

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Renata Tourinho Santos

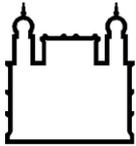
**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO VÍRUS E DO HOSPEDEIRO
NA HEPATITE A AGUDA E FULMINANTE**

Tese apresentada à coordenação do programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de concentração: Imunologia e Patogenia.

Orientadora: Dra. Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Renata Tourinho Santos

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO VÍRUS E DO HOSPEDEIRO
NA HEPATITE A AGUDA E FULMINANTE**

ORIENTADORA: Dra. Vanessa Salete de Paula

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Christian Maurice Gabriel Niel (Revisor e Presidente) – Instituto Oswaldo Cruz /Fiocruz

Dra. Claudia Lamarca Vitral – Universidade Federal Fluminense (UFF)

Dra. Sylvia Lopes Maia Teixeira – Instituto Oswaldo Cruz /Fiocruz

SUPLENTE:

Dra. Elizabeth Lampe – Instituto Oswaldo Cruz /Fiocruz

Dra. Adriana de Abreu Corrêa – Universidade Federal Fluminense (UFF)

Tourinho, Renata Santos

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO VÍRUS E DO HOSPEDEIRO
NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA HEPATITE A**

Renata Tourinho Santos – Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz –
Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, 2015. 134 fls.

Tese de doutorado apresentada à coordenação do curso de pós-graduação
em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do grau de
Doutor em Ciências. Área de concentração: Imunologia e Patogenia.

1. Hepatite A – 2. Falência aguda do fígado – 3. Polimorfismo

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro/RJ sob orientação da Dra. Vanessa Salete de Paula. Em colaboração com o núcleo de Hepatites Virais – FIOCRUZ/RJ, o Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) e o Laboratório de Epidemiologia molecular e Bioinformática do Center for Disease Control and Prevention (CDC) – Atlanta, EUA.

“The night is long and the coffee is cheap.”

Dr. Gilberto Vaughan

Dedico este trabalho aos que estão e estarão eternamente ao meu lado, meus pais, minha irmã e meu marido.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à coordenação do curso de Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro que auxiliou a execução deste trabalho.

Gostaria de agradecer, também, a uma pessoa especial que confiou no meu trabalho desde a iniciação científica e que me impulsionou e me incentivou na vida acadêmica, minha orientadora Dra. Vanessa Salete de Paula.

Um eterno agradecimento a um pesquisador que me ensinou o que é fazer ciência, Dr. Gilberto Vaughan.

À Dra. Livia Rossi, agradeço carinhosamente por todo apoio e colaboração.

Aos pesquisadores Dr. Marcelo Alves Pinto, Dra. Lia Liewis–Ximenez, Dr. Adilson José de Almeida, Dra. Livia Villar, Dr. Gustavo Milson e Dr. Luís Cristóvão Porto, muito obrigada pela colaboração e apoio científico.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, em especial Lyana e Juliana Melgaço que estiveram ao meu lado trocando experiências e me ajudando sempre que possível, muito obrigada.

Às grandes amigas, Dra. Amanda Perse e futura Dra. Yasmine Rangel que em todos os momentos ruins ou bons estiveram ao meu lado.

Agradeço, especialmente, ao Dr. Christian Niel por aceitar o convite de revisor desta tese, o que irá contribuir bastante para este trabalho.

Gostaria, por fim, de agradecer especialmente aos meus amores que compreendem minhas dificuldades e que compartilham comigo a alegria de ter realizado dois dos sonhos da minha vida, meu pai, Marcos; minha mãe, Thelma; minha irmã Fernanda; e minha pequena e nova família, meu marido, Bernardo, e meu filho, Iron.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Dados demográficos, laboratoriais e desfecho clínico de acordo com a etiologia de ALF, n=2000 adultos dos EUA 1998–2014. (Adaptado de Bernal <i>et al.</i> , 2015).....	28
------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A (Fonte: www.cdc.gov , 1998).....	01
Figura 1.2	Esquema do RNA do HAV, mostrando as principais proteínas codificadas (Fonte: Pereira e Gonçalves, 2003).....	02
Figura 1.3	Distribuição geográfica da infecção pelo HAV (Fonte: <i>Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis A to E– an overview</i> , CDC 2006).....	06
Figura 1.4	Curso temporal da infecção pelo HAV (Adaptado de De Paula, 2012).....	17

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1	Dosagem recomendada da vacina contra hepatite A e esquema de vacinação por faixa etária (Fonte: <i>Fiore et al., 2006</i>).....	11
Quadro 1.2	Grupos expostos ao risco de infecção pelo HAV (Adaptado de Nguyen e Tran, 2009).....	14
Quadro 1.3	Função das proteínas codificadas pelos genes associados aos diferentes desfechos clínicos da hepatite A.....	23
Quadro 1.4	Causas da falência hepática fulminante.....	26
Quadro 1.5	Fatores prognósticos de falência hepática fulminante....	29
Quadro 1.6	Condutas terapêuticas nas diferentes manifestações clínicas da falência hepática fulminante.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

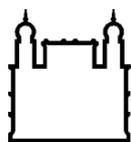
- ALF – Falência aguda do fígado, do inglês “Acute Liver Failure”
- ALT – Alanina Aminotransferase
- AST – Aspartato Aminotransferase
- Anti-HAV IgA – Imunoglobulina do tipo A contra o vírus da hepatite A
- Anti-HAV IgG – Imunoglobulina do tipo G contra o vírus da hepatite A
- Anti-HAV IgM – Imunoglobulina do tipo M contra o vírus da hepatite A
- Anti-HAV total – Imunoglobulina do tipo M e G contra o vírus da hepatite A, detectadas juntamente.
- CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês “*Center for Disease Control and Prevention*”.
- DNA – Ácido desoxirribonucléico, do termo em inglês “*deoxyribonucleic acid*”
- EUA – Estados Unidos da América
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- HAV – Vírus da hepatite A, do inglês “hepatitis A vírus”
- HBV – Vírus da hepatite B, do inglês “hepatitis B vírus”
- HCV – Vírus da hepatite C, do inglês “hepatitis C vírus”
- IOC – Instituto Oswaldo Cruz
- Kb – Quilo-bases (1000 bases ou pares de bases)
- LADTV – Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia
- ONG – Organização Não Governamental
- PBS – Tampão fosfato salino, do termo em inglês “*Phosphate Buffer Saline*”
- PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês “Polimerase Chain Reaction”.
- RNA – Ácido ribonucléico, do termo em inglês “*ribonucleic acid*”
- SNP – polimorfismo de nucleotídeo único, do termo em inglês “*Single Nucleotide Polymorphism*”
- UDPS – Pirosequenciamento de alta eficiência, do termo em inglês “*Ultra-deep pyrosequencing*”
- UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
- WHO/OMS – Organização Mundial da Saúde, do inglês “*World Health Organization*”.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE QUADROS	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 – O vírus da hepatite A (HAV).....	01
1.2 – Epidemiologia.....	05
1.3 – Diagnóstico da hepatite A.....	08
1.4 – Prevenção e controle da hepatite A.....	10
1.5 – Imunopatologia da hepatite A.....	13
1.6 – Interação HAV– hospedeiro.....	18
1.7 – Falência hepática aguda.....	24
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	31
3. OBJETIVOS	33
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS	34
4.1. ARTIGO 1 – Cross-Sectional Study of Hepatitis A Virus Infection in the Pantanal Population before Vaccine Implementation in Brazil: Usage of Non-Invasive Specimen Collection.....	35
4.2. ARTIGO 2 – Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR.....	49
4.3. ARTIGO 3 – Evidence of person-to-person transmission of hepatitis A virus in household outbreaks.....	53

4.4. ARTIGO 4 – The effect of host <i>iINFL3</i> polymorphysm on hepatitis A clinical outcomes.....	60
4.5. ARTIGO 5 – Acute liver failure upon hepatitis A virus infection: Role of host nucleotide polymorphisms.....	76
5. DISCUSSÃO	94
6. CONCLUSÃO	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

RESUMO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

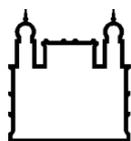
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TOURINHO, R.S. **ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO VÍRUS E DO HOSPEDEIRO NA HEPATITE A AGUDA E FULMINANTE.** 134 fls. Tese de Doutorado – Pós-graduação *strictu sensu* em Biologia Parasitária. 2015.

Na infecção pelo vírus da hepatite A, a maioria dos pacientes desenvolvem uma doença branda ou assintomática. No entanto, alguns pacientes podem progredir para uma doença mais grave que é caracterizada pela rápida degradação do fígado, coagulopatia e encefalopatia hepática, conhecida como falência hepática aguda (ALF). A infecção pelo HAV se apresenta como uma interação dinâmica entre fatores do vírus e do hospedeiro que em conjunto é responsável pela diversidade no desfecho clínico da doença. Apresentações incomuns de infecções prevalentes foram muitas vezes atribuídas a fatores específicos do hospedeiro. Estudos de associações genômicas (GWAS) provaram ser uma ótima abordagem na identificação de alelos de risco que estão relacionados a tais síndromes. Neste estudo, 31 variações nucleotídicas humanas, incluindo variações de um único nucleotídeo (SNP) e inserções, associadas à infecção pelo HAV foram caracterizadas numa coorte com casos clássicos e de ALF. Todos os casos de hepatite A foram identificados pelo PCR em tempo real otimizado para a região 5' não codificante do HAV. A população amostral dos GWAS consistiu em indivíduos expostos a surtos intradomiciliares e casos esporádicos de hepatite A no Brasil. Ao todo 321 amostras foram coletadas das quais 164 foram utilizadas nos estudos de variabilidade genética do hospedeiro. As análises de “odds ratio” e “data mining” sugeriram que os SNPs INFL3 rs rs8099917, TGFbeta1 rs1800469, ABCB1 rs1045642, IL10 rs1800871 (IL10b), TNF-alpha rs1799964 (TNF-alpha a), TNF-alpha rs1800630 (TNF-alpha b) foram significativamente associados à gravidade da doença. Muitas das variantes identificadas neste estudo estão relacionadas a genes importantes na patofisiologia da infecção pelo HAV. Entender como os fatores do hospedeiro influenciam a resposta imune à infecção viral fornece novas oportunidades para controlar esta doença e o desenvolvimento de terapêuticas eficientes.

