in Brazil (Cardoso et al. 2000, de Paula et al. 2002, Villar et al. 2002a), even when considering the viral RNA positivity in the analyzed serum samples (51.9%).

A similar viral RNA detection rate was observed taking into account samples with or without IgM antibody

TABLE I
Hepatitis A virus (HAV) positivity considering the viral infection markers in relation to the samples

Markers	Samples			Total
	Serum	Serum and feces	Feces	
anti-HAV-IgM (+)	279	-	-	279
anti-HAV-IgM (+) and RNA (+)	39	1	7	47
anti-HAV-IgM (-) and RNA (+)	35	2	2	39
Total	353	3	9	365

TABLE II
Hepatitis A virus positivity considering serological and molecular markers in relation to age, stratified by year

Years	Age (years)	0-10 Positive/Total (%)	11-20 Positive/Total (%)	21-30 Positive/Total (%)	> 31 Positive/Total (%)	Total Positive/Total (%)
1995		03/03 (100)	-/-	01/03 (33.3)	-/-	04/06 (66.6)
1996		26/31 (83.9)	10/11 (90)	04/09 (44.4)	02/11 (18.2)	42/62 (67.7)
1997		20/22 (90.9)	07/14 (50)	02/07 (28.6)	04/12 (33.3)	33/55 (60)
1998		16/21 (76.2)	03/05 (60)	-/03	-/06	19/35 (54.3)
1999		75/96 (78.1)	21/38 (55.2)	08/27 (29.6)	02/28 (7.1)	106/189 (56.1)
2000		51/76 (67.1)	30/46 (65.2)	11/37 (29.7)	02/43 (4.6)	94/202 (46.5)
2001		12/16 (75)	03/09 (33.3)	01/05 (20)	-/07	16/37 (41)
2002		04/06 (66.6)	-/02	-/02	-/02	04/12 (33.3)
Total ^a		207/271 (76.4)	74/125 (59.2)	27/93 (29)	10/109 (9.1)	318/598 ^b (53.2)

a: χ^2 for trend test = 165.239; p < 0.001; b: it was not possible obtain the age of 105 patients and of these, 47 were positive.

positivity. This result differs from those of other studies, which show greater molecular marker positivity from anti-HAV-IgM positive samples (Fujiwara et al. 1997, Kwon et al. 2000, de Paula et al. 2002, 2004a, b, Villar et al. 2004, Poovorawan et al. 2005). This difference could be explained by the fact that the serum samples were stored for a long time and for this reason, the viral RNA could have been degraded. Also, the primers utilized were different from those used in some studies (Fujiwara et al. 1997, Kwon et al. 2000, Poovorawan et al. 2005). In any case, these results confirm the HAV circulation in Goiânia, underscore the importance of HAV RNA detection in the elucidation of acute hepatitis cases of unknown etiology, and suggest the need to adopt this methodology in blood banks.

HAV RNA was detected in 54.5% of the fecal samples, which is consistent with the results of other studies (Skinhoj et al. 1981, Yotsuyanagi et al. 1996, Villar et al. 2004). On the other hand, it was observed that this rate was significantly greater considering serum samples. It was suggested that this condition, also described in other studies, could be related to a greater viral concentration in the feces (10^8 virions/g) in relation to serum (10^5 virions/ml) (Daemer et al. 1981, Rosenblum et al. 1991, Normann et al. 1995, Yotsuyanagi et al. 1996, Fujiwara et al. 1997).

Previous studies have shown that HAV infection in regions with a high endemicity pattern occur mainly in children under five years old (Ferreira et al. 1996, Vitral et al. 1998, Cardoso et al. 2000). Studies carried out in Latin America, including Brazil, as well as in other regions of the world have described a variation in the endemicity pattern of HAV infection, which has demonstrated a re-

duction of this infection in children under five and a gradual increase among adolescents and adults (Tapia-Conyer et al. 1999, Barzaga 2000, Cianciara 2000, Tanaka 2000, Tufenkeji 2000, Villar et al. 2002b). The present study corroborates this endemicity pattern variation, demonstrating a decline in HAV infection from 1995 to 2002. On the other hand, in the present study, a greater percentage of HAV infection positivity was observed up to ten years of age (76.4%), with a significant decline of the infection with the age increase, which characterizes a high endemicity pattern. Although the study population is not homogenous, these data were observed in every year of the study. This led to the suggestion that the Central region of Brazil is actually a high endemicity region. Thus, the data presented in this study underscore the extensive HAV circulation in our region, as well as suggesting the possibility of transmission of this virus by blood.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Oswaldo Cruz Foundation for providing the positive serum samples.

REFERENCES

- Barzaga NG 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in South-East Asia and China. *Vaccine* 18: 61-64.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Werthem-Ven-Dilleen PME, Noordaa JVD 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
- Büchen-Osmond C 2003. Taxonomy and classification of viruses. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., ASM Press, Washington DC, p. 1217-1226.

- Buti M, Jardi R, Bosch A, Rodríguez F, Sánchez G, Pinto R, Costa X, Sánchez-Ávila JF, Cotrina M, Esteban R, Guardia J 2001. Valoración de la técnica de PCR-Southern blot para el análisis de la viremia en pacientes con hepatitis aguda A. *Gastroenterol Hepatol* 24: 1-4.
- Cardoso DDP, Azevedo MSP, Martins RMB, Borges AMT, Queiroz DAO, Hidalgo AN, Fiaccadori FS, Daher RR 2000. Hepatite A em Goiânia, Goiás: epidemiologia descritiva da infecção de acordo com a faixa etária. *Rev Pat Trop* 29: 109-112.
- Carrilho FJ, Mendes CC, Silva LC 2005. Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. *Gastroenterol Hepatol* 28: 118-125.
- Cianciara J 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in Poland and Eastern Europe. *Vaccine* 18: 68-70.
- Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Nicand E, Aleman MH, Billaudel S, Ferré V 2002. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J Viral Hepat* 9: 101-106.
- Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH 1981. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun* 32: 388-393.
- de Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, Gaspar AMC 2002. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 62: 22-27.
- de Paula VS, Lu Ling, Niel Christian, Gaspar AMC, Robertson BH 2004a. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol* 73: 378-383.
- de Paula VS, Villar LM, Morais LM, Lewis-Ximenez LL, Niel C, Gaspar AMC 2004b. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. *J Clin Virol* 29: 254-259.
- Diwan AH, Stubbs JR, Carnahan GE 2003. Transmission of hepatitis A via WBC-reduced RBCs and FFP from a single donation. *Transfusion* 43: 536-540.
- Ferreira CT, Silva GL, Barros FC, Lima JP 1996. Soroepidemiologia da hepatite A em dois grupos populacionais economicamente distintos de Porto Alegre. *GED* 15: 85-90.
- Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Imazeki F, Saisho H, Miki M, Omata M 1997. Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *Hepatology* 26: 1634-1639.
- Gowland P, Fontana S, Niederhauser C, Taleghani BM 2004. Molecular and serologic tracing of a transfusion-transmitted hepatitis A virus. *Transfusion* 44: 1555-1561.
- Koff RS 1998. Hepatitis A. *Lancet* 341: 1643-1649.
- Kwon OS, Byun KS, Yeon JE, Park SH, Kim JS, Kim JH, Bak YT, Kim JH, Lee CH 2000. Detection of hepatitis A viral RNA in sera of patients with acute hepatitis A. *Gastroenterol Hepatol* 15: 1043-1047.
- Lemon SM 1985. Type A viral hepatitis. New developments in an old disease. *N Engl J Med* 313: 1059-1067.
- Normann A, Pfisterer-Hunt M, Schade S, Graff J, Chaves RL, Crovari P, Icardi G, Flehmig B 1995. Molecular epidemiology of an outbreak of hepatitis A in Italy. *J Med Virol* 47: 467-471.
- Poovorawan Y, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P, Chutsirimongkol S, Tangkijvanich P 2005. Clinical features and molecular characterization of hepatitis A virus outbreak in a child care center in Thailand. *J Clin Virol* 32: 24-28.
- Rosenblum LS, Villarino ME, Nainan OV, Melish ME, Hadler SC, Pinsky PP, Jarvis WR, Ott CE, Margolis HS 1991. Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants. *J Infect Dis* 164: 476-482.
- Seelig R, Renz M, Seelig HP 1992. PCR in the diagnosis of viral hepatitis. *Ann Intern Med* 24: 225-230.
- Skinhoj P, Mathiesen LR, Kryger P, Moller Am 1981. Faecal excretion of hepatitis A virus in patients with symptomatic hepatitis A infection. *Scand J Gastroenterol* 16: 1057-1059.
- Tanaka J 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 18: 57-60.
- Tapia-Conyer R, Santos JJ, Cavalcanti AM, Urdaneta E, Rivera L, Manterola A, Potin M, Ruttiman R, Kido JT 1999. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *Am J Trop Med Hyg* 6: 825-829.
- Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Ticehurst JR, Purcell RH 1986. Fecal excretion of greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* 154: 231-237.
- Tufenkeji H 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in the Middle East and Africa. *Vaccine* 18: 65-67.
- Villar LM, de Paula VS, Gaspar AMC 2002a. Seasonal variation of hepatitis A virus infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44: 289-292.
- Villar LM, Costa MCE, de Paula VS, Gaspar AMC 2002b. Hepatitis A outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 301-305.
- Villar LM, Lampe E, Meyer A, Gaspar AMC 2004. Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Braz J Med Biol Res* 37: 1779-1787.
- Vitral CL, Yoshida CFT, Lemos ERS, Teixeira CS, Gaspar AMC 1998. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 1-5.
- Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Kurokawa K, Imo S 1996. Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. *Hepatology* 24: 10-13.

