



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**Relatório de Estágio Supervisionado realizado no Laboratório
de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto
Oswaldo Cruz/FIOCRUZ**

Bryam Amorim Santana
Orientadora: Profa. Dra. Simone Perecmanis

BRASÍLIA - DF
DEZEMBRO, 2018



BRYAM AMORIM SANTANA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO FINAL REALIZADO NO LABORATÓRIO
DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO EM VIROLOGIA
INSTITUTO OSWALDO CRUZ/FIOCRUZ**

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

AB915r Amorim Santana, Bryam
Relatório de Estágio Final – Laboratório de Desenvolvimento
Tecnológico em Virologia – IOC/FIOCRUZ / Bryam Amorim
Santana; orientador Simone Perecmanis. -- Brasília, 2018. 38 p.

Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) --
Universidade de Brasília, 2018.

1. Virologia. 2. Técnicas Moleculares . 3. PCR. 4. RT PCR. I.
Perecmanis, Simone, orient. II. Título.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Bryam Amorim Santana

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: RELATÓRIO DE ESTÁGIO –
LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO EM VIROLOGIA –
IOC/FIOCRUZ

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.



Bryam Amorim Santana

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: SANTANA, Bryam Amorim

Título: Relatório de Estágio – Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia – IOC/FIOCRUZ

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: 04 de dezembro de 2018

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Simone Perecmanis

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

Profa. Dra. Lígia Maria Cantarino da Costa

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: aprovado

Assinatura: 

Médica Veterinária Me. Paula Suzana Elisa Maciel Poll

Instituição: Médica Veterinária Autônoma

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

*É preciso não ter medo, é preciso ter a coragem de dizer.
Há os que têm vocação para escravo, mas há os escravos que se revoltam contra
a escravidão.*

*Não ficar de joelhos, que não é racional renunciar a ser livre.
Mesmo os escravos por vocação devem ser obrigados a ser livres quando as
algemas forem quebradas.*

*É preciso não ter medo, é preciso ter a coragem de dizer.
O homem deve ser livre...*

*O amor é que não se detém ante nenhum obstáculo, e pode mesmo existir
quando não se é livre.*

*E, no entanto, ele é em si mesmo a expressão mais elevada do que houver de
mais livre em todas as gamas do humano sentimento.*

É preciso não ter medo, é preciso ter a coragem de dizer.

*Rondó da Liberdade
Carlos Marighella, 1939.*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Maria do Socorro, a quem eu dedico esse trabalho. Mulher forte, que me proporcionou TODOS os meios para chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Brener e Amanda, pela parceria e companheirismo.

A minha orientadora e amiga, Simone, por todas as conversas, por todo o ensinamento e por ter aberto o seu laboratório e o seu coração para mim.

Aos amigos que fiz durante a graduação, Maria Claudia, Leticia e Patrícia pelas horas de conversa e conselhos durante os maravilhosos almoços. Aos PUGS que tem minha eterna gratidão pela amizade verdadeira.

A professora Carol Pombo, por ter sido minha primeira professora na graduação. Caso siga na área da docência, você foi uma das maiores influências.

A Professora Lígia, com sua maneira impecável de ser, por me fazer apaixonar pela saúde pública e tudo envolvido a ela. A professora Patrícia, por me escutar e aconselhar tantas vezes e sobre tantos assuntos.

Ao CAVET e os amigos que ele me trouxe, as melhores gestões sem dúvida. Foi esse ambiente e essas pessoas que me reestruturavam e me davam forças para seguir o dia.

A todos profissionais e funcionários do LADTV – IOC / Fiocruz, pela troca de conhecimentos, amizade e confiança. Em especial a Dra. Jaqueline, a quem eu tenho um enorme carinho por ter me recebido tão bem.

A todos os profissionais e funcionários do Laboratório de Microbiologia Medica Veterinária da FAV, minha primeira casa, pelo despertar da minha jornada.

À Universidade de Brasília e professores da FAV, a quem sou eternamente grato pelos ensinamentos e aprendizados durante a graduação.

Aos animais, que me deram um propósito a seguir que vai muito além deste curso.

Sumário

RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. Relatório de Estágio.....	2
2.1. Apresentação geral e estrutura do Laboratório	2
3. Biossegurança.....	5
4. Técnicas Moleculares	7
5. Vírus	8
5.1. Características gerais do vírus	9
5.2. Diagnostico Molecular de Vírus.....	9
5.3. Concentração	10
5.4. Extração.....	11
6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	13
6.1. Componentes da PCR	14
6.2. Tipos de reação de PCR realizados no LADTV	16
6.2.1. RT-PCR (<i>Reverse Transcriptase</i> PCR)	16
6.2.2. Nested PCR.....	17
6.2.3. Multiplex PCR.....	19
6.2.4. <i>Real Time</i> PCR.....	19
6.3. Visualização	21
7. Referências	22
8. Relato de caso	28
8.1. Resumo	28
8.2. Abstract.....	29
8.3. Introdução.....	30
8.4. Caso	31
8.5. Discussão	33
9. Referências	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema salas do LADTV destinadas a análises de amostras.	4
Figura 2 - Declaração QBA on-line.	7
Figura 3 - Fluxograma do Processamento de Amostras Ambientais pela técnica de PCR para diagnóstico viral.	10
Figura 4 - Equipamento de filtração/purificação de água (LADTV, 2018).....	11
Figura 5 – Kit <i>QIAamp Viral RNA Mini Kit</i>	11
Figura 6 – Imagem do artigo Desafios da extração do RNA do Vírus da Dengue - ligação e extração ao DNA: Métodos, Aplicações e Limitações....	12
Figura 7 – Robô <i>QIAcube</i> de extração e purificação de DNA/RNA viral.....	13
Figura 8 - Recuperação de produtos de PCR nos métodos Manual e Automatizado.....	13
Figura 9 - Componentes da PCR.....	16
Figura 10 - Cabine asséptica para PCR.....	16
Figura 11 - Termociclador <i>Mastercycler® pro</i> - Cycler, Eppendorf.	19
Figura 12 - PCR em tempo Real. Durante análise.....	20
Figura 13 - PCR em tempo Real	20
Figura 14 - Sala C 209 b, Sala para Eletroforese em Gel.....	21
Figura 15 - Sala C 209 d, sala de Fotodocumentação.	22
Figura 16 - Notícia vinculada em site	30
Figura 17 - Notícia vinculada na mídia	31
Figura 18 - Distribuição Semanal dos Casos de Hepatite A com a curva de tendência e a curva acumulada dos casos.....	32
Figura 19 - Distribuição espacial dos casos de hepatite A confirmados	32
Figura 20 - Análise filogenética: amostras clínicas e ambientais. Arvore filogenética construída com inferência Bayesiana	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AN – Ácidos Nucleicos

c-DNA – DNA Complementar

CEDAE – Companhia Estadual de Águas e Esgoto

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

EPI – Equipamento de Proteção Individual

HAV – Vírus da Hepatite A

HEV – Vírus da Hepatite E

HPP – Hélio e Peggy Pereira

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

LADTV – Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia

LAVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

ml – Mililitros

nPCR – Nested PCR

PCR – Reação da Cadeia da Polimerase

POP – Procedimento Operacional Padrão

QBA – Referente ao curso on-line sobre a Sensibilização em Gestão da Qualidade, Biossegurança e Ambiente laboratorial

qPCR – PCR em Tempo Real

RJ – Rio de Janeiro

RNA – Ácido Ribonucleico

SBPC / ML – Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial

SMS – Secretaria Municipal de Saúde.

RESUMO

O presente relatório refere-se as atividades desenvolvidas pelo autor durante a realização de estágio supervisionado do curso de graduação em Medicina Veterinária, realizado nas dependências do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) do Instituto Oswaldo Cruz – IOC Fiocruz, Rio de Janeiro. O LADTV destina-se ao desenvolvimento e aplicação de novas metodologias em diagnóstico, epidemiologia e patogênese das hepatites virais de transmissão entérica, com foco nos Vírus da Hepatite A (HAV) e Vírus da Hepatite E (HEV). Também desenvolve pesquisas relacionadas as áreas de desenvolvimento de metodologias para diagnóstico e vigilância epidemiológica das hepatites virais em geral, estudos imunológicos das hepatites fulminantes, estudos soropidemiológicos e de biologia molecular do HAV e HEV, além do desenvolvimento de modelos experimentais para estudo da patogênese das hepatites e de outras infecções virais relacionadas, testes pré-clínicos de vacinas e de drogas antivirais (PINTO e OLIVEIRA, 2018). O estágio teve a duração de três meses e visava contribuir para uma experiência complementar ao agente, proporcionando contato direto com a realidade de um laboratório de referência nacional, suas tecnologias e ambiente profissional de trabalho. As principais técnicas de PCR serão abordadas, evidenciando sua aplicabilidade durante a rotina do LADTV.

Palavras-chave: Virologia; Técnicas Moleculares; PCR; RT-PCR.

ABSTRACT

This report refers to the activities developed by the author during the supervised internship of the undergraduate course in Veterinary Medicine, held at the Laboratory of Technological Development (LADTV) of the Oswaldo Cruz Institute - IOC Fiocruz, Rio de Janeiro. LADTV is intended for the development and application of new methodologies in the diagnosis, epidemiology and pathogenesis of enteric viral hepatitis, focusing on Hepatitis A Virus (HAV) and Hepatitis E Virus (HEV). He also develops research related to the development of methodologies for diagnosis and epidemiological surveillance of viral hepatitis in general, immunological studies of fulminant hepatitis, seroepidemiological and molecular biology studies of HAV and HEV, as well as the development of experimental models for the study of the pathogenesis of hepatitis and other related viral infections, pre-clinical tests of vaccines and antiviral drugs (PINTO e OLIVEIRA, 2018). The internship lasted three months and aimed to contribute to a complementary experience to the agent, providing direct contact with the reality of a national reference laboratory, its technologies and professional work environment. The main PCR techniques will be addressed, evidencing their applicability during the LADTV routine.

Keywords: Virologia; Técnicas Moleculares; PCR; RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho é parte da avaliação da disciplina Estágio Supervisionado do curso de Medicina Veterinária e requisito para a obtenção do grau de Médico Veterinário. Tal disciplina constitui-se em um estágio de 480 horas, que deve ser realizado em local previamente acordado com o orientador. O estágio foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV), vinculado ao Instituto Oswaldo Cruz – IOC, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, localizado no campus de Manguinhos na cidade do Rio de Janeiro.

