



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

HEPATITE VIRAL DE TIPO A
- REVISÃO DE LITERATURA

Amanda de Oliveira Alves
Orientadora: Profa. Dra. Simone Perecmanis

BRASÍLIA - DF
DEZEMBRO 2018



AMANDA DE OLIVEIRA ALVES

HEPATITE VIRAL DE TIPO A - REVISÃO DE LITERATURA

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientador: Profa. Dra. Simone Perecmanis

BRASÍLIA - DF

DEZEMBRO 2018

Ficha Catalográfica

AAL474h	Alves, Amanda de Oliveira HEPATITE VIRAL DE TIPO A - REVISÃO DE LITERATURA / Amanda de Oliveira Alves; orientador Simone Perecmanis. -- Brasília, 2018. 56 p.
	Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) -- Universidade de Brasília, 2018.
	1. Fígado. 2. Inflamação. 3. Hepatite. 4. Picornavírus. 5. Fecal-oral. I. Perecmanis, Simone, orient. II. Título.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Amanda de Oliveira Alves

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: HEPATITE VIRAL DE TIPO A –
REVISÃO DE LITERATURA.

Ano: 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Amanda de Oliveira Alves

Amanda de Oliveira Alves

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: ALVES, Amanda de Oliveira

Título: Hepatite Viral de tipo A – Revisão de literatura

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em: 06 de Dezembro de 2018.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Simone Perecmanis

Instituição: Universidade de Brasília

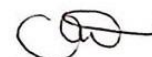
Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

Profa. Dra. Angela Patrícia Santana

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

M.V. Dalila de Carvalho Silva Gonzaga

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância”.

Hipócrates (460-370 a.C)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sheyla e Ailton, que com amor, compreensão e incentivo são o alicerce da minha formação como pessoa.

Às minhas irmãs, Bruna e Ana Beatriz e meu irmão Rafael, por todo o carinho e companheirismo, sempre compartilhando todos os momentos sendo eles difíceis ou alegres.

A minha família que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora, Simone, à qual tenho grande carinho, apreço e gratidão por todo o conhecimento, todas as oportunidades e experiências.

A todos profissionais, funcionários, residentes e alunos do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária – UnB, com quem passei tanto tempo, pela troca de conhecimentos, companhia e confiança.

A Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária e a Universidade de Brasília por me propiciarem toda a base fundamental para minha formação.

A todos os profissionais, funcionários, estagiários e alunos do LADTV pelo acolhimento, por todo o aprendizado e pela experiência como um todo que levarei para a vida.

Aos amigos que fiz durante a graduação, dos que me acompanharam nessa jornada desde o início (Adara, Andressa, Karina, Mariana, Rebeca, Fernando, Júlia, Igor, Kamilla, Bernardo, ao “Gazilão” e toda a “Trintaetretas”) aos que chegaram a pouco e já deixaram sua marca.

Ao CAVet e todas as pessoas incríveis que ele inseriu ou preservou na minha vida para me dar suporte em momentos penosos e compartilhar de momentos fantásticos.

Aos animais que me deram um norte e a pesquisa que me mantém no rumo do que eu amo fazer, ciência.

Meu mais sincero muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE QUADROS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1. Introdução às Hepatites Virais	1
2.2. Hepatites virais de transmissão entérica	3
2.3. Vírus da Hepatite A	4
2.3.1. Virologia molecular do vírus da Hepatite A	4
2.3.2. Patogenia	8
2.3.3. Epidemiologia	10
2.3.4. Características Clínicas	16
2.3.5. Diagnóstico	18
2.3.6. Estratégias de controle e prevenção	18
2.3.6.1. Estratégias para profilaxia pré exposição	20
2.3.6.2. Estratégias para profilaxia pós exposição	21
3. RELATÓRIO DE ESTÁGIO	21
3.1. Estágio Curricular Obrigatório	21
3.2. Apresentação e estrutura do local	22
3.3. Técnicas moleculares	23
3.3.1. Diagnóstico molecular do vírus da hepatite A	24
3.3.1.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	26
3.3.1.2. Eletroforese em gel de agarose	29
3.4. Casuística	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa genético, HAV.	5
Figura 2. Visão molecular do ciclo de vida do HAV.	7
Figura 3. Partícula viral do HAV.	7
Figura 4. Endemicidade estimada do HAV no mundo.	12
Figura 5. Casos de hepatites virais notificados segundo as regiões. Brasil (1999 a 2017).	13
Figura 6. Incidência de hepatites virais segundo agente etiológico e ano de notificação. Brasil (2007 a 2017).	13
Figura 7. Incidência de hepatite A segundo região de residência e ano de notificação. Brasil (2007 a 2017).	14
Figura 8. Incidência de hepatite A segundo faixa etária e ano de notificação. Brasil (2007 a 2017).	15
Figura 9. Mortalidade por hepatite A como causa básica segundo região de residência e ano do óbito. Brasil (2006 a 2016).	15
Figura 10. Portas de acesso ao Laboratório de Virologia Comparada e Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico.	23
Figura 11. Frasco ambar disponibilizado, pelo LVCA, para agentes da vigilância sanitária para investigação de surto de hepatite A.	24
Figura 12. Membrana em Ester de celulose Milipore® (A). Equipamento de concentração de água (B).	25
Figura 13. Kit <i>QIAamp Viral RNA Mini Kit</i> – Quiagen®.	26
Figura 14. Termociclador Eppendorf® em funcionamento (B).	28
Figura 15. Resultado do gel de agarose 1,5% contendo controles positivos para HAV amplificados (fragmentos de 243 pb).	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Anos das primeiras descrições em literatura dos agentes etiológicos das hepatites virais.	2
Quadro 2. Padrão de endemicidade pelo HAV estimado por revisão sistemática, de dados publicados, das taxas de prevalência da infecção por HAV de acordo com a idade em 21 regiões do mundo como estabelecem as diretrizes de um estudo de análise global do impacto das doenças	11
Quadro 3. Características clínicas dos pacientes acometidos pelo HAV divididas em cinco grupos.	17
Quadro 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção do genoma do Vírus da Hepatite A com o tamanho de seus produtos	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras processadas para hepatites virais de transmissão entérica pela técnica de diagnóstico biomolecular PCR no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, Agosto a Outubro de 2018.	30
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

AN – Ácidos Nucleicos

CDC – Centros de Controle e Prevenção de Doenças

c-DNA – DNA Complementar

CRIE - Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP –

***Deoxyribonucleotide triphosphate* (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)**

EPI – Equipamento de Proteção Individual

EPgV - Pegivírus Equino

EqHV - Hepacivírus Equino

HA – Hepatite A

HAV – Vírus da Hepatite A

HBV – Vírus da Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HDV - Vírus da Hepatite D

HEV – Vírus da Hepatite E

HGV - Vírus da Hepatite G

HPP – Hélio e Peggy Pereira

IG – ImunoGlobulinas

IRES - Sítio Interno de Entrada no Ribossoma

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IM – via Intra Muscular

IU – *International Units* (Unidades Internacionais)

Kb – Kilobases

LADTV – Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia

LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitros

mM – Milimolar

MS – Ministério da Saúde

nm – Nanômetros

nPCR – Nested PCR

NPHV - Hepacivírus Não Primata Equino

NT – regiões Não Traduzidas

ORF – *Open reading frame* (Fase de Leitura Aberta)

Pb – Pares de Base

PCR – Reação da Cadeia da Polimerase

Pmol – Picomol

PNH – Primata Não Humano

PNI - Programa Nacional de Imunizações

POP – Procedimento Operacional Padrão

qPCR – PCR em Tempo Real

RJ – Rio de Janeiro

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido Ribonucleico)

RT – *Reverse transcriptase* (Transcriptase reversa)

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa

SC – via Subcutânea

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMS – Secretaria Municipal de Saúde

Taq – Taq DNA polimerase

UMV – *Universal Mass Vaccination* (Vacinação Universal em Massa)

V - Volt

μL – Microlitro

% - Porcentagem

RESUMO

A afecção denominada icterícia epidêmica, causadas pelos vírus da Hepatite A (HAV) e Hepatite E (HEV), é conhecida desde tempos antigos. Contudo, faz pouco tempo que ocorreu progresso no conhecimento das causas e biologia dessa infecção que têm conquistado protagonismo quando comparada ao combate às infecções por hepatite B persistente e hepatite C. Recentemente, as mudanças do perfil socioeconômico, das condições sanitárias e de higiene de populações e a instituição de protocolo vacinal para controle da infecção pelo HAV em crianças têm provocado uma mudança no perfil epidemiológico da doença, que antes era mais “silenciosa”, passando a apresentar um maior número de adultos desenvolvendo formas mais severas dessa afecção. Essa revisão compila dados contidos em literatura no intuito de introduzir noções da infecção pelo vírus causador da doença hepática inflamatória aguda, de transmissão por via fecal-oral, abordando sua virologia molecular, patogenia, epidemiologia, características clínicas e estratégias de controle e prevenção. E evidencia a necessidade de obtenção de novos dados acerca do novo perfil clínico e epidemiológico, para auxiliar na adequação dos programas vacinais, no desenvolvimento de novas metodologias tanto para o controle, quanto para a identificação da doença.

Palavras-chave: Fígado; Inflamação; Ingestão; Água; Alimentos; Vírus;

ABSTRACT

Epidemic jaundice has been known since ancient times. However, progress in understanding these infections has for some time fallen into the background on the importance of combating persistent hepatitis B and hepatitis C infections. Recently, changes in socioeconomic profile, sanitary conditions and population hygiene, and institution of vaccines protocols for the control of HAV infection in children seem to have brought a change in the epidemiological profile of the previously silent disease, to present alarming number of adults developing more severe forms of HAV infection. This review compiles data contained in the literature in order to introduce notions of infection by the virus that causes acute inflammatory hepatic disease of the fecal-oral route, addressing its molecular virology, pathogenesis, epidemiology, clinical characteristics and strategies of control and prevention. And it shows the need to obtain new data about the new clinical and epidemiological profile, to assist in the adequacy of the vaccine programs, in the development of new methodologies for both the control and the identification of the disease.

Keywords: liver; inflammation; ingestion; water; food; virus;

1. INTRODUÇÃO

Os surtos de hepatites, *epidemias* ou *pandemias ictéricas* são descritos a séculos em literatura. Frequentemente associados a períodos de guerras e afetando milhares de indivíduos. (Reuben, 2002; Fonseca, 2010). No decorrer dos anos, a pesquisa e análise de diversos surtos, desde a forma de transmissão do agente, o período de incubação até a resolução do quadro, possibilitou a diferenciação dos agentes causadores de afecções hepáticas inflamatórias (Reuben, 2002; Fonseca, 2010).

Há algum tempo que progresso no entendimento das infecções pelos vírus da hepatite A (HAV) e hepatite E (HEV) é deixado em segundo plano quanto à importância do combate às infecções por hepatite B persistente e hepatite C (Lemon & Walker, 2018). Recentemente, a utilização de vacinas para controle da infecção pelo HAV tem provocado uma mudança no perfil epidemiológico da doença, ocasionando a mudança da faixa etária acometida e resultando em adultos desenvolvendo formas mais severas dessa afecção (Lemon *et al*, 2018; Lemon & Walker, 2018).

Essa revisão traz noções da infecção pelo picornavírus, de transmissão por via fecal-oral, causador da doença hepática inflamatória aguda de tipo A abordando a virologia molecular, patogenia, epidemiologia, características clínicas, diagnóstico e estratégias de controle e prevenção.

Trata-se, também, de um relatório referente à disciplina Estágio Curricular Obrigatório, última disciplina de caráter obrigatório do curso de Medicina Veterinária, cujo estágio foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV), integrante do Instituto Oswaldo Cruz – (IOC/Fiocruz), localizado na Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. Introdução às Hepatites Virais

As hepatites virais têm como causa diferentes vírus primariamente hepatotrópicos, porém com características - sendo elas

epidemiológicas clínicas e algumas outras – distintas (Reyes *et al*, 1990; Hollinger, 1994; Alter, 2003; Fonseca, 2010).

As hepatites virais aparecem ao longo da história da humanidade como relatos da ocorrência de icterícia entre a população mundial que veio a ser associada a agentes infecciosos. Estes foram, posteriormente, distinguidos quanto aos modos de transmissão, período de incubação, aspectos clínicos e outras características (Hollinger, 1994; Reuben, 2002; Fonseca, 2010).

Dentre os agentes etiológicos das hepatites virais encontram-se cinco vírus hepatotrópicos primários (Quadro 1) designados Vírus da Hepatite A (HAV), Vírus da Hepatite B (HBV), Vírus da Hepatite C (HCV), Vírus da Hepatite D (HDV) e Vírus da Hepatite E (HEV) que são mais relevantes quando considerados aspectos clínicos e epidemiológicos (Blumberg, *et al*, 1965; Feinstone, 1973; Rizzetto, 1977; Balayan, 1983; Reyes, 1990; Brasil, 2007; Fonseca, 2010).