5. ARTIGO II

Ocorrência dos subgenótipos IA e IB do vírus da hepatite A em Goiânia, Brasil.

Artigo a ser encaminhado a periódico especializado



Ocorrência dos subgenótipos IA e IB. Fabíola Souza Fiaccadori et al.

Ocorrência dos subgenótipos IA e IB do vírus da hepatite A em Goiânia, Brasil.

Fabíola Souza Fiaccadori, Divina das Dôres de Paula Cardoso, Maristela Pereira*,
Alexandre Siqueira Guedes Coelho**, Ana Maria Tavares Borges, Juliana Alves Parente*,
Célia Maria de Almeida Soares^{*/+}

Laboratório de Virologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade
Federal de Goiás, Rua 235, esquina com 1^a avenida sem N^o, Setor Universitário, 74605-050
Goiânia, GO, Brasil *Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil **Laboratório de Genética e Genômica
de Plantas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO,
Brasil

Suporte Financeiro: CNPq / Processo: 141043/2003-2

⁺ Autor correspondente: celia@icb.ufg.br

A infecção pelo vírus da hepatite A (VHA) é problema de saúde pública em todo o mundo. O presente estudo teve como objetivo a identificação dos genótipos do VHA circulantes em Goiânia, Goiás, Brasil, no período de 1996 a 2001. O RNA viral de 18 amostras de soro foi extraído e amplificado (*RT-PCR / nested-PCR*), seguindo-se de seqüenciamento genômico da região junção VP1/2A do genoma do VHA. Seqüências de 168 nucleotídeos foram comparadas e analisadas utilizando os programas BLAST N, Clustal X e Paup v.4.10b. Foi observado que todas as amostras eram genótipo I, sendo dez delas subgenótipo IA e oito subgenótipo IB. Os isolados subgenótipo IA mostraram maior diversidade do que os isolados IB a nível de nucleotídeos. No entanto, como um todo, foram observados altos valores de identidade entre os isolados obtidos neste estudo e isolados obtidos de outras regiões do mundo, incluindo o Brasil, destacando-se a grande conservação entre diferentes isolados deste vírus. Este é o primeiro estudo que relata a ocorrência de ambos subgenótipos do VHA (IA e IB) no Estado de Goiás e, neste sentido, demonstra a necessidade de informações adicionais a respeito da epidemiologia molecular de amostras do VHA na Região e no Brasil.

Palavras-chave: vírus da hepatite A; subgenótipo IA; subgenótipo IB; seqüenciamento genômico; Goiânia; Brasil

A infecção pelo vírus da hepatite A (VHA) constitui um problema de saúde pública em todo o mundo, incluindo o Brasil. O VHA, classificado na família *Picornaviridae*, gênero *Hepatovirus* (ICTVdB 2006), possui genoma de RNA fita simples linear com sentido positivo e 7,5 Kb de tamanho, o qual apresenta um único quadro de leitura aberta (Open Reading Frame – ORF), flanqueado por duas regiões não codificantes, 5' e 3'. À extremidade 5' liga-se covalentemente a proteína VPg e a 3' é poliadenilada. O ORF viral codifica para uma poliproteína precursora de 2.225 a 2.227 aminoácidos que, por clivagens sucessivas, origina as proteínas estruturais (VP1-4), constituintes do capsídeo viral, e as não estruturais (2A-C e 3A-D) (Siegl & Frosner 1978, Najarian et al. 1985, Weitz et al. 1986, Cohen et al. 1987, Totsuka & Moritsugu 1999).

O VHA é sorotipo único (Lemon & Binn 1983, Lemon et al. 1992, Melnick 1992, Lemon & Robertson 1993), muito embora apresente heterogeneidade baseada em diferentes regiões do genoma, que incluem a codificante da região C-terminal da VP3 (Jansen et al. 1990), da N-terminal da VP1 (Robertson et al. 1991, 2000, Afaire-Marchais et al. 1995, De Serres et al. 1999, Arauz-Ruiz et al. 2001, Costa-Mattioli et al. 2001b) e da junção VP1/2A (Robertson et al. 1992, 2000, Bruisten et al. 2001, Byun et al. 2001, Costa-Mattioli et al. 2001a, Diaz et al. 2001), sendo esta última considerada a mais variável (Robertson et al. 1992).

A definição dessas variantes vem sendo feita por análises filogenéticas, que identificaram seis genótipos (I – VI), que diferem entre si entre 15 a 25%. Os genótipos I, II e III são subdivididos em subgenótipos A e B, os quais diferem em aproximadamente 7,5% na composição de bases (Robertson et al. 1992, Costa-Mattioli et al. 2002, Lu et al. 2004). O genótipo I é predominante em todo o mundo, particularmente o subgenótipo IA

(Robertson et al. 1992, Normann et al. 1995, Taylor 1997, Bruisten et al. 2001, Byun et al. 2001, Costa-Mattioli et al. 2001a, 2001b, Pina et al. 2001, Theamboonlers et al. 2002, Gabrieli et al. 2004, Hussain et al. 2005, Poovorawan et al. 2005). No Brasil, observa-se um padrão genotípico endêmico de transmissão, com ocorrência apenas do genótipo I nas cinco regiões do País, com predominância do subgenótipo IA (de Paula et al. 2004). Não obstante, a circulação também do subgenótipo IB foi observada nos Estados do Rio de Janeiro e Pernambuco e na região Amazônica (de Paula et al. 2002, 2006, Devalle et al. 2003, Villar et al. 2004, 2006).

Em Goiás, um estudo de caracterização genômica de nove isolados do VHA realizado por de Paula et al. 2004, identificou apenas o subgenótipo IA. O presente estudo, realizado em amostras obtidas no período de 1996 a 2001, é o primeiro a relatar a ocorrência de ambos subgenótipos do VHA (IA e IB) em Goiânia, Goiás, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Material de Estudo – Este estudo foi realizado com 18 amostras positivas para o RNA do VHA, as quais foram detectadas a partir de amostras de soro provenientes de indivíduos que apresentavam suspeita clínica de hepatite viral, das quais, treze eram anti-VHA-IgM positivas. Destas amostras, 12 eram provenientes de indivíduos do sexo masculino e seis do sexo feminino, com faixa etária variando de três a 40 anos de idade.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (COEP-UFG) sob o número 22000000289.

Detecção do RNA do VHA – O ssRNA viral foi extraído a partir de 400 µL da amostra de soro, segundo o método descrito por Boom et al. (1990), com modificações (Fiaccadori et al. 2006). Para a obtenção do cDNA, foi utilizado o oligonucleotídeo randômico pd(N)₆ (Random Hexamer, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) conforme o protocolo descrito por de Paula et al. (2002), com modificações (Fiaccadori et al. 2006).

Adicionalmente, as reações de amplificação, bem como os oligonucleotídeos desenhados para a região da junção VP1/2A, seguiram protocolo descrito por de Paula et al. (2002). A primeira reação de amplificação foi realizada utilizando-se 5 µL do cDNA, ao qual era adicionada a mistura de reação para um volume final de 25 µL, contendo 0,8 mM de cada oligonucleotídeo F06 (CTATTCAGATTGCAAATTAYAAT) e F07 (AAYTTCATYATTTTCATGCTCCT). A reação de *nested PCR* foi realizada utilizando-se 1 µL do produto da primeira amplificação e os oligonucleotídeos internos F8 (TATTTGTCTGTYACAGAACAATCAG) e F9 (AGGRGGTGGAAAGYACTTCATTTGA). O produto de amplificação obtido foi visualizado em transluminador UV a partir de gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), para observação do fragmento de DNA com tamanho esperado de 244 pb. Como controles das reações, foram utilizados água milli-Q estéril e amostra de soro RNA-VHA positiva, gentilmente cedida pelo Departamento de Virologia/Fundação Instituto Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro/RJ/Brasil.