O LADTV destina-se a pesquisa e diagnóstico das Hepatites Virais A (HAV) e E (HEV), provenientes principalmente de amostras ambientais, além do desenvolvimento de novas tecnologias de análise e vigilância ambiental.

O HAV é de ocorrência mundial e a causa mais comum quando se trata de hepatites virais agudas na grande maioria dos países. Mesmo com a alta taxa de subnotificação, é comunicado cerca de 1,5 milhão de casos clínicos / ano. Seu genoma é constituído por RNA positivo, e sua transmissão se dá principalmente pela via fecal-oral, consumo de água e alimentos contaminados (OLIVEIRA, 2013; KRONEMAN, SOUSA, *et al.*, 2018; ROBERTSON, JANSEN, *et al.*, 1992; COSTA, CRISTINA, *et al.*, 2002; QUEIRÓZ, CARDOSO, *et al.*, 1995; LEMON, JANSEN e BROWN, 1992; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - HEPATITES VIRAIS, 2018). A maioria das amostras recebidas no LADTV são provenientes de suspeitas de surto pelo HAV, maiormente água possivelmente contaminada.

O Vírus da Hepatite E (HEV) apresenta-se também como causa comum de hepatite aguda, sendo o segundo vírus de transmissão fecal-oral após o HAV. Existem estudos epidemiológicos demonstrando que ele está circulante a pelo menos 2 séculos. Composto por RNA, possui hepatropismo confirmado, e em se tratando de meios de contaminação, destaca-se a propagação através de água contaminada (OLIVEIRA, 2013; FERREIRA, 2016; FERRARI, SAVAZZI, *et al.*, 2012; SAÚDE, 2002; FERREIRA e SILVEIRA, 2004; PARANÁ e SCHINONI, 2002; SRIDHAR, TENG, *et al.*, 2017; HOFMEISTER, FOSTER e TESHLE, 2018). O primeiro caso no Brasil foi relatado no artigo First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection (SANTOS, LEWIS XIMENEZ, *et al.*, 2010), detectado pelo

LADTV em 2010.

Para a detecção de ambos os vírus, o LADTV utiliza técnicas moleculares, em especial as diferentes técnicas de Reação em cadeia da Polimerase (PCR), a saber: PCR convencional, Nested PCR (nPCR) e PCR em Tempo Real (qPCR). A apresentação de tais técnicas é o principal objetivo deste relatório, além de exemplificação prática através de um relato de caso de surto por Hepatite A, na comunidade do Vidigal, bairro da zona sul da cidade do Rio de Janeiro, onde o HAV foi detectado no LADTV em 2017.

2. Relatório de Estágio

2.1. Apresentação geral e estrutura do Laboratório

O estágio referente a esse trabalho foi realizado no LADTV, entre agosto e outubro de 2018, totalizando 30 horas semanais, conforme Lei Federal nº 11788 de 2008. As atividades desenvolvidas correspondem a principal linha de pesquisa do LADTV, o desenvolvimento e a aplicação de novas metodologias para o diagnóstico das hepatites virais de transmissão entérica, consistindo basicamente no recebimento, acompanhamento e diagnóstico de amostras ambientais com suspeita de contaminação por HAV, provenientes de diversas partes do Brasil. Foram atividades realizadas: receber e concentrar a amostra, analisar por meio de técnicas moleculares e elaborar um laudo. O estágio foi supervisionado pelo Dr. Marcelo Alves Pinto, Médico Veterinário e Diretor de Ensino do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e pela Dra. Jaqueline Mendes, chefe do LADTV, ambos Pesquisadores Titulares em Saúde Pública.

Além do acompanhamento da rotina, também foi permitida ciência das linhas de pesquisa com maior importância e relevância desenvolvidas no laboratório. Detecção e o estudo do hepacivírus equino (linha de pesquisa desenvolvida pela Dra. Andreza Soriano e auxiliares) e o Projeto zika, no qual o vírus da zika é inoculado em fêmeas de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) prenhas

analisando a ação do antiviral sofosbuvir na infecção pelo vírus zika em um modelo experimental objetivando um tratamento contra zika, desenvolvido pela Dra. Noemi Rovaris, trabalho premiado com a honraria máxima, o prêmio Oswaldo Cruz em 2018.

O laboratório conta com 7 funcionários pesquisadores, 3 alunos de pós-doutorado, 2 alunos de doutorado, 2 alunos de mestrado, 8 alunos de iniciação científica e 4 estagiários.

O LADTV está localizado no segundo andar do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira – HPP, na unidade principal da Fiocruz, em Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. É organizado de maneira que as salas administrativas, salas de pesquisadores e salas destinadas ao trabalho burocrático (determinadas pelo prefixo “B” antes do número das salas) não tenham nenhum contato com as salas destinadas a análises (determinadas pelo prefixo “C”). O esquema do laboratório pode ser conferida na Figura 1 - Esquema salas do LADTV destinadas a análises de amostras.

As salas “C” correspondem ao laboratório propriamente dito, o acesso a essa área só é permitido a funcionários, pesquisadores e estagiários da instituição que devem estar, obrigatoriamente, paramentados com EPIs. Nenhuma amostra, meio ou reagente sai desse ambiente sem estar devidamente armazenada em caixa de transporte identificada e lacrada, obedecendo regulamento de biossegurança próprio da Fiocruz.

A principal aplicabilidade de métodos moleculares utilizados no LADTV está relacionada ao diagnóstico de hepatites virais, principalmente referentes ao HAV. No decorrer do estágio, técnicas de rotina do referido laboratório foram realizadas, a saber: concentração de água por meio de POP adaptado do próprio laboratório, extração de genoma viral através de kit de extração de RNA (Quiagen®), reação de transcriptase reversa através da transcriptase reversa para preparo de c-DNA, PCR convencional, Nested PCR e PCR em tempo real, preparo e aplicação de produtos de PCR em gel de agarose, interpretação e leitura dos resultados obtidos por meio da visualização do gel ou das curvas de quantificação no caso da PCR em tempo real. Tais atividades permitiram um maior aprofundamento de técnicas já conhecidas na graduação e um incremento de diferentes protocolos que permitiram expandir o domínio nessas metodologias biomoleculares.

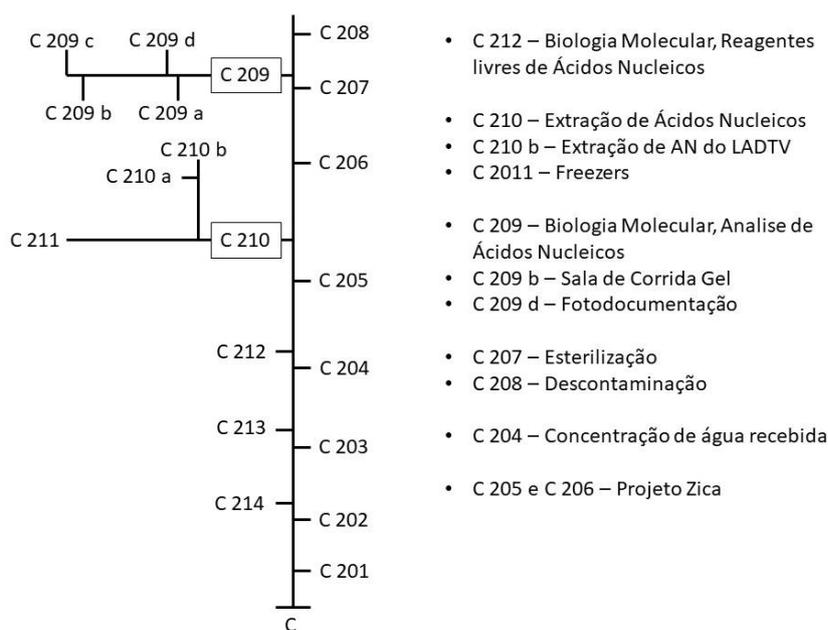


Figura 1 - Esquema salas do LADTV destinadas a análises de amostras.

As salas C 205, C 206, C 209 b, C 210 b, e C 212 pertencem exclusivamente ao LADTV. Já as salas C 204, C 207, C 208, C 209 d e C 211 são salas compartilhadas com o Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental – LAVCA / IOC Fiocruz, localizado no mesmo andar. As demais salas pertencem ao LVCA.

Encontra-se estabelecida uma rotina de verificação, onde todas as salas são aferidas 1 vez ao dia, confirmando-se a presença de ponteiras, pipetas, reagentes, materiais de proteção individual – EPIs para reposição, além de apurar a temperatura de todas as geladeiras, havendo registro das informações para caso necessite uma posterior conferência.

Dispõe de rigorosa classificação de salas contaminadas e salas limpas, atendendo a determinação da Fiocruz para um laboratório com Nível de Biossegurança 2, adequado ao LADTV. A sala C 212 é considerada a mais limpa, onde somente é preparado o mix da reação em cabine asséptica (Figura 10), sem a adição de amostras. Nada que saia dessa sala pode voltar a ela, inclusive pesquisadores que já tenham estado em salas contaminadas como a C 209 ou C 210 não poderão entrar na C 212 no mesmo dia.

A estrutura do laboratório é tida como uma das mais modernas do país. Simples e eficaz para o trabalho desenvolvido, contando com aparelhos e

profissionais de ponta, aptos a realizarem encargos em um laboratório de referência nacional.

3. Biossegurança¹

O Instituto Oswaldo Cruz, juntamente com a Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – ENSP, oferece um curso on-line sobre a Sensibilização em Gestão da Qualidade, Biossegurança e Ambiente laboratorial – QBA. No Quadro 1 confere-se exemplos de agentes de risco em ambientes de trabalho, expostos na aula número II do QBA.

O autor realizou referido curso, sem o qual não poderia desempenhar as atividades laboratoriais, com aproveitamento superior a 70%, conforme Figura 2.

Físicos	Químicos	Biológicos	Ergonômicos	Gerador de Acidentes
Ruídos	Nevoas	Vírus	Esforço Físico intenso	Arranjo Físico Inadequado
Vibrações	Fumos	Bactérias	Levantamento e transporte manual de peso excessivo	Máquinas e equipamentos sem proteção
Radiações ionizantes	Poeiras	Protozoários	Monotonia e ações repetitivas	Ferramentas inadequadas ou defeituosas
Radiação	Neblinas	Fungos	Jornada de	Iluminação

¹ “Entende-se por Biossegurança o conjunto de medidas voltadas para a prevenção, a minimização ou a eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos”. (Comissão de Biossegurança da Fundação Oswaldo Cruz, 1998)

ionizantes			trabalho prolongadas	inadequada
Frio	Gases	Parasitas	Dupla jornada de trabalho (diurno e noturno)	Eletricidade
Calor	Vapores	Bacilos	Imposição de ritmos excessivos	Probabilidade de incêndio ou explosão
Pressões anormais e umidade	Substancias compostos ou produtos químicos em geral	Príons	Exigência de postura inadequada e controle rígido de produtividade	Armazenamento inadequado e animais peçonhentos

Quadro 1 - Exemplo de agentes de risco em ambientes de trabalho capazes de causar danos à saúde do trabalhador (Fiocruz, 2018) com adaptações.