ABSTRACT



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TOURINHO, R.S. COMPARATIVE STUDY OF VIRUS AND HOST GENETIC POLYMORPHISMS AMONG CLINICAL OUTCOMES OF HEPATITIS A. 134 pages. PhD Thesis– Pós-graduação *strictu sensu* em Biologia Parasitária. 2015.

During hepatitis A virus infection, most patients develop mild or asymptomatic disease. However, some patients can progress to a serious, life-threatening disease characterized by rapid deterioration of the liver, hepatic encephalopathy, and coagulopathy known as acute liver failure (ALF). HAV infection features a dynamic interplay of viral and host factors that in conjunction are responsible for the range of disease outcomes. Unusual presentations of prevalent infections have often been attributed to host-specific factors. Genome-wide association study (GWAS) has proven to be a powerful approach for identifying risk alleles that underlie such syndromes. In this study, thirty one human nucleotide variations, including single nucleotide polymorphisms (SNP) and insertions, associated with HAV infection were characterized in a cohort of ALF and classical HAV cases. All hepatitis A cases were identified by optimized real-time PCR for HAV 5' non-coding region. GWAS sample population consisted in individuals exposed to an intradomiciliary outbreak and sporadic cases of hepatitis A in Brazil. Altogether 321 samples were collected of which 164 were placed into host genetic variability study. Odds ratio and data mining analysis suggested that INFL3 rs8099917, TGFbeta1 rs1800469, ABCB1 rs1045642, IL10 rs1800871 (IL10b), TNF-alpha rs1799964 (TNF-alpha a), TNF-alpha rs1800630 (TNF-alpha b) SNPs were significant associated with severe hepatitis A outcome. Several of the variants identified in this genome-wide study lie within genes important to hepatic pathophysiology for hepatitis A virus infection. Understanding how the host factor influences the immune response to viral infection provides new opportunities to control this disease and for the development of effective therapeutics.

1-INTRODUÇÃO

1.1 - O vírus da hepatite A (HAV)

O vírus da hepatite A (HAV) é o único membro do gênero *Hepatovirus*, pertencente a família *Picornaviridae* (Melnick, 1982). Diferentemente de outros representantes dos Picornavírus, as partículas não envelopadas do HAV são bastante estáveis no ambiente, especialmente quando associados a matéria orgânica, exibindo um alto grau de resistência em baixas temperaturas e pH. Estas características facilitam a transmissão fecal-oral através da água e alimentos contaminados (Hollinger e Emerson, 2007).

O vírion possui morfologia icosaédrica com 27 a 32nm de diâmetro (Feinstone *et. al.*, 1973) (Figura 1.1) e é composto de 60 cópias de cada uma das três maiores proteínas estruturais, VP1, VP2, VP3 (Siegl *et al.*, 1981).

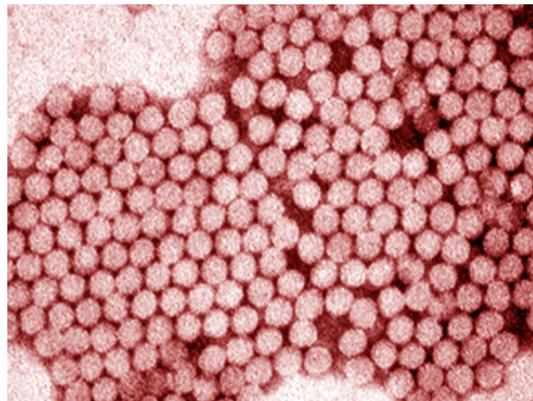


Figura 1.1: Imunomicroscopia eletrônica do HAV (Fonte: www.cdc.gov, 1998).

Seu genoma é constituído por uma molécula de RNA linear de fita simples, de polaridade positiva, com 7.5 Kb, seguido por uma cauda poli (A) de 40 a 80 nucleotídeos (Provost *et al.*, 1975; Bradley *et al.*, 1978; Koff, 1998). A cadeia de RNA consiste de três regiões: uma região não-codificante na extremidade 5', de 732 a 740 nucleotídeos, que corresponde a 10% do genoma; uma região intermediária, codificante de proteínas virais estruturais e não-estruturais, com 2.225 a 2.227 nucleotídeos; e uma região não-codificante na extremidade 3' com

40 a 80 nucleotídeos. O RNA genômico está associado covalentemente à proteína VPg (ou 3B) na extremidade 5' não-codificante, tendo esta um papel importante na iniciação da transcrição, pois forma o sítio de entrada do ribossomo (Redondo *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011; Pereira e Gonçalves, 2003) (Figura 1.2).

As proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4, formam o conjunto das principais proteínas estruturais do HAV. Essas proteínas são originadas por clivagem da proteína primária pela protease 3C, codificada a partir região P3, que também codifica a VPg (Siegl *et al.*, 1981). As proteínas não-estruturais têm funções diferenciadas: a proteína 2A atua como precursora do capsídeo e na morfogênese viral (Cohen *et al.*, 2002); as proteínas 2B e 2C induzem rearranjos na estrutura das membranas intracelulares para a formação do complexo de replicação, além disso, a proteína 2C possui ainda atividades de helicase e NTPase (Weilandt *et al.*, 2014); a proteína 3A (ou pré-VPg) ancora a proteína 3B no RNA, enquanto que a proteína 3C tem atividade de protease viral, sendo a maior responsável pelo processamento proteolítico do vírus (Gauss-Muller *et al.*, 1991); já a proteína 3D é considerada uma RNA polimerase RNA-dependente (Martin e Lemon, 2006) (Figura 1.2).

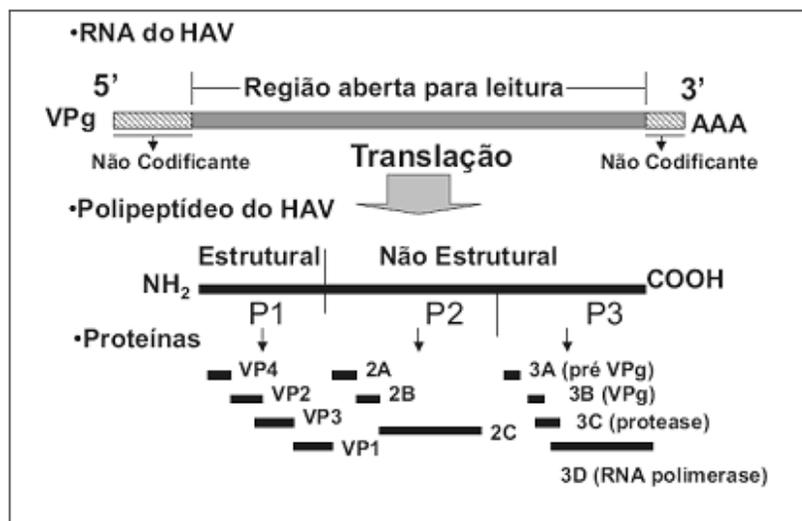


Figura 1.2: Esquema do RNA do HAV, mostrando as principais proteínas codificadas (Fonte: Pereira e Gonçalves, 2003).

O HAV possui um único sítio conservado de neutralização antigênica (Stapleton e Lemon, 1987) e, devido a este fato, todos os isolados de diferentes partes do mundo pertencem a um único sorotipo. Apesar desta uniformidade antigênica, o HAV demonstra um modesto grau de diversidade genética que é suficiente para definir alguns genótipos e subgenótipos. Algumas regiões genômicas são comumente usadas para tal fim. Variações na sequência nucleotídica ocorridas na região VP1 ou na junção VP1/2A são usadas para defini-los: os genótipos têm 15% de variação nucleotídica entre os isolados e os subgenótipos têm de 7 a 7,5% de variações nucleotídicas. Existem seis genótipos do HAV já identificados: três genótipos (I, II, III) são de origem humana, sendo I e III classificados em subgenótipos A e B; e três (IV, V, VI) são originados de símios (Robertson *et al.*, 1992). Anteriormente, foram relatados sete genótipos, porém, alguns estudos reclassificaram o genótipo VII como um subgenótipo do genótipo II (Lu *et al.*, 2004). Os genótipos mais frequentes nas infecções humanas são os genótipos I e III (Costa-Mattioli *et al.*, 2002a).

Estudos de epidemiologia molecular permitiram determinar a distribuição dos genótipos do HAV no mundo. O genótipo I é o mais prevalente, sendo o subgenótipo IA mais comum do que o IB. O subgenótipo IA é mais frequentemente encontrado na América do Norte, China, Japão, Tailândia e Nigéria (Robertson *et al.*, 1992; Costa-Mattioli *et al.*, 2002a; Nainan *et al.*, 2006; Forbi *et al.*, 2013).

Estudos de caracterização molecular conduzidos em países da América Latina (Argentina, Venezuela e Uruguai) demonstraram apenas a circulação do subgenótipo IA (Mbayed *et al.*, 2002; Munné *et al.*, 2007; García-Aguirre *et al.*, 2008; Sulbaran *et al.*, 2010; Aguirre *et al.*, 2011). No entanto, no Brasil, além do subgenótipo IA, o subgenótipo IB também vem sendo associado com surtos (Costa-Mattioli *et al.*, 2001a; de Paula *et al.*, 2002; Amado *et al.*, 2011) e casos esporádicos de hepatite A (de Paula *et al.*, 2002; Fiaccadori *et al.*, 2006; Villar 2006b). A circulação concomitante dos subgenótipos IA e IB em surtos de hepatite A já foi descrita no Brasil (Costa-Mattioli *et al.*, 2001b; De Paula *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008; Amado *et al.*, 2011) e na África do Sul, Europa e EUA (Cristina

e Costa-Mattioli, 2007). Artigos recentes relataram a existência de cepas recombinantes IA/IB na Argentina (Aguirre *et al.*, 2011) e Uruguai (Liu *et al.*, 2010), apesar de nunca ter sido isolado o genótipo IB nestes países, sugerindo o aumento da cocirculação ou introdução de cepas recombinantes do Brasil para os países vizinhos.