Quadro 1 – Anos das primeiras descrições em literatura dos agentes etiológicos das hepatites virais.

Ano de descrição	Patógeno
1965	Antígeno Austrália ¹
1973	Visualização das partículas virais do HAV
1977	Complexo Imune – Ag/Ac Delta ²
1989	Hepatite C – HCV
1990	Clonagem e descrição da infecção do HEV
1994-2001	HGV, Yonban, Sanban, outros ³ .

¹ Posteriormente definido como antígeno de superfície do vírus da hepatite B.

² Ocorrência concomitante com o HBV, somente em 1983 foi reconhecido como um novo agente patogênico e denominado Vírus da Hepatite Delta.

³ Vírus supostamente capazes de causar hepatite, mas ainda sem comprovação científica da sua participação na patologia ou descartados como agentes etiológicos das hepatites virais.

Existem outros vírus supostamente capazes de causar hepatite (Vírus da Hepatite G - HGV, vírus Sanban, vírus Yonban dentre outros) (Simons *et al*, 1995; Linnen *et al*, 1996; Nishizawa *et al*, 1997, Yeh *et al*, 2002), no entanto seu impacto clínico e epidemiológico é menor, seu envolvimento com as hepatites e se há tropismo pelo fígado ainda estão sob investigação, mas até o momento não há evidências da sua implicação na patogenia de hepatites não A - não E (Brasil,

2007; Fonseca, 2010). Para o HGV, já foi demonstrado que o agente não se replica no fígado, não possui tropismo pelo mesmo e não se correlaciona à doença hepática (Pessoa *et al*, 1998).

As hepatites virais são dispostas, quanto à forma de transmissão, em dois grupos: o de transmissão percutânea ou parental (HBV, HCV, HDV) e o de transmissão fecal-oral (HAV, HEV) (Reuben, 2002; Hollinger, 1994; Brasil, 2007, Fonseca, 2010).

2.2. Hepatites Virais de Transmissão entérica

O grupo de hepatites virais com transmissão fecal-oral está intimamente ligado às condições básicas de saneamento, higiene, desenvolvimento socioeconômico e à qualidade de água e alimentos de uma população (Brasil, 2007; Vitral & Oliveira, 2013). Sua presença é descrita em diversos momentos da história mundial, supõe-se que o agente responsável pelo que hoje é conhecido como hepatite A, por exemplo, aparece frequentemente em períodos de guerras e locais com condições sanitárias precárias (Reuben, 2002).

Trabalhos como a designação dos termos hepatite A e hepatite B, diferenciando as formas de transmissão fecal-oral e transmissão parenteral, por MacCallum em 1947 (Fonseca, 2010); a distinção e estudo da cepa MS-1, de transmissão primordialmente fecal-oral, por Krugman *et al* (1967); a sugestão da possível etiologia da hepatite A, através da visualização de partículas virais esféricas (27nm) nas fezes de pacientes portadores de uma suposta *hepatite infecciosa* em fase aguda e demonstração da resposta sorológica desses pacientes a este antígeno, por Feinstone *et al* (1973); e a observação de partículas similares, em tamanho e morfologia, às descritas por Feinstone em primatas por Gravelle *et al* (1975); culminaram na definição das características epidemiológicas da hepatite A. A clonagem molecular e sequenciamento do genoma viral ocorreram cerca de uma década após o descobrimento desse agente patogênico (Ticehurst *et al*, 1983), tratando-se do primeiro passo para a composição de vacinas efetivas contra o agente.

Dentre os diversos estudos e experimentos que levaram ao conhecimento dos cinco vírus hepatotrópicos primários: Vírus da Hepatite B em 1965; Vírus da Hepatite Delta em 1983; Vírus da Hepatite C em 1989 (Blumberg

et al, 1965; 1967; Rizzetto *et al*, 1977; Cho *et al* o, 1989; Rizzetto, 1990) , a identificação do Vírus da Hepatite E (HEV) só ocorre em 1990 através da clonagem molecular e transmissão do agente em macacos (Reyes *et al*, 1990).

Desde a década de cinquenta tinha-se conhecimento de uma forma de hepatite não-A e não-B, com transmissão entérica que foi associada ao consumo de água imprópria, em contato com esgoto. As características clínicas e epidemiológicas dessa infecção a diferenciavam de outra forma de hepatite com transmissão entérica que passaria a ser conhecida como hepatite A (Mushahwar, 2008). Surtos com um curso característico da infecção pelo HEV são presentes ao longo da história, mas a associação destes com o patógeno em questão só se deu anos após a ocorrência dos mesmos (Balayan *et al*, 1983; Mushahwar, 2008). O conhecimento genômico do HEV e seus mecanismos de expressão são descritos a partir de 1991-1992 (Mushahwar, 2008), e literatura posterior passa a apontar sua participação na ocorrência da forma crônica da hepatite (Aggarwal, 2008).

2.3. Vírus da Hepatite A

O HAV tem sua transmissão primária por via entérica e é capaz de causar grandes surtos ao se associar à água e/ou alimentos contaminados. Sua ocorrência é mundial e é considerada a causa mais comum de hepatite viral aguda em muitos países (Vital & Oliveira, 2013; Pinto *et al*, 2017).

O HAV, atualmente, se encontra presente na lista de zoonoses transmitidas por primatas não humanos (Andrade *et al.*, 2002; Brasil, 2014). Estudos recentes demonstram seu caráter zoonótico, uma vez que, o vírus pode desenvolver infecções subclínicas em primatas não humanos - como *Callithrix jacchus*, *Saimiri sciureus*, *Macaca fascicularis*, dentre outras espécies - e ser transmitido para humanos (Pinto *et al*, 2002; Amado *et al*, 2010; Bottino, 2015).

2.3.1. Virologia molecular do vírus da hepatite A

Componente da família *Picornaviridae*, o HAV é o único membro do gênero *Hepatovirus* (Gaspar *et al*, 2013; Lemon, 2018). Como outros membros da família, não possui envelope lipídico e seu genoma é revestido pelas proteínas

estruturais VP1, VP2 e VP3, o polipeptídeo VP4 ainda não foi demonstrado (Pinto *et al*, 2017). Outras diferenças do HAV quanto aos *Picornaviridae* são a estabilidade da partícula viral, o tropismo por hepatócitos, o ciclo replicativo que é lento e não citopático, além de, diferentemente dos outros picornavírus, o HAV é incapaz de suprimir a síntese de macromoléculas da célula hospedeira (Gaspar *et al*, 2013).

Seu genoma é formado por uma fita simples de RNA, polaridade positiva, de aproximadamente 7,5 kilobases (kb). O genoma contém uma única fase de leitura aberta (ORF) cercada por regiões não traduzidas (NT) (Cohen *et al*, 1987).

A ORF é traduzida em uma poliproteína única de cerca de 2.225 – 2.227 aminoácidos e é dividida em três segmentos (P1, P2 e P3). O segmento P1, ou terço aminoterminal da ORF, codifica as proteínas estruturais do capsídeo viral (VP1, VP2 e VP3). Os segmentos P2 e P3 codificam proteínas necessárias à replicação do HAV (2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{pro} e 3D^{pol}) como demonstrado na Figura 1 (Cohen *et al*, 1987; Martin & Lemon, 2002).

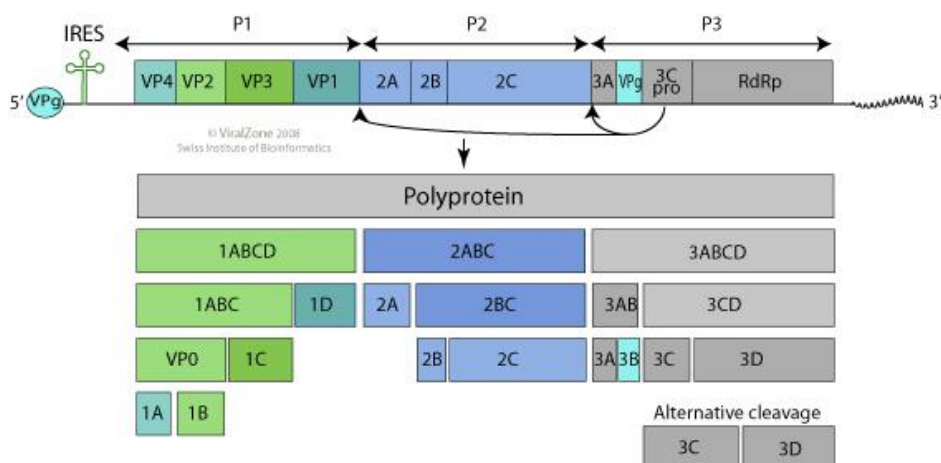


Figura 1: Mapa genético do HAV. Genoma formado por uma fita simples de RNA polaridade positiva e revestido por capsídeo. Poliproteína única formada por cerca de 2.225 - 2.227 aminoácidos, dividida em três segmentos: P1 codifica as proteínas estruturais que compõem o capsídeo (VP1, VP2 e VP3), P2 e P3 codificam proteínas necessárias para a replicação do vírus (2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{pro} e 3D^{pol}). Presença do complexo VP1/2A que é um intermediário fundamental para a morfogênese do vírion.

Fonte: [HTTP://viralzone.expasy.org/resources/Hepatovirus_genome.jpg](http://viralzone.expasy.org/resources/Hepatovirus_genome.jpg)

A protease 3C^{pro} exerce atividade durante o ciclo proteolítico da poliproteína, cliva a junção 2A/2B gerando a proteína VP3 e dois precursores de proteínas de capsídeo VP0 (VP4-VP2) e VP1/2A (Figura 1)

(Anderson & Ross, 1990; Martin & Lemon, 2006; Gaspar *et al*, 2013). O complexo VP1/2A é um intermediário fundamental para a morfogênese do vírion (Cohen *et al*, 2002; Martin & Lemon, 2006), sua clivagem resulta da ação de uma protease desconhecida e a proteína 2A madura não foi identificada em células diretamente infectadas (Martin *et al*, 1999; Graff *et al*, 1999; Martin & Lemon, 2006; Gaspar *et al*, 2013).

A proteína 3A parece participar na interação vírus-célula. A proteína 3B (ou VPg) se encontra ligada covalentemente à porção 5' do RNA e provavelmente age, no HAV, como uma proteína iniciadora (*primer*) durante a síntese de RNA (Figura 1), semelhantemente a uma variedade de famílias: *Picornaviridae* e *Caliciviridae*, por exemplo (Gaspar *et al*, 2013).

A primeira etapa de replicação do genoma, após a descapsidação do RNA é a síntese da poliproteína que é direcionada pelo Sítio Interno de Entrada no Ribossoma (IRES) (Figura 2). Esse sítio, no HAV, é ineficiente, ou seja, possui muito baixa atividade de tradução quando comparado a outros picornavírus. É provável que essa ineficiência contribua para uma replicação lenta e não citolítica (Whetter *et al*, 1994; Gaspar *et al*, 2013; Pinto *et al*, 2017).

Na replicação genômica, o HAV sintetiza uma cópia de RNA complementar (polaridade negativa) que serve de molde para a síntese de fitas de polaridade positiva, esse processo ocorre dentro do retículo endoplasmático liso usando as proteínas não estruturais como catalizadoras (Figura 2). As novas moléculas de RNA têm três possíveis destinos: serem traduzidas em proteínas virais; servir de molde para moléculas polaridade negativa ou serem embrulhadas formando novas partículas virais (Gaspar *et al*, 2013).