De acordo com o próprio site do QBA on-line, consultado em outubro de 2018, o curso visa oferecer as recomendações mínimas necessárias para o seu ingresso nos laboratórios de pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, dentro das normas de gestão da biossegurança, qualidade e de proteção ambiental, para que o estagiário possa desenvolver um trabalho com segurança e confiabilidade nos resultados.

Os temas abordados pelo QBA são:

- I. Condutas Laboratoriais;
- II. Agentes de Riscos;
- III. Desinfecção e Esterilização em Ambientes Laboratoriais;
- IV. Contenção em Biossegurança: Barreiras Primárias e Secundárias;
- V. Gestão de Biossegurança;
- VI. Transporte de Material Biológico;
- VII. Bioética e Biossegurança;

- VIII. Atendimento, Notificação e Investigação de Acidentes na Fiocruz;
- IX. Gestão da Qualidade em Serviços de Saúde;
- X. Gestão de Resíduos, Gerenciamento em Laboratórios e Serviços de Saúde;
- XI. Agenda Ambiental na Administração Pública (A3P).

Cada aula é composta por textos teóricos, elaborados por profissionais com conhecida expertise na área, e posterior prova, contendo 30 questões de múltipla escolha, que deve ser respondida no tempo máximo de 60 minutos e o interessado deve obter aproveitamento igual ou superior a 70% sob o risco de não ser autorizado a entrar nos laboratórios.

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Comissão Interna de Biossegurança

QBA

DECLARAÇÃO

Declaro que BRYAM AMORIM SANTANA concluiu, em 04 de setembro de 2018, o "QBA/On-line - Sensibilização em Gestão da Qualidade, Biossegurança e Ambiente", que contém instruções técnicas e operacionais básicas visando ao ingresso e desenvolvimento de atividades laboratoriais na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), dentro das diretrizes da Gestão da qualidade, biossegurança e proteção ambiental. Informo ainda que estou ciente que o QBA/On-line NÃO SUBSTITUI os cursos presenciais relacionados a estas temáticas, e que estes serão fortemente recomendados.

Jacqueline M. de Oliveira
Tecnóloga Sênior - Chefe
LACTV/OC/FIOCRUZ
SAPE 111893

Chefe do Laboratório/Serviço (assinatura e carimbo)

Rio de Janeiro, 11, 09, 18
(Local e Data)

Declaro que realizei o QBA/On-line e que estou ciente do conteúdo e das diretrizes de segurança para realização das minhas atividades e da importância de participação em cursos presenciais para complementar a minha formação.

BRYAM AMORIM SANTANA
(Nome em letras de forma)

Rio de Janeiro, 11/09/2018
(Local e Data)

Bryam Amorim Santana
(Assinatura do Participante)

Figura 2 - Declaração QBA on-line. Somente fornecida para resultados iguais ou superiores a 70% de aproveitamento.

4. Técnicas Moleculares

O DNA foi descoberto em 1944 pelo clássico trabalho de Oswald Theodore Avery (1877-1955) e colaboradores, comprovadas por Hershey em 1953. No mesmo ano, Watson e Crick propuseram a existência da estrutura em dupla-

hélice, sugerindo também as bases de como essa molécula poderia ser duplicada (ZAHA e FERREIRA, 2014; BATISTETI, ARAÚJO e CALUZI, 2008);

A biologia molecular é um campo de estudo amplo, que promoveu o desenvolvimento de projetos genomas e que deriva e depende de outras áreas de conhecimento como a Microbiologia, a Imunologia, a Genética, Biologia e Químicas gerais (VERZOLA, 2017; ZAHA e FERREIRA, 2014; OSADA e COSTA, 2006). De acordo com MICHAELIS (2018), o estudo do desenvolvimento dos seres vivos a nível molecular, com foco no estudo da composição, função e estrutura do material genético deve ser definida como biologia molecular, isso quer dizer, o estudo das proteínas. Um dos passos mais importantes da biologia foi a descoberta da função dos Ácidos Nucleicos (AN) como substâncias controladoras da atividade celular. A partir da década de 70, diversos pesquisadores dedicaram-se a desenvolver e aperfeiçoar técnicas de detecção e diferenciação de Ácidos Nucléicos, que consistem basicamente na variação de temperatura e pH do meio, e isso está relacionado a capacidade do DNA em fazer, desfazer e refazer pontes de H⁺, considerando que essa é a base fundamental, e muito simplista, da maioria das técnicas moleculares, como a PCR (VERZOLA, 2017; BARTLET e STIRLING, 2003; BOTTINO, 2015; FERREIRA e SILVEIRA, 2004).

Detectar o agente etiológico de forma rápida e eficaz é o que faz do diagnóstico molecular uma ferramenta importante (YANG e ROTHMAN, 2004; BOLLELA, SATO e FONSECA, 1997; SILVA, CASTRO, *et al.*, 2017). Os testes moleculares não são absolutos ou não passíveis de falhas, e como qualquer outro teste laboratorial, está sujeito a erros, principalmente no período pré-analítico. A quantidade e qualidade dos AN extraídos estão intimamente ligados a forma de coleta da amostra, seu manuseio e transporte para o laboratório, assim como o método de extração determinado (SBPC/ML, 2014).

5. Vírus

O LADTV trata-se de um laboratório de referência em diagnósticos de hepatites virais de transmissão entérica, especificamente o HAV e HEV, e pela incidência maior do vírus da hepatite A, foram facultados trabalhos de maior frequência com o HAV, sobre os quais se dissertará adiante.

5.1. Características gerais do vírus

O HAV é um vírus da família *Picornaviridae*, gênero *Hepatovirus*, não envelopado que possui capsídeo icosaédrico envolvendo o RNA fita simples positiva (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2018; PEREIRA e GONÇALVES, 2003).

A infecção pelo HAV é adquirida principalmente pela via fecal-oral, apesar de estudos demonstrarem que água e alimentos contaminados são fontes frequentes de disseminação (OLIVEIRA, 2013; SILVA, VITRA, *et al.*, 2007; FERREIRA e SILVEIRA, 2004; BRASIL, 2018).

O Brasil é o maior país da América do sul, com um território de 85.142.153 km², e com uma população estimada de 208.494.900 pessoas, apresentando grande concentração de indivíduos em área urbana (IBGE, 2018). O país apresenta um quadro grave de problemas de saneamento em grande parte do seu território, cenário que propicia a alta prevalência de doenças associadas a falta de saneamento veiculadas pela água contaminada, como a Hepatite A, cujo agente está presente tanto em cidades grandes ou pequenas e na área rural do Brasil (OLIVEIRA, 2013; RAZZOLINI e GÜNTHER, 2007; MENDONÇA e MOTTA, 2005; NERI, MELO, *et al.*, 2009; BRASIL, 2018)

Tais situações indicam a importância do trabalho de vigilância ambiental e detecção do HAV principalmente na investigação de surtos associados a águas contaminadas.

5.2. Diagnóstico Molecular de Vírus

As técnicas moleculares são empregadas no diagnóstico viral do HAV, a partir de amostras de água (ambientais). Como se pode aferir na Figura 3, as amostras são encaminhadas ao LADTV, oriundas de coletas realizadas pela Vigilância Sanitária do Município do Rio de Janeiro, vinculada à Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (SMS), são testadas pelo método da PCR convencional para detecção de HAV e fazem parte da rotina do laboratório.

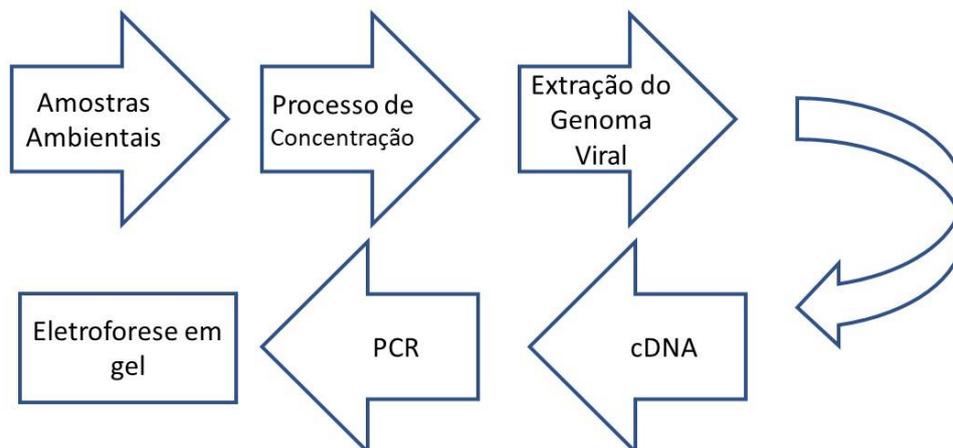


Figura 3 - Fluxograma do Processamento de Amostras Ambientais pela técnica de PCR para diagnóstico viral.

As amostras são coletadas conforme orientações do LADTV, em frascos âmbar e refrigeradas a 4°C até que seja realizado o processo de concentração.

5.3. Concentração

O processo de concentração de amostras ambientais / água é feito através do protocolo ISO-15216-1², com adaptações do LADTV.

Utiliza-se uma membrana em éster de celulose, com 0,45 UM de poro, 142 MM de diâmetro da marca Millipore. Tal membrana captura as impurezas presentes na água, inclusive o HAV caso esteja presente. O volume total das amostras encaminhadas ao LADTV é de 2 litros, em frasco âmbar, que após a purificação é reduzida a 2 ml.

² ISO-15216-1. Microbiology of the food chain horizontal method for determination of hepatitis A vírus and norovirus using real time PCR – Part 1: method for quantification.



Figura 4 - Equipamento de filtração/purificação de água (LADTV, 2018) – Arquivo pessoal.

5.4. Extração

A extração do genoma do HAV a partir de amostras ambientais no LADTV é feita através de kits comerciais (Figura 5) seguindo as recomendações do fabricante (Figura 6). No caso das amostras ambientais de água, foi utilizado o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit*, da marca Quiagen® (Figura 5).