O subgenótipo IB tem sido descrito principalmente na Europa, região Mediterrânea, e EUA (Nainan *et al.*, 2006; Pintó *et al.*, 2007; Normann *et al.*, 2008; Klevens *et al.*, 2010). O subgenótipo IB também vem sendo isolado em amostras ambientais de águas marinhas de Hong Kong, sendo o principal genótipo de HAV humano encontrado em águas marinhas desta região (Yang *et al.*, 2011). Na Espanha, um estudo realizado com cepas isoladas de surtos e casos esporádicos identificou duas novas cepas obtidas de marisco que provavelmente pertencem a um novo subgenótipo (IC) dentro do genótipo I (Pérez-Sautu, 2011b). Na Argentina, também já foi encontrada uma cepa do novo subgenótipo IC proveniente de uma amostra ambiental (Blanco Fernández *et al.*, 2012). No Brasil, ainda não existem relatos da ocorrência subgenótipo IC.

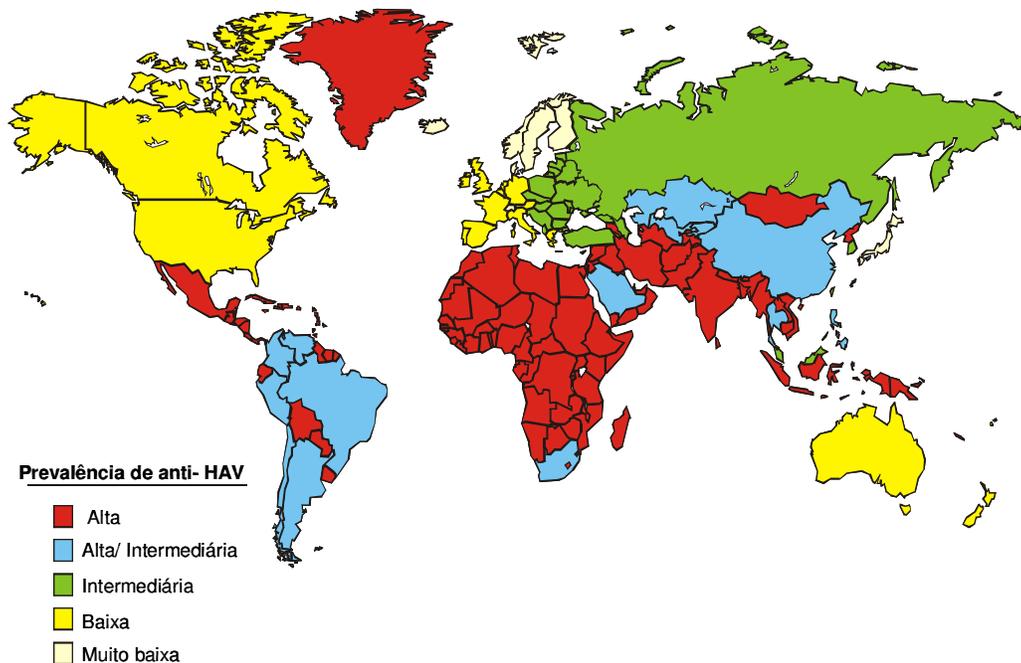
Os subgenótipos IIA e IIB são raramente reportados e, até o presente momento, foram identificadas as cepas CF-53 (IIA) na França e SLF88 (IIB) de Serra Leoa (Lu *et al.*, 2004). Porém, surpreendentemente, nos últimos anos têm se verificado casos autóctones de hepatite A causados pelo subgenótipo IIA na França ((Tjon *et al.*, 2005; Desbois *et al.*, 2010).

O subgenótipo IIIA é prevalente em países da Ásia Central e do Sudeste da Ásia (Costa-Mattioli *et al.*, 2003b; Arankalle *et al.*, 2006; Chadha *et al.*, 2009). Cepas têm sido isoladas da Índia, Alemanha e Japão (Heitmann *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2005; Kulkarni *et al.*, 2009; Miyamura *et al.*, 2012). Poucas informações foram obtidas até então sobre o subgenótipo IIIB; sabe-se apenas que este está associado com infecções em humanos na Dinamarca e no Japão (Robertson *et al.*, 1992; Mitsui *et al.*, 2006).

1.2 - Epidemiologia

Mundialmente, a endemicidade da infecção pelo HAV varia de acordo com padrões de higiene, condição sanitária e fatores sócio-econômicos (WHO, 2000). Estima-se a ocorrência de, aproximadamente, 1,5 milhões de novos casos de hepatite A em todo o mundo a cada ano (Vaughan *et al.*, 2014; Martin e Lemon, 2006), representando a causa mais comum de hepatite viral aguda (Vital *et al.*, 2008). A maior prevalência de infecções causadas pelo HAV ocorre em regiões com baixos níveis sócio-econômicos, como em países em desenvolvimento, onde o baixo padrão sanitário permite a transmissão do vírus (Hadler, 1991).

Nas áreas de alta endemicidade, o HAV é transmitido primariamente pelo contato pessoa-a-pessoa. Apesar de 90% das crianças se tornarem infectadas antes de completar os 10 anos de idade, a hepatite A não representa um grave problema clínico, e os surtos são relativamente incomuns. Em áreas de endemicidade moderada, a infecção ocorre mais frequentemente em adolescentes ou jovens. Em tais áreas, os surtos são comuns, e a transmissão ocorre de pessoa-a-pessoa ou através do consumo de alimentos e água contaminados (Tanaka, 2000). Já nas áreas de baixa endemicidade, a taxa da doença é muito baixa, e a infecção ocorre tipicamente em adultos. Casos de infecção são esporádicos e os indivíduos são, geralmente, contaminados durante viagens a áreas endêmicas. Nestas áreas, os surtos são comuns (Pham *et al.*, 2005) (Figura 1.3).



O Ministério da Saúde (MS) Brasileiro estima que 70% da população do país entrou em contato com o vírus da hepatite A (MS 2011). A doença ainda apresenta índices elevados de transmissão devido às baixas condições de saneamento básico ou até mesmo pela inexistência das mesmas em algumas regiões do país (Santos *et al.*, 2005). Porém, o país vive um momento de mudança do padrão de alta endemicidade para um padrão de endemicidade moderada (Pannuti *et al.*, 1985; Jacobsen e Wiersma, 2010; Vitral *et al.*, 2012) graças ao crescimento econômico do país e, conseqüentemente, à melhoria das condições de saneamento básico e planejamento ambiental. Em consequência a essas melhorias, foi observada uma diminuição da circulação do HAV (Clemens *et al.*, 2000; Vitral *et al.*, 2006; 2008; Jacobsen e Wiersma, 2010). Segundo dados do Ministério da Saúde, o Brasil vem apresentando uma diminuição da incidência. No ano de 2006, a taxa de incidência registrada foi de 9,1 casos por 100 mil habitantes enquanto em 2010 a taxa foi de 3,6 por 100 mil habitantes (MS 2012b).

Segundo o inquérito nacional conduzido em 27 capitais das cinco macrorregiões do Brasil, o país apresenta regiões com diferentes padrões de endemicidade. A região com maior soroprevalência para o HAV em indivíduos

com menos de 20 anos é a do Norte com 58,3%, seguido do Centro Oeste com 54,1%, Nordeste 53,1% e Distrito Federal com 41,6%. Todas essas regiões foram consideradas de endemicidade intermediária. Já a região Sul apresenta a menor soroprevalência com 30,8%, seguido da região Sudeste com 32,5%. Estas regiões são consideradas de baixa endemicidade (Ximenes *et al.*, 2010).

Nos últimos anos tem se observado uma correlação inversa entre a exposição ao HAV e nível socioeconômico da população (Pannuti *et al.*, 1985; Abuzwaida, 1987; Ferreira *et al.*, 1998; Pinho *et al.*, 1998; Zago-Gomes *et al.*, 2005). Normalmente, as instalações sanitárias são fornecidas primeiramente para regiões metropolitanas, o que explica por que a exposição ao HAV é mais comum em regiões rurais e cidades periféricas. Porém, alterações na soroprevalência do HAV não podem ser sempre consideradas como indicativas de melhorias socioeconômicas. Melhorias em condições sanitárias foram implementadas em várias áreas urbanas onde o nível socioeconômico dos habitantes permaneceu o mesmo (Vital *et al.*, 2006). Um estudo recente conduzido no Rio de Janeiro, Cuiabá e Manaus, com crianças e adolescentes de baixa condição socioeconômica que vivem em regiões periféricas, também demonstrou declínio na soroprevalência do HAV (Vital *et al.*, 2012). Este estudo revelou que 10%, 13,2% e 25,9% das crianças com menos de 5 anos foram soropositivas para o HAV no Rio de Janeiro, Cuiabá e Manaus, respectivamente. A prevalência de anticorpos anti-HAV encontrada foi menor do que tem sido reportado para população de baixa condição econômica (Ferreira *et al.*, 1998; Assis *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2006) e similar à população de maior renda mensal (Ferreira *et al.*, 1998; Dinelli *et al.*, 2006; Krebs *et al.*, 2011).

Embora venha ocorrendo uma redução da exposição ao HAV durante a infância (Jacobsen e Koopman, 2004), a persistência do vírus circulando no ambiente potencializa as chances de ocorrência de surtos epidêmicos (Vital *et al.*, 2006). Por tal razão, os dados sobre a proporção da população que é imune ou tem sido infectada com um vírus específico têm muitas aplicações epidemiológicas. Estes incluem a identificação de grupos susceptíveis em uma

determinada população (Tourinho *et al.*, 2011), a avaliação de programas de saúde (vacinação) e o uso destes dados em modelos matemáticos para prever surtos (Gayotto *et al.*, 1991).