Seqüenciamento do DNA – O produto da *nested PCR* obtido foi purificado utilizando-se o sistema comercial *Qiaquick*[®] *PCR Purification* (Qiagen, Uniscience, SP, Brasil), segundo instruções do fabricante. A partir da visualização do fragmento de DNA

em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), procedeu-se a quantificação do DNA, a qual foi realizada por estimativa, comparando-se visualmente com produtos de concentração de DNA previamente conhecidos, sendo considerado satisfatório para o procedimento de seqüenciamento do DNA, produto com no mínimo 50 a 100 ng de DNA/µL de reação.

A reação de seqüenciamento do DNA foi realizada diretamente, a partir do produto de *nested PCR*, em ambas as direções, utilizando-se seqüenciador automático (MegaBACE 1000 – Amersham Biosciences), segundo procedimento descrito por Sanger et al. (1977). O sistema de reação consistiu dos oligonucleotídeos F08 e F09, a enzima Thermo Sequenase (32 U/µL) (Amersham Biosciences) e o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (Amersham Biosciences).

Análises das seqüências e relações filogenéticas – As seqüências obtidas foram analisadas inicialmente utilizando-se o programa BLAST N (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul et al. 1990). Para análises comparativas entre as seqüências obtidas e com outras disponíveis em banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html), seqüências de 168 nucleotídeos (posição 3024 a 3191) da região da junção VP1/2A do genoma do VHA foram alinhadas usando o programa Clustal X (Thompson et al. 1997). As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se os métodos Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), máxima parsimônia (Edwards & Cavalli-Sforza 1963) e máxima verossimilhança (Felsenstein 1981), através do programa Paup v.4.10b (Swofford 1998). A consistência dos nós obtidos foi avaliada pelo procedimento de “bootstrap” (Felsenstein 1985). As árvores

filogenéticas obtidas foram enraizadas com as seqüências representativas dos genótipos IIA (CF 53), IIB (SLF88), IIIA (GA76), IIIB (KPH), IV (Cy145), V (AGM27), VI (JM55).

RESULTADOS

As análises comparativas entre as 18 seqüências de nucleotídeos obtidas considerando-se 168pb da região da junção VP1/2A, mostraram identidades com valores entre 88 e 100%. Ainda, a comparação dos 18 isolados com a amostra protótipo HM-175 mostrou valores de identidade entre 88 e 100% (dados não mostrados).

Ainda, a comparação dessas seqüências com outras amostras do VHA disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) mostrou alto grau de identidade (entre 96 e 100%) com amostras classificadas como genótipo I, em particular, com aquelas isoladas no Brasil (Quadro I). Esses valores foram sustentados por valores abaixo de e^{-63} .

A Figura 1 mostra as árvores filogenéticas construídas a partir dos isolados do estudo, acrescidos de seqüências publicadas previamente (www.ncbi.nlm.nih.gov), representativas de todos os genótipos do vírus. As árvores foram enraizadas com as seqüências representativas dos genótipos IIA, IIB, IIIA, IIIB, IV, V, VI. Verifica-se que todos os isolados se agruparam com o genótipo I, dos quais, 8 (44,5%) foram definidos como subgenótipo IB e os outros 10 (55,5%) como subgenótipo IA, confirmando os resultados observados a partir da análise realizada utilizando-se o programa BLAST N (dados não mostrados).

Isolados subgenótipo IA apresentaram maior diversidade entre si, tendo sido observados valores de identidade variando de 94 a 100%. Os isolados BrGO_47, BrGO_126 e BrGO_227 se mostraram idênticos, sendo identificados pela denominação BrGO_HP 3 (haplótipos 3).

Os isolados subgenótipo IB apresentaram, entre si, valores de identidade variando de 98 a 100%, sugerindo a existência de um menor nível de diversidade dentro do grupo. Três isolados, identificados pela denominação BrGO_HP 1 (haplótipos 1) (BrGO_11, BrGO_571 e BrGO_583), foram idênticos entre si e à amostra protótipo HM-175 (M14707). Também, outros dois isolados identificados por BrGO_HP 2 (haplótipos 2) (BrGO_12 e BrGO_572) se mostraram idênticos entre si.

Foi observado alternância de circulação dos subgenótipos, com a substituição do subgenótipo IB no final do ano 1996 e o reaparecimento do mesmo no final do ano 2000 (Quadro II).

A comparação da seqüência predita de aminoácidos, para a região de junção VP1/2A dos isolados, é mostrada na figura 2. Utilizou-se, nessa análise, a seqüência deduzida de aminoácidos dos 18 isolados. A identidade entre essas seqüências deduzidas variou de 98 a 100% entre os isolados IA bem como entre os isolados IB. Entre isolados de diferentes genótipos, a identidade variou de 96 a 98% (dados não mostrados). Verifica-se que entre o grupo de amostras IA e IB, no vigésimo quinto aminoácido, as amostras IA apresentam uma Arginina (R-Arg) e as amostras IB uma Lisina (K-Lys).

DISCUSSÃO

A identificação dos subgenótipos IA e IB neste estudo, corrobora estudos prévios realizados em outras regiões do País, que demonstraram que a infecção pelo genótipo I se apresenta como de caráter endêmico no Brasil, muito embora seja o único país da América do Sul com circulação de ambos subgenótipos, IA e IB (de Paula et al. 2002, 2006, Devalle et al. 2003, Villar et al. 2004, 2006). No entanto, discorda do estudo realizado por de Paula et al. (2004), o qual, também por análises de seqüências de nucleotídeos da junção VP1/2A, mostrou a ocorrência apenas do subgenótipo IA, em isolados do Estado de Goiás. Este fato aponta para a necessidade da análise de um maior número de amostras quando então, outras informações podem ser obtidas, refletindo em um maior conhecimento a respeito das amostras do VHA na Região.

Os isolados deste estudo mostraram alto grau de identidade com outras amostras brasileiras, o que também foi observado em estudo realizado a partir de isolados do Estado do Rio de Janeiro (Villar et al. 2004). Este fato sugere uma circulação endêmica de isolados do País, sem importação de amostras de outras regiões do mundo. No entanto, com vistas a uma melhor compreensão do caráter evolutivo de isolados do VHA obtidos em diferentes regiões do mundo, estamos realizando estudos adicionais.

Embora tenha sido analisado um pequeno número de amostras, foi observada alternância na circulação dos subgenótipos. O subgenótipo IB circulou até a metade do ano 1996 sendo substituído pelo IA, o qual circulou até o início do ano 2000, quando novamente emerge o IB, que circula até 2001. Ao nosso conhecimento não existem dados

na literatura sobre a alternância de cepas do VHA que permitam uma comparação. Esta condição de substituição de amostras virais em termos temporais tem sido observada no Estado de Goiás para *Rotavirus A* (Cardoso et al. 2000). Estudos adicionais são necessários para um melhor entendimento deste fato.

Conforme esperado, a diversidade observada entre os isolados dos diferentes genótipos (II, III, IV, V e VI), inferida pelo comprimento dos ramos das árvores filogenéticas obtidas, foi superior àquela observada entre os isolados genótipo I. Os isolados subgenótipo IA, por sua vez, foram mais variáveis entre si do que aqueles pertencentes ao subgenótipo IB, em termos de seqüências nucleotídicas. Do ponto de vista filogenético, observou-se uma boa concordância dos resultados obtidos pela aplicação das três metodologias (Neighbor-Joining, máxima parsimônia e máxima verossimilhança), embora os resultados obtidos pelo critério de máxima verossimilhança sugeriram que o subgenótipo IB possa ter sido originário a partir de mutações em isolados do subgenótipo IA. Tal hipótese é corroborada pela menor diversidade encontrada entre os isolados do grupo IB, em comparação com aquela observada entre os isolados do grupo IA. Uma análise mais abrangente está sendo realizada para averiguar esta hipótese.

No que se refere às seqüências preditas de aminoácidos, estas mostraram valores de identidade variando de 98 a 100%, em ambos subgenótipos (dados não mostrados). Considerando as substituições ocorridas nestas seqüências, destaca-se a presença de Arginina (R-Arg) nos isolados IA e de Lisina (K-Lys) nos isolados IB, na posição 25 da seqüência deduzida de aminoácidos. Esses aminoácidos pertencem a um mesmo grupo, contendo radicais positivamente carregados. Possivelmente, essa substituição não acarreta

em uma alteração funcional. Esta substituição também foi observada entre isolados do Estado de Pernambuco (Villar et al., 2006), o que pode sugerir adaptação deste subgenótipo no Brasil.