Figura 5 – Kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit*, da marca Quiagen® (Gentech Bio, 2018).

O processo é feito com utilização de mini colunas, que são centrifugadas diversas vezes após a adição de cada tampão. O RNA é eluído, proporcionando

um volume final de 60µl, que são então divididos em 2 eppendorfs, cada um com 30µl, um para análise e outro que deve ser guardado como amostra de segurança, ambos estocados a -70°C.



Figura 6 – Imagem³ do artigo Desafios da extração do RNA do Vírus da Dengue - ligação e extração ao DNA: Métodos, Aplicações e Limitações (DETTOGNI e LOURO, 2017).

A extração também pode ser feita através de robô de extração - Figura 7, onde o processo de extração é totalmente automatizado. A máquina do LADTV é a *QIAcube*, da Quiagen®, e possui capacidade de até 12 amostras por processo, cada processo leva o tempo total de 1 hora e 20 minutos. O uso de tais máquinas é benéfico pois além de otimizar o tempo do pesquisador, reduz o risco de contaminação durante o processo de extração. O comparativo entre as técnicas manual e automatizadas consta na Figura 8.

³ Principais etapas da extração de RNA com uso de colunas. 1 - Uma pequena quantidade da amostra é adicionada a um microtubo. 2 - A amostra é incubada com uma solução de lise para que ocorra a lise das membranas celulares e digestão proteica. 3 - A solução resultante é adicionada à coluna e esta é centrifugada. O RNA permanecerá ligado à coluna. 4 - Um tampão de lavagem é adicionado à coluna e que é centrifugada. O processo é repetido e, assim, a coluna é lavada duas vezes para retirada de moléculas, diferentes do RNA, que possam a ela estar aderidas. A lavagem dupla permite que apenas o RNA permaneça ligado à coluna. 5 - Um tampão de eluição (ou água livre de RNAses) é adicionado à coluna que é centrifugada. Ao final do processo, o RNA é eluído da coluna e encontra-se dissolvido no tampão (DETTOGNI e LOURO, 2017).

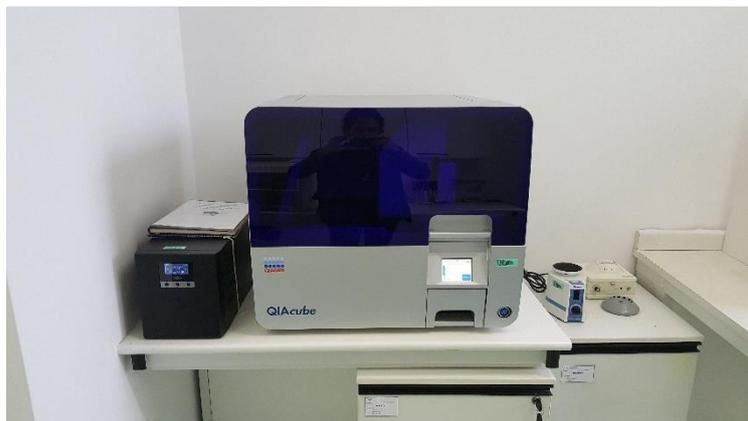


Figura 7 – Robô *QIAcube* de extração e purificação de DNA/RNA viral em funcionamento usando o Mini Kit de RNA viral *QIAamp*. (LADTV, 2018) – Arquivo pessoal.

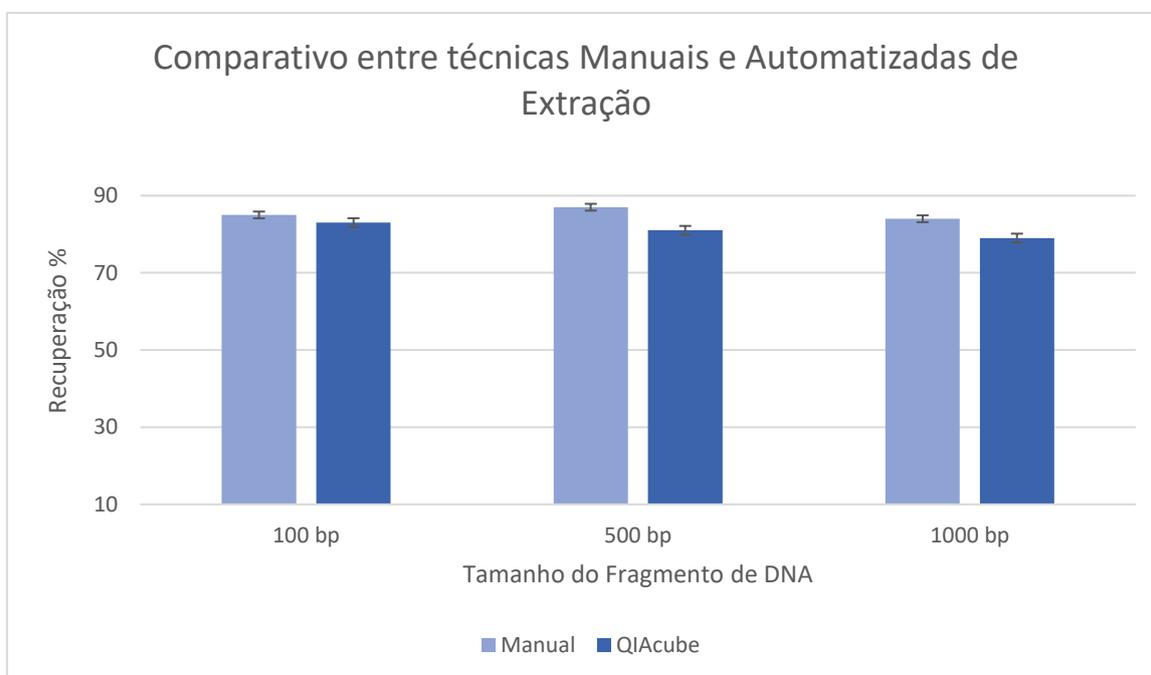


Figura 8 – Gráfico de recuperação de produtos de PCR pelos métodos Manual e Automatizado⁴ QIAgen® com modificações (QIAGEN, 2018)

6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A *polymerase chain reaction (PCR)*, ou reação em cadeia da polimerase, no português, foi desenvolvida por Kary B. Mullis em 1985, sendo uma técnica

⁴ “Os produtos de PCR (2 µg num volume de 100 µl) foram purificados utilizando o kit de purificação de PCR QIAquick com o procedimento manual ou automatizado no QIAcube. A recuperação percentual foi determinada espectrofotometricamente. A recuperação de produtos de PCR usando o QIAcube foi comparável ao procedimento manual” (QIAGEN, 2018).

altamente sensível, onde, através de uma reação enzimática, são obtidas milhões de cópias de sequências de AN, a partir de sequências significativamente pequenas de DNA ou RNA específicas (GANDRA, GANDRA, *et al.*, 2008; BOTTINO, 2015; VIEIRA, 2018; ZAHA e FERREIRA, 2014). A amplificação de um determinado segmento de DNA, através da extensão de oligonucleotídeos (os chamados *primers*) que se ligam com as fitas complementares de uma sequência alvo, é feito por meio de um termociclador (Figura 11), que, através de repetidos ciclos com sucessivas variações de temperatura, permite a desnaturação, hibridização e extensão pela ação da DNA polimerase (VERZOLA, 2017; BOLLELA, SATO e FONSECA, 1997; GANDRA, GANDRA, *et al.*, 2008; JOTHIKUMAR, CROMEANS, *et al.*, 2006).

Durante os primeiros experimentos de PCR, a cada passo de desnaturação a enzima era desativada pela temperatura, e mais enzima deveria ser incorporada. Posteriormente, a polimerase de *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polimerase) foi descoberta e passou a ser utilizada por possuir uma característica termoestável, suprimindo a necessidade de adição de mais enzima após cada ciclo de desnaturação não fosse mais necessária (PASSAGLIA e ZAHA, 2001).

Partindo de uma única molécula de DNA molde, proporcionando condições ideais, depois de uma média de 30 ciclos no termociclador que proporciona a desnaturação, hibridização e extensão, obtemos cerca de 1.400.000.000 de cópias da região limitada pelos oligonucleotídeos (TANG e PERSING, 1999; VIEIRA, 2018; VERZOLA, 2017; BOTTINO, 2015; FRITSCH e MANIATIS, 1989).

6.1. Componentes da PCR

De acordo com o clássico trabalho de Oswald Theodore Avery (1877-1955) e colaboradores, compreendido por MONTIJO, 2018; VIEIRA, 2018; BOTTINO, 2015, são apresentados os componentes essenciais para que ocorra a PCR (Figura 9):

- I. DNA polimerase, que deve ser termoestável, conhecida como *Taq* polimerase isolada do eubacterium termofílico *Thermus aquaticus*. Atua como catalizadora da extensão dos *primers*;
- II. DNA molde, podendo ser fita simples ou fita dupla;
- III. Oligonucleotídeos, um par de primers que funcionam como ponto de partida para a polimerização. São a chave para uma boa reação e são desenhados para serem complementares a sequência alvo, podem ser utilizadas sequências já disponíveis na literatura ou desenhados pelo próprio pesquisador através de programas específicos para isso;
- IV. Deoxinucleotídeos, dNTPs, são os “tijolos” da reação, devem possuir quantidades iguais de dATP, dCTP, dTTP e dGTP. Estão disponíveis no mercado com marcadores não-radioativos ou radioativos, facilitando um posterior sequenciamento caso seja de interesse. O dNTP reduz o Mg^{2+} livre, o que proporciona uma interferência na atividade da enzima polimerase, causando uma diminuição de anelamento do primer;
- V. $MgCl_2$, cátions divalentes que atua como doador muito estável de Mg^{2+} , cofatores indispensáveis para a atividade enzimática.
- VI. Tampão, atuando na manutenção do pH, geralmente entre 8,3 e 9 à temperatura ambiente que com o aumento da temperatura no termociclador o pH diminui para 7,4, que é considerado um valor ótimo para a atividade da *Taq* polimerase na temperatura de 72°C. o tampão mais utilizado em técnicas de PCR é o Tris 10mM;
- VII. Água.

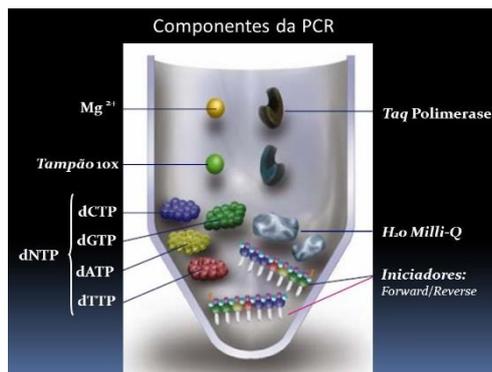


Figura 9 - Componentes da PCR (Montijo, 2018).