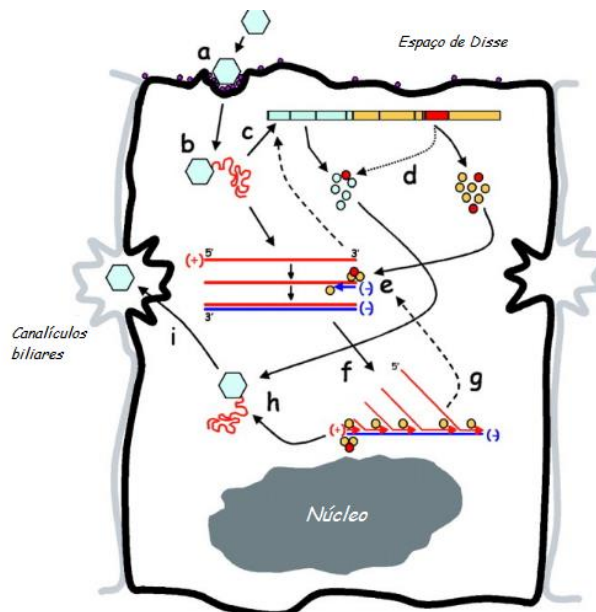


Figura 2: Visão molecular do ciclo de vida do HAV; (a) o vírus entra no hepatócito por meio de interação com receptor celular ainda não descrito ao certo; (b) ocorre a descapsidação da partícula viral e liberação da fita de RNA (+); (c) o IRES no segmento 5'NT do genoma media a tradução da poliproteína; (d) a poliproteína passa pelo ciclo proteolítico direcionada pela protease 3C^{pro}; (e) proteínas não estruturais se unem em uma RNA replicase ligada à membrana, liga a porção 3' do genoma e inicia a síntese de uma cópia de RNA complementar; (f) a fita polaridade negativa e usada como molde para a síntese de múltiplas cópias das fitas de RNA (+); (g) algumas das fitas de RNA polaridade positiva são reutilizadas para síntese de mais RNA ou tradução; (h) outras moléculas de polaridade positiva são empacotadas formando novas partículas virais; (i) novas partículas de HAV são secretadas pela célula através da membrana do hepatócito para os canalículos biliares, dos quais passarão para a bile e posteriormente intestino. Fonte: Adaptado de Martin & Lemon, 2006).

A última etapa de replicação é a montagem da partícula viral. O capsídeo é formado por 60 cópias de cada proteína estrutural (VP1, VP2 e VP3) e assume um formato icosaédrico - Figura 3 (Martin & Lemon, 2006; Gaspar *et al*, 2013).

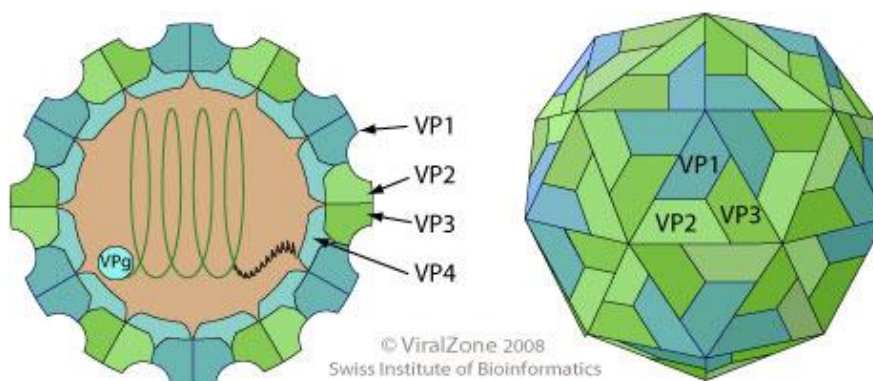


Figura 3: Partícula viral do HAV. Capsídeo icosaédrico, composto por 60 cópias de cada proteína estrutural (VP1, VP2 e VP3), a ação da proteína VP4 ainda não é demonstrada no HAV. Fonte: http://viralzone.expasy.org/resources/Picornaviridae_virion.jpg

A utilização de sequências de diferentes regiões do genoma para análise de isolados de HAV de diversas partes do mundo permite a demonstração e classificação da grande variabilidade genética entre as cepas desse agente. Por meio dos achados de Robertson *et al* (1992) somados aos de Costa-Mattiolo *et al* (2002) e posteriormente confirmados por Lu *et al* (2004) obtém-se a classificação atual do Vírus da Hepatite A em três genótipos de origem humana (I, II, e III) e três genótipos de origem símia (VI, V e VI), totalizando seis genótipos do HAV (Robertson *et al*, 1992; Costa-Mattioli *et al* 2002 e 2004; Lu *et al*, 2004; Gaspar, 2013; Pinto *et al*, 2017).

A distribuição geográfica do HAV varia. O genótipo I é distribuído por todo o globo, sendo o subgenótipo IA predominante (Robertson *et al*, 1992; Cristina & Costa-Mattioli, 2007; Gaspar *et al*, 2013; Pinto *et al*, 2017). Na América do Norte, China, Japão e diversos países da Europa, os mais frequentes são os subgenótipos IA e IB. Com exceção do Brasil, na América do Sul circula apenas o IA (Cristina & Costa-Mattioli, 2007; Pinto *et al*, 2017). Algumas regiões apresentam cocirculação de subgenótipos, como a França com os tipos IA e IB, a Índia com IA e IIIA e as regiões Brasileiras de Rio de Janeiro, Goiás, Amazonas e Pernambuco com a circulação dos subgenótipos IA e IB, nas demais regiões do Brasil há o predomínio do subgenótipo IA (de Paula *et al*, 2002; Villar *et al*, 2006; de Paula *et al*, 2006; Cristina & Costa-Mattioli, 2007; Fiaccadori *et al*, 2008; Gaspar *et al*, 2013; Pinto *et al*, 2017).

2.3.2. Patogenia

O HAV geralmente é adquirido pela ingestão de partículas virais. Por se tratar de uma molécula consideravelmente estável no ambiente, o HAV possui um alto grau de resistência ao pH ácido do estômago, sendo capaz de atravessar o epitélio intestinal, chegar ao fígado, através do sistema porta, se replicar nos hepatócitos e então ser excretado, junto à bile, para o intestino (Lemon, 1985; Zuckerman, 1988; Asher *et al*, 1995; Focaccia *et al*, 2013; Pinto *et al*, 2017).

Até então, a patologia causada pelo HAV é praticamente restrita ao fígado e os sítios de replicação extra-hepáticos ainda não são bem definidos, no entanto, há estudos com modelos animais que sugerem outros locais para possível replicação viral, tais como células da orofaringe, criptas intestinais e

lâmina própria do intestino (Mathiesen *et al*, 1980; Krawczynski *et al*, 1981; Blank *et al*, 2000; Pinto *et al*, 2017).

A idade é um fator de extrema importância no quadro clínico do paciente com HAV, pacientes mais jovens tendem a desenvolver um quadro poucos sinais clínicos ou totalmente assintomático, enquanto pacientes que adquirem a infecção em idade mais avançada apresentam uma evolução sintomática e mais grave. Ainda não é estabelecido um motivo para tal (Focaccia *et al*, 2013).

O período de incubação geralmente dura entre duas e sete semanas, apresentando o pico virêmico e eliminação fecal do vírus cerca de duas semanas antes do aparecimento dos sintomas (da Silva *et al*, 2015). Devido ao acontecimento do pico de viremia antes do surgimento dos sintomas, a transmissão parental do HAV, por transfusão de sangue total ou seus componentes, tem sido descrita, esporadicamente, desde a década de 70 (Meyers *et al*, 1974; Skidmore *et al*, 1982; Hughes *et al*, 2014; da Silva *et al*, 2015).

Estudo experimentais demonstram o desenvolvimento de viremia de uma a duas semanas após a inoculação em primatas não-humanos (PNH); a soroinfectividade cerca de três a quatro semanas antes do aparecimento da icterícia em humanos voluntariamente infectados; - em análise retrospectiva em soro estocado de pacientes infectados por HAV - refere um período de viremia de em média 95 dias (com variação entre 36 a 391 dias). A presença do RNA do HAV é descrita vários dias antes da detecção de anticorpos específicos (IgM) (Bower *et al*, 2000; Focaccia *et al*, 2013).

As respostas humoral e celular geralmente são detectadas pouco antes da elevação das enzimas hepáticas. A presença de anticorpos neutralizantes, característica da resposta humoral, é identificada cinco dias após a instalação dos sintomas. Detecta-se primeiramente a imunoglobulina IgM (fase aguda) e em seguida a fração IgG (Bower *et al*, 2000; Focaccia *et al*, 2013).

Diferentemente dos outros enterovírus, *Picornaviridae*, o HAV não causa dano citopático aparente (Gaspar *et al*, 2013; Focaccia *et al*, 2013). A lesão aos hepatócitos não é resultado direto da ação viral, mas secundária ao mecanismo imunológico do hospedeiro. A destruição de hepatócitos infectados e

dano hepatocelular são mediados pelos antígenos leucocitários humanos (HLA) - HAV específicos, linfócitos T-CD8 e células *Natural killers* (NK), alguns estudos sugerem também, o envolvimento de complexos imunes na patogênese do HAV (Vento *et al*, 1991; Tsai *et al*, 1996; Focaccia *et al*, 2013).

Considera-se então, a infecção por HAV como um processo bifásico onde, na fase aguda o vírus se replica no citoplasma da célula hospedeira (hepatócito) e não causa prejuízo aparente (não citopático) e numa segunda fase, citopática, causa dano hepatocelular (infiltração portal, necrose, erosão da placa limitante) cuja extensão depende da reação imune do hospedeiro (Slusarczyk *et al*, 1984; Zuckerman, 1988; Focaccia *et al*, 2013).

2.3.3. Epidemiologia

A infecção pelo HAV tem distribuição mundial e é considerada, em muitos países, a causa mais comum de hepatite viral aguda (Vital & Oliveira, 2013; Pinto *et al*, 2017). Estimam-se cerca de 1,5 milhões de casos clínicos notificados por ano (WHO, 2012), no entanto, esse número provavelmente está muito aquém da proporção real de incidência devido às limitações da obtenção de dados epidemiológicos sobre o HAV, como a subnotificação e ocorrência de casos assintomáticos (Vital & Oliveira, 2013; Lemon *et al*, 2018).

O nível de desenvolvimento socioeconômico, as condições básicas de saneamento, higiene, acesso a água potável e a qualidade dos alimentos são fatores decisivos na distribuição e prevalência dos casos de hepatite A. No geral, o aumento do nível socioeconômico, saneamento, qualidade da água e poder aquisitivo são inversamente proporcionais à incidência de infecções pelo HAV (Vital & Oliveira, 2013; Lemon *et al*, 2018).

O perfil epidemiológico do HAV em um país é definido por estudos de soroprevalência que medem a proporção de anticorpos específicos (anti-HAV IgG) em amostras de soro dos indivíduos da população divididos em grupos etários. Sua endemicidade é classificada em baixa, intermediária e alta (Shouval, 2010; Vital & Oliveira, 2013; Lemon *et al*, 2018). Esses dados nos levam ao “paradoxo do risco de hepatite A”, no qual a interpretação da endemicidade e dos

mapas de risco diverge de outros vírus e levar a um entendimento errôneo do seu significado (Mohd Hanafiah *et al*, 2011; Lemon *et al*, 2018).

A alta detecção de anticorpos anti-HAV IgG retrata uma alta endemicidade e conseqüentemente níveis altos de imunidade da população. Considera-se que em áreas com alta endemicidade a tendência é uma contração precoce na infecção, logo no início da infância, período em que o curso da doença é geralmente assintomático ou sem muitas manifestações clínicas. Logo, se tem uma população em que o impacto da doença é pouco significativo e são poucos os adultos susceptíveis que escaparam a exposição ao HAV quando crianças. Enquanto que em regiões com baixa incidência de infecções por HAV, a idade média de contração do vírus aumenta. Menor é o número de indivíduos afetados na infância tornando tanto as crianças quanto os adultos susceptíveis à infecção (Vital & Oliveira, 2013; Lemon *et al*, 2018).

A partir de estudos de prevalência do HAV e análises de dados geográficos e epidemiológicos correlacionados ao perfil de desenvolvimento socioeconômico de diversos países e regiões, estimam-se os atuais padrões de endemicidade mundial para o HAV - Quadro 1 (Jacobsen & Wiersma, 2010; Mortality GBD, 2013; Havelaar *et al*, 2015; Lemon *et al*, 2018).

Quadro 2 - Padrão de endemicidade pelo HAV estimado por revisão sistemática, de dados publicados, das taxas de prevalência da infecção por HAV de acordo com a idade em 21 regiões do mundo como estabelecem as diretrizes de um estudo de análise global do impacto das doenças (Adaptado de Jacobsen & Wiersma, 2010).

Padrão de endemicidade	Região
Alto ¹	África subsaariana, sul da Ásia.
Intermediário ²	América do Sul ³ , Ásia, Leste Europeu, Oriente Médio.
Baixo	Oeste Europeu, Austrália, Nova Zelândia, América do Norte, Japão, República da Coreia, Singapura.

¹ Regiões tradicionalmente endêmicas para HAV.

² Países em desenvolvimento têm um aumento no número de susceptíveis devido às melhorias socioeconômicas.

³ Diminuição nas taxas de soroprevalência.

A América do Sul, por exemplo, vem demonstrando uma mudança no perfil epidemiológico da hepatite A que decresce de uma alta endemicidade (Figura 4) para um padrão intermediário. Tal mudança ocorre em virtude das melhorias socioeconômicas e sanitárias que vem sendo implementadas. No entanto, a mudança do perfil pode vir a causar problemas devido ao atraso na exposição ao agente têm-se um maior número de adultos susceptíveis contraindo a doença que tem uma gravidade maior do que se fosse contraída na infância, aumentando o impacto da hepatite sobre indivíduos de idade mais avançada.