1.3 – Diagnóstico da hepatite A

Testes bioquímicos das funções hepáticas podem ser utilizados com diagnóstico auxiliar para hepatites virais (De Paula, 2012). Tal infecção pode ser evidenciada pelo aumento dos níveis séricos de bilirrubina e enzimas hepáticas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), que podem preceder as manifestações clínicas e diminuição do tempo de protrombina (Hussain *et al.*, 2005). A principal alteração bioquímica sérica, durante a infecção sintomática pelos vírus hepatotrópicos, é a elevação de ALT maior que da AST. A ALT se localiza exclusivamente no citosol, enquanto AST é encontrado na mitocôndria (80%) e no citosol (20%). Sabe-se que as alterações histológicas no fígado nas hepatites virais agudas induzem lesão da membrana plasmática do hepatócito e liberação das enzimas do citoplasma (Hollinger e Emerson, 2007). As enzimas AST e ALT podem atingir taxas maiores que 1.000 UI/L (Hussain *et al.*, 2005), no entanto, como tal situação pode ocorrer por outros agentes que causam hepatite, a detecção destas alterações não é utilizada como diagnóstico final (Cuthbert, 2001).

O diagnóstico clínico da hepatite A aguda não permite diferenciá-la de outras formas de hepatites virais. Portanto, é necessário um diagnóstico sorológico específico que é confirmado por meio da detecção de anticorpos anti-HAV IgM, geralmente feito por ensaio imunoenzimático (ELISA) (De Paula, 2012; Hollinger e Emerson, 2007; Poddar *et al.*, 2002). A presença de anti-HAV IgG e a ausência do anti-HAV IgM pode ser usada para diferenciar a infecção passada da infecção recente. Como mencionado, embora existam seis genótipos do HAV, estes constituem apenas um sorotipo, não interferindo, portanto, no diagnóstico sorológico. Os testes para detecção de anticorpos anti-HAV totais (IgM e IgG) são

utilizados fundamentalmente para determinar o estado imune de indivíduos após vacinação ou infecção (Oba *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 1995).

Testes utilizando amostras de fluidos orais têm sido apresentados como uma forma alternativa aos testes convencionais para a detecção de anticorpos anti-HAV total no soro devido a sua simplicidade e facilidade na coleta das amostras. Apesar da sensibilidade da detecção do anti-HAV em fluidos orais ser de 1 a 3 unidades de log menor do que no soro, muitos estudos têm demonstrado os benefícios da implementação de testes utilizando tal espécime como uma ferramenta de triagem em investigações de surtos e estudos epidemiológicos (Tourinho *et al.*, 2011; Amado *et al.*, 2006; Oba *et al.*, 2000; Ochnio *et al.*, 1997; Jacobson *et al.*, 1995).

O uso da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) tem importante papel no diagnóstico precoce em casos agudos de etiologia desconhecida e em surtos epidêmicos ou em pacientes com sintomas e sem marcadores sorológicos para hepatites A, B e C. Tal método é a técnica mais sensível para a triagem de diversas espécimes clínicas como: suspensão fecal, soro, fluido oral e amostras ambientais (De Paula, 2012). Estudos que utilizaram o PCR de transcrição reversa (RT-PCR) demonstraram que o HAV RNA pode ser detectado previamente no sangue do que os anticorpos e que a viremia pode estar presente por um período muito mais longo durante a fase convalescente da hepatite A do que se imaginava. O diagnóstico molecular pode ser baseado na detecção de diferentes regiões genômicas virais: 5' não codificante, região mais conservada e utilizada para detecção e quantificação do HAV (Fujiwara *et al.*, 2002); e VP1 (Costa-Mattioli *et al.*, 2002a), VP3 (Munné *et al.*, 2007) e VP1/2A (De Paula *et al.*, 2007; De Paula *et al.*, 2002), regiões utilizadas na detecção do HAV RNA e em estudos de variabilidade genética através do sequenciamento gênico. É recomendado que, para confirmação do diagnóstico, mais de uma dessas regiões sejam detectadas. Dentre as variações na técnica de PCR, o PCR em tempo real é o mais recentemente utilizado para detecção e quantificação do HAV devido a alta

sensibilidade e a rapidez na análise das amostras (De Paula., 2012; Costa-Mattioli *et al.*, 2002a).

1.4 – Prevenção e controle da Hepatite A

A medida de prevenção mais simples contra a infecção pelo HAV é a utilização de métodos que previnem a contaminação das mãos, comida, água, ou outras fontes por fezes contaminadas de indivíduos infectados antes da doença clínica se tornar aparente. Lavar bem as mãos, assim como evitar práticas de trabalho que facilitam a contaminação das mesmas ao entrar em contato com crianças menores de dois anos também são medidas importantes para o controle da hepatite A (Hollinger, 1992).

A administração de imunoglobulinas, utilizada até 1995 como único método de imunização, ainda é recomendada na prevenção contra a doença em casos de viajantes que frequentarão áreas de alta endemicidade (CDC, 2009). No entanto, seu uso como profilaxia pré-exposição tem sido substituído pelas vacinas inativadas contra o HAV (Martin e Lemon, 2006).

Estão disponíveis no mercado, diversas vacinas consideradas seguras e eficazes contra a infecção pelo HAV. As duas mais comumente usadas são compostas por vírus inativados por formalina: a HAVRIX (Smith – Kline Beecham) e a VAQTA (Merck Sharpe e Dohme). Ambas possuem taxa de soroconversão de 91-100% após a administração da primeira dose vacinal em indivíduos anteriormente soronegativos.

Em 1988, foram avaliadas algumas cepas mutantes de HAV que foram diretamente isoladas da cultura celular de fezes humanas e propagadas em células certificadas para produção de vacinas (Provost *et al.*, 1988). Ao utilizar uma dessas vacinas experimentais atenuadas, anticorpos neutralizantes foram detectados a partir do terceiro até o sexto mês após a vacinação em todos os voluntários soronegativos (Midthun *et al.*, 1991). A vacina foi bem tolerada e o HAV não foi recuperado das fezes ou sangue dos indivíduos. No entanto, vacinas

com vírus vivos e atenuados têm sido utilizadas somente em países asiáticos, principalmente China e Índia (Faridi *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2005)

Vacinas seguras e eficazes contra o HAV têm sido licenciadas desde 1992, mas são significativamente subutilizadas. As vacinas são altamente imunogênicas, induzindo a produção de anticorpos anti-HAV que persistem por pelo menos 15 anos. Há, ainda, indicações de que tais vacinas conferem proteção a longo prazo. Baseado em evidências científicas atuais, a proteção vacinal é considerada de longo prazo após a aplicação de duas doses da vacina (Conference report, 2010; Mongillo *et al.*, 2010) (Quadro 1.1).

Quadro 1.1: Dosagem recomendada da vacina contra hepatite A e esquema de vacinação por faixa etária (Fonte: Fiore *et al.*, 2006).

Vacina	Idade (anos)	Concentração por dose	Volume (mL)	Doses	Reforço (meses)
HAVRIX	1-18	720 EL.U.*	0.5	2	6 a 12
	> 18	1440 EL.U.*	1.0	2	6 a 12
VAQTA	1-18	25 U**	0.5	2	6 a 18
	> 18	50 U**	1.0	2	6 a 18

* Unidades do ensaio imunoenzimático (ELISA) ** Unidades

As políticas de vacinação são variadas em todo o mundo, e vão desde a inclusão da vacina contra hepatite A em programa nacional universal de imunização para crianças a imunizações dirigidas a grupos de risco. Programas nacionais de imunização têm sido bem sucedidos, com boas taxas de cobertura e diminuição da incidência em até 90% (CDC, 1999). Países ou regiões que implementaram a imunização universal, como Israel (Mor *et al.*, 2010), Itália (Romanò *et al.*, 2009), Espanha (Dominguez *et al.*, 2008) e os Estados Unidos das

América (EUA) (Wasley *et al.*, 2005), Argentina (Vizzotti *et al.*, 2014) demonstraram um impacto positivo sobre a incidência da hepatite A.

Em países altamente endêmicos, programas de vacinação em larga escala contra a hepatite A não são recomendados. Já em países de endemicidade intermediária, onde uma proporção relativamente grande da população adulta é suscetível ao HAV e onde a hepatite A representa um ônus significativo para a saúde pública, a OMS recomenda que a vacinação infantil em grande escala possa ser considerada como um complemento à educação em saúde e saneamento básico. Em regiões de baixa endemicidade, a vacinação é indicada para indivíduos com maior risco de infecção, como os viajantes para áreas de endemicidade alta ou intermediária (WHO, 2000).

A vacinação contra hepatite A, antes de 2013, era indicada pelo Ministério da Saúde Brasileiro, em casos especiais, para indivíduos portadores de: hepatopatias crônicas de qualquer etiologia, inclusive portadores dos vírus da hepatite B e C; portadores do HIV, fibrose cística, trissomias; e portadores de hemoglobinopatias e coagulopatias; e indivíduos com imunodepressão terapêutica, candidatos a transplante, transplantados ou doadores de órgão sólido; (Ministério da Saúde, 2011). No entanto, o Senado Federal aprovou recentemente a inclusão da vacina contra hepatite A no calendário infantil. A vacina foi incorporada na rotina do Programa Nacional de Imunização (PNI) brasileiro através da portaria MS nº. 2, de 18 de Janeiro de 2013. O Ministério da Saúde aprovou a administração inicial de uma dose da vacina inativada para crianças a partir de 12 meses até 2 anos. A administração de uma dose da vacina foi justificada pelo MS uma vez que, entre os indivíduos inicialmente soronegativos, observou-se a soroconversão em mais de 99% dos indivíduos 4 semanas após a vacinação. O início da soroconversão após uma dose foi verificado ocorrendo paralelamente ao início da proteção contra a doença clínica da hepatite A. O PNI está monitorando a situação epidemiológica da hepatite A, visando a definição da inclusão ou não de uma segunda dose desta vacina no calendário de vacinação infantil brasileiro.