6.2. Tipos de reação de PCR

6.2.1. RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*)

O HAV é um vírus de genoma RNA. A síntese do DNA complementar – cDNA, consiste na composição de uma molécula de fita simples, complementar ao RNA do vírus que é produzida a partir da enzima Transcriptase Reversa (RT). Esse cDNA é o que será utilizado como molde na PCR, onde será amplificado (BOTTINO, 2015).



Figura 10 - Cabine asséptica para PCR – DNA Workstation, LOCCUS® (LADTV, 2018) – Arquivo pessoal.

Tal reação é composta de 2 etapas, a transcrição reversa, que consiste na biossíntese de uma fita simples de DNA utilizando como *template* uma fita de

RNA, onde a transcriptase reversa atua como catalizadora da reação (VIEIRA, 2018; JOTHIKUMAR, CROMEANS, *et al.*, 2006).

Nessa etapa, os primers utilizados costumam possuir menor especificidade, e possuem sequências longas de timinas (6 a 35), que se anelam a regiões Poly-a do RNA, região onde se encontram muitas adeninas, proporcionando como resultado de tal reação o cDNA que será amplificado na PCR (ZAHA e FERREIRA, 2014; BOTTINO, 2015).

A técnica do RT-PCR possui uma importante aplicação para o estudo de RNAs virais, como o caso do HAV. Também pode ser utilizada na análise de expressão gênicas, de virulência ou de produção de toxinas em alimentos (TANG e PERSING, 1999; VIEIRA, 2018; BARTLET e STIRLING, 2003; DETTOGNI e LOURO, 2017; GANDRA, GANDRA, *et al.*, 2008).

Para obtenção do cDNA adicionou-se 25µL do ssRNA a 25µL da mistura de reação 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), totalizando um volume final de 50µL. A mistura foi disposta em termociclador, acatando protocolo descrito na literatura, conforme é utilizado na rotina do LADTV. O cDNA obtido é estocado a -20°C.

Os Oligonucleotídeos (primers) utilizados no LADTV (Quadro 2) na RT-PCR para detecção do genoma do HAV já são descritos na literatura, e amplificam o segmento que codifica a proteína estrutural VP1 (SILVA, 2010).

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Pb
HAVF6 (2897)	CTA TTG AGA TTG CAA ATT AYA AT	391
HAVF7 (3288)	AA Y TTC ATY ATT TCA TGC TCC T	391

Quadro 2 – Sequência de *primers* utilizados na RT-PCR para detecção do genoma HAV e tamanho de pares de base (pb). Y= C ou T.

6.2.2. Nested PCR

A técnica de Nested é uma PCR convencional modificada. Os Primers utilizados nessa etapa são evidenciados no Quadro 3. A técnica é utilizada em todos os diagnósticos de amostras ambientais encaminhadas ao LADTV. Consiste

em utilizar o amplicon resultado da PCR convencional como amostra no novo mix para uma segunda PCR, o que caracteriza Nested. De acordo com Bartlet e Stirling (2003), esse método promove uma melhoria da especificidade e sensibilidade.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Pb
HAVF8 (2949)	TAT TTG TCT GTY ACA GAA CAA TCA G	243
H AVF9 (3192)	AGG RGG TGG AAG YAC TTC ATT TGA	243

Quadro 3 – Sequência de *primers* utilizados na Nested-PCR para detecção do genoma HAV e tamanho de pares de base (pb). Y= C ou T / R = A ou G.

No LADTV, para o preparo do Mix utilizado para o Nested-PCR, são empregados os seguintes reagentes: 1,04x PCR Buffer; 3,125 μ M de MgCl₂; 0,208 μ M de dNTP; 0,5pM de cada um dos iniciadores HAVF6/HAVF7 (Quadro 2); 0,104 U/ μ L de Platinum Taq DNA Pol 22 (Invitrogen®) e água DNase/RNase free. Após a adição de 5 μ L do cDNA em 20 μ L da mistura da reação, a PCR é realizada em termociclador automático (Figura 11) com o protocolo de desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C/1 minuto, 55°C/1 minuto e 72°C/3minutos, conforme pragmática estabelecida no laboratório. Uma alíquota de água destilada UltraPure™ DNase/RNase free (Gibco®) é usada como controle negativo e a diluição 1:1000 do HAV isolado de cultura de células do próprio LADTV é aplicado como controle positivo. Utiliza-se 2 μ L do produto da primeira reação incorporado a 23 μ L da mistura de PCR com os iniciadores HAVF8/HAVF9 (Quadro 3) procedendo a amplificação com as mesmas condições utilizadas na primeira PCR.



Figura 11 - Termociclador Mastercycler® pro - Cyclers, Eppendorf em funcionamento. Capacidade para placas PCR, tubos PCR 0,2 ml, tubos PCR 0,5 ml e tubos PCR 1,5 ml. (LADTV, 2018) – Arquivo pessoal.

6.2.3. Multiplex PCR

A técnica do multiplex PCR utiliza mais de um par de *primers* na mesma reação, o que possibilita a amplificação concomitante de mais de uma sequência de DNA. Tal técnica, por facultar a amplificação simultânea de patógenos diferentes na mesma reação economiza tempo e custos além de possuir um crescente potencial para ser utilizada na rotina clínica (TANG e PERSING, 1999; RAMOS, 2012; PASSAGLIA e ZAHA, 2001).

6.2.4. Real Time PCR

A PCR em tempo real (Figura 12 e Figura 13) é uma técnica quantitativa, que no LADTV está sendo utilizada, durante o período do estágio supervisionado, para a detecção do genoma do HEV. Portanto tal técnica pôde ser acompanhada durante a realização de protocolos de alguns pesquisadores que a utilizavam.

A metodologia empregada consistiu na realização da PCR quantitativa precedida pela transcrição reversa (q-RT-PCR) *one step*, cujos reagentes da

mistura da reação são utilizados diretamente na amplificação do RNA presente nas amostras. Desta forma o Mix da reação contém água RNase free; 2x RT PCR Buffer; 25x RT-PCR enzyme mix (enzima transcriptase reversa (M-MLV RT®) + enzima DNA polimerase (Taq polimerase®) e os iniciadores JHEVF/ JHEVR (0,25 μ M) e JHEVP (0,25 μ M). Tais primers foram descritos em literatura e amplificam um fragmento de 69 pb (JOTHIKUMAR, CROMEANS, ROBERTSON, MENG, & HILL, 2006).



Figura 12 - PCR em tempo Real. Durante análise (LADTV, 2018) – Arquivo pessoal.

Quanto a interpretação dos resultados, no LADTV, os desfechos são esclarecidos através do padrão linear. Juntamente com os efeitos, analisa-se também, a curva padrão, cujo principal objetivo é determinar a concentração inicial de uma amostra (cópias de DNA ou de RNA) de concentração desconhecida a partir de uma curva padrão de concentração conhecida.



Figura 13 - PCR em tempo Real (LADTV, 2018) – Arquivo pessoal.

6.3. Visualização

A eletroforese em gel⁵ de agarose a 1,5% é o método utilizado para visualização dos *amplicons*, que são os produtos da PCR e Nested-PCR . Tal procedimento ocorre nas dependências da sala C 209 (Figura 14).



Figura 14 - Sala C 209 b, Sala para Eletroforese em Gel (LADTV, 2018) – Arquivo pessoal.

As amostras são aplicadas individualmente nos poços presentes no gel de agarose submerso em um tampão TAE 1%. Sob influência de uma corrente elétrica de 70 a 100V. Os fragmentos de DNA, que são carregados negativamente, migram em direção ao polo positivo da eletroforese. No LADTV adiciona-se brometo de etídio no gel de agarose a 0,25 μ l a cada 50 ml de gel para a visualização de bandas formadas pelos fragmentos de DNA quando submetidos a luz ultravioleta no transiluminador (Figura 15). Em todos os géis também é aplicado um marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen®), que possui vários fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, que permite inferir o tamanho dos fragmentos presentes na amostra.

⁵ “O processo de eletroforese consiste na separação de fragmentos de DNA por enzimas de restrição” (FRITSCH e MANIATIS, 1989).



Figura 15 - Sala C 209 d, sala de Fotodocumentação (LADTV, 2018) – Arquivo pessoal.

7. Referências

BARTLET, J. M. S.; STIRLING, D. PCR Protocols. [S.I.]: Totowa Humana Press, 2003.

BATISTETI, C. B.; ARAÚJO, E. S. N. D.; CALUZI, J. J. The interpretations of MacCarty, MacLoed and Avery's studies on the chemical nature of the "transforming factor" in bacteria. *Filosofia e História da Biologia*, p. 71-94, 2008.

BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP. Salvador, BA. 1997. (Apresentado nos Anais do VIII Congresso Panamericano e X Congresso Brasileiro de Infectologia).**

BOTTINO, F. D. O. Relatório de estágio supervisionado. **Universidade Federal Fluminense. Niterói, p. 43. 2015.**

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde -Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais. **Brasília. 2018.**

CLEMENS, S. A. C. et al. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* , p. 1-10, 2000.

COSTA, M. M. et al. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *PubMed*, p. 9516-9525, 2002.

DETTOGNI, R. S.; LOURO, I. D. Desafios da Extração do RNA do Vírus da Dengue (ligação e extração ao DNA: Métodos Aplicações e Limitações). In: **REZENDE, R. R.** Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. [S.I.]: Blucher, 2017. p. 937-966.

FERRARI, C. K. B. et al. Conhecimentos sobre hepatites virais numa amostra de estudantes brasileiros do Vale do Araguaia, Amazônia Legal. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, p. 120-126, 2012.

FERREIRA, A. C. Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo Vírus da Hepatite E (HEV) em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). **São Paulo. 2016.**

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. D. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia* , 2004.

FIOCRUZ. Agentes de Risco Relacionados às Atividades Desenvolvidas no. QBA - Online Fiocruz, Rio de Janeiro, 11 Setembro 2018. Disponível em: <<http://moodle.ead.fiocruz.br/course/view.php?id=147>>. Acesso em: 11 setembro 2018.

FRITSCH, F. E.; MANIATIS, T. Molecular cloning - a laboratory manual. U.S.A.: green and sambrook, 1989.

GANDRA, E. Á. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. Red de Revistas Científicas de America Latina y el Caribe, España y Portugal, p. 109-118, 2008.