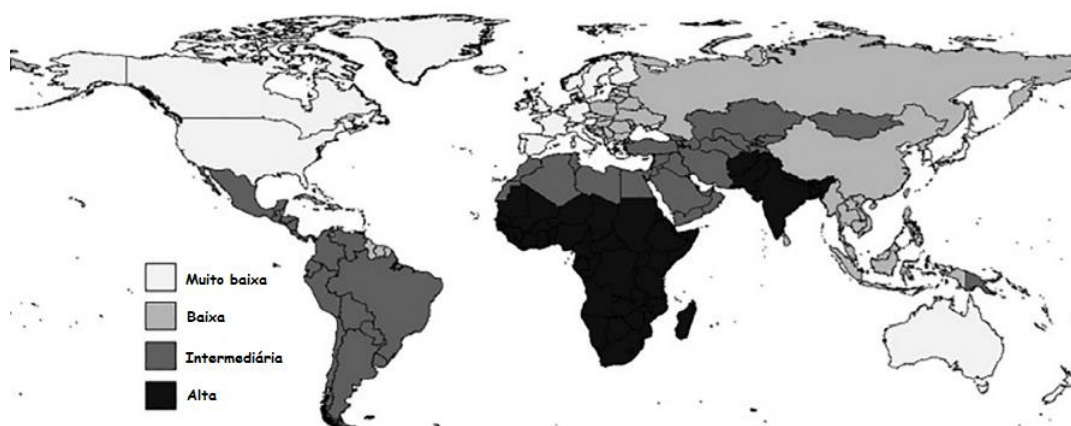


Figura 4: Endemicidade estimada do HAV no mundo. Muito baixa: < 50% dos indivíduos imunes ao 30s anos; Baixa: \geq 50% dos indivíduos imunes por volta dos 30 anos; Intermediária: \geq 50% dos indivíduos imunes por volta dos 15 anos; Alta: \geq 90% dos indivíduos imunes até os 10 anos. Fonte: Jacobsen & Wiersma, 2010.

O Brasil tem passado por um importante processo de desenvolvimento econômico que propiciou melhorias nas condições de vida de diversos brasileiros. Trata-se de um país em desenvolvimento com alta prevalência de doenças de veiculação hídrica e alimentícia, devido ao problema de saneamento difundido em grande parte de seu território, no qual houve um aumento expressivo na proporção de municípios abrangidos pelo sistema de saneamento básico, como rede de distribuição de água e rede coletora de esgoto. No entanto, ainda persistem diferenças regionais gritando no que diz respeito ao saneamento, principalmente quanto à instalação da rede de esgoto e abastecimento de água (Barreto *et al*, 2011; Vitral & Oliveira, 2013).

Segundo dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde, entre 1999 e 2017 o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) teve a notificação de 587.821 casos confirmados de Hepatites Virais, dos quais 164.892 (28%) referem a casos de hepatite A, sendo a região Nordeste a detentora da maior proporção das infecções pelo HAV (30,6%) como pode ser observado na Figura 5 (Brasil, 2018).

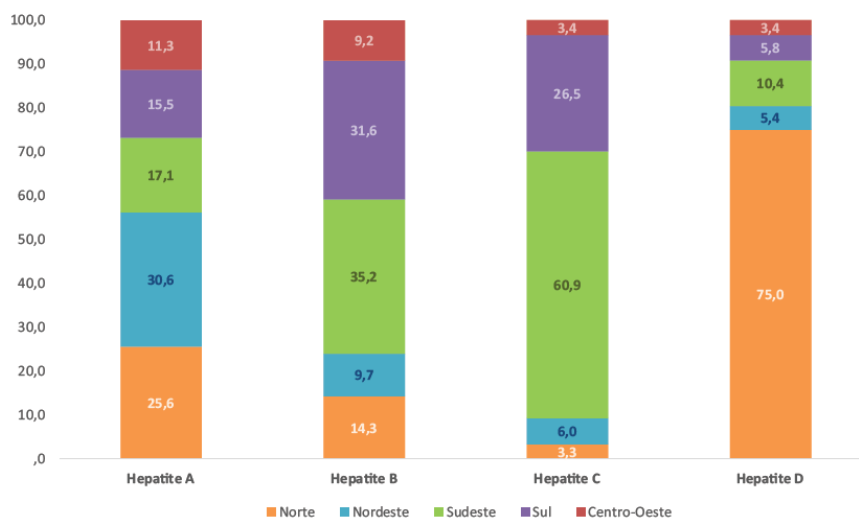


Figura 5. Casos de hepatites virais notificados segundo as regiões. Brasil (1999 a 2017). Fonte: Sinan/SVS/MS ([HTTP://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018](http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018)).

De 2007 a 2016 a taxa de incidência de hepatite A sofreu um importante declínio, com 85,7% de redução, passando de 7,1 casos para 1 caso a cada 100.000 habitantes - Figura 6 (Brasil, 2018).

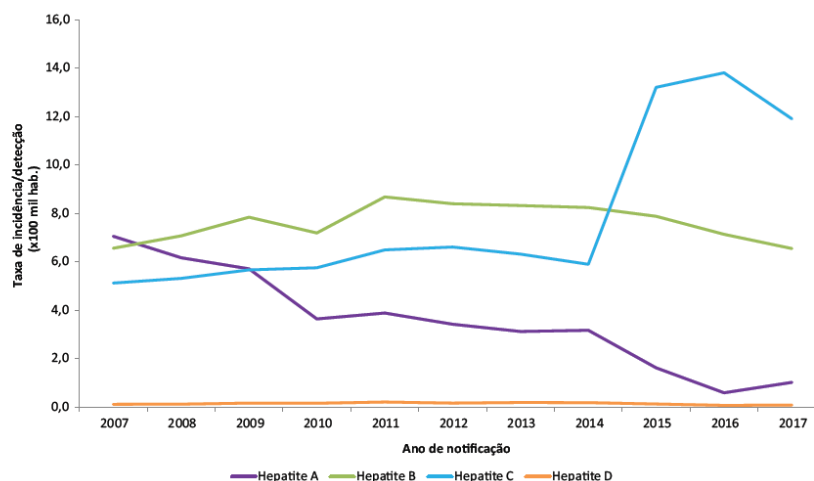


Figura 6. Incidência de hepatites virais segundo agente etiológico e ano de notificação. Brasil (2007 a 2017). Fonte: Sinan/SVS/MS ([HTTP://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018](http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018)).

As regiões Norte e Nordeste concentraram 56,2% dos casos de infecção por HAV confirmados no período de 1999 a 2017, enquanto as regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste compreendem 17,1%, 15,5% e 11,3% dos casos, respectivamente - Figura 7 (Brasil, 2018).

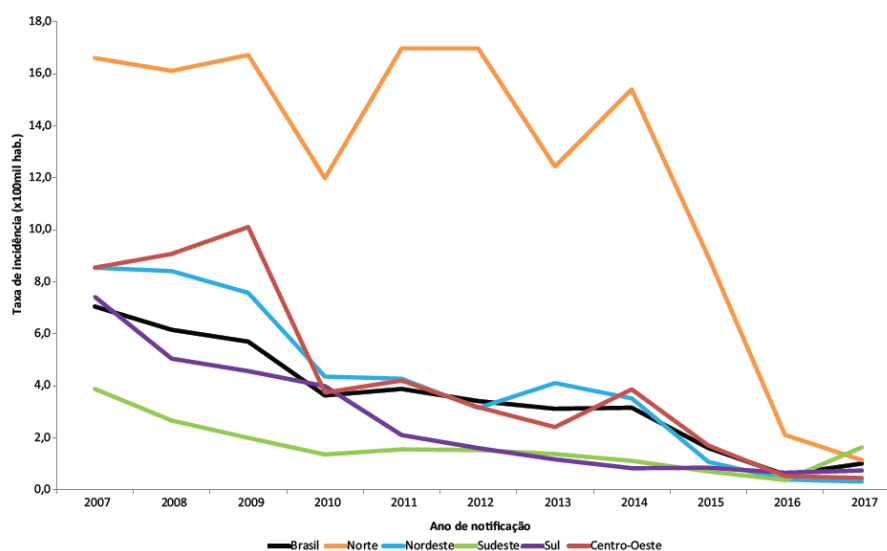


Figura 7. Incidência de hepatite A segundo região de residência e ano de notificação. Brasil (2007 a 2017). Fonte: Sinan/SVS/MS ([HTTP://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018](http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018)).

Até 2016 a incidência de hepatite A permaneceu mais alta na faixa etária de menores de 10 anos de idade, enquanto que no ano de 2017 a maior incidência ocorreu na faixa etária de 20 a 39 anos - Figura 8 (Brasil, 2018).

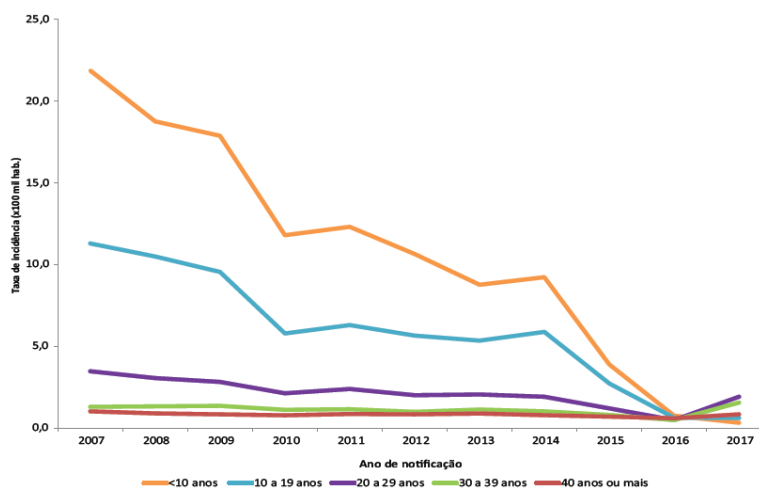


Figura 8. Incidência de hepatite A segundo faixa etária e ano de notificação. Brasil (2007 a 2017). Fonte: Sinan/SVS/MS ([HTTP://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018](http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018)).

Entre 2000 e 2016 foram relatados 1.110 óbitos dos quais 794 tiveram a hepatite A como causa básica e 316 como causa associada. Desde 2013 o coeficiente de mortalidade por hepatite A como causa básica tem aumentado na região Norte, enquanto que em todas as outras regiões do país se observa uma tendência de decréscimo – Figura 9.

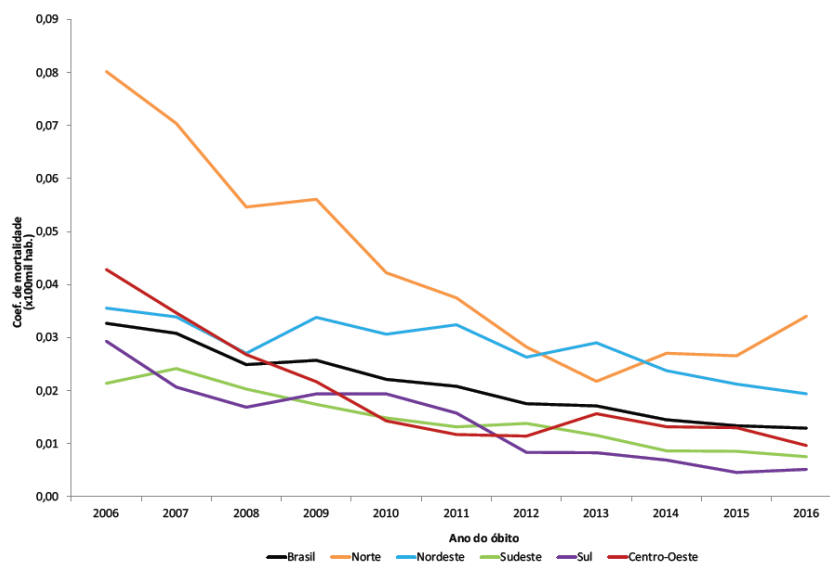


Figura 9. Mortalidade por hepatite A como causa básica segundo região de residência e ano do óbito. Brasil (2006 a 2016). Fonte: Sinan/SVS/MS ([HTTP://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018](http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018)). Nota: Representação gráfica suavizada do coeficiente de mortalidade.

No ano de 2014 o Programa Nacional de Imunizações (PNI) incluiu no Calendário Nacional de Vacinação a vacina adsorvida de hepatite A (inativada).