Como um todo, os altos valores de identidade observados em relação às seqüências de nucleotídeos e seqüências preditas de aminoácidos, entre os isolados obtidos neste estudo e isolados obtidos de outras regiões do mundo, em especial o Brasil, destacam a conservação entre diferentes isolados deste vírus. Uma vez que se dispõe de uma vacina extremamente eficaz contra o VHA, e a permanência de um sorotipo único até o momento, há possibilidade de erradicação do vírus em todo o mundo, a partir da elaboração de um programa com base na adoção do processo de vacinação.

O presente estudo apresentou informações a respeito do VHA a nível molecular tendo sido o primeiro a relatar a circulação dos subgenótipos IA e IB na região. Os resultados pretendem contribuir para um melhor conhecimento a respeito da epidemiologia desse vírus no Brasil e no mundo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DA 1990. Basic local alignment search tools. *J Mol Biol* 215: 403-410.

Apaire-Marchais V, Robertson BH, Aubineau-Ferre V, Le Roux MG, Leveque F, Schwartzbrod L, Billaudel S 1995. Direct sequencing of Hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. *Appl Environ Microbiol* 61: 3977-3980.

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

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Werthem-Ven-Dilleen PME, Noordaa JVD 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.

Bruisten SM, van Steenbergen JE, Pijl AS, Niesters HGM, van Doornum GJJ, Coutinho RA 2001. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Amsterdam, the Netherlands. *J Med Virol* 63: 88-95.

Byun KS, Kim JH, Song K-J, Baek LJ, Song J-W, Park SH, Kwon OS, Yeon JE, Kim JS, Bak YT, Lee CH 2001. Molecular studies: hepatitis A virus and hepatectomy. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 16: 519-524.

Cardoso DDP, Soares CMA, Azevedo MSP, Leite JPG, Munford V, Rácz ML 2000. Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. *J Health Popul Nutr* 18: 39-43.

CohenJI, Ticehurst JR, Purcell RH, Buckler-White A, Baroudy BM 1987. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol* 61: 50-59.

Costa-Mattioli M, Ferre V, Monpoeho S, Garcia L, Colina R, Billaudel S, Vega I, Perez-Bercoff R, Cristina J 2001a. Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *J Gen Virol* 82: 2647-2652.

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

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

de Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, Gaspar AMC 2002. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 62: 22-27.

de Paula VS, Lu L, Niel C, Gaspar AMC, Robertson BH 2004. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol* 73: 378-383.

de Paula VS, Niel C, Teves SC, Villar LM, Virgolino H, Gaspar AMC 2006. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Brazilian Amazon. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1435-1438.

De Serres G, Cromeans TL, Levesque B, Brassard N, Barthe C, Dionne M, Prud'homme H, Paradis D, Shapiro CN, Nainan OV, Margolis HS 1999. Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *J Infect Dis* 179: 37-43.

Devalle S, de Paula VS, Oliveira JM, Niel C, Gaspar AMC 2003. Hepatitis A virus infection in hepatitis C brazilian patients. *J Infect* 47: 125-128.

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

Edwards AWF, Cavalli-Sforza LL 1963. The reconstruction of evolution. *Annals of Human Genetics* 27: 105-106.

Felsenstein J 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368-376.

Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Fiaccadori FS, Soares CMA, Borges AMT, Cardoso DDP 2006. Prevalence of hepatitis A virus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, by molecular and serological procedures, 1995-2002. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 423-426.

Gabrieli R, Sanchez G, Macaluso A, Cenko F, Bino S, Palombi L, Buonomo E, Pinto RM, Bosch A, Divizia M 2004. Hepatitis in Albanian children: molecular analysis of hepatitis A virus isolates. *J Med Virol* 72: 533-537.

Hussain Z, Das BC, Husain SA, Asim M, Chattopadhyay S, Malik A, Poovorawan Y, Theamboonlers A, Kar P 2005. Hepatitis A viral genotypes and clinical relevance: clinical

and molecular characterization of hepatitis A virus isolates from northern India. *Hepatol Res* 32: 16-24.

ICTVdb – The Universal Virus Database, version 4. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>. Acesso em 28 de agosto de 2006.

Jansen RW, Siegl G, Lemon SM 1990. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2867-2871.

Lemon SM, Binn LN 1983. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 148: 1033-1039.

Lemon SM, Jansen RW, Brown EA 1992. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine* 10: 40-44.

Lemon SM, Robertson BH 1993. Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Semin Virol* 4: 285-295.

Lu L, Ching KZ, De Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, Robertson BH 2004. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol* 85: 2943-2952.

Melnick JL 1992. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine* 10: 24-26.

Najarian R, Caput D, Gee W, Potter SJ, Renard A, Merryweather J, Nest GV, Dina D 1985. Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2627-2631.

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

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

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

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

Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, Ishizu T, Moritsugu Y, Lemon SM 1992. Genetic

relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 73: 1365-1377.

Robertson BH, Averhoff F, Cromeans TL, Han X-H, Khoprasert B, Nainan OV, Rosenberg J, Paikoff L, DeBess E, Shapiro CN, Margolis HS 2000. Genetic relatedness of hepatitis A virus isolates during a community-wide outbreak. *J Med Virol* 62: 144-150.

Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

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

Siegl G, Frosner GG 1978. Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A, II. Type and configuration of nucleic acid. *J Virol* 26: 48-53.

Swofford DL 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

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

Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Chatchatee P, Chongsrissawat V, Mokmula M, Poovorawan Y 2002. Molecular characterization of hepatitis-A-virus infections, in the context of two outbreaks in southern Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 727-734.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

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

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

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

Weitz M, Baroudy BM, Maloy WL, Ticehurst JR, Purcell RH 1986. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J Virol* 60: 124-130.

QUADRO I

Dados referentes à comparação das seqüências de nucleotídeos dos isolados analisados neste estudo, com seqüências depositadas em banco de dados, utilizando o programa BLAST N

Isolado	Amostra Referência / Nº Acesso	Identidade	e-value	Genótipo
BrGO_11	HAP343 / DQ198363	100%	$9e^{-89}$	IB
BrGO_12	HAP343 / DQ198363	98%	$2e^{-80}$	IB
BrGO_24	HAP343 / DQ198363	99%	$2e^{-86}$	IB
BrGO_47	MG_350 / AY323002	99%	$5e^{-84}$	IA
BrGO_86	BA_256 / AY322842	98%	$1e^{-81}$	IA
BrGO_90	RJ_182 / AY322995	99%	$2e^{-86}$	IA
BrGO_100	MG_350 / AY323002	98%	$5e^{-84}$	IA
BrGO_109	MG_14 / AY323004	97%	$8e^{-77}$	IA
BrGO_126	MG_350 / AY323002	100%	$9e^{-89}$	IA
BrGO_162	PR_208 / AY323010	96%	$4e^{-63}$	IA
BrGO_227	MG_350 / AY323002	100%	$9e^{-89}$	IA
BrGO_302	MA_365 / AY322993	100%	$9e^{-89}$	IA
BrGO_386	MA_365 / AY322993	98%	$1e^{-81}$	IA
BrGO_568	HAP343 / DQ198363	99%	$2e^{-86}$	IB
BrGO_571	HAP343 / DQ198363	100%	$9e^{-89}$	IB
BrGO_572	HAP343 / DQ198363	99%	$2e^{-86}$	IB
BrGO_573	HAP343 / DQ198363	99%	$2e^{-86}$	IB
BrGO_583	HAP343 / DQ198363	100%	$9e^{-89}$	IB