GENTECH Bio. Gentech Bio Quiagen, 12 outubro 2018. Disponível em: <<https://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&ved=&url=http%3A%2F%2Fwww.gentechbio.com%2Finicio%2F48-qiaamp-viral-rna-mini.html&psig=AOvVaw1NBqyhTL3t6Kz7pPQFd--H&ust=1539471938572150>>.

HOFMEISTER, M. G.; FOSTER, M. A.; TESHALE, E. H. Epidemiology and Transmission of Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus Infections in the United States. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 27, 2018.

IBGE. Censo 2010. IBGE GOV BR, 2010. Disponível em: <www.censo2010.ibge.gov.br/>.

IBGE. ESTIMATIVAS DA POPULAÇÃO RESIDENTE NO BRASIL E UNIDADES DA FEDERAÇÃO. IBGE. Brasília , p. 119. 2018.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). General Rules - 3. Rules of Classification and Nomenclature – The universal scheme, 2018. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/information/w/ictv-information/383/ictv-code>>. Acesso em: 22 outubro 2018.

JOTHIKUMAR, N. et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. Journal of Virological Methods, p. 65-71, 2006.

KRONEMAN, A. et al. Usability of the international HAVNet hepatitis A virus database for geographical annotation, backtracing and outbreak detection. Euro Surveill, p. 23-37, 2018.

LEMON, S. M.; JANSEN, R. W.; BROWN, E. A. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. Elsevier, p. 40-44, 1992.

LISBOA, V. Agência Brasil. Agência Brasil, 8 Janeiro 2018. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2018-01/prefeitura-do-rio-e-fiocruz-investigam-caoa-de-surto-de-hepatite-no-vidigal>>.

MENDONÇA, M. J. C. D.; MOTTA, R. S. D. Saúde e saneamento no Brasil. IPEA. Rio de Janeiro. 2005. (Repositório do conhecimento do IPEA 1081).

MICHAELIS. Dicionário Michaelis, 2018. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/>>.

MONTIJO, Y. Slideplayer. © 2018 SlidePlayer.com.br Inc., 14 outubro 2018. Disponível em: <<https://slideplayer.com.br/slide/366864/#>>.

NERI, M. C. et al. Trata Brasil: Impactos Sociais da Falta de Saneamento nas Principais Cidades Brasileiras. Centro de Políticas Sociais / Instituto Brasileiro de Economia / Fundação Getúlio Vargas. Rio de Janeiro, p. 120. 2009.

OLIVEIRA, J. M. D. Epidemiologia da Hepatite A no Brasil. In: FOCACCIA, R. Tratado de Hepatites virais e Doenças Associadas 3 ed. [S.I.]: Atheneu, 2013. p. 237-967.

OSADA, N. M.; COSTA, M. C. D. Consntrução social de gênero na Biologia: preconceitos e obstáculos na biologia molecular. Cadernus pagu, p. 279-299, 2006.

PARANÁ, R.; SCHINONI, M. I. Hepatite E - Artigo de Atualização. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 247-253, 2002.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Tecnicas de DNA recombinante. In: ZAHA, A. Biologia Molecular Básica. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 307-331.

PEREIRA, F. E. L.; GONÇALVES, C. S. Hepatite A. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 387-400, 2003.

PINTO, M. A.; OLIVEIRA, J. M. Sobre os Laboratórios que fazem parte do Instituto Oswaldo Cruz - IOC Fiocruz R.J. Site IOC, 27 novembro 2018. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioclabs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=46>>.

QIAGEN, Q. Automated solutions, 2018. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/sample-preparation/qiacube/#productdetails>>. Acesso em: 2 novembro 2018.

QUEIRÓZ, D. A. O. et al. Fatores de risco e prevalência de anticorpos contra o vírus da hepatite A (VHA) em crianças de creche em Goiânia, Brasil. Revista do Instuto de Medicina tropical de São Paulo vol.37, p. nº 5, 1995.

RAMOS, E. M. D. S. Sistemas Multiplex para a detecção e caracterização Molecular de Infecções. **Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal. 2012.**

RAZZOLINI, M. T. P.; GÜNTHER, W. M. R. Impactos na saúde das deficiências de acesso a água. *Saúde e Sociedade, São Paulo, maio 2007.*

RJTV. G1. G1 Rio de Janeiro, **06 Janeiro 2018.** Disponível em: <https://g1.globo.com/rj/rio-de-janeiro/noticia/vidigal-rio-tem-surto-de-hepatite-a-alerta-associacao-de-moradores.ghtml>.

ROBERTSON, B. et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *PubMed, p. 1365-1367, 1992.*

SALINES, M.; ANDRAUD, M.; ROSE, N. From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences* , p. 31-48, 2017.

SANTOS, L. D. D. R. et al. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *PubMed, p. 276-279, 2010.*

SAÚDE, M. D. Hepatites Virais. O Brasil está atento. **Brasília. 2002.**

SBPC/ML, S. B. D. P. C. L.-. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): **Coleta e Preparo da Amostra Biológica. Barueri, SP: Manole Ltda, 2014.**

SILVA, A. S. Ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da Hepatite A utilizando IgY anti-HAV. **IOC - PGBP - Dissertações de Mestrado. Rio de Janeiro. 2010.**

SILVA, E. R. D. et al. PERFIL LABORATORIAL E ANÁLISE MOLECULAR DE CHIKUNGUNYA VÍRUS. **Centro Universitário de Várzea Grande. Mato Grosso. 2017. (ISSN 2594-6145).**

SILVA, J. F. C. D. et al. Hepatites virais na terceira idade: casos do Rio Grande do Norte, Brasil. *Brazilian Journal Health review, p. Vol 1, nº 1, 2018.*

SILVA, P. D. C. et al. Hepatitis A in the city of Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological pattern and socio-environmental variables. **Cross-analysis of SINAN and population census data. SciELO - Scientific Electronic Library Online, Rio de Janeiro, fevereiro 2007.**

SRIDHAR, S. et al. Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. *International Journal of Molecular Sciences, p. 869, 2017.*

TANG, Y.; PERSING, D. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P. R. E. A. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM, 1999. p. 215-244.

VERZOLA, L. F. S. USP - Ribeirão. Tecnicas em Biologia Molecular, 2017.

Disponível em:

<<http://www.rpm.fmrp.usp.br/kit/Artigos/APOSTILATECNICASDEBIOLOGIAMOLECULAR2017.pdf>>. Acesso em: 10 novembro 2018.

VIEIRA, D. P. IMT USP. Instituto de Medicina Tropical, 1 outubro 2018.

Disponível em: <[http://www.imt.usp.br/wp-](http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf)

content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf>. Acesso em: 17 outubro 2018.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. PubMed, p. 337-48, 2004.

YATES, M. V. Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition). [S.I.]: Academic Press, 2014.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Biologia Molecular Básica. Porto Alegre: Artmed, 2014. 36-63 p.

8. Relato de caso

DESCRIÇÃO DE UM SURTO DE HEPATITE A NA COMUNIDADE DO VIDIGAL, ZONA SUL DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO - BRASIL.

DESCRIPTION OF AN HEPATITIS A OUTBREAK IN THE VIDIGAL COMMUNITY, SOUTH
ZONE OF THE CITY OF RIO DE JANEIRO – BRAZIL

8.1. Resumo

Existem muitos patógenos circulantes no ambiente, dentre eles o Vírus da Hepatite A - HAV (OLIVEIRA, 2013; FERRARI, SAVAZZI, *et al.*, 2012). O cenário contemporâneo do Vírus da Hepatite A (HAV) no Brasil encontra-se em mudança nas últimas décadas, havendo uma redução significativa da exposição ao HAV durante a infância devido a melhorias sanitárias e políticas de vacinação para crianças de 15 meses a 5 anos incompletos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - HEPATITES VIRAIS, 2018; LEMON, JANSEN e BROWN, 1992; MENDONÇA e MOTTA, 2005). Tal cenário propicia uma população de jovens-adultos que nunca teve contato com o HAV, portanto susceptíveis. Nesse contexto, surtos epidêmicos não são difíceis de acontecer, classificando assim o HAV como um problema de saúde pública em expansão (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - HEPATITES VIRAIS, 2018; SILVA, VITRA, *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2013). O Surto de hepatite A relatado, ocorreu na comunidade do Vidigal, bairro localizado na zona sul do Rio de Janeiro, com aproximadamente 14 mil habitantes (IBGE, 2010), durante os meses de fevereiro de 2017 a fevereiro de 2018. Foram notificados 184 casos clínicos de Hepatite A, caracterizando assim um surto, amplamente divulgado em mídias e sites (Figura 16 e Figura 17) de comunicação. Os diagnósticos positivos foram emitidos pelo LADTV depois de análise das amostras ambientais encaminhada pela Secretaria Municipal de Saúde (SMS).

Palavras-chave: Vírus da Hepatite A; HAV; Medidas sanitárias; Grupo suscetível; Saúde pública; Vidigal; Rio de Janeiro.

8.2. Abstract

It is known that HAV is circulating in the environment (OLIVEIRA, 2013; FERRARI, SAVAZZI, et al., 2012). The contemporary scenario of the Hepatitis A Virus (HAV) in Brazil has been changing in the last decades, with a significant reduction in HAV exposure during childhood due to health improvements and vaccination policies for children aged 15 months to 5 years incomplete (Mendeleo and Motta, 2005; LEMON, JANSEN, and BROWN, 1992; EPIDEMIOLOGICAL BULLETIN - HEPATITES VIRAL, 2018). Such scenario provides a population of young adults who have never had contact with HAV, therefore susceptible. In this context, epidemiological outbreaks are not difficult to happen, thus classifying HAV as an expanding public health problem (OLIVEIRA, 2013; SILVA, VITRA, et al., 2007). The reported hepatitis A outbreak occurred in the community of Vidigal, bairro located in the southern zone of Rio de Janeiro, with approximately 14 thousand inhabitants (IBGE, 2010), during the months of February 2017 to February 2018. 184 cases were reported Hepatitis A, thus characterizing an outbreak of national effect, widely reported in media and sites (Figure 16 and Figure 17) of communication. The positive diagnoses were issued by the LADTV after analysis of the environmental samples forwarded by the Municipal Health Secretariat (SMS).

Keywords: Hepatitis A Virus; HAV; Sanitary measures; Susceptible group; Public health; Vidigal; Rio de Janeiro.