Em 2017, o PNI alterou a faixa etária de 12 meses a um ano, 11 meses e 29 dias para de 15 meses a 4 anos, 11 meses e 29 dias (Brasil 2014; 2017). A vacina de hepatite A (HA) também é fornecida para alguns grupos de risco de infecção pelo HAV, como portadores de hepatopatias crônicas e pacientes em terapia imunossupressora para doenças oncológicas, pelo Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE) (Vital & Oliveira, 2013). A vacina HA é altamente eficaz, possui baixa reatogenicidade e altas taxas de soroconversão. Países que adotaram o esquema de vacinação com HA apresentaram um controle da incidência da doença principalmente em creches e escolas (Brasil, 2017).

Segundo dados do Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais – 2018, há um decréscimo na taxa de incidência de crianças menores de 10 anos de idade o que corrobora a eficiência da estratégia de introdução da vacina para o controle da infecção nessa faixa. Entretanto, tal medida muda o foco da infecção para outra faixa etária susceptível, adolescentes e jovens adultos, que ao se infectarem correm um risco maior de desenvolver uma infecção sintomática mais severa (Vital & Oliveira, 2013; Brasil, 2018).

2.3.4. Características clínicas

Infecções agudas por HAV causam um processo inflamatório agudo do fígado que, na maioria dos casos, cursa de forma assintomática e se resolve espontaneamente sem deixar sequelas (Lemon *et al*, 2018).

Lemon *et al* (2018) divide as características clínicas em cinco grupos: 1 – pacientes assintomáticos, geralmente crianças com menos de cinco anos de idade; 2 – pacientes sintomáticos com colúria (urina escurecida), acolia (fezes esbranquiçadas), acompanhadas ou seguidas por icterícia; 3 – hepatite colestásica com a icterícia e o prurido podendo persistir por semanas ou meses, febre, perda de peso, diarreia, elevação acentuada da bilirrubina sérica e fosfatase alcalina; 4 – infecção recorrente, reaparecimento dos marcadores clínicos, bioquímicos e virológicos após a resolução do quadro; 5 – hepatite fulminante, da qual o paciente pode se recuperar sozinho, mas frequentemente necessita de um transplante.

Quadro 3 – Características clínicas dos pacientes acometidos pelo HAV divididas em cinco grupos. Adaptado de Lemon *et al* 2018.

Grupo	Quadro Clínico
I	Pacientes assintomáticos ¹
II	Colúria acolia, icterícia ²
III	Hepatite colestásica, icterícia, prurido, febre, enzimas
IV	Reincidência ³
V	Hepatite fulminante.

¹ Geralmente crianças com menos de cinco anos de idade.

² Colúria se trata da urina enegrecida e acolia remete a fezes esbranquiçadas.

³ Reaparecimento dos marcadores após a resolução do quadro

O curso clínico da doença é relacionado à idade do paciente, crianças muito novas, geralmente apresentam a forma assintomática da afecção, enquanto crianças mais velhas e adultos costumam apresentar a forma sintomática (Hollinger, 1996; Zamir *et al*, 2001; Lemon *et al*, 2018). A incidência de sintomas mais severos e óbitos é maior em pacientes de faixa etária mais elevada. Crianças de até seis meses não costumam apresentar sinais notáveis, são poucos os casos que desenvolvem icterícia. Adolescentes e jovens adultos manifestam os sintomas e a maioria dos casos se apresenta com icterícia (Lemon *et al*, 2018).

A hepatite A é resolvida completamente em quase todos os casos, mas são descritos alguns casos de reincidência, onde o paciente tem um novo quadro clínico semanas após o primeiro, apresentando nova viremia, elevação das enzimas hepáticas. O HAV volta a ser detectado no sangue e eliminado nas fezes. A recuperação completa pode levar até seis meses (Glikson *et al*, 1992; Lemon *et al*, 2018). O HAV não costuma evoluir para uma afecção crônica, mas pode causar sintomas debilitantes, desenvolver uma insuficiência hepática aguda (hepatite fulminante) e, quando associado a outro vírus (outras hepatites virais, HIV, dengue) ou afecção hepática crônica, levar a uma falência hepática (Vento, 2000; Lin *et al*, 2006; Radha Krishna *et al*, 2009; Lemon *et al*, 2018).

No geral, um quadro de hepatite fulminante levar à morte é raro, mas os casos são associados à alta mortalidade, principalmente se não há possibilidade de um transplante (Lemon *et al*, 2018). Países como Argentina e

Brasil apresentam altos índices de associação da hepatite A com o desenvolvimento da hepatite fulminando em pacientes pediátricos (Ciocca *et al*, 2007; Ferreira *et al*, 2008; Lemon *et al*, 2018). Em 2005 foi introduzido na Argentina o programa universal de imunização para hepatite A, desde então o número de casos de falência hepática fulminante reduziu de 54,6% para 27,7% no período após a instituição da imunização, sem relatos de ocorrência entre 2006 e 2008 (Cervio *et al*, 2011; Lemon *et al*, 2018). No Brasil a vacina de hepatite A foi incluída no Calendário Nacional de Vacinação em 2014 e sofreu alterações em 2017, passando a atender uma faixa etária mais abrangente (Brasil, 2014; 2017).

2.3.5. Diagnóstico

O diagnóstico da hepatite A aguda pode ser feito por teste sorológico, uma vez que os anticorpos anti-HAV IgM, IgG e IgA aparecem pouco antes ou durante o aparecimento dos sintomas. A imunoglobulina IgM pode ser detectada tanto em pacientes sintomáticos quanto assintomáticos. Em pacientes sintomáticos a presença de IgM ocorre entre 5 – 10 dias e persiste por cerca de 4 meses, enquanto que os IgG aparecem simultaneamente, mas podem persistir por anos (Shouval, 2010; Lemon *et al*, 2018). O RNA do HAV pode ainda ser detectado por PCR ou sequenciamento em fezes ou outros fluidos corporais.

2.3.6. Estratégias de controle e prevenção

A proteção contra o HAV é possível através de:

1- Condições sanitárias e higiene pessoal adequadas: o HAV é resistente ao congelamento, temperaturas moderadas e baixo pH e permanece persistente em fezes e no ambiente por longos períodos. Hábitos de higiene evitando ingestão de água ou alimentos contaminados e contato de pessoa-pessoa são formas de controle da transmissão do HAV;

2- Pré e pós exposição profilática a imunoglobulinas (IG): imunoglobulinas produzidas a partir de amostras de plasma humano têm sido utilizadas, por mais de 50 anos na profilaxia contra a infecção por HAV. A injeção de IG por via intra muscular (IM) é uma forma eficaz de profilaxia tem efeito horas após a aplicação e duração de semanas dependendo da dose usada. A proteção

pós exposição também ocorre horas após a injeção e possui eficácia entre 80-90% quando aplicada não mais do que 14 dias após a exposição ao patógeno (Liu *et al*, 2009; Lemon *et al*, 2018). A administração de IG protege o indivíduo do surgimento dos sintomas da infecção por HAV, mas pode não prevenir da infecção em si (Tejada-strop *et al*, 2017; Lemon *et al*, 2018). A coadministração de IG e vacinas pode levar à neutralização da resposta imune àquela vacina. A eficiência da pós exposição com vacinas inativadas, o alto custo da confecção de IG e o curto período de imunização levam as IG a cair no desuso (Walter *et al*, 1999).

3- Imunização ativa com vacinas: todas as vacinas são produzidas a partir de cepas adaptadas a culturas celulares de mamíferos, essa adaptação ocorre associada a pequenas mutações nas proteínas não estruturais e leva à atenuação da patogenicidade do vírus (Emerson *et al*, 2002; Lemon *et al*, 2018). Definem-se como proteção a HAV induzida por vacina a detecção de níveis de anti-HAV (IgG) entre 10 e 33 IU/mL (Lemon, 1993). Existem dois tipo de vacinas atualmente utilizadas pelo mundo:

> As inativadas por formalina são usadas na maioria dos países, com exceção de uma, todas as outras contém hidróxido de alumínio como adjuvante; quando armazenadas adequadamente (2-8°C) têm validade de 18 a 36 meses dependendo do fabricante; são usadas em crianças de idade menor ou igual a 12 meses e são injetadas por via IM respeitando um intervalo de, no mínimo, seis meses entre as doses; pode ser administrada junto a outras vacinas (Stalder *et al*, 2010; WHO, 2012; Lemon *et al*, 2018). Existem também vacinas combinadas para hepatite A e hepatite B ou hepatite A e tifoide, disponíveis principalmente para viajantes (WHO, 2012; Shouval, 2010; Gilca *et al*, 2009; Lemon *et al*, 2018);

> As vacinas atenuadas têm sido desenvolvidas na China, são utilizadas em estratégias de dose única e possuem validade de 18 meses (Shouval, 2010; WHO, 2012; Cui *et al*, 2014). Em 2007, foi introduzida na China a vacinação universal em massa (UMV) para crianças com 18 meses de idade, tendo metade delas recebido uma dose subcutânea (SC) da vacina atenuada e a outra metade, duas doses IM da vacina inativada, com intervalo de seis meses. Não houve relatos de reversão do vírus atenuado. Apesar de a vacina atenuada apresentar soroconversão mais lenta quando comparada à vacina inativada,

ambas as vacinas induzem proteção similar pelo mesmo período, cerca de oito anos (WHO, 2012; Cui *et al*, 2014; Lemon *et al*, 2018).

2.3.6.1. Estratégias para profilaxia pré exposição

As estratégias para proteção do indivíduo anteriormente à exposição ao vírus são:

i) Vacinação da população em risco: essa estratégia visa a proteção de indivíduos susceptíveis. Ainda é válida em áreas de endemicidade baixa ou extremamente alta, no entanto, por ter pouco impacto na imunidade de rebanho, não é tão eficaz em áreas em transição ou de endemicidade intermediária (Lemon *et al*, 2018);

ii) Vacinação regional em massa da população pediátrica em risco: a vacinação em massa de crianças susceptíveis leva a, comprovado, declínio da incidência de HAV. A eficiência dessa intervenção relatada em literatura levou à adoção do método em diversos países (Shouval, 2010; Zhou *et al*, 2014; Lemon *et al*, 2018).

iii) Vacinação universal em massa com protocolo vacinal de duas doses da vacina inativada: em 1999, Israel foi o primeiro país a instaurar a UMV em bebês de 18 meses de idade usando protocolo vacinal com duas doses IM da vacina inativada em um intervalo de seis meses. Com cobertura vacinal de 90% para a primeira dose e de 85% para a segunda, observa-se o decréscimo de casos, saindo de 33-70 casos/100.000 (1992-1998) para 2,5 casos/100.000 em 2002. Dados de vigilância confirmam a estabilidade dessa redução por 16 anos após a UMV, passando de um padrão de endemicidade intermediário para baixo (Dagan *et al*, 2005; Chodick *et al*, 2008). Uma análise recente de dados acerca do impacto dos programas de vacinação em massa demonstra uma evidente queda na incidência de hepatite A aguda após a introdução da UMV (Stuurman *et al*, 2017).

iv) Vacinação universal em massa com protocolo vacinal de uma dose de vacina inativada ou atenuada: estudos, em diferentes países, confirmam a eficiência a curto e médio prazo da imunização em dose única independente de ser a vacina inativada ou atenuada, ou do tipo do adjuvante (Song *et al*, 2015; Bhavne *et al*, 2015; Vizzotti *et al*, 2015; Bohm *et al*, 2017; Zhang *et al*, 2017).

Entretanto, ainda são necessários dados quanto à ação em longo prazo da imunização em dose única, se confere uma imunidade longa ou se haverá necessidade de uma dose de reforço (Lemon *et al*, 2018).

2.3.6.2. Estratégias para profilaxia pós exposição

Até pouco tempo atrás a administração de IG era a forma recomendada de profilaxia pós exposição, contudo a diminuição dos títulos de anti-HAV (IgG) no plasma utilizado para o preparo de IG, a proteção de curta duração, o aumento do custo de produção levaram à busca por alternativas. Estudos experimentais sugerem a eficácia da vacina inativada na prevenção da infecção por HAV, quando aplicada em até 14 dias após a exposição (Werzberger *et al*, 1992; Robertson *et al*, 1994; D'Hondt *et al*, 1995; Levine *et al*, 2015). Existe uma recomendação do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos para a utilização de vacinas inativadas ou invés de IG na profilaxia pós exposição em indivíduos de 2 a 40 anos de idade (MMWR, 2007). Embora ainda não hajam testes clínicos publicados, existe a sugestão de que o mesmo protocolo será eficiente também em indivíduos com idade superior a 41 anos de idade (Nelson *et al*, 2014).

3. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

3.1. Estágio Curricular Obrigatório

A disciplina Estágio Curricular Obrigatório é a última disciplina, de caráter obrigatório, ofertada no décimo período, após a conclusão de todas as matérias obrigatórias que constituem o currículo do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB). Este relatório tem como objetivo a descrição das atividades realizadas com mais frequência durante a realização do estágio supervisionado.