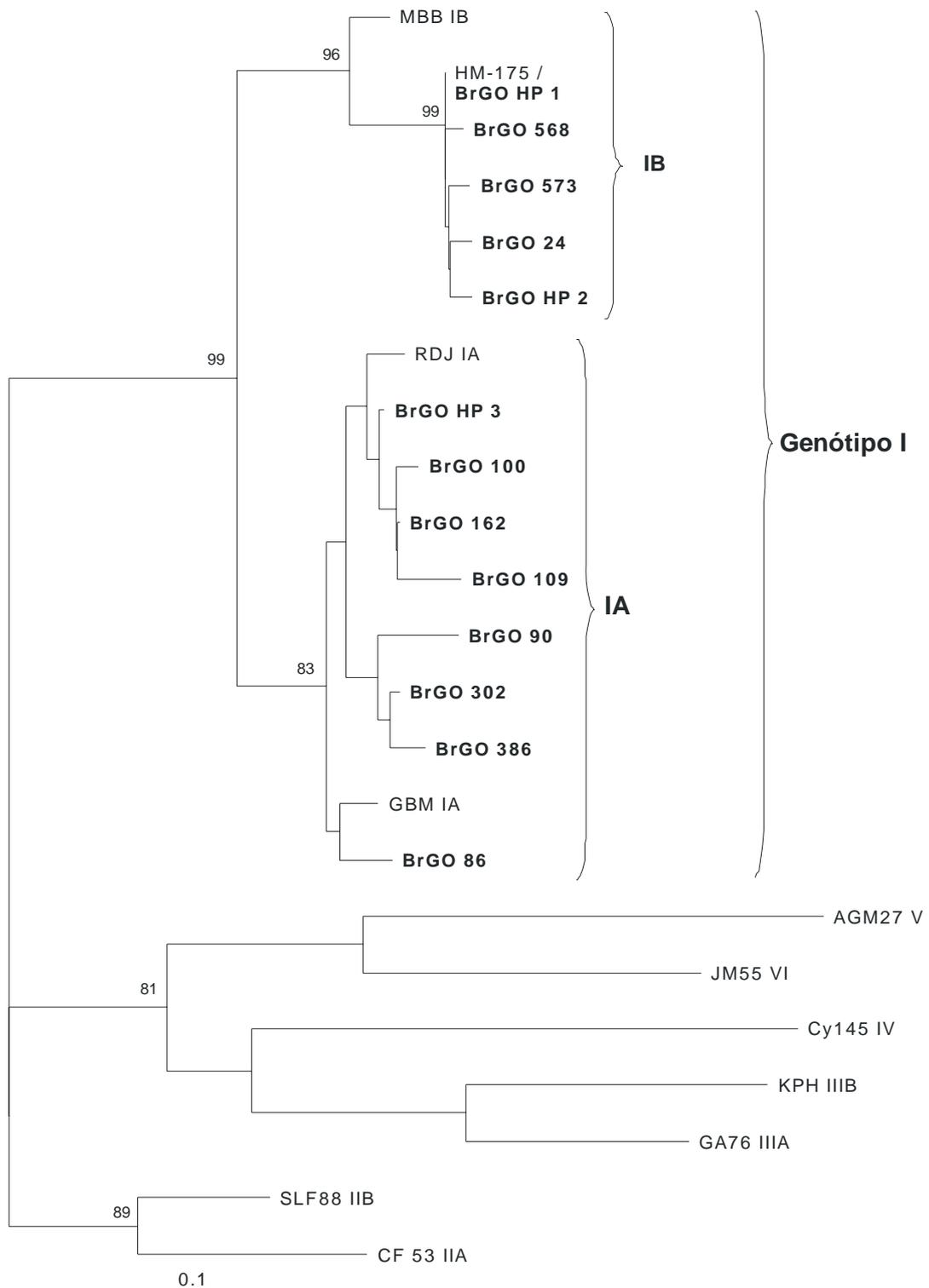
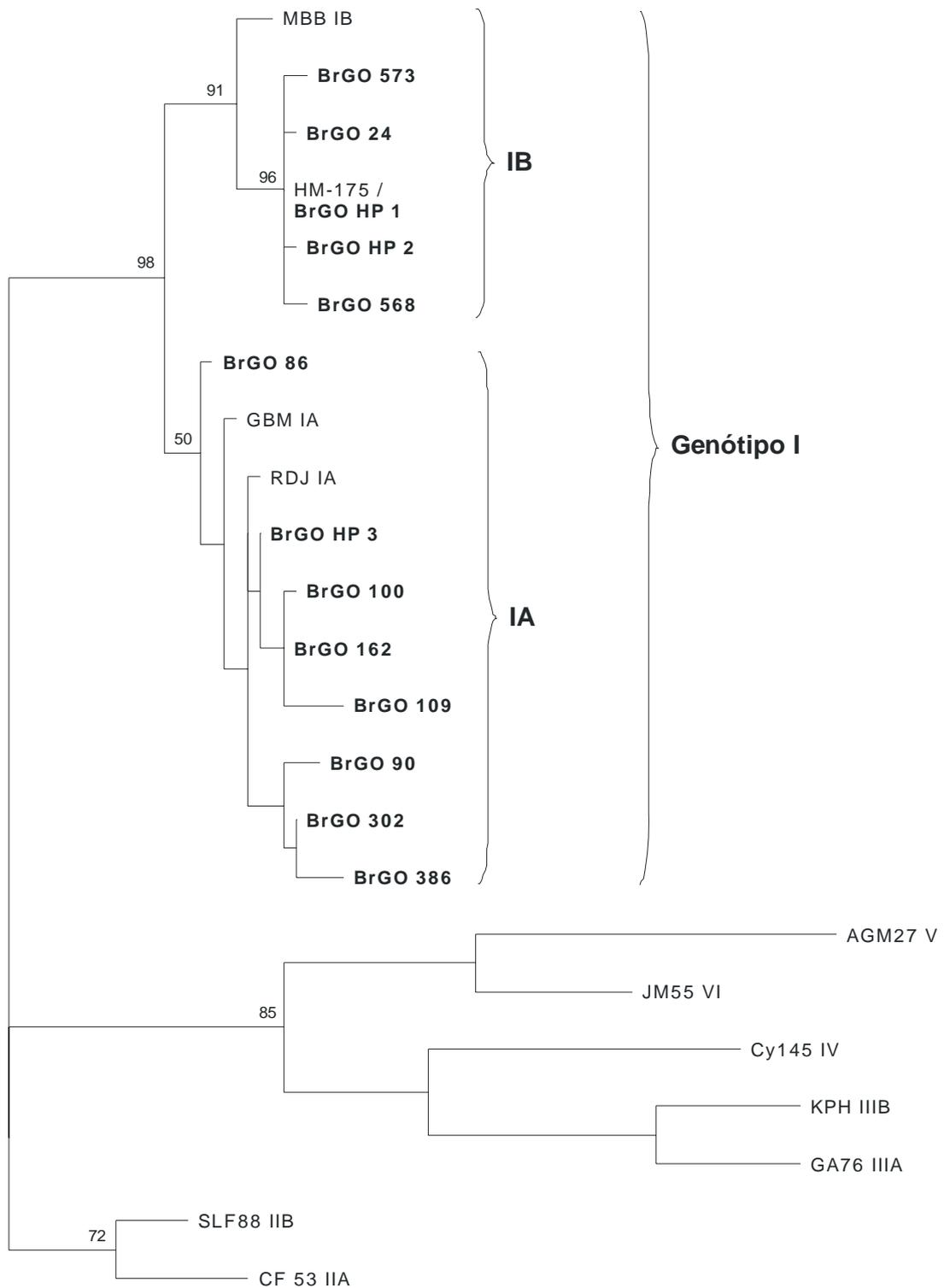