8.3. Introdução

O HAV é de ocorrência mundial e a causa mais comum quando se trata de hepatites virais agudas na grande maioria dos países. Mesmo com a alta taxa de subnotificação, é notificado cerca de 1,5 milhão de casos clínicos / ano. Seu genoma é constituído por RNA positivo, e sua transmissão se dá principalmente pela via fecal-oral, consumo de água e alimentos contaminados (OLIVEIRA, 2013; KRONEMAN, SOUSA, *et al.*, 2018; ROBERTSON, JANSEN, *et al.*, 1992; COSTA, CRISTINA, *et al.*, 2002; QUEIRÓZ, CARDOSO, *et al.*, 1995; LEMON, JANSEN e BROWN, 1992; BRASIL, 2018).



Figura 16 - Notícia vinculada em site (RJTV, 2018).

O Brasil é o maior país da América do Sul, com um território de 85.142.153 km², e com uma população estimada de 208.494.900 pessoas, apresentando grande concentração de indivíduos em área urbana (IBGE, 2018). O país apresenta um quadro grave de problemas de saneamento em grande parte do seu território, cenário que propicia a alta prevalência de doenças associadas a falta de saneamento veiculadas pela água contaminada, como a Hepatite A, cujo agente está presente tanto em cidades grandes ou pequenas e na area rural do Brasil (OLIVEIRA, 2013; RAZZOLINI e GÜNTHER, 2007; MENDONÇA e MOTTA, 2005; NERI, MELO, *et al.*, 2009; BRASIL, 2018).



Figura 17 - Notícia vinculada na mídia (Lisboa, 2018).

8.4. Caso

Foram coletadas amostras de água em poços artesianos, nascentes, tubulações da Companhia Estadual de Águas e Esgoto (Cedae), fábricas de gelo, distribuidoras de água engarrafada, água mineral à venda, casas com casos confirmados (Figura 19) e de chuveiros das praias dos bairros do Leblon e Ipanema, num total de 20 amostras enviadas ao LADTV, conforme Figura 18.

As amostras de água foram concentradas seguindo as recomendações da ISO-15216-1⁶, de acordo com a rotina do laboratório. Seguiu-se a realização das PCRs e Nested PCR para todas as amostras, sendo HAV-RNA positivas 6 delas, correspondentes a 2 amostras de poço, 1 amostra do chuveiro da praia e 2 amostras de água mineral, locais evidenciados geograficamente na Figura 19 respectivamente.

⁶ ISO-15216-1. Microbiology of the food chain horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real time PCR – Part 1: method for quantification

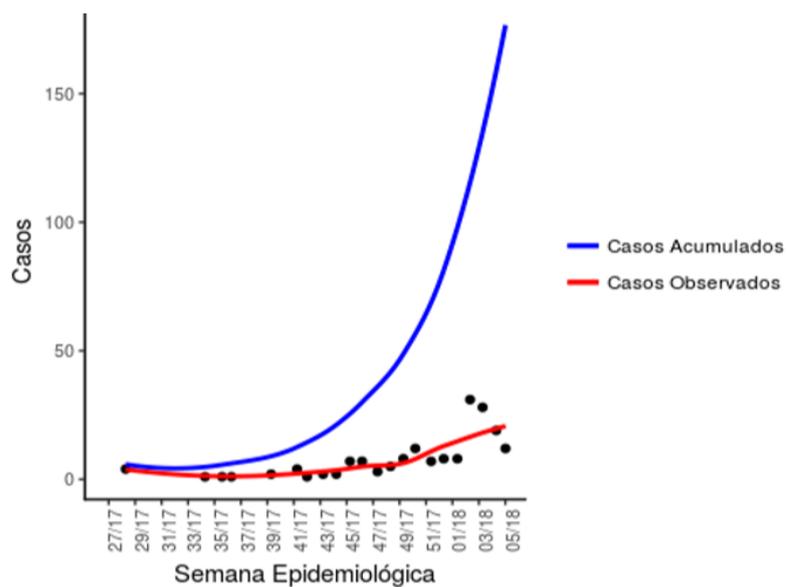


Figura 18 - Distribuição Semanal dos Casos de Hepatite A com a curva de tendência e a curva acumulada dos casos (LADTV, 2018).

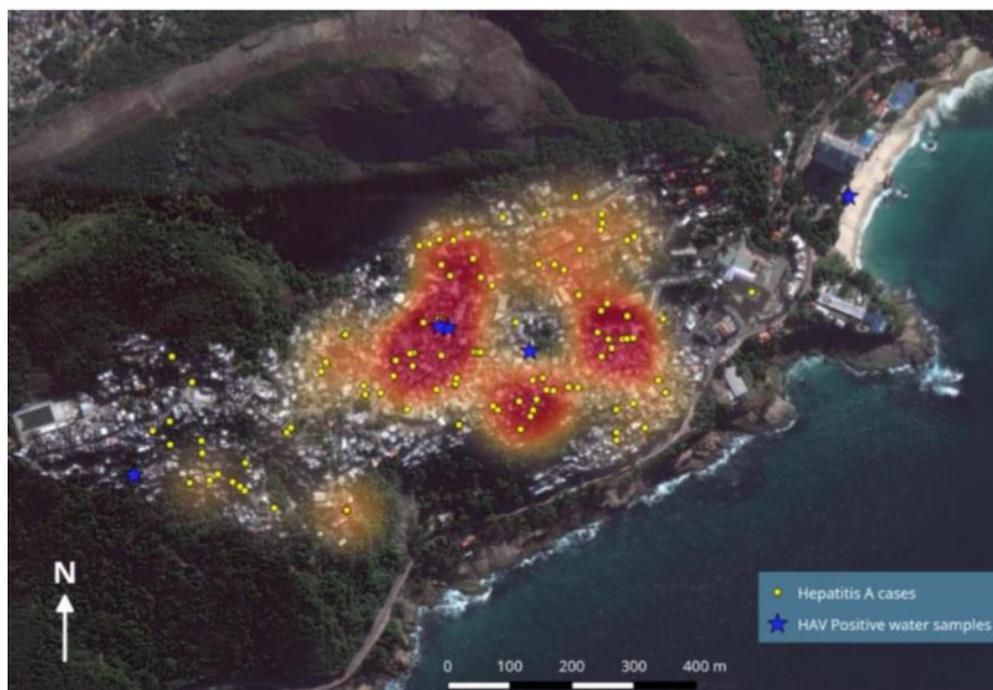


Figura 19 - Distribuição espacial dos casos de hepatite A confirmados (Amado, 2018, LADTV).

As amostras positivas marcaram o gel na altura de 218pb, como o esperado. Foram ainda submetidas ao sequenciamento e posterior análise

filogenética (Figura 20), evidenciando a presença dos subgenótipos 1A e 1B co-circulantes no Rio de Janeiro.

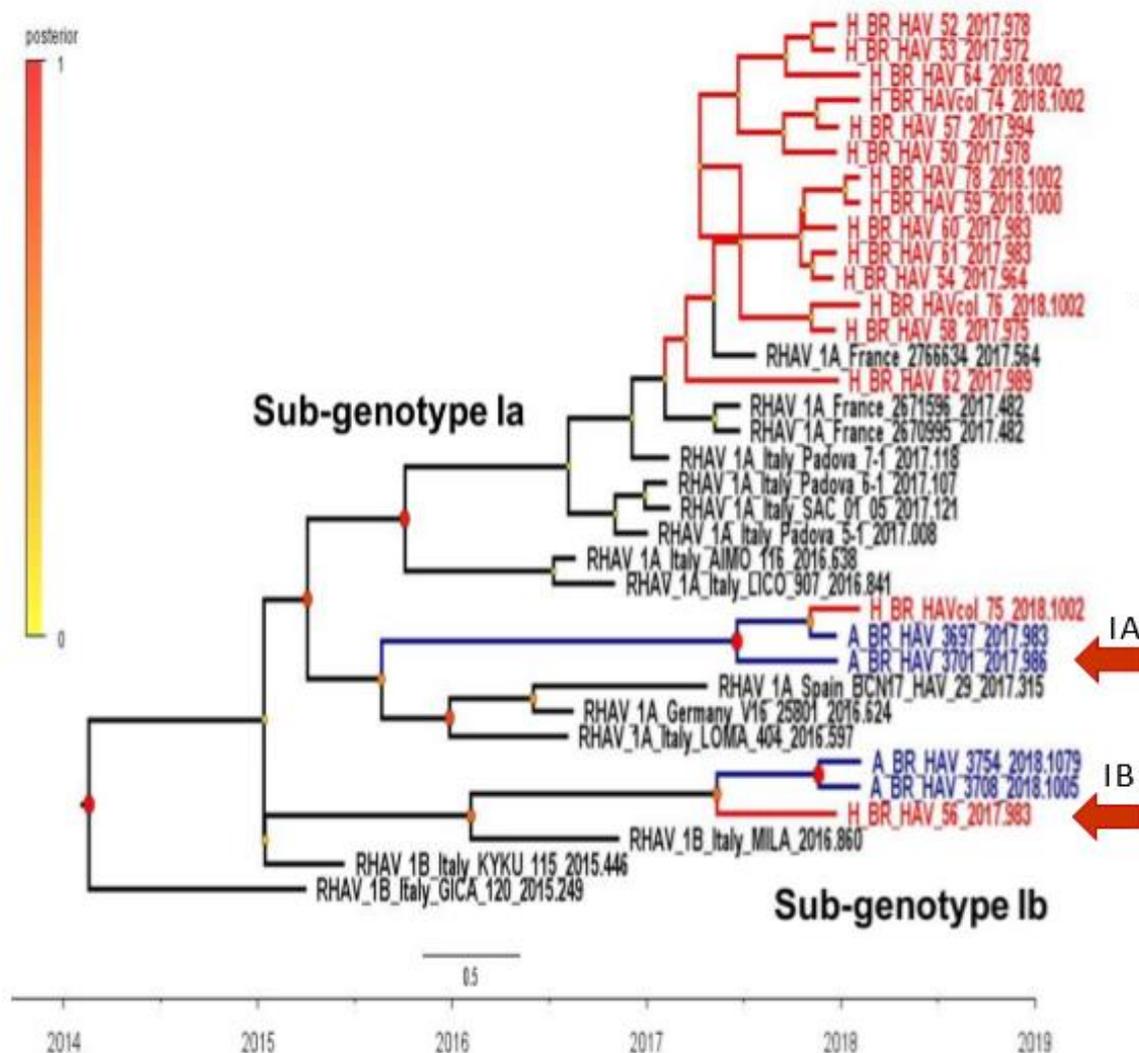


Figura 20 - Análise filogenética: amostras clínicas e ambientais. Arvore filogenética construída com inferência Bayesiana (LADTV, 2018). Em vermelho: Amostras Clínicas. Em azul: Amostras Ambientais.