O estágio ocorreu no período de agosto a novembro de 2018, totalizando 480 horas, sob a supervisão do Médico Veterinário Dr. Marcelo Alves Pinto, Pesquisador Titular em Saúde Pública e vice-diretor de ensino do IOC e da Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira, Tecnologista em Saúde Pública e chefe do LADTV.

3.2. Apresentação e estrutura do local

O LADTV é um laboratório destinado à pesquisa, desenvolvimento e aplicação de novas metodologias em diagnóstico das hepatites virais de transmissão entérica, com ênfase nos vírus das hepatites A e E, bem como o desenvolvimento de novas metodologias para análise e diagnose das hepatites. Suas atividades consistem no recebimento, processamento e diagnóstico de amostras ambientais ou clínicas com suspeita de contaminação por HAV ou HEV advindas de todo o território nacional.

A equipe do LADTV é constituída por funcionários pesquisadores, alunos de pós-doutorado, doutorado, mestrado, iniciação científica e estagiários. O LADTV tem dentre suas linhas de pesquisa, concomitantemente à elaboração e aperfeiçoamento das metodologias voltadas às hepatites virais, o desenvolvimento de modelos experimentais de outras infecções virais, testes pré-clínicos de drogas antivirais dentre outras tecnologias, projetos voltados ao estudo de patógenos como o parvovírus humano B19, coordenado pela Dra. Luciane Almeida Amado Leon, pesquisadora em Saúde Pública e chefe substituta do LADTV; o Hepacivírus equino (EqHV), o Pegivírus equino (EPgV), a diversidade genética do hepacivírus não primata equino (NPHV) no Brasil, coordenados pela Dra. Andreza Soriano Figueiredo, pesquisadora em Saúde Pública; e o acompanhamento da infecção por *Zika vírus* em modelo experimental *Macaca mulatta*, projeto atualmente sob a supervisão da Dra. Noemi Rovaris Gardinali.

O laboratório é dividido de forma que as salas administrativas, lado “B”, não tenham contato com as salas destinadas à realização de procedimentos e análises, lado “C” (Figura 10). As salas de prefixo “C” têm acesso restrito a funcionários, estagiários e pessoas autorizadas. São divididas de acordo com sua função: extração de ácidos nucleicos, reagentes livres de ácidos nucleicos, análise de ácidos nucleicos, cultivo celular, imunopatologia, esterilização e descontaminação (Figura 10) e ficam dispostas seguindo um “fluxo de limpeza” de forma que os produtos de reações já realizadas não entrem em contato com a área de manipulação de reagentes, evitando também o contato entre diferentes patógenos.

Cada sala contém os equipamentos necessários para o desenvolvimento das atividades a ela atribuídas, bem como os equipamentos de proteção individual (EPIs) que são de uso obrigatório para os indivíduos que farão uso. Dentre os EPIs utilizados, os mais comuns e presentes em todas as salas, são jalecos e luvas para procedimentos. Algumas salas apresentam, também, óculos de proteção, máscaras e toucas, dependendo do patógeno ou reagente a ser manuseado.



Figura 10. Portas de acesso ao Laboratório de Virologia Comparada e Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico. Lado “C” (A). Placas indicativas do laboratório de Biologia Molecular para Extração de Ácidos Nucléicos (B) com a devida sinalização de “risco biológico” e “utilização obrigatória de EPIs”. Fonte: FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2018.

3.3. Técnicas Moleculares

O isolamento de vírus entéricos, em amostras ambientais, por métodos tradicionais de rotina é dificultado pela necessidade, por parte dos microrganismos, da presença de compostos específicos para o seu desenvolvimento, faz-se então necessária a utilização de métodos de diagnóstico molecular, uma ferramenta de extrema importância na detecção, de forma rápida e eficaz, de um agente etiológico (Yang & Rothman, 2004; Moraes Tavares *et al*, 2005).

Durante o estágio no LADTV tive a oportunidade de realizar um treinamento em métodos moleculares para o diagnóstico laboratorial, de

incrementar minha experiência com a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e expandir meus conhecimentos sobre diferentes protocolos de extração de amostras ambientais e clínicas.

3.3.1. Diagnóstico Molecular do Vírus das Hepatites A

As técnicas de diagnóstico molecular para detecção de HAV são empregadas em amostras de água (ambiental) recebidas pelo LADTV. As amostras são oriundas de coletas realizadas pela Vigilância Sanitária do estado do Rio de Janeiro, ou outras secretarias em todo o território nacional, e encaminhadas ao laboratório. São provenientes de coletas domiciliares para o monitoramento de água de consumo ou de coletas para investigação de surtos de afecções hepáticas inflamatórias com suspeita de transmissão entérica.

As amostras ambientais são recebidas pelo LADTV em recipiente devidamente esterilizado de forma a evitar contaminações, ou, preferencialmente, em frascos âmbar, disponibilizados pelo Laboratório de Virologia Comparada em Ambiental (LVCA)¹ para os agentes da vigilância do estado em investigações (Figura 11).

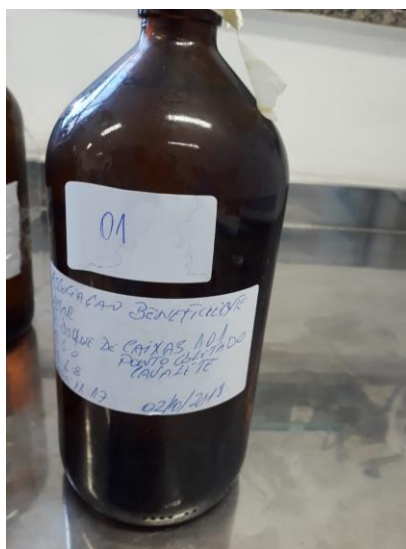


Figura 11. Frasco âmbar disponibilizado, pelo LVCA, para agentes da vigilância sanitária do estado do Rio de Janeiro para investigação de surto de hepatite A. Fonte: FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2018.

O processo de concentração das amostras se dá segundo Procedimento Operacional Padrão (POP) desenvolvido a partir da ISO 15216-1 (2017)² e adaptado para a rotina do laboratório. O protocolo determina a

coleta de um volume de 2 litros da amostra, o qual passa por um processo de filtração em equipamento próprio com uma membrana de celulose (Milipore®) cujos poros captam partículas presentes na amostra, incluindo o HAV. Como resultado final, obtém-se um concentrado de 2 mL que será submetido às análises moleculares para detecção de patógenos.



Figura 12. Membrana em Ester de celulose Milipore® (A). Equipamento de concentração de água (B). Fonte: FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2018.

A extração do genoma do HAV a partir de amostras ambientais se dá através da utilização de Kit comercial de acordo com as recomendações de uso do fabricante. Para as amostras de água foi empregado o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* - Qiagen® (Figura 13).

¹ O Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz atua como Serviço de Referência para Rotavíruses, na resolução de surtos de gastroenterites virais através da análise de água e alimentos possivelmente contaminados.

² ISO 15216-1:2017 – Microbiology of the food chain – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR – Part1: Method for quantification. International Organization for Standardization, 2017.



Figura 13. Kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* – Quiagen® (A). Fonte: Gentech Bio, 2018).

3.3.1.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase, técnica desenvolvida em 1985 (Saiki *et al*, 1985; Mullis *et al*, 1986), se trata de uma reação enzimática na qual se obtém milhões de cópias de uma sequência de AN, a partir de pequenas sequências específicas de DNA ou RNA (Gandra *et al*, 2008).

Prepara-se um mix de componentes necessários para construir um ambiente ideal para a ação enzimática. Trata-se da utilização de uma molécula molde de DNA que, em condições ideais e submetida a repetidos ciclos de variação de temperatura, propicia a formação de milhões de cópias da região alvo.

O genoma RNA do HAV torna necessária a síntese de uma molécula complementar ao RNA, uma fita de DNA complementar (cDNA) - produzida com a ação da enzima catalizadora Transcriptase Reversa (RT) - que será utilizada como molde para a PCR (Bottino, 2015).

A partir do RNA extraído, foi feita a síntese do cDNA com o iniciador (*primer*) randômico C1181 (Promega®). A utilização do *primer* randômico melhora o rendimento da reação por permitir maior número de combinações das bases nitrogenadas que se ligam a qualquer região do RNA (Bottino, 2015).

Para obtenção do cDNA utiliza-se, para obtenção do volume final de 25µL, a mistura de 12,5µL do RNA extraído + 12,5µL da solução contendo 5x *First-Strand buffer*, 3,5 mM DTT, 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 mM de *Random Primer* C1181 (Promega®), 0,6 mM de *RNAse Out* e *Superscript III-RT*

(Invitrogen® *Life Technologies*). O mix de reação foi levado ao termociclador (Eppendorf®): desnaturação a 25°C por cinco minutos; hibridização a 50°C por 60 minutos e extensão dos oligonucleotídeos a 70°C por 20 minutos. O cDNA obtido foi estocado a –20°C (Figura 14).

Para detecção do genoma do HAV, o cDNA obtido é submetido a um primeiro round de PCR. As reações compreenderam volume final de 25 µL, contendo 1,25x Tampão para PCR (*Buffer*), 3,75 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP, 0,5 pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2) HAV-F6 (5'- CTA TTG AGA TTG CAA ATT AYA AT – 3') e HAV-F7 (5'- AAY TTC ATY ATT TCA TGC TCC T – 3'); (de Paula *et al.*, 2002), 0,125 U/µL de *Platinum Taq* DNA polimerase em amplificação do tipo host-start e utilizados 5µL de cDNA anteriormente sintetizado.

Os *primers* usados, descritos em literatura, amplificam o segmento da junção VP1/2A do genoma do HAV, as sequências dos mesmos se encontram no Quadro 2 (de Paula *et al.*, 2002).

As reações foram submetidas ao termociclador, protocolo descrito em de Paula *et al.*, 2000: desnaturação inicial a 94°C por quatro minutos; 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos; hibridização a 40°C por 30 segundos e extensão dos oligonucleotídeos a 72°C por um minuto. Após o fim dos 30 ciclos, os tubos foram incubados por sete minutos a 72 °C e permaneceram a 4 °C até a retirada do termociclador. Para cada reação foi incluído um controle negativo (água Mili-Q estéril), de forma a obstar resultados falso positivos, e uma ou mais diluições do HAV isolado em cultura de células como controle positivo.

Quadro 4 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção do genoma do Vírus da Hepatite A com o tamanho de seus produtos.

<i>Primer</i>	Sequência	Posição	Tamanho
HAV F6 ¹	5' - CTA TTG AGA TTG CAA ATT AYA AT – 3'	2897	391 pb
HAV F7 ¹	5' – AAY TTC ATY ATT TCA TGC TCC T – 3'	3288	391 pb
HAV F8 ²	5' – TAT TTG TCT GTY ACA GAA CAA TCA G – 3'	2949	243 pb
HAV F ⁹	5' – AGG RGG TGG AAG YAC TTC ATT TGA – 3'	3192	243 pb

¹ Iniciadores da PCR; ² Iniciadores da *Nested-PCR*/ Y = C ou T/ R = A ou G.

Para melhorar a especificidade e sensibilidade da reação, o segmento genômico amplificado no primeiro round de PCR, de forma abrangente, é submetido a uma nova reação para amplificação da sequência alvo, utilizando *primers* internos à primeira reação (Carr, *et al*, 2010), por serem realizadas duas reações separadas denominamos essa etapa de *semi-nested* PCR.

Para a reação de *semi-nested* PCR, o mix de reação compreende volume final de 26 μ L, contendo 1,04x PCR *Buffer*, 3,125 mM MgCl₂, 0,208 mM dNTP, 0,417 pmol/ μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2) HAV-F8 (55' – TAT TTG TCT GTY ACA GAA CAA TCA G – 3') e HAV-F9 (5' – AGG RGG TGG AAG YAC TTC ATT TGA – 3'); (de Paula *et al.*, 2002), 0,104 U/ μ L de *Platinum* Taq DNA polimerase em amplificação do tipo host-start e utilizados 2 μ L do produto da PCR 1.

As reações são submetidas ao termociclador, protocolo: desnaturação inicial a 94°C por quatro minutos; 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos; hibridização a 40°C por 30 segundos e extensão dos oligonucleotídeos a 72°C por um minuto. Após os 40 ciclos, os tubos são incubados a 72 °C por sete minutos e permanecem a 4 °C até a retirada do termociclador.



Figura 14. Termociclador Eppendorf® em funcionamento. Fonte: FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2018.