1.5 – Imunopatologia da hepatite A

A hepatite A é caracterizada como uma doença hepática aguda inflamatória autolimitada, na qual os sintomas podem variar desde a forma assintomática a doença leve, e até mesmo a hepatite fulminante (De Paula, 2012). A transmissão do HAV ocorre, usualmente, por via fecal-oral, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com o vírus, ou via contato pessoa-pessoa. A aglomeração de indivíduos susceptíveis associada aos maus hábitos higiênicos favorece, neste caso, a disseminação da doença (Morais *et al.*, 2006; De Paula *et al.*, 2002; Villar *et al.*, 2002). A transmissão sanguínea é rara e, quando ocorre, está mais frequentemente associada a transfusões de sangue (Cástková e Benes, 2009). Já o risco de transmissão parenteral é mais alto entre os usuários de drogas injetáveis (Diel e Schneider, 2001) e vem aumentando em indivíduos com este fator de risco (Cástková *et al.*, 2009). No quadro 1.2 estão demonstrados os grupos com risco de infecção para a hepatite A.

Quadro 1.2: Grupos expostos ao risco de infecção pelo HAV (Adaptado de Nguyen e Tran, 2009).

Grupo de risco	Fator de exposição ao risco
Viajantes	Viajantes de países desenvolvidos que se deslocam para países subdesenvolvidos e podem ser infectados pelo HAV
Homossexuais	Sexo anal-oral
Usuários de drogas injetáveis e não injetáveis	Utilização de drogas e seringas contaminadas com HAV
Indivíduos com distúrbio da coagulação sanguínea	Fator VII do plasma de doadores com Hepatite A
Indivíduos que trabalham manuseando alimentos	Contaminação com HAV na comida e bebida durante sua preparação
Indivíduos que trabalham com crianças (creche, escola)	Esses indivíduos são infectados ao entrar em contato com crianças com infecção assintomática ou branda
Trabalhadores da área de saúde	Transmissão do paciente para o profissional de saúde
Tratadores de primatas não-humanos	Transmissão de primatas suscetíveis ao HAV para o trabalhador

Em indivíduos infectados com HAV, as partículas virais viáveis são ingeridas e adsorvidas no intestino delgado, antes de atingir a circulação portal e serem transportadas para o fígado. O período de incubação varia entre 10 e 50 dias, dependendo do número de partículas virais infecciosas ingeridas; a infecção com poucas partículas resulta em um maior período de incubação (Koff, 1992).

Durante a infecção, o vírus ultrapassa a barreira do trato digestório e adere aos hepatócitos pelo receptor HAVCR1 onde inicia sua replicação (Tami *et al.*, 2007). Em seguida, ocorre a liberação de partículas virais para o sangue (viremia)

que pode estar presente por um longo período durante a fase convalescente da hepatite A (Yotsuyanagi *et al.*, 1993). A detecção do vírus nas tonsilas e saliva, logo após o aparecimento do vírus no sangue, sugere que um evento anterior de replicação pode ocorrer na orofaringe ou nas glândulas salivares (Amado *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 1989). Ainda existem dúvidas se existem sítios extrahepáticos de replicação primária. Acredita-se que, após a ingestão, o HAV alcance o fígado através do sistema porta hepático e seja capturado pelos hepatócitos através de receptores específicos (Cuthbert, 2001), replique-se e, a seguir, seja excretado no intestino pela bile (Asher *et al.*, 1995; Pinto *et al.*, 2002a).

Primatas não-humanos desenvolvem, pela inoculação experimental do HAV, lesões histológicas no fígado que incluem a) infiltração inflamatória portal, principalmente com linfócitos e macrófagos; b) aumento e ativação das células de Kupffer; e c) difuso dano hepatocelular. As alterações histológicas verificadas nos animais experimentalmente inoculados são semelhantes, porém menos intensas que em humanos com hepatite A (Amado *et al.*, 2010; LeDuc *et al.*, 1983).

Os mecanismos responsáveis pela injúria hepatocelular na hepatite A ainda não estão totalmente esclarecidos. Considera-se que o dano hepatocelular ocorra pela resposta imunomediada contra hepatócitos infectados e não pela direta ação citopática do vírus. Durante a fase aguda da doença observou-se a presença de células T citotóxicas CD8⁺ (Vallbracht *et al.*, 1989; Fleischer *et al.*, 1990) e CD4⁺ (Pinto *et al.*, 2002b) que secretam interferon- γ , com capacidade de estimular células inflamatórias para os locais de replicação viral no fígado, aumentando desta maneira a injúria hepatocelular (Maier *et al.*, 1988; Fleischer *et al.*, 1990; Pinto *et al.*, 2002b). Outras citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α), liberadas nos locais da injúria hepática relacionada ao HAV, podem recrutar células inflamatórias que são potencialmente desencadeadoras de dano e regeneração hepatocelulares (Pinto *et al.*, 2002b).

A detecção da enzima óxido nítrico sintetase, em macrófagos esplênicos e células de Kupffer, de primatas não-humanos com hepatite A, sugere a

contribuição do óxido nítrico, produto desta enzima, para os mecanismos citotóxicos hepáticos e de eliminação do vírus (Pinto *et al.*, 2000). As células NK (natural killer) do sistema imune inespecífico parecem ter também papel importante no dano hepatocelular antecedendo a ativação das células T citotóxicas (dos Santos *et al.*, 2009; Baba *et al.*, 1993).

A infecção pelo HAV não induz à síntese de interferon- α (IFN- α) e interferon- β (IFN- β) basicamente pelo fato de que a introdução desses interferons exógenos é capaz de eliminar infecções pelo HAV persistentes em fibroblastos humanos (Vallbracht *et al.*, 1984, 1985). Em cultura de células, o HAV inibe a transcrição do RNA mensageiro do interferon- β , induzido pela dupla fita de RNA (dsRNA) formada durante a replicação, e a apoptose induzida pelo acúmulo de RNA. Esta dupla capacidade preserva o local de replicação do vírus por um longo período, permitindo a propagação para as células vizinhas, facilitando ao vírus estabelecer a infecção (Brack *et al.*, 2002).

Na figura 1.4, podemos observar a cinética de infecção pelo HAV. Os marcadores bioquímicos (por exemplo, níveis séricos de ALT) e os sintomas clínicos estão correlacionados com a detecção do HAV RNA por PCR em tempo real em amostras de fezes, soro e saliva, e a resposta imune é medida como anticorpos anti-HAV IgM e IgG detectados por ensaio imunoenzimático em amostras de soro. Depois de 4 semanas de exposição ao HAV, há um aumento da ALT e o aparecimento da icterícia. As barras representam o tempo que é possível detectar o HAV RNA por PCR em tempo real. Antes do início dos sintomas clínicos, o HAV RNA pode ser detectado no soro durante cerca de 1-10 semanas (Fujiwara *et al.*, 2011; Normann *et al.*, 2004), no fluido oral durante cerca de 1-8 semanas (Amado *et al.*, 2010) e é excretado nas fezes durante aproximadamente 1-12 semanas (Tjon *et al.*, 2006). Os títulos de anti-HAV IgM têm seu pico durante a fase sintomática e diminuem para valores basais dentro de 3-6 meses dentro da fase sintomática. Títulos de anti-HAV IgG aumentam gradualmente, atingindo altos níveis durante a fase convalescente e permanecem por toda vida, conferindo imunidade contra reinfecção.

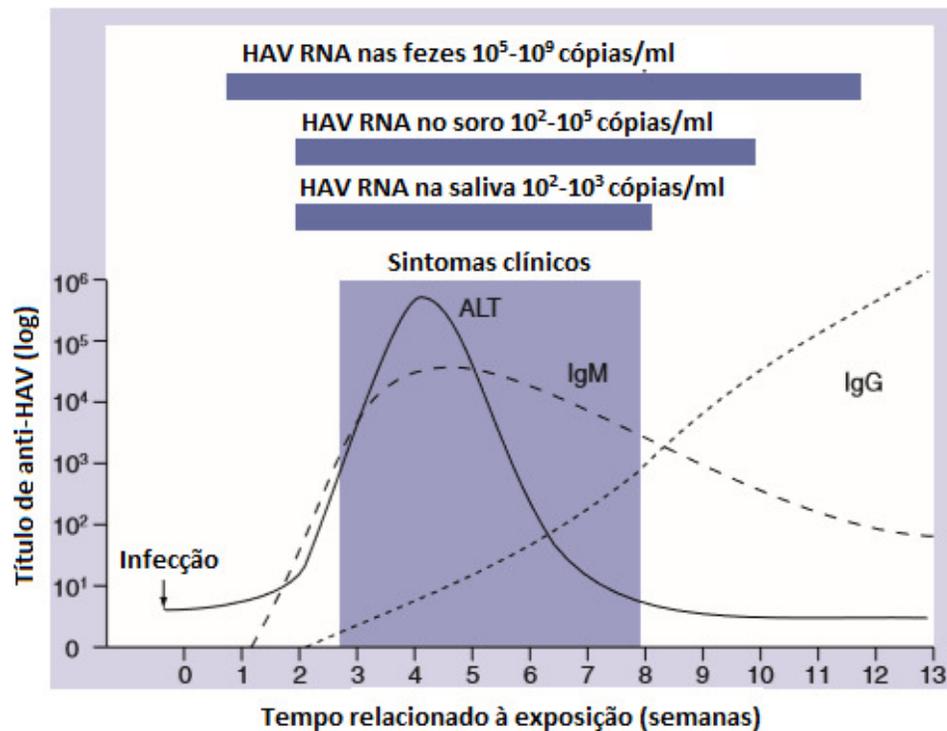


Figura 1.4: Curso temporal da infecção pelo HAV (Adaptado de De Paula, 2012).