Figura 1A



_1
Figura 1B

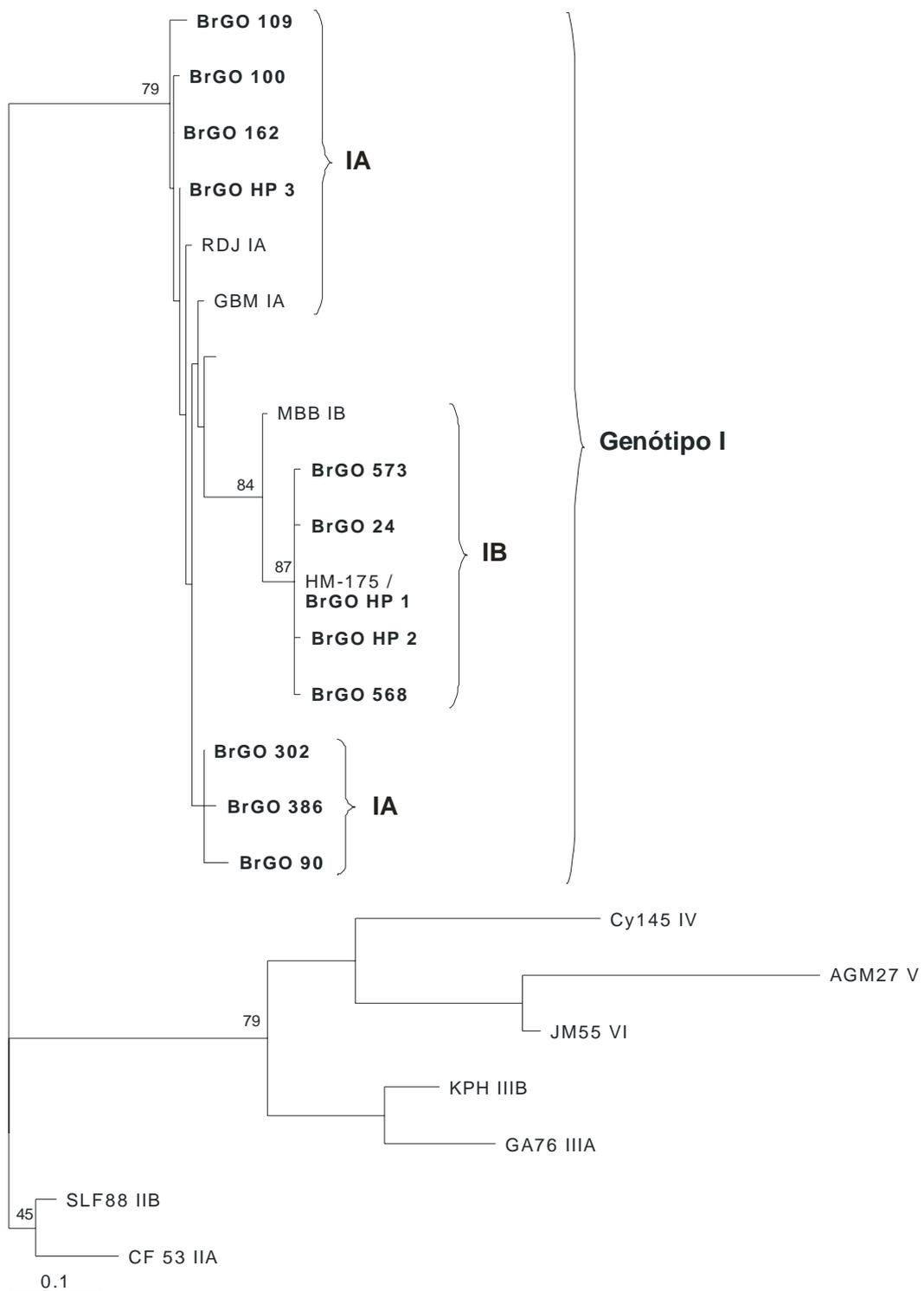


Figura 1C

Figura 1. Árvores filogenéticas utilizando seqüências provenientes de isolados VHA. 11 seqüências foram obtidas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) as quais foram comparadas a 18 amostras seqüenciadas do estudo (em negrito) tendo sido considerado para análise 168 nucleotídeos. As denominações BrGO_HP 1, BrGO_HP 2 e BrGO_HP 3 representam os respectivos grupos de isolados idênticos: (BrGO_11, BrGO_571 e BrGO_583); (BrGO_12 e BrGO_572); (BrGO_47, BrGO_126 e BrGO_227). Números romanos designam os agrupamentos em genótipos, enquanto A e B designam os subgenótipos. Seqüências referências do GenBank SLF88 (L07729), CF53 (L07693), AGM27 (D00924), JM55 (L07731), Cy145 (L07732), KPH (L07691), GA76 (L07668), HM175 (M14707), MBB (M20273), GBM (X75215), RDJ (L07681): 1A. Método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987); 1B. Método de máxima parsimônia (Edwards & Cavalli-Sforza 1963); 1C. Método de máxima verossimilhança (Felsenstein 1981).

QUADRO II

Genótipos dos isolados de VHA em relação à data de coleta		
Isolado	Data Coleta (Mês/Ano)	Genótipo
BrGO_11	05/1996	IB
BrGO_12	05/1996	IB
BrGO_24	07/1996	IB
BrGO_47	10/1996	IA
BrGO_86	08/1997	IA
BrGO_90	09/1997	IA
BrGO_100	10/1997	IA
BrGO_109	12/1997	IA
BrGO_126	08/1998	IA
BrGO_162	02/1999	IA
BrGO_227	06/1999	IA
BrGO_302	10/1999	IA
BrGO_386	02/2000	IA
BrGO_568	09/2000	IB
BrGO_571	10/2000	IB
BrGO_572	10/2000	IB
BrGO_573	10/2000	IB
BrGO_583	02/2001	IB

↓

BrGO_227	ESMSRIAAGDLESSVDDPRSEED RR FESHIECRKPYKELRLEVKGQRLKYAQEEL	}	IA
BrGO_302 R		
BrGO_162 R		
BrGO_386	.. L R		
BrGO_90 R		
BrGO_100 R		
BrGO_126 R		
BrGO_109	.. V R		
BrGO_47 R		
BrGO_86 G R		
BrGO_571	ESMSRIAAGDLESSVDDPRSEED KR FESHIECRKPYKELRLEVKGQRLKYAQEEL	}	IB
BrGO_568	.. I K		
BrGO_572 K		
BrGO_573 VK		
BrGO_583 K		
BrGO_11 K		
BrGO_24	G K		
BrGO_12 K		

Figura 2. Comparação entre as seqüências previstas de aminoácidos relativa à junção VP1/2A dos isolados do VHA do Estado de Goiás. Os aminoácidos que apresentaram alterações estão indicados em negrito. Os subgenótipos IA e IB estão indicados à direita.

6. CONCLUSÕES

1. Foi demonstrado alto índice de infecção aguda pelo VHA em pacientes com suspeita clínica de hepatite na cidade de Goiânia – GO, no período de 1995-2002;
 2. Foram observados índices similares de detecção do RNA viral, considerando-se amostras positivas e negativas para o anticorpo de infecção aguda (anti-VHA-IgM);
 3. Verificou-se um índice significativamente maior de detecção do RNA viral em amostras fecais;
 4. A positividade para o VHA foi maior em crianças até os 10 anos de idade, ocorrendo significativo declínio em relação ao aumento da idade;
 5. A infecção pelo VHA esteve presente em todos os meses do ano, com maior frequência durante o verão;
 6. Foi demonstrado um declínio significativo da infecção pelo VHA de 1995 a 2002;
 7. Verificou-se a circulação apenas do genótipo I, com frequência similar dos subgenótipos IA e IB, ocorrendo, no entanto, alternância de circulação dos subgenótipos durante o período do estudo;
 8. Foram observados altos valores de identidade entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos obtidas, variando de 88 a 100% e 96 a 100%, respectivamente.
-

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akriviadis EA, Redeker AG 1989. Fulminant hepatitis A in intravenous drug users with chronic liver disease. *Ann Intern Med* 110: 838-839.

Almeida LM, Werneck GL, Cairncross S, Coeli CM, Costa MCE, Coletty PE 2001. The epidemiology of hepatitis A in Rio de Janeiro: environmental and domestic risk factors. *Epidemiol Infect* 127: 327-333.

Almuneef MA, Memish ZA, Balkhy HH, Qahtani M, AlOtaibi B, Hajeer A, Qasim L, Al Knawy B 2006. Epidemiologic shift in the prevalence of hepatitis A virus in Saudi Arabia: a case for routine hepatitis A vaccination. *Vaccine* 24: 5599-5603.

Apaire-Marchais V, Robertson BH, Aubineau-Ferre V, Le Roux MG, Leveque F, Schwartzbrod L, Billaudel S 1995. Direct sequencing of Hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. *Appl Environ Microbiol* 61: 3977-3980.

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

Assis SB, Souto FJD, Fontes CJF, Gaspar AMC 2002. Prevalência da infecção pelos vírus das hepatites A e E em escolares de município da Amazônia Matogrossense. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 155-158.

Azimi PH, Roberto RR, Guralnik J, Livermore T, Hoag S, Hagens S, Lugo N 1986. Transfusion-acquired hepatitis A in a premature infant with secondary nosocomial spread in an intensive care nursery. *Am J Dis Child* 140: 23-27.

Barzaga NG 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in South-East Asia and China. *Vaccine* 18: 61-64.

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

Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS 2000. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 182: 12-17.

Bradley DW, Maynard JE, Hindman SH, Hornbeck CL, Fields HA, McCaustland KA, Cook EH 1977. Serodiagnosis of viral hepatitis A: detection of acute-phase immunoglobulin M anti-hepatitis A virus by radioimmunoassay. *J Clin Microbiol* 5: 521-530.

Bradley DW, Fields HA, McCaustland KA, Cook EH, Gravelle CR, Maynard JE 1978. Biochemical and biophysical characterization of light and heavy density hepatitis A virus particles: evidence HAV is an RNA virus. *J Med Virol* 2: 175-187.

Bruisten SM, van Steenbergen JE, Pijl AS, Niesters HGM, van Doornum GJJ, Coutinho RA 2001. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Amsterdam, the Netherlands. *J Med Virol* 63: 88-95.

Buti M, Jardí R, Bosch A, Rodríguez F, Sánchez G, Pinto R, Costa X, Sánchez-Ávila JF, Cotrina M, Esteban R, Guardia J 2001. Valoración de la técnica de PCR-Southern blot para el análisis de la viremia en pacientes con hepatitis aguda A. *Gastroenterol Hepatol* 24: 1-4.

Byun KS, Kim JH, Song K-J, Baek LJ, Song J-W, Park SH, Kwon OS, Yeon JE, Kim JS, Bak YT, Lee CH 2001. Molecular studies: hepatitis A virus and hepatectomy. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 16: 519-524.

Cardoso DDP, Azevedo MSP, Martins RMB, Borges AMT, Queiroz DAO, Hidalgo AN, Fiaccadori FS, Daher RR 2000. Hepatite A em Goiânia, Goiás: epidemiologia descritiva da infecção de acordo com a faixa etária. *Revista Patologia Tropical* 29: 109-112.