3.3.1.2. Eletroforese em gel de agarose

Os *amplicons* (produtos das reações anteriormente descritas) são submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Trata-se da separação dos fragmentos de DNA por meio de enzimas de restrição (Fritsch & Maniatis, 1989; Bottino, 2015). As amostras são aplicadas a pequenos poços feitos no gel de agarose, junto a um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®), o gel é posicionado em uma cuba com tampão TAE 1x e é sujeitado a corrente elétrica (100V). Os fragmentos de DNA migram junto à corrente elétrica para o polo positivo da cuba e são retidos em diferentes alturas na agarose, formando “bandas”, que são visualizadas em transiluminador de ultravioleta, devido a serem coradas com brometo de etídio, substância que emite fluorescência quando exposta à luz ultravioleta (Fritsch & Maniatis, 1989; Bottino, 2015). Durante a confecção do gel de agarose 1,5% é acrescentado 0,05µL de brometo de etídio para cada mL do meio ainda líquido. O marcador de peso molecular (*Ladder*), marca a agarose em diversos pontos, assumindo o aspecto de escada, nos permitindo comparar em que altura da agarose está a banda e saber o tamanho do fragmento obtido. Para o HAV, o tamanho do fragmento esperado, após a reação de *semi-nested* PCR, é de aproximadamente 243 pb (Quadro 2, Figura 15).

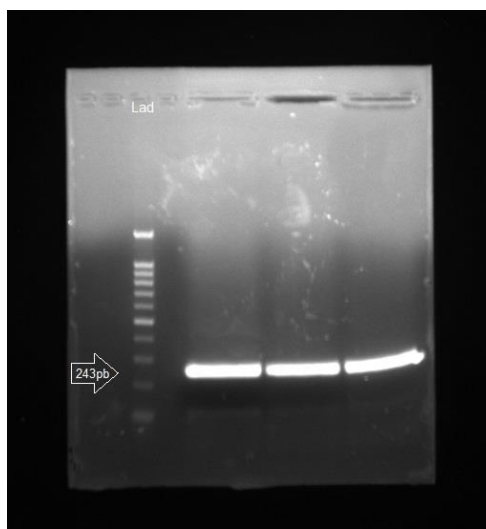


Figura 15. Resultado do gel de agarose 1,5% contendo controles positivos para HAV amplificados (fragmentos de 243 pb). Fonte: FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2018.

3.4. Casuística

Durante o estágio a pesquisa de HAV foi realizada, por PCR convencional, em nove amostras de água, oriundas da vigilância sanitária e 11 amostras de tecidos de mexilhão, oriundas de um projeto de pesquisa de outro laboratório em parceria com o LADTV (Tabela 1).

Tabela 1. Amostras processadas para hepatites virais de transmissão entérica pela técnica de diagnóstico biomolecular PCR no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, Agosto a Outubro de 2018.

PCR convencional	Nº de amostras
Amostra ambiental (água)	9
Amostra ambiental (mexilhões)	11
Controles (positivo e negativo)	12
Total	32

Das nove amostras, de água, testadas para hepatite A, três foram positivas, seis negativas. Os resultados das amostras de mexilhão não serão descritos, uma vez que integram uma tese ainda não publicada.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção por HAV é muito antiga e vem a muito afetando populações (Hollinger, 1994; Reuben, 2002; Fonseca, 2010). As melhorias sanitárias e socioeconômicas que vêm acontecendo mundialmente associadas a vacinações em massa da população em alguns países têm conduzido uma mudança no perfil epidemiológico da doença causada por esse agente (Lemon *et al*, 2018). Diferentemente de outros vírus, o declínio da endemicidade desse agente tem levado ao aumento da população susceptível e ao desenvolvimento de quadros mais severos da doença (Lemon *et al*, 2018). No Brasil, começa a ser observada a mudança no comportamento da doença, dados epidemiológicos confirmam a diminuição da incidência de infecção em crianças (< 10 anos), após a introdução da vacina HA no Calendário Vacinal. Os dados também indicam uma queda da ocorrência de casos na maior parte do território nacional (Brasil, 2018). Estudos recentes têm esclarecido cada vez mais aspectos como estrutura, replicação viral, evolução, patogênese, dentre outros, contudo, ainda são necessários novos dados acerca do novo perfil clínico e epidemiológico, adequação dos programas

vacinais, desenvolvimento de novas metodologias tanto para o controle, quanto para a identificação da doença, uma vez que a infecção por HAV ainda é muito subnotificada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, R. Hepatitis E: does it cause chronic hepatitis. **Hepatol**, v. 48, p. 1328-1330, 2008.

ALTER, H.J. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 149-152, 2003.

AMADO, L.A.; *et al.* Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication. **International Journal Experimental Pathology**, v. 91, p. 87-97, 2010.

AMADO, L.A.; *et al.* Exposure to multiple subgenotypes of hepatitis A virus during an outbreak using matched serum and saliva specimens. **Journal of Medical Virology**, v. 83, p. 768-775, 2011.

ANDERSON, D.A.; ROSS, B.C. Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles. **Journal of Virology**, v. 64, p. 5284-5289, 1990.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro:FIOCRUZ, 388p, 2002. ISBN: 85-7541-015-6.

ASHER, L.V.S.; *et al.* Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). **Journal of Medical Virology**, v. 47, p. 260-268, 1995.

BALAYAN, M.S.; ANDJAPARIDZE, A.G.; SAVINSKA, S.S.; KETILADZE, E.S.; BRAGINSKY, D.M.; *et al.* Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. **Intervirology**, v. 20, p. 23-31, 1983.

BAPTISTA, M.L.; *et al.* Genetic variability of hepatitis A virus strain HAF-203 isolated in Brazil and expression of the VP1 gene in *Escherichia coli*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2006, n. 101, p. 759-766, 2003.

BEARD, M.R.; COHEN, L.; LEMON, S.M.; MARTIN, A. Characterization of recombinant hepatitis A virus genomes containing exogenous sequences at the 2A/2B junction. **Journal of Virology**, v. 75, p. 1414-1426, 2001.

BHAVE, S.; SAPRU, A.; *et al.* Long-term immunogenicity of single dose of live attenuated hepatitis A vaccine in Indian children. **Indian Pediatrics**, v. 52, p. 687–690, 2015.

BLANK, C.A.; ANDERSON, D.A.; BEARD, M.; LEMON, S.M. *et al.* Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. **Journal of Virology**, v. 74, p. 6476-6484, 2000.

BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J.; VISNICH, A.A. “new” antigen in leukemia sera. **JAMA**, v. 191, p. 541-546, 1965.

BLUMBERG, B.S.; GERYSTLEY, B.J.S.; HUNGERFORD, D.A.; LONDON, W.T.; SUTNICK, A.I. A serum antigen (Australia antigen) in Down’s syndrome, leukemia and hepatitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 66, p. 924-931, 1967.

BOHM, K.; *et al.* Validation of HAV biomarker 2A for differential diagnostic of hepatitis A infected and vaccinated individuals using multiplex serology. **Vaccine**, v. 35, n. 43, p. 5883–5889, 2017.

BOTTINO, F.O. **Trabalho de conclusão de curso – Relatório de estágio supervisionado**. 68 f. Relatório (Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2015.

BOWER, W.A.; NAINAN, O.V.; HAN, X.; *et al.* Duration of viremia in hepatitis A virus infection. **The Journal of Infectious Diseases** v. 182, p. 12-17, 2000.

BRASIL. Hepatites Virais / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Volume único, Brasília: **Ministério da Saúde**, 2007.

BRASIL. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2 ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2014.

BRASIL. Informe Técnico da Introdução da Vacina Adsorvida Hepatite A (Inativada) / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunização. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2014. Disponível em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/26/Informe-t--cnico-vacina-hepatite-A-junho-2014.pdf>.

BRASIL. Nota Informativa sobre mudanças no Calendário Nacional de Vacinação para o ano de 2017 / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunização. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/28/Nota-Informativa-384-Calendario-Nacional-de-Vacinacao-2017.pdf>.

BRASIL. Boletim Epidemiológico: Hepatites Virais 2018 / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: **Ministério da Saúde**, v. 49, n. 31, 2018. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018>.

CARR, J.; WILLIAMS, D.G.; HAYDEN, R.T. Molecular detection of multiple respiratory viruses. *In*: **Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory**. 1 ed, p. 289-300, 2010.

CERVIO, G.; D'AGOSTINO, D.; *et al.* Decline in HAV-associated fulminant hepatic failure and liver transplant in children in Argentina after the introduction of a universal hepatitis A vaccination program. **Hepatic Medicine**, v. 3, p. 99–106, 2011.

CIOCCA, M.; *et al.* Hepatitis A as an etiologic agent of acute liver failure in Latin America. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 26, p. 711–715, 2007.

CHODICK, G.; *et al.* Long-term trends in hepatitis A incidence following the inclusion of Hepatitis A vaccine in the routine nationwide immunization program. **Journal of Viral Hepatology**, v. 15, p. 62–65, 2008.

CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.; WANG, K.S.; OVERBY, L.; BRADLEY, D.; *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-362, 1989.

COHEN, J.I.; TICEHURST, J.R.; FEINSTONE, S.M.; ROSENBLUM, B.; PURCELL, R.H. Hepatitis A virus cDNA and its RNA transcripts are infectious in cell cultura. **Journal of Virology**, v. 61, p. 3035-3039, 1987.

COHEN, J.I.; TICEHURST, J.R.; PURCELL, R.H.; BUCKLER-WHITE, A.; BAROUDY, B.M. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus:

- comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. **Journal of Virology**, v. 61, n. 1, p. 50-59, 1987.
- COHEN, L.; BENICHO, D.; MARTIN, A. Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. **Journal of Virology**, v. 76, p. 7495-7505, 2002.
- COSTA-MATTIOLI, M.; *et al.* Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. **Journal of Virology**, v. 76, p. 9516-9525, 2002.
- COSTA-MATTIOLI, M.; CRISTINA, J.; *et al.* Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. **Virology**, v. 311, p. 51-59, 2003.
- CRISTINA, J.; COSTA-MATTIOLI, M.; *et al.* Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. **Virus Research**, v. 127, p. 151-157, 2007.
- CUI, F.; *et al.* Development, production, and postmarketing surveillance of hepatitis A vaccines in China. **Journal of Epidemiology**, v. 24, p. 169–177, 2014.
- D'HONDT, E.; *et al.* Efficacy of an inactivated hepatitis A vaccine in pre- and postexposure conditions in marmosets. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. S40–S43, 1995.
- DA SILVA, S.G.C.; DE PAULA, V.S.; PINTO, M.A.; DE OLIVEIRA, J.M.; *et al.* A Rare Case of Transfusion Transmission of Hepatitis A Virus to Two Patients with Haematological Disease. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 43, p. 131-141, 2016.
- DAGAN, R.; *et al.* Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. **JAMA**, v. 294, p. 202–210, 2015.
- DE PAULA, V.S.; *et al.* Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 66, p. 22-27, 2002.
- DE PAULA, V.S.; GASPAR, A.M.; *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Brazilian Amazon. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 21, p. 1435-1438, 2006.
- EMERSON, S.U.; *et al.* Identification of VP1/2A and 2C as virulence genes of hepatitis A virus and demonstration of genetic instability of 2C. **Journal of Virology**, v. 76, p. 8551–8559, 2002.

FEINSTONE, S.M.; KAPIKIAN, A.Z.; PURCELL, R.H. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of virus like antigen associated with acute illness. **Science**, v. 182, p. 1026-1028, 1973.

FERREIRA, C.T.; VIEIRA, S.M.; *et al.* Hepatitis A acute liver failure: follow-up of paediatric patients in southern Brazil. **Journal of Viral Hepatology**, v. 15, p. 66–68, 2008.

FIACCADORI, F.S.; *et al.* Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from Goiânia, Goiás, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 831-835, 2008.

FOCACCIA, R.; *et al.* Hepatite A: Patogenia. *In: Tratado de Hepatites Virais*, 3 ed. São Paulo: Atheneu, p. 245-248, 2013.

FONSECA, J.C.F. Artigo de Revisão: Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 322-330, 2010.

FRANCO, E.; *et al.* Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. **World Journal of Hepatology**, v. 4, p.68–73, 2012.

FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2 ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

GANDRA, E.A.; *et al.* Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Redalyc**, v. 30, n.1, p. 109-118, 2008.

GASPAR, A.M.C.; VITRAL, C.L.; OLIVEIRA, J.M. Biologia Molecular do Vírus da Hepatite A. *In: Tratado de Hepatites Virais*, 3 ed. São Paulo: Atheneu, p. 249-256, 2013.

GILCA, V.; *et al.* Long-term immunogenicity of two pediatric doses of combined hepatitis A and B or monovalent hepatitis B vaccine in 8 to 10-year-old children and the effect of a challenge dose given seven years later. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, p. 916–918, 2009.

GLIKSON, M.; *et al.* Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. **Medicine**, v. 71, p. 14–23, 1992.