O curso da infecção pelo HAV é dividido em quatro fases: período de incubação, fase pré-ictérica, fase de icterícia e fase convalescente. O período de incubação do vírus varia de 15 a 50 dias (Nainan *et. al.*, 2006; Paul *et. al.*, 1945). Durante esta fase, o indivíduo infectado permanece assintomático, apesar da replicação viral estar ocorrendo. Por este motivo, este é o período de maior risco de transmissão, já que resulta em grande quantidade de vírus eliminado nas fezes. Na fase pré-ictérica ocorre o aparecimento dos primeiros sintomas. Em seguida, ocorre uma deposição de pigmentos na pele e mucosas que assumem uma coloração amarelada, o que caracteriza a fase icterícia. As manifestações clínicas da hepatite A em adultos começam abruptamente, com os sinais clínicos e sintomas mais comuns sendo: urina escura, fadiga, febre, problemas gastrointestinais (tais como anorexia, náuseas, vômitos e dor abdominal), hepatomegalia e icterícia observada nas mucosas, pele e conjuntiva. Em crianças, a infecção pelo HAV pode levar a sintomas inespecíficos embora, na maioria dos casos a infecção seja assintomática, mostrando que a manifestação clínica e gravidade da doença está intimamente relacionada com a idade (De Paula, 2012).

A fase convalescente representa a fase de recuperação do indivíduo (O'grady, 1992; Nainan *et. al.*, 2006).

Clinicamente, a hepatite A segue um curso anictérico e assintomático em 90% das pessoas quando infectadas até cinco anos de idade (Ross *et al.*, 1991). Em áreas de alta endemicidade, a maioria dos indivíduos se torna infectado no início da infância. Nos adultos, a doença é mais grave e prolongada (Lednar *et. al.*, 1985), mas não leva a um estado crônico (Battegay *et al.*, 1995). A hepatite fulminante é uma rara complicação da hepatite A. O risco de falência aguda do fígado é de 0,5-1% (Akriviadis e Redeker, 1989). Em 15 a 20% dos pacientes pode ocorrer reincidência ou prolongamento da doença por até seis meses (Sjogren *et. al.*, 1987), sendo o HAV detectado por seis a doze meses após a infecção (Bower *et al.*, 2000). Anticorpos IgA específicos para o HAV (anti-HAV IgA) também são produzidos, por um tempo limitado, durante a infecção. O papel dos anticorpos IgA na resposta contra o HAV não é bem estabelecido. No entanto, a IgA foi postulada como carreadora auxiliando o transporte hepatotrópico do HAV, sendo especulado que esse mecanismo de carreamento contribui para os desfechos clínicos da doença (Dotzauer *et al.*, 2012).

Anticorpos contra as proteínas estruturais do HAV são produzidos também após imunização com a vacina contra hepatite A. Uma pequena proporção de pessoas vacinadas (8 a 20%) tem uma resposta transitória de anti-HAV IgM. Anticorpos anti-HAV IgG são produzidos por pessoas imunizadas com sucesso (91-100% após a primeira dose da vacina) (Sjogren *et. al.*, 1987). Anticorpos anti-HAV IgM e IgG são neutralizantes, pois reconhecem epítomos conformacionais formados pelas proteínas estruturais do capsídeo viral.

1.6- Interação HAV-Hospedeiro

O progresso em tecnologias genômicas tornou possível avaliar a contribuição dos fatores genéticos do hospedeiro para as doenças infecciosas (Manry e Quintana-Murci, 2013). A variabilidade nos resultados clínicos entre indivíduos e populações foi inicialmente atribuído à variabilidade genética dos

patógenos, mas estudos recentes têm demonstrado que o mesmo agente infeccioso poderia causar diferentes tipos de infecções (Casanova e Abel, 2005; Quintana-Murci *et al.*, 2007). Os resultados da variabilidade individual de uma infecção é uma complexa interação entre fatores ambientais, fatores microbianos e fatores genéticos e não genéticos do hospedeiro (Casanova e Abel, 2004).

É geralmente aceito que fatores virais associados com diferentes fatores demográficos, tais como idade, sexo e etnia têm um importante papel no desfecho clínico da infecção pelo HAV (Fujiwara *et al.*, 2002;. Sasbon *et al.*, 2010). No entanto, variações genômicas do hospedeiro responsáveis pela gravidade dessa doença não são bem compreendidos. É importante ressaltar que um número limitado de estudos têm abordado em detalhes a associação entre a gravidade da hepatite A e variações no genoma do HAV; e mais reduzidos ainda são os estudos que avaliam essa mesma associação com polimorfismos genéticos do hospedeiro (Vaughan *et al.*, 2014).

Em um estudo recente, os dados de genotipagem de 67 SNPs em 31 genes candidatos foram avaliados por associações estatísticas com a soropositividade de anticorpos anti-HAV usando amostras de DNA de 6.779 participantes, como parte da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição nos Estados Unidos, (Zhang *et al.*, 2012). Este estudo identificou associações genéticas significantes entre soropositividade de anti-HAV entre os americanos de descendência mexicana e variantes dos genes ABCB1, TGFB1, e XRCC1. Os autores mostraram que os indivíduos portadores do alelo funcional T no gene TGFB1, uma citocina reguladora multifuncional que desempenha um papel na patogênese da lesão do fígado durante a hepatite A (Flisiak *et al.*, 2005), foram mais propensos a infecção pelo HAV. Além disso, os portadores do alelo funcional T do gene XRCC1 apresentaram maior prevalência na infecção por este mesmo vírus, sugerindo que XRCC1 pode desempenhar um papel na susceptibilidade a esta infecção através de seus efeitos indiretos sobre a inflamação, o estresse oxidativo, e vias de apoptose (Vidal *et al.*, 2001). A expressão supra regulada do gene ABCB1 em hepatócitos humanos e ductos biliares nas hepatites virais pode oferecer proteção

contra a acumulação de constituintes tóxicos biliares e torna estas células resistentes ao estresse oxidativo (Ros *et al.*, 2003). Na população mexicano-americana, indivíduos com uma ou duas cópias do alelo T eram menos propensos a infecção pelo HAV, sugerindo que o gene ABCB1 pode afetar a susceptibilidade de um indivíduo a esta infecção através do seu efeito protetor no fígado (Zhang *et al.*, 2012).

Em um estudo recente, mostrou-se que fatores genéticos afetam a resposta de anticorpos anti-HAV após a vacinação contra hepatite A. Certos alelos de HLA foram encontrados como sendo associados com a evolução da infecção em crianças. A tipagem de alta resolução do HLA-DRB1* mostrou um aumento na frequência do alelo DRB1* 1301 nos controles saudáveis, em comparação com crianças com formas prolongadas da infecção pelo HAV. No entanto, esta predisposição para uma infecção prolongada não parece estar ligada a uma maior susceptibilidade à infecção em geral. O aumento da frequência deste alelo não foi observado entre crianças com infecção autolimitada pelo HAV (Fainboim *et al.*, 2001).

A infecção pelo HAV tem sido sugerida como uma predisposição para hepatite autoimune em indivíduos susceptíveis (Rahaman *et al.*, 1994; Vento *et al.*, 1988). No entanto, a relação entre a infecção pelo HAV, os genes de HLA e hepatite autoimune não é clara (Czaja *et al.*, 2002; Fainboim *et al.*, 1994). O alelo HLA-DRB1* 1301, que foi associado com a infecção prolongada pelo HAV, não foi correlacionado com a hepatite autoimune, apesar deste alelo ser potencialmente ligado a persistência de danos no fígado (Fainboim *et al.*, 2001). Curiosamente, em países onde a hepatite autoimune não é comumente relatada, como o Japão, a frequência do gene, DRB1* 1301, é muito baixa (Saito *et al.*, 2000). Além disso, o haplotipo DRB1* 1302, que difere do alelo HLA-DRB1* 1301 apenas por um aminoácido, parece ter um caráter protetor em relação ao desenvolvimento de hepatite autoimune pediátrica do tipo 1 (Pando *et al.*, 1999).

A associação significativa entre o polimorfismo 2E1 no gene do citocromo P450 (CYP2E1) e a hepatite em pacientes indianos também tem sido relatada (Deka *et al.*, 2010). Este estudo analisou dados da genotipagem do gene CYP2E1 e os genótipos do HAV como um marcador de prognóstico para predisposição de pacientes com doença hepática. Os pacientes foram acompanhados durante a fase aguda da infecção. A prevalência do alelo Dral mutante entre os pacientes com hepatite viral foi significativamente maior nos casos de infecção pelo HAV. Assim, a presença do alelo Dral pode desempenhar um papel na lesão do fígado causada pela infecção aguda deste vírus.

Embora os fatores genéticos que predispõem para a susceptibilidade a formas graves de hepatite induzida pelo HAV estão ainda em investigação, é possível que a variabilidade na gravidade da doença induzida por este vírus possa ser regulada, também, pelo polimorfismo no gene que codifica o receptor para o HAV nas células, o HAVCR1, também conhecido como TIM1 (Feigelstock *et al.*, 1998). Tem sido sugerido que o HAV pode modular o sistema imune do hospedeiro, uma vez que HAVCR1 é expresso por células T CD4+ ativadas durante o desenvolvimento de células T auxiliares (Th2) e regula a produção de citocinas (McIntyre *et al.*, 2001). Além disso, o HAVCR1 é uma importante molécula co-estimuladora de células T que regula a indução de tolerância e de ativação dessas células (Rodriguez-Manzanet *et al.*, 2009). Através do sequenciamento do DNA complementar a partir de linfócitos humanos, uma inserção de seis aminoácidos (INS) foi identificada no resíduo 157, denominado 157insMTTTVP. A inserção 157insMTTTVP está localizada no centro de uma região extracelular do tipo mucina que é necessária para o desencapsulamento eficiente do HAV (Silberstein *et al.*, 2003). Assim, a inserção 157insMTTTVP pode afetar a eficiência de entrada do vírus na célula.