Foi evidenciado a relação entre contaminação ambiental e as infecções humanas em pelo menos dois casos, um com genótipo 1A e outro com 1B (suporte estatístico relevante (bootstrap >80)).

8.5. Discussão

O registro de resultados positivos de HAV em amostras ambientais torna-se importante pela relevância nacional. Tal caso trouxe visibilidade ao LADTV, fazendo-o referência nacional em diagnósticos em hepatites virais

entéricas ambientais.

Tais dados reforçam a mudança no padrão epidemiológico da hepatite A no Brasil com deslocamento da infecção para a faixa etária de indivíduos adultos, cuja morbidade e mortalidade da doença são maiores (BRASIL, 2018).

O caso explicitado não satisfaz critérios epidemiológicos adequados para uma investigação de surto. As amostras foram coletadas e enviadas ao longo de somente uma semana (entre os dias 27 de dezembro 2017 e 05 de janeiro de 2018), fato que provavelmente propiciou uma detecção inferior aos casos reais de infecção, visto que essa semana provavelmente corresponde somente ao pico de infecção, não abrangendo a totalidade do ciclo.

Como recomendação, baseados nos resultados detectados, o LADTV encaminhou a SMS recomendação para que a vacinação para HAV fosse estendida a grupos potencialmente expostos, como jovens adultos residentes em comunidades de baixa renda.

O estudo evidencia o papel da contaminação ambiental como fonte de infecção viral em seres humanos, reforçando a importância de uma vigilância abrangente da hepatite A, incluindo abordagens epidemiológicas, sanitárias e principalmente ambientais, bem como uma estratégia de prevenção adequada.

9. Referências

BARTLET, J. M. S.; STIRLING, D. PCR Protocols. [S.l.]: Totowa Humana Press, 2003.

BATISTETI, C. B.; ARAÚJO, E. S. N. D.; CALUZI, J. J. The interpretations of MacCarty, MacLoed and Avery's studies on the chemical nature of the "transforming factor" in bacteria. *Filosofia e História da Biologia*, p. 71-94, 2008.

BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP. Salvador, BA. 1997. (Apresentado nos Anais do VIII Congresso Panamericano e X Congresso Brasileiro de Infectologia).*

BOTTINO, F. D. O. Relatório de estágio supervisionado. *Universidade Federal Fluminense. Niterói*, p. 43. 2015.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde -Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais. *Brasília*. 2018.

CLEMENS, S. A. C. et al. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* , p. 1-10, 2000.

COSTA, M. M. et al. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *PubMed*, p. 9516-9525, 2002.

DETTOGNI, R. S.; LOURO, I. D. Desafios da Extração do RNA do Vírus da Dengue (ligação e extração ao DNA: Métodos Aplicações e Limitações). In: **REZENDE, R. R.** Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. [S.l.]: Blucher, 2017. p. 937-966.

FERRARI, C. K. B. et al. Conhecimentos sobre hepatites virais numa amostra de estudantes brasileiros do Vale do Araguaia, Amazônia Legal. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, p. 120-126, 2012.

FERREIRA, A. C. Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo Vírus da Hepatite E (HEV) em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). *São Paulo*. 2016.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. D. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia* , 2004.

FIOCRUZ. Agentes de Risco Relacionados às Atividades Desenvolvidas no. QBA - Online Fiocruz, Rio de Janeiro, 11 Setembro 2018. Disponível em:

<<http://moodle.ead.fiocruz.br/course/view.php?id=147>>. Acesso em: 11 setembro 2018.

FRITSCH, F. E.; MANIATIS, T. Molecular cloning - a laboratory manual. U.S.A.: green and sambrook, 1989.

GANDRA, E. Á. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. Red de Revistas Científicas de America Latina y el Caribe, España y Portugal, p. 109-118, 2008.

GENTECH Bio. Gentech Bio Quiagen, 12 outubro 2018. Disponível em: <<https://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&ved=&url=http%3A%2F%2Fwww.gentechbio.com%2Finicio%2F48-qiaamp-viral-rna-mini.html&psig=AOvVaw1NBqyhTL3t6Kz7pPQFd--H&ust=1539471938572150>>.

HOFMEISTER, M. G.; FOSTER, M. A.; TESHLE, E. H. Epidemiology and Transmission of Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus Infections in the United States. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 27, 2018.

IBGE. Censo 2010. IBGE GOV BR, 2010. Disponível em: <www.censo2010.ibge.gov.br/>.

IBGE. ESTIMATIVAS DA POPULAÇÃO RESIDENTE NO BRASIL E UNIDADES DA FEDERAÇÃO. IBGE. Brasília , p. 119. 2018.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). General Rules - 3. Rules of Classification and Nomenclature – The universal scheme, 2018. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/information/w/ictv-information/383/ictv-code>>. Acesso em: 22 outubro 2018.

JOTHIKUMAR, N. et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. Journal of Virological Methods, p. 65-71, 2006.

KRONEMAN, A. et al. Usability of the international HAVNet hepatitis A virus database for geographical annotation, backtracing and outbreak detection. Euro Surveill, p. 23-37, 2018.

LEMON, S. M.; JANSEN, R. W.; BROWN, E. A. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. Elsevier, p. 40-44, 1992.

LISBOA, V. Agência Brasil. Agência Brasil, 8 Janeiro 2018. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2018-01/prefeitura-do-rio-e-fiocruz-investigam-cao-de-surto-de-hepatite-no-vidigal>>.

MENDONÇA, M. J. C. D.; MOTTA, R. S. D. Saúde e saneamento no Brasil. IPEA. Rio de Janeiro. 2005. (Repositório do conhecimento do IPEA 1081).

MICHAELIS. Dicionário Michaelis, 2018. Disponível em: <<https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/>>.

MONTIJO, Y. Slideplayer. © 2018 SlidePlayer.com.br Inc., 14 outubro 2018. Disponível em: <<https://slideplayer.com.br/slide/366864/#>>.

NERI, M. C. et al. Trata Brasil: Impactos Sociais da Falta de Saneamento nas Principais Cidades Brasileiras. Centro de Políticas Sociais / Instituto Brasileiro de Economia / Fundação Getúlio Vargas. Rio de Janeiro, p. 120. 2009.

OLIVEIRA, J. M. D. Epidemiologia da Hepatite A no Brasil. In: FOCACCIA, R. Tratado de Hepatites virais e Doenças Associadas 3 ed. [S.l.]: Atheneu, 2013. p. 237-967.

OSADA, N. M.; COSTA, M. C. D. Consntrução social de gênero na Biologia: preconceitos e obstáculos na biologia molecular. Cadernus pagu, p. 279-299, 2006.

PARANÁ, R.; SCHINONI, M. I. Hepatite E - Artigo de Atualização. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 247-253, 2002.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Tecnicas de DNA recombinante. In: ZAHA, A. Biologia Molecular Básica. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 307-331.

PEREIRA, F. E. L.; GONÇALVES, C. S. Hepatite A. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 387-400, 2003.

PINTO, M. A.; OLIVEIRA, J. M. Sobre os Laboratórios que fazem parte do Instituto Oswaldo Cruz - IOC Fiocruz R.J. Site IOC, 27 novembro 2018. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioclabs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=46>>.

QIAGEN, Q. Automated solutions, 2018. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/sample-preparation/qiacube/#productdetails>>. Acesso em: 2 novembro 2018.

QUEIRÓZ, D. A. O. et al. Fatores de risco e prevalência de anticorpos contra o vírus da hepatite A (VHA) em crianças de creche em Goiânia, Brasil. Revista do Instuto de Medicina tropical de São Paulo vol.37, p. nº 5, 1995.

RAMOS, E. M. D. S. Sistemas Multiplex para a detecção e caracterização Molecular de Infecções. Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal. 2012.

RAZZOLINI, M. T. P.; GÜNTHER, W. M. R. Impactos na saúde das deficiências de acesso a água. Saúde e Sociedade, São Paulo, maio 2007.

RJTV. G1. G1 Rio de Janeiro, 06 Janeiro 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/rj/rio-de-janeiro/noticia/vidigal-rio-tem-surto-de-hepatite-a-alerta-associacao-de-moradores.ghtml>>.

ROBERTSON, B. et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. PubMed, p. 1365-1367, 1992.

SALINES, M.; ANDRAUD, M.; ROSE, N. From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. International Journal of Molecular Sciences , p. 31-48, 2017.

SANTOS, L. D. D. R. et al. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. PubMed, p. 276-279, 2010.

SAÚDE, M. D. Hepatites Virais. O Brasil está atento. Brasília. 2002.

SBPC/ML, S. B. D. P. C. L.-. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): **Coleta e Preparo da Amostra Biológica**. Barueri, SP: Manole Ltda, 2014.

SILVA, A. S. Ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da Hepatite A utilizando IgY anti-HAV. IOC - PGBP - Dissertações de Mestrado. Rio de Janeiro. 2010.

SILVA, E. R. D. et al. PERFIL LABORATORIAL E ANÁLISE MOLECULAR DE CHIKUNGUNYA VÍRUS. Centro Universitário de Várzea Grande. Mato Grosso. 2017. (ISSN 2594-6145).

SILVA, J. F. C. D. et al. Hepatites virais na terceira idade: casos do Rio Grande do Norte, Brasil. Brazilian Journal Health review, p. Vol 1, nº 1, 2018.

SILVA, P. D. C. et al. Hepatitis A in the city of Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological pattern and socio-environmental variables. Cross-analysis of SINAN and population census data. SciELO - Scientific Electronic Library Online, Rio de Janeiro, fevereiro 2007.

SRIDHAR, S. et al. Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. International Journal of Molecular Sciences, p. 869, 2017.

TANG, Y.; PERSING, D. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P. R. E. A. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM, 1999. p. 215-244.

VERZOLA, L. F. S. USP - Ribeirão. Técnicas em Biologia Molecular, 2017. Disponível em:

<<http://www.rpm.fmrp.usp.br/kit/Artigos/APOSTILATECNICASDEBIOLOGIAMOLECULAR2017.pdf>>. Acesso em: 10 novembro 2018.

VIEIRA, D. P. IMT USP. Instituto de Medicina Tropical, 1 outubro 2018. Disponível em: <<http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf>>. Acesso em: 17 outubro 2018.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. PubMed, p. 337-48, 2004.

YATES, M. V. Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition). [S.l.]: Academic Press, 2014.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Biologia Molecular Básica. Porto Alegre: Artmed, 2014. 36-63 p.