GRAFF, J.; RICHARDS, O.C.; SWIDEREK, K.M.; DAVIS, M.T.; RUSNAK, F.; HARMON, S.A.; *et al.* Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogenous C terminus. **Journal of Virology**, v. 73, p. 6015-6023, 1999.

GRAVELLE, C.R.; HORNBECK, C.L.; MAYNARD, J.E.; SCHABLE, C.A.; COOK, E.H.; BRADLEY, D.W. Hepatitis A: report of a common-source outbreak with

recovery of a possible etiologic agent. II Laboratory studies. **Journal of infectious Diseases**, v. 131, p. 167-171, 1975.

HAVELAAR, A.H.; *et al.* World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. **PLOS Medicine**, v. 12, 2015.

HOLLINGER, F.B. The five viruses: a perspective. **AASLD Postgraduate Course “Viral hepatitis A to F: an update**, p. 2-20, 1994.

HOLLINGER, F.B. Fields virology. 3 ed. **Philadelphia: Lippincott Raven**; 1996.

HUGHES, J.A.; *et al.* Case report of a transfusion-associated hepatitis A infection. **Transfusion**, v. 54, p. 2202-2206, 2014.

ISO 15216-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification. **International Organization for Standardization**. 2017. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15216:-1:ed-1:v1:en>.

JACOBSEN, K.H.; WIERSMA, S.T. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. **Vaccine**, v. 28, p. 6653-6657, 2010.

KRAWCZYNSKI, K.K.; *et al.* Pathogenetic aspects of hepatitis A virus infection in enterally inoculated marmosets. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 76, p. 698-706, 1981.

KRUGMAN, S.; GILES, J.P.; HAMMOND, D.A. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. **JAMA**, v. 200, p. 365-373, 1967.

LEMON, S.M. Typa A viral hepatitis. New developments in an old disease. **New England Journal of Medicine**, v. 313, p. 1059, 1985.

LEMON, S.M. Immunologic approaches to assessing the response to inactivated hepatitis A vaccine. **Journal of Hepatology**, v. 18, p. S15–S19, 1993.

LEMON, S.M.; WALKER, C.M. Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus: Emerging and Re-Emerging Enterically Transmitted Hepatitis Viruses. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 8p. 2018. Doi: 10.1101/cshperspect.a031823

LEMON, S.M.; OTT, J.J.; VAN DAMME, P.; SHOUVAL, D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. **Journal of Hepatology**, v. 68, p. 167-184, 2018.

- LEVINE, H.; *et al.* The impact of a national routine immunisation programme initiated in 1999 on Hepatitis A incidence in Israel, 1993 to 2012. **Euro Surveillance**, v. 20, p. 3–10, 2015.
- LIN, L.; *et al.* Viral interaction and clinical implications of coinfection of hepatitis C virus with other hepatitis viruses. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, p. 1311–1319, 2006.
- LINNEN, J.; WAGES JR, J.; ZHANG-KECK, Z.Y.; FRY, K.E.; KRAWCZYNSKI, K.Z.; ALTER, H.; *et al.* Molecular cloning and disease associated with hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. **Science**, v. 271, p. 505-508, 1996.
- LIU, J.P.; NIKOLOVA, D.; FEI, Y. Immunoglobulins for preventing hepatitis A. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, 2009.
- LU, L.; CHING, K.Z.; *et al.* Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2943-2952, 2004.
- MARTIN, A.; BENICHO, D.; CHAO, S.F.; COHEN, L.M.; LEMON, S.M. Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3Cpro proteinase. **Journal of Virology**, v. 73, p. 6220-6227, 1999.
- MARTIN, A.; LEMON, S.M. Hepatitis A virus: From discovery to vaccines. **Hepatology**, v. 43, n. 1, p. 164-172, 2006.
- MATHIESEN, L.R.; *et al.* Hepatitis A virus in the liver and intestine of marmosets after oral inoculation. **Infection and Immunity**, v. 28, p. 45-48, 1980.
- MEYERS, J.D.; *et al.* Parenterally transmitted hepatitis A associated with platelet transfusions. Epidemiologic study of an outbreak in a marrow transplantation center. **Annals of Internal Medicine**, v. 81, p. 145-151, 1974.
- MMWR. Update: Prevention of Hepatitis A After Exposure to Hepatitis A Virus and in International Travelers. Updated: **Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)**, 2007.
- MOHD HANAFIAH, K.; JACOBSEN, K.H.; WIERSMA, S.T. Challenges to mapping the health risk of hepatitis A virus infection. **International Journal of Health Geographics**, v. 10, p. 57, 2011.

MORAES TAVARES, T.; *et al.* Vírus Entéricos Veiculados por Água: Aspectos Microbiológicos e de Controle de Qualidade da Água. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 85-104, 2005.

MORTALITY GBD. Causes of Death C. Global, regional and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1999-2013. **Lancet**, v. 385, p. 117-171, 2015.

MULLIS, K.; *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 51, p. 263-273, 1986.

MUSHAHWAR, I.K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 646-658, 2008.

NELSON, N.P.; MURPHY, T.V.; MCMAHON, B.J. Hepatitis A vaccination for postexposure prophylaxis in persons aged 40 years and older. **Vaccine**, v. 32, p. 2939, 2014.

NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H.; KONISHI, K.; YOSHIZAWA, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, p. 92-97, 1997.

PESSOA, M.G.; TERRAULT, N.A.; DETMER, J.; KOLBERG, J.; COLLINS, M.; HASSOBA, H.M.; *et al.* Quantification of hepatitis G and viruses in the liver: Evidence that hepatitis G is not hepatotropic. **Hepatology**, v. 27, p. 877-880, 1998.

REUBEN, A. Landmarks in heptaology: the thin red line. **Hepatology**, v. 36, p. 770-773, 2002.

PINTO, M.A.; *et al.* Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: Early detection of HAV antigen and viral fate. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 53, p. 413-420, 2002.

PINTO, M.A.; de OLIVEIRA, J.M.; GONZÁLEZ, J. Hepatitis A and E in South America: New Challenges Toward Prevention and Control. In: **Human Virology in Latin America: From Biology to Control**, 1 ed. Springer International Publishing, p. 119-138, 2017.

PINTÓ, R.M.; *et al.* Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. **Virus Research**, v. 127, p. 158-163, 2007.

- RADHA KRISHNA, Y.; SARASWAT, V.A.; *et al.* Clinical features and predictors of outcome in acute hepatitis A and hepatitis E virus hepatitis on cirrhosis. **Liver International**, v. 29, p. 392–398, 2009.
- REYES, G.R.; PURDY, M.A.; KIM, J.P.; LUK, K.C.; YOUNG, L.M.; FRY, K.E.; *et al.* Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. **Science**, v. 247, p. 1335-1339, 1990.
- RIZZETTO, M. Hepatitis Delta: The virus and disease. **Journal of Hepatology**, v. 11, p. 145-148, 1990.
- RIZZETTO, M.; CANESE, M.G.; ARICÒ, S.; CRIVELLI, O.; TREPO, C.; BONINO, F.; *et al.* Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (Delta/anti-Delta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. **GUT**, v. 18, p. 997-1003, 1977.
- ROBERTSON, B.H.; *et al.* Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1365-1377, 1992.
- ROBERTSON, B.H.; *et al.* Effect of postexposure vaccination in a chimpanzee model of hepatitis A virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 43, p. 249–251, 1994.
- SAIKI, R.K.; *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.
- SÁNCHEZ, G.; BOSCH, A.; PINTÓ, R.M.; Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. **Journal of Virology**, v. 77, p. 452-459, 2003.
- SATTAR, S.A.; JASON, T.; *et al.* Foodborne spread of hepatitis A: Recent studies on virus survival, transfer and inactivation, **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 11, p. 159-163, 2000.
- SCHIMID, R. Viral hepatitis: Some Historical Perspectives. **Viral Hepatitis and Liver Disease**, p. 1-7, 1994.
- SHOUVAL, D. The immunological basis for immunization series. *In: Immunization vaccines and biological*, ed: World Health Organization, 2010.

- SIMONS, J.N.; LEARY, T.P.; DAWSON, G.J.; PILOT-MATIAS, T.J.; MUERHOFF, A.S.; SCHLAUDER, G.G.; *et al.* Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. **Nature Medicine**, v. 1, p. 564-569, 1995.
- SKIDMORE, S.J.; BOXALL, E.H.; ALA, F. A case report of posttransfusion hepatitis A. **Journal of Medical Virology**, v. 10, p. 223, 1982.
- SLUSARCCZYK, J.; HANSSON, B.G.; NORDENFELT, E.; *et al.* Etiopathogenetic aspects of hepatitis A II. Specific and nonspecific humoral immune response during the course of infection. **Journal of Medical Virology**, v. 14, p. 269-276, 1984.
- SONG, Y.J.; LIM, J.; PARK, W.S.; *et al.* Seropositivity among Korean young adults approximately 2 years after a single-dose vaccination against hepatitis A virus. **PLoS One**, v. 10, 2015.
- STALDE, J.; *et al.* Establishment of a biological reference preparation for hepatitis A vaccine (inactivated, non-adsorbed). **Pharmeuropa Bio & Scientific Notes**, v. 2010, p.15–29, 2010.
- STUURMAN, A.L.; SHOUVAL, D.; *et al.* Impact of universal mass vaccination with monovalent inactivated hepatitis A vaccines – A systematic review. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 13, p. 724–736, 2017.
- TEJADA-STROP, A.; *et al.* Evaluation of potencies of immune globulin products against hepatitis A. **JAMA Internal Medicine**, v. 177, p. 430–432, 2017.
- TICEHURST, J.R.; RACANIELLO, V.R.; BAROUDY, B.M.; BALTIMORE, D.; PURCELL, R.H.; FEINSTONE, S.M. Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 60, p. 5885-5889, 1983.
- TICEHURST, R.L.; HENRY, R.L. Stage-related behavioural problems in the 1-4 year old child: parental expectations in a child development unit referral group compared with a control group. **Australian Paediatric Journal**, v. 25, p. 93-42, 1989.
- TSAI, J.F.; MARGOLIS, H.S.; JENG, J.E.; *et al.* Increased IgM class circulating immune complexes in acute hepatitis A virus infection. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v., 78, n. 3, p. 291-295, 1996.

- VENTO, S.; GAROFANO, T.; DI PERRI, G.; *et al.* Identification of hepatitis A virus as a trigger for autoimmune chronic hepatitis type 1 in susceptible individuals. **Lancet**, v. 337, p. 1183-1187, 1991.
- VENTO, S. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Viral Hepatology**, v. 7, p. 7–8, 2000.
- VILLAR, L.M.; *et al.* Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 873-881, 2006.
- VITRAL, C.L.; OLIVEIRA, J.M. Epidemiologia da Hepatite A no Brasil. *In*: **Tratado de Hepatites Virais**, 3 ed. São Paulo:Atheneu, p. 237-244, 2013.
- VIZZOTTI, C.; PIPPO, T.; URUENA, A.; *et al.* Economic analysis of the single-dose immunization strategy against hepatitis A in Argentina. **Vaccine**, v. 33, p. A227–A232, 2015.
- WALTER, E.B.; *et al.* Concurrent administration of inactivated hepatitis A vaccine with immune globulin in healthy adults. **Vaccine**, v. 17, p. 1468–1473, 1999.
- WERZBERGER, A.; KUTER, B.; *et al.* A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. **The New England Journal of Medicine**. v. 327, p. 453–457, 1992.
- WHETTER, L.E.; *et al.* Low efficiency of the 5' –nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. **Journal of Virology**, v. 68, p. 5253-5263, 1994.
- WHO. World Health Organization: Position paper on hepatitis A vaccines. **The Weekly Epidemiological Record**, v. 87, p. 15, 2012.
- YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious diseases**, v. 4, n. 6, p. 337-348, 2004.
- YEH, C.H.; CHEN, T.C.; CHANG, M.L.; HSU, C.W.; YEH, T.S.; LEE, W.C.; *et al.* Identification of NV-F virus in hepatocellular carcinoma. **Journal of Medical Virology**, v. 79, p. 92-96, 2002.
- ZAMIR, C.; Rimon, N.; *et al.* Control of a community-wide outbreak of hepatitis A by mass vaccination with inactivated hepatitis A vaccine. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 20, p. 185–187, 2001.

ZHANG, Z.; ZHU, X.; HU, Y.; *et al.* Five-year antibody persistence in children after one dose of inactivated or live attenuated hepatitis A vaccine. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, p. 1–6, 2017.

ZHOU, F.; SHEFER, A.; WENGER, J.; *et al.* Economic evaluation of the routine childhood immunization program in the United States, 2009. **Pediatrics**, v. 133, p. 577–585, 2014.

ZUCKERMAN, A. **Viral hepatitis and liver diseases**. London: AR Liss, 1988.