A variante polimórfica do HAVCR1 também tem sido associada com um aumento do risco para a hepatite grave (Kim *et al.*, 2011). Entre crianças argentinas com insuficiência hepática aguda induzida pelo HAV, verificou-se que o polimorfismo 157insMTTTVP (forma longa) do HAVCR1 foi associado com a

gravidade da doença. Esta associação pode ser explicada em parte pelo fato de que a forma longa de TIM-1 se liga ao HAV mais eficientemente do que a forma curta. Além disso, as células NKT, que expressam a forma longa de HAVCR1, têm uma maior citotoxicidade sobre células infectadas pelo HAV, sugerindo que o HAV pode induzir respostas imunes mais vigorosas e com maior lesão hepática em indivíduos com a forma longa do HAVCR1. O HAVCR1 está associado, também, a atopia em indivíduos soropositivos para o HAV, sugerindo que este pode favorecer a seleção natural de alelos mais curtos do HAVCR1, assim, reduzindo a gravidade da hepatite induzida pelo vírus (Kim *et al.*, 2011).

Durante a infecção pelo HAV, a maioria dos pacientes desenvolvem a doença sintomática leve ou assintomática. No entanto, um pequeno número de pacientes desenvolvem hepatite grave que pode apresentar risco de vida (Kim *et al.*, 2011). Os resultados destes estudos podem ajudar a explicar a variabilidade na gravidade desta doença. No quadro 1.3 é possível visualizar os genes e a função das proteínas codificadas por eles que podem estar relacionados aos diferentes desfechos clínicos da hepatite A.

Quadro 1.3: Função das proteínas codificadas pelos genes associados aos diferentes desfechos clínicos da hepatite A.

Gene alvo	Função da Proteína Codificada	Referência
INFL3	Citocina com atividade antiviral, antitumor e imunomoduladora	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=INFL3
TGFBeta1	Ajuda a controlar o crescimento, proliferação, diferenciação, motilidade e apoptose celular	http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TGFB1
XRCC1	Corrige defeitos reparando quebras na dupla-fita de DNA	http://www.uniprot.org/uniprot/P18887
ABCB1 (MDR1)	Atua como transportador de várias moléculas entre as membranas do meio intra e extracelular	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB1
TM1 (HAVCR1)	Pode desempenhar um papel no desenvolvimento da célula T-helper e a regulação da asma e das doenças alérgicas. No caso da hepatite A, funciona como um receptor de superfície celular para o vírus. Pode desempenhar um papel na lesão e reparação renal	http://www.uniprot.org/uniprot/Q96D42
CYP2E1	Codifica um membro da superfamília de enzimas do citocromo P450. As proteínas do citocromo P450 catalisam diversas reações envolvidas no metabolismo de fármacos e da síntese de colesterol, esteróides e outros lípidos.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2E1
TTC40	Tetratricopeptide repeat domain 40. A repetição tetratricopeptide (TPR) é um motivo estrutural. Consiste em um motivo degenerado de 34 aminoácidos identificado numa ampla variedade de proteínas.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54777
RELN	Este gene codifica uma grande proteína da matriz extracelular que parece controlar as interações célula-célula críticas para o posicionamento celular e a migração neuronal durante o desenvolvimento do cérebro.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RELN
NCR3LG1	É um ligante para receptores das células Natural Killers e parecem desempenhar um papel imunomodulador na resposta TLR e na sinalização de citocinas pró-inflamatórias	Matta et al., 2013
STXBP1	Este gene codifica uma proteína de ligação a sintaxina. A proteína codificada parece desempenhar um papel na liberação de neurotransmissores através da regulação da sintaxina, uma proteína de ligação do receptor transmembranar.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STXBP1
GPC1	É um glicofosfatidilinositol (GPI) ligada proteína da superfície celular e membro de um grande grupo de proteínas de ligação de sulfato de heparano que estão envolvidos na morfogênese, aderência, quimiotaxia, e na inflamação	Fransson, 2003; Parish, 2006
DNAH12	Tem atividade de ATPase	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DNAH12
MST1R	É um receptor tirosina-quinase da superfície celular, que regula respostas imunes hepáticas e é expresso em macrófagos e hepatócitos.	McDowell et al., 2002
NFATC4	É um regulador de células T e da resposta imune inata, é altamente expresso no fígado.	Bukong et al., 2011
HLA-DQA1	Ela desempenha um papel central no sistema imunitário através da apresentação de péptidos derivados de proteínas extracelulares	Falah et al., 2013
ESR1	Os efeitos dos estrogênios são mediados por receptores de estrógeno (ESRS). Quando estrogênio se liga ao seu receptor, ativa e regula múltiplos genes, como NF-kB, TNF α e IL-6	Maeda et al., 2010; Nakagawa et al., 2009; Shimizu, 2003
IL-10	Citocina com efeitos pleiotrópicos na imunoregulação e inflamação. Regula negativamente a expressão de citocinas Th1, MHC-II Ags, e moléculas co-estimulatórias em macrófagos. Aumenta a sobrevivência das células B, proliferação e produção de anticorpos.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586
TNF-alpha	Citocina pró-inflamatória multifuncional. É secretada principalmente por macrófagos. Está envolvida na regulação de um vários processos biológicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo de lípidos, e coagulação.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124
miR-164a	Atividade imunomoduladora e supressor de tumor	Jiang et al., 2013
TLR3	Desempenha um papel fundamental no reconhecimento do patógeno e ativação da imunidade inata. Reconhece dsRNA associado com infecção viral, e induz a ativação de NF-kB e a produção de INF do tipo I.	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR3
TANK	Proteína adaptadora que desempenha um papel na imunidade inata antiviral	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TANK

1.7 – Falência Hepática Aguda

A falência hepática aguda (do inglês “*Acute Liver Failure*” - ALF) foi inicialmente definida como o aparecimento simultâneo de defeitos de coagulação e encefalopatia num quadro de insuficiência hepática aguda de qualquer tipo e na ausência de doença hepática pré-existente (Trey e Davidson, 1970). Ao longo dos anos, definições variaram no que diz respeito ao tempo de aparecimento dos sinais de insuficiência hepática. No entanto, um padrão central de sinais e sintomas clínicos caracteriza todas as causas de ALF a medida que a lesão hepática grave evolui com o passar do tempo, independentemente da etiologia. São eles: prolongado tempo de protrombina/ INR (“*International normalized ratio*” - INR), a diminuição da função mental, vasodilatação periférica, características de síndrome de resposta inflamatória sistêmica e, finalmente, falência múltipla dos órgãos (Bernal e Wendon, 2013). A insuficiência hepática aguda é uma síndrome na qual, além do fígado, outros órgãos podem ser acometidos, como o cérebro, rins, pulmões, medula, sistema circulatório e sistema imunológico. Apesar da apresentação clínica relativamente uniforme, as diferentes causas da ALF estão associados com resultados notavelmente diferentes (Ostapowicz *et al.*, 2002). Assim, o desfecho é definido pela etiologia, que deve ser determinada para avaliação prognóstica e, sempre que possível, para aplicação da terapêutica adequada de causa específica (Bernal *et al.*, 2015).

São numerosas as causas da ALF, tais como hepatites virais, uso de medicamentos, doenças metabólicas, exposição a tóxicos, isquemia e uma série de outras causas listadas no quadro 1.4. A investigação criteriosa de todos os possíveis agentes etiológicos da ALF, entretanto, nem sempre é bem sucedida, e cerca de 40% a 50% dos casos ficam sem etiologia determinada (Acharya *et al.*, 2002). O uso de drogas com reação imprevisível pode ser uma das causas da ALF, mas uma droga de efeito hepatotóxico previsível, o paracetamol, tem sido relatada em todo o mundo como uma das causas mais frequentes da ALF, tanto em adultos como em crianças (Ostapowicz *et al.*, 2002). Tanto a hepatite A como a hepatite B aguda, também, podem evoluir para ALF em percentuais variáveis,

geralmente < 1% dos casos. Somente a ação do vírus não parece causar lesão hepática, e a evolução mais grave da infecção parece ser consequência da resposta imunológica mais vigorosa do hospedeiro (Locarnini *et al.*, 2006). No caso da hepatite A, nenhuma mutação genética viral foi associada aos casos de ALF (dos Santos *et al.*, 2009). Já para hepatite B, tanto mutações da região pré-core do genoma viral quanto a reativação em casos de hepatite B crônica, ou uso de imunossupressores ou quimioterapia pode, ocasionalmente, levar ao desencadeamento da ALF (Mindikoglu *et al.*, 2006). No entanto, fatores imunogenéticos do hospedeiro relacionados a este desfecho mais grave da doença ainda necessitam ser elucidados principalmente, nos casos de hepatite A onde poucas informações foram reportadas na literatura.

Quadro 1.4: Causas de falência hepática fulminante.

Etiologia	
Infeciosas	Vírus das hepatites A e B Citomegalovírus Vírus da Herpes simples Epstein-Barr vírus Paramixovírus Adenovírus Vírus da Dengue Vírus da Febre Amarela
Metabólicas	Doença de Wilson Deficiência de alpha-1-antitripsina Galactosemia Tirosinemia
Exposição à drogas ou toxinas:	
a) Relacionada à dose	Acetaminofeno CCl4 Amanita phalloides Fósforo amarelo
b) Idiossincrática	Halotano Isoniazida Rifampicina Tetraciclina Dissulfiram Síndrome de Reye (ácido acetilsalicílico) cetoconazol Anti-inflamatórios não hormonais Antitireoidianos, hidatoínas, alpha-metildopamina Isqêmicas/hipóxia Doença venoclusiva Disfunção primária hepática pós transplante Choque hepático isquêmico Insuficiência cardíaca
Outros	hepatite auto-imune Doença de Still do adulto Linfoma Metástases hepáticas Esteatose aguda na gravidez Hipertermia Hepatectomia parcial Criptogênica

Ao longo dos últimos anos, a frequência relativa das causas da ALF evoluiu. As diferenças na etiologia entre países em desenvolvimento e desenvolvidos estão bem caracterizadas, a Europa e os Estados Unidos apresentam uma alta incidência de toxicidade por paracetamol levando a ALF junto com lesão hepática induzida por drogas devido a agentes de prescrição, menos comum, mas igualmente importante. Em contrapartida, Sul da Ásia, Hong Kong e América do Sul têm uma maior incidência dos vírus das hepatites, especificamente hepatite E no Paquistão, hepatite B em Hong Kong, e hepatite A na América do Sul (Acharya *et al.*, 2002; Ostapowicz *et al.*, 2002).