CDC-Center for Diseases Control and Prevention 2003. Hepatitis A Virus. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_a. Acesso em 19 de setembro de 2006.

Chen Y, Mao J, Hong Y, Yang L, Ling Z, Yu W 2001. Genetic analysis of wild-type hepatitis A virus strains. *Chin Med J* 114: 422-423.

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

Chironna M, Lopalco P, Prato R, Germinario C, Barbuti S, Quarto M 2004. Outbreak of infection with hepatitis A virus (HAV) associated with a foodhandler and confirmed by sequence analysis reveals a new HAV genotype IB variant. *J Clin Microbiol* 42: 2825-2828.

Chitambar SD, Joshi MS, Sreenivasan MA, Arankalle VA 2001. Fecal shedding of hepatitis A virus in Indian patients with hepatitis A and in experimentally infected Rhesus monkey. *Hepatol Res* 19: 237-246.

Christenson B, Brostrom CH, Bottiger M, Hermanson J, Weiland O, Ryd G, Berg JVR, Sjoblom R 1982. An epidemic outbreak of hepatitis A among homosexual men in Stockholm. *Am J Epidemiol* 116: 599-607.

Cianciara J 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in Poland and Eastern Europe. *Vaccine* 18: 68-70.

Cilla G, Pérez-Trallero E, Artieda J, Serrano-Bengoechea E, Montes M, Vicente D 2006. Marked decrease in the incidence and prevalence of hepatitis A in the Basque Country, Spain, 1986-2004. *Epidemiol Infect* 19: 1-7.

Clemens SAC, da Fonseca DC, Azevedo T, Cavalcanti A, Silveira TR, Castilho MC, Clemens R 2000. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 1 –10.

Cockayne EA 1912. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q J Med* 6: 1-28.

Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RH, Buckler-White A, Baroudy BM 1987. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol* 61: 50-59.

Costa-Mattioli M, Ferre V, Monpoeho S, Garcia L, Colina R, Billaudel S, Vega I, Perez-Bercoff R, Cristina J 2001a. Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *J Gen Virol* 82: 2647-2652.

Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Schvoerer C, Besse B, Aleman M-H, Billaudel S, Cristina J, Ferre V 2001b. Genetic analysis of hepatitis A virus outbreak in France confirms the co-

circulation of subgenotypes Ia, Ib and reveals a new genetic lineage. *J Med Virol* 65: 233-240.

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

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

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

Coulepis AG, Locarnini SA, Gust ID 1980. Iodination of hepatitis A virus reveals a fourth structural polypeptide. *J Virol* 35: 572-574.

de Paula VS, Arruda ME, Vitral CL, Gaspar AMC 2001. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the western region of the Brazilian Amazon Basin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1123-1128.

de Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, Gaspar AMC 2002. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 62: 22-27.

de Paula VS, Lu L, Niel C, Gaspar AMC, Robertson BH 2004a. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol* 73: 378-383.

de Paula VS, Villar LM, Morais LM, Lewis-Ximenez LL, Niel C, Gaspar AMC 2004b. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. *J Clin Virol* 29: 254-259.

de Paula VS, Niel C, Teves SC, Villar LM, Virgolino H, Gaspar AMC 2006. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Brazilian Amazon. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1435-1438.

De Serres G, Cromeans TL, Levesque B, Brassard N, Barthe C, Dionne M, Prud'homme H, Paradis D, Shapiro CN, Nainan OV, Margolis HS 1999. Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *J Infect Dis* 179: 37-43.

Devalle S, de Paula VS, Oliveira JM, Niel C, Gaspar AMC 2003. Hepatitis A virus infection in hepatitis C brazilian patients. *J Infect* 47: 125-128.

Diamond C, Thiede H, Perdue T, Secura GM, Valleroy L, Mackellar D, Corey L 2003. Viral hepatitis among young men who have sex with men: prevalence of infection, risk behaviors, and vaccination. *Sex Transm Dis* 30: 425-432.

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

Dienstag JL, Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH 1975. Faecal shedding of hepatitis A antigen. *Lancet* 765-767.

Dinelli MIS, Fisberg M, Moraes-Pinto MI 2006. Anti-hepatitis A virus frequency in adolescents at an outpatient clinic in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 48: 43-44.

Diwan AH, Stubbs JR, Carnahan GE 2003. Transmission of hepatitis A via WBC-reduced RBCs and FFP from a single donation. *Transfusion* 43: 536-540.

Ferraz MLG, Ohashi MA, Silva AEB, Kemp VL, Cruz CN, Guimarães RX 1991. Surto de hepatite aguda pelo vírus A: avaliação epidemiológica, clínica e laboratorial. *GED* 10: 13-16.

Ferreira CT, Silva GL, Barros FC, Lima JP 1996. Soroepidemiologia da hepatite A em dois grupos populacionais economicamente distintos do Porto Alegre. *GED* 15: 85-90.

Ferreira CT, da Silveira TR 2004. Viral hepatitis: epidemiological and preventive aspects. *Rev Bras Epidemiol* 7: 473-487.

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

Fiore AE 2004. Hepatitis A transmitted by food. *Clin Infect Dis* 38: 705-715.

Fiore AE, Wasley A, Bell BP 2006. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 55: 1-23.

Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Imazeki F, Saisho H, Miki M, Omata M 1997. Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *Hepatology* 26: 1634-1639.

Fujiwara K, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Saotome N, Suzuki K, Okita K, Tanaka E, Omata M 2003. Analysis of the genotype-determining region of hepatitis A viral RNA in relation to disease severities. *Hepatol Res* 25: 124-134.

Gabrieli R, Sanchez G, Macaluso A, Cenko F, Bino S, Palombi L, Buonomo E, Pinto RM, Bosch A, Divizia M 2004. Hepatitis in Albanian children: molecular analysis of hepatitis A virus isolates. *J Med Virol* 72: 533-537.

Gowland P, Fontana S, Niederhauser C, Taleghani BM 2004. Molecular and serologic tracing of a transfusion-transmitted hepatitis A virus. *Transfusion* 44: 1555-1561.

Gust ID 1992. Epidemiological patterns of hepatitis A in different parts of the world. *Vaccine* 10: 56-58.

Hadler SC, Webster HM, Erben JJ, Swanson JE, Maynard JE 1980. Hepatitis A in day-care centers. *N Engl J Med* 302: 1222-1227.

Henning KJ, Bell E, Braun J, Barker ND 1995. A community-wide outbreak of hepatitis A: risk factors for infection among homosexual and bisexual men. *Am J Med* 99: 132-136.

Hidalgo AN 1999. Soroepidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite A em escolares de Goiânia-Goiás. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás.

Hollinger FB, Ticehurst JR 1996. Hepatitis A virus. In Fields BN, Knippe DM, Howlwy PM 1996. et al. *Fields Virology*, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, p. 735-782.

Hussain Z, Das BC, Husain SA, Asim M, Chattopadhyay S, Malik A, Poovorawan Y, Theamboonlers A, Kar P 2005. Hepatitis A viral genotypes and clinical relevance: clinical and molecular characterization of hepatitis A virus isolates from northern India. *Hepatol Res* 32: 16-24.

ICTVdb – The Universal Virus Database, version 4. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>. Acesso em 28 de agosto de 2006.

Jacobsen KH, Koopman JS 2004. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol Infect* 132: 1005-1022.

Jansen RW, Siegl G, Lemon SM 1990. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2867-2871.

Kao HW, Ashcavai M, Redeker AG 1984. The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. *Hepatology* 4: 933-936.

Koff RS 1992. Clinical manifestations and diagnosis of hepatitis A virus infection. *Vaccine* 10: 15-17.

Koff RS 1995. Preventing hepatitis A infections in travelers to endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 53: 586-590.

Koff RS 1998. Hepatitis A. *Lancet* 341: 1643-1649.

Koike K 2001. Symposium on clinical aspects in hepatitis virus infection – 1. Hepatitis virus update. *Intern Med* 40: 173-175.

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

Kwon OS, Byun KS, Yeon JE, Park SH, Kim JS, Kim JH, Bak YT, Kim JH, Lee CH 2000. Detection of hepatitis A viral RNA in sera of patients with acute hepatitis A. *Gastroenterol Hepatol* 15: 1043-1047.

Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, Redfield RR, Fields ML, Kelley PW 1985. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Am J Epidemiol* 122: 226-233.

Lemon SM, Binn LN 1983. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 148: 1033-1039.

Liberto MIM, Oliveira BCEPD, Cabral MC 2002. Hepatites virais. In Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD 2002, Introdução à virologia humana, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 135-155.

Locarnini SA, Ferris AA, Lehmann NI, Gust ID 1977. The antibody response following hepatitis A infection. *Intervirology* 8: 309-318.

Lu L, Ching KZ, De Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, Robertson BH 2004. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol* 85: 2943-2952.

MacCallum FO 1947. Homologous serum jaundice. *Lancet* 2: 691-692.

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

McCausland KA, Bond WW, Bradley DW, Ebert JW, Maynard JE 1982. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *J Clin Microbiol* 16: 957-958.

Melnick JL 1992. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine* 10: 24-26.

Melnick R, Barreneche LG, Kupski C, Mazzoleni LE 1994. Diagnóstico clínico e laboratorial das hepatites virais. *Acta Med (Porto Alegre)* 15: 575-587.

Menon KVN 2002. Non-A to E hepatitis. *Curr Opin Infect Dis* 15: 529-534.

Minor P 1991. Picornaviridae. In: Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F, Classification and nomenclature of viruses, *Arch Virol Suppl* 2, Wien: Springer-Verlag, p. 320-326.

Najarian R, Caput D, Gee W, Potter SJ, Renard A, Merryweather J, Nest GV, Dina D 1985. Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2627-2631.

Normann A, Graff J, Flehmig B 1994. Detection of hepatitis A virus in a factor VIII preparation by antigen capture/PCR. *Vox Sang* 67: 57-61.

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

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

Ochnio JJ, Patrick D, Ho M, Talling DN, Dobson SR 2001. Past infection with hepatitis A virus among Vancouver street youth, injection drug users and men who have sex with men: implications for vaccination programs. *CMAJ* 165: 293-297.

O'Donovan D, Cooke RPD, Joce R, Eastbury A, Waite J, Stene-Johansen K 2001. An outbreak of hepatitis A amongst injecting drug users. *Epidemiol Infect* 127: 469-473.

Palmenberg AC 1990. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol* 44: 603-623.

Pereira FEL, Gonçalves CS 2003. Hepatite A. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 387-400.

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

Polz-Dacewicz MA, Policzekiewicz P, Badach Z 2000. Changing epidemiology of hepatitis A virus infection – a comparative study in Central Eastern Poland (1990-1999). *Med Sci Monit* 6: 989-993.

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

Provost PJ, Wolanski BS, Miller WJ, Ittensohn OL, McAleer WL, Hilleman MR 1975. Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326 (38578). *Proc Soc Exp Biol Med* 148: 532-539.

Provost PJ, Hilleman MR 1979. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med* 160: 213-221.

Queiróz DAO, Cardoso DDP, Martelli CMT, Martins RMB, Porto SOB, Azevedo MSP, Borges AMT, Daher RR 1995a. Soroepidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite A em “meninos de/na rua” de Goiânia-Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 199-203.

Queiróz DAO, Cardoso DDP, Martelli CMT, Martins RMB, Porto SOB, Borges AMT, Azevedo MSP, Daher RR 1995b. Risk factors and prevalence of antibodies against hepatitis A virus (HAV) in children from day-care centers, in Goiânia, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 427-433.

Rakela J, Fay OH, Stevenson D, Gordon I, Mosley JW 1976. Similarities of two hepatitis A virus strains. *Bull World Health Organ* 54: 561-564.

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

Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, Ishizu T, Moritsugu Y, Lemon SM 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 73: 1365-1377.

Robertson BH, Averhoff F, Cromeans TL, Han X-H, Khoprasert B, Nainan OV, Rosenberg J, Paikoff L, DeBess E, Shapiro CN, Margolis HS 2000. Genetic relatedness of hepatitis A virus isolates during a community-wide outbreak. *J Med Virol* 62: 144-150.

Ross BC, Anderson DA, Gust ID 1991. Hepatitis A virus and hepatitis A infection. *Adv Virus Res* 39: 209-253.

Sacy RG, Haddad M, Baasiri G, Khoriaty A, Gerbaka BJ, Abu-Elyazeed R 2005. Hepatitis A in Lebanon: a changing epidemiological pattern. *Am J Trop Med Hyg* 73: 453-456.

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

Santos DCM, Souto FJD, Santos DRL, Vitral CL, Gaspar AMC 2002. 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1-4.

Schade CP, Komorwska D 1988. Continuing outbreak of hepatitis A linked with intravenous drug abuse in multnomah county. *Public Health Rep* 103: 452-459.

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

Seelig R, Renz M, Seelig HP 1992. PCR in the diagnosis of viral hepatitis. *Ann Intern Med* 24: 225-230.

Siegl G, Frosner GG 1978. Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A, II. Type and configuration of nucleic acid. *J Virol* 26: 48-53.

Siegl G, Frosner GG, Gauss-Muller V, Tratschin J-D, Deinhardt F 1981. The physicochemical properties of infectious hepatitis A virions. *J Gen Virol* 57: 331-341.

Skinhoj P, Mathiesen LR, Kryger P, Moller Am 1981. Faecal excretion of hepatitis A virus in patients with symptomatic hepatitis A infection. *Scand J Gastroenterol* 16: 1057-1059.

Sohn YM, Rho HO, Park MS, Park JH, Choi BY, Ki M, Jang W-I 2000. The changing epidemiology of hepatitis A in children and the consideration of active immunization in Korea. *Yonsei Med J* 41: 34-39.

Spada E, Genovese D, Tosti ME, Mariano A, Cucchini M, Proietti L, Giuli CD, Lavagna A, Crapa GE, Morace G, Taffon S, Mele A, Rezza G, Rapicetta M 2005. An outbreak of hepatitis A virus infection with a high case-fatality rate among injecting drug users. *J Hepatol* 43: 958-964.

Stene-Johansen K, Skaug K, Blystad H, Grinde B 1998. A unique hepatitis A virus strain caused an epidemic in Norway associated with intravenous drug abuse. *Scand J Infect Dis* 30: 35-38.

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

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

Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Ticehurst JR, Purcell RH 1986. Fecal excretion of greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* 154: 231-237.

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

Tedeschi MV, Yoshida CFT, Silva M, Feinstone SM 1989. Detection of hepatitis A viral genome in stool samples of patients with relapsed hepatitis A by the polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 429.

Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Chatchatee P, Chongsrisawat V, Mokmula M, Poovorawan Y 2002. Molecular characterization of hepatitis-A-virus infections, in the context of two outbreaks in southern Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 727-734.

Tjon GMS, Wijkmans CJ, Coutinho RA, Koek AG, van den Hoek JAR, Leenders ACAP, Schneeberger PM, Bruisten SM 2005. Molecular epidemiology of hepatitis A in Noord-Brabant, The Netherlands. *J Clin Virol* 32: 128-136.

Totsuka A, Moritsugu Y 1999. Hepatitis A viurs proteins. *Intervirolgy* 42: 63-68.

Tratschin JD, Siegl G, Frosner GG, Deinhardt F 1981. Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A. *J Virol* 38: 151-156.

Tufenkeji H 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in the Middle East and Africa. *Vaccine* 18: 65-67.

Villano SA, Nelson KE, Vlahov D, Purcell RH, Saar AJ, Thomas DL 1997. Hepatitis A among homosexual men and injection drug users: more evidence for vaccination. *Clin Infect Dis* 25: 726-728.

Villar LM, Costa MCE, de Paula VS, Gaspar AMC 2002. Hepatitis A outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 301-305.

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

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

Vitral CL, Yoshida CFT, Lemos ERS, Teixeira CS, Gaspar AMC 1998. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 1-5.

Vitral CL, Gaspar AMC, Souto FJ 2006. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002 – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 119-127.

Voegt H 1942. Zur aetiologie der hepatitis epidemica. *Munch Med Wochenschr* 89: 76-79.

Wasley A, Fiore A, Bell BP 2006. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol Rev* 28: 101-111.

Weitz M, Baroudy BM, Maloy WL, Ticehurst JR, Purcell RH 1986. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J Virol* 60: 124-130.

Yokosuka O 2000. Current status of treatment of hepatobiliary disorders in Japan. Molecular biology of hepatitis A virus: significance of various substitutions in the hepatitis A virus genome. *J Gastroenterol Hepatol* 15: 91-97.

Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Kurokawa K, Iino S 1996. Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. *Hepatology* 24: 10-13.

Zago-Gomes MP, Stantolin GC, Perazzio S, Aikawa KH, Gonçalves CS, Pereira FEL 2005. Prevalence of anti-hepatitis A antibodies in children of different socioeconomic conditions in Vila Velha, ES. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 285-289.

Zaha A 2006. Biologia Molecular Básica. In Rossetti ML, Silva CMD, Rodrigues JJS 2006, Doenças infecciosas - Diagnóstico Molecular, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1-15.

Zuckerman AJ 1970. Virus disease of the liver. Butterworth, London, 16-41.

Zuckerman AJ 1983. The history of viral hepatitis from antiquity to the present. In: Deinhardt F, Deinhardt J 1983, Viral Hepatitis: laboratory and clinical science, New York: Marcel Dekker, p. 3-32.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)