Um importante fator para a compreensão das características clínicas e o prognóstico da ALF é a relação do padrão de lesão, determinado pela etiologia, curso da doença e sua duração. Nomes diferentes foram aplicados, mas os termos hiperaguda, aguda e sub-aguda são muitas vezes utilizados (O'grady, 1992). O período de lesão ativa nos casos de paracetamol e isquemias pode ser medido em horas, e é auto-limitado. Estes pacientes são caracterizados como tendo um padrão "hiperagudo", e, em muitos casos, tem uma recuperação rápida apesar da falência múltipla de órgãos. Este padrão é muito diferente da maioria das outras formas de ALF, usualmente denominada "Aguda ou sub-aguda", na qual o padrão de lesão evolui ao longo de 1-4 semanas, e não é auto-limitado, mas sim de longa duração. A lesão hepática induzida por drogas, pelas hepatite A e B, pela hepatite auto-imune e a maioria dos casos indeterminados terão um padrão sub-aguda e uma pior taxa de sobrevivência (Bernal *et al.*, 2015; O'grady, 1992).

Os resultados dos testes hepáticos diferem sensivelmente entre os pacientes. Os casos hiperagudos são caracterizados por baixos níveis de bilirrubina e níveis surpreendentemente elevados de aminotransferases, característica da necrose celular, como mecanismo patogênico primário (Tabela 1.1). Em contrapartida, os pacientes sub-agudos têm transaminases séricas menores e maiores valores séricos de bilirrubina, decorrentes de uma lesão hepática mais gradual e num maior intervalo de tempo. Os mecanismos patogênicos variam provavelmente entre as etiologias, mas a apoptose e a

ativação da resposta imunitária adaptativa são importantes para a ALF (Bernal *et al.*, 2015; O'grady, 1992).

Tabela 1.1: Dados demográficos, laboratoriais e desfecho clínico de acordo com a etiologia de ALF, n=2000 adultos dos EUA 1998-2014. (Adaptado de Bernal *et al.*, 2015)

	APAP n=916	DILI n=220	Indeterminado n=245	HAV n=36	HBV n=142	Outros n=441
Idade (média em anos)	37	46	39	49	43	45
Sexo (% de femininos)	76	69	59	44	44	71
Icterícia ao coma (média de dias)	1	12	11	4	8	7
Grau de HE ≥ 3 (%)	53	35	48	56	52	38
ALT (média em UI)	3773	640	865	2275	1649	681
Bilirrubina (média em $\mu\text{mol/L}$)	74	339	361	210	315	238
Transplante (%)	9	40	42	33	39	32

APAP -Paracetamol; DILI -dano ao fígado induzido por outras drogas; HAV – vírus da hepatite A; HBV -vírus da hepatite B; HE – encefalopatia hepática.

A ALF leva à deficiência funcional grave do fígado, com alteração de todo o seu metabolismo. A capacidade de metabolização de substâncias endógenas como hormônios, bilirrubinas, vitaminas e mesmo medicamentos encontra-se prejudicada. Diversos fatores de coagulação sanguínea, sintetizados no fígado e de meia-vida curta, também estão diminuídos na ALF, como o fator V e a atividade da protrombina. O mau funcionamento das células de Kupffer permite o livre trânsito de micro-organismos e endotoxinas provenientes do intestino, que alcançam a circulação sanguínea, piorando as funções metabólicas e favorecendo a instalação de infecções e a liberação de citocinas com graves consequências circulatórias, agravando ainda mais a doença (Shawcross *et al.*, 2004).

Os primeiros sintomas não são específicos – náusea, mal-estar, fadiga. O sintoma que mais chama a atenção é a encefalopatia, que pode aparecer antes ou depois da icterícia. Vários fatores extra-hepáticos podem contribuir para a encefalopatia como hipoglicemia, hiponatremia, uremia, hipóxia e sepse. A

evolução da encefalopatia é classicamente descrita em quatro estágios, iniciando-se com alterações de comportamento (grau I), distúrbios de sono-vigilância (grau II) e desorientação têmporo-espacial (grau III). Alternâncias de um grau para outro podem ocorrer em horas, evoluindo para estágios mais avançados como o pré-coma e o coma hepático (grau IV). Em concomitância com o desenvolvimento de alterações neuropsíquicas próprias da encefalopatia hepática, é comum a instalação de infecções, insuficiência renal e hemorragias, sendo possível caracterizar a síndrome de falência múltipla dos órgãos (Hoofnagle *et al.*, 1995).

Os fatores prognósticos da ALF podem ser estáticos ou dinâmicos. Têm sido considerados como fatores prognósticos estáticos a idade do paciente e a etiologia da ALF. Apesar da infecção pelo vírus da hepatite A e a intoxicação com paracetamol serem consideradas de melhor prognóstico, estas apresentam taxas de mortalidade ao redor de 50%. Já os casos de etiologia provavelmente viral, classificados como não A-E, bem como vários medicamentos, costumam ter pior prognóstico (O'Grady *et al.*, 1989) (quadro 1.5).

Quadro 1.5: Fatores prognósticos de falência hepática fulminante

<i>Fatores</i>	<i>Mau Prognóstico</i>
<i>Fatores Estáticos</i>	
Idade	< 10 ou > 40 anos
Etiologia	hepatites virais (exceto hepatite A), Drogas (exceto acetaminofen)
<i>Fatores Dinâmicos</i>	
Nível de bilirrubina	>18mg/dL
Tempo de ação da Protrombina	>100 segundos
Fator V	<20%
Grau de Encefalopatia hepática	grau IV
Necrose hepatocelular	extensa
Complicações	presentes

A terapia específica só pode ser instituída a partir da identificação etiológica da ALF. Na intoxicação pelo acetaminofeno, o uso de N-acetilcisteína deve ser o mais precoce possível, nas primeiras 10-24 horas. O tratamento desta enfermidade induzida pelo herpes simples é a administração de aciclovir (Montalbano *et al.*, 2005). No caso da hepatite B, é indicado o uso de antivirais orais, como a lamivudina (em doses habituais) embora outros antivirais de ação rápida, como o entecavir sejam promissores. A correção dos fatores que possam levar à piora da lesão hepática e da encefalopatia, como hemorragias, hipóxia, alterações hemodinâmicas, hidroeletrólíticas ou do metabolismo ácido-básico, são urgentes e mandatórias. Embora, todas essas medidas possam ser aplicadas, o transplante hepático é o tratamento definitivo, capaz de salvar a vida desses pacientes (Bernal e Wendon, 2013). No quadro 1.6 encontramos o conjunto de medidas terapêuticas a serem tomadas nos casos de ALF.

Quadro 1.6: Condutas terapêuticas nas diferentes manifestações clínicas da falência hepática fulminante.

Complicação	Conduta terapêutica
<i>Encefalopatia hepática</i>	Encefalopatia hepática, dieta hipoproteica Evitar sedativos Lavagem intestinal Lactulose (?) - evitar em caso de edema cerebral Transplante hepático
<i>Edema Cerebra</i>	Monitorar pressão intracraniana Evitar movimentos Evitar aspiração nasotraqueal Cabeceira a 45° Manitol
<i>Hipoglicemia</i>	Controle constante da glicemia Soro glicosado em perfusão contínua
<i>Insuficiência renal</i>	Diálise Hemofiltração
<i>Insuficiência respiratória</i>	Monitorar gases arteriais Intubação orotraqueal Ventilação mecânica
<i>Hipotensão</i>	Dopamina
<i>Infecção</i>	Culturas frequentes Antibioticoterapia
<i>Hemorragia</i>	Plasma fresco/plaquetas Fatores de coagulação Bloqueadores de H ₂ / Inibidores de bomba de prótons

2 – RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Mundialmente, a infecção pelo HAV é a forma mais comum de hepatite aguda, sendo responsável por 1.5 milhões de novos casos a cada ano (Vaughan *et al.*, 2014; Martin e Lemon, *et al.*, 2006). Clinicamente, a infecção por este vírus segue um curso auto-limitado e assintomático em 90% dos casos de crianças infectadas até 5 anos de idade; em adultos, a doença é mais grave e prolongada. A ALF é uma complicação que apresenta uma taxa de mortalidade de até 80% dos casos não transplantados. A infecção pelo HAV é uma das causas mais importantes de ALF, ocorrendo em até 1% dos casos reportados (O'Grady *et al.*, 1993). No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, as melhorias nas condições de higiene e saneamento tem contribuído para a mudança no perfil epidemiológico da hepatite A. Atualmente, devido a estas melhorias, houve um aumento no número de indivíduos suscetíveis no país e, conseqüentemente, de surtos em faixas etárias mais avançadas, o que é preocupante, pois a doença tende a ser mais grave.

A evolução clínica da hepatite A, assim como as outras hepatites virais, apresenta um estado dinâmico de interações entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro. O curso natural dessas infecções varia muito entre indivíduos. Enquanto alguns pacientes apresentam extensão no quadro clínico com progressão mais rápida da doença hepática, outros têm um prognóstico relativamente benigno (Lee *et al.*, 2013). No entanto, o mecanismo molecular responsável pela gravidade da doença não está bem compreendido (Vaughan *et al.*, 2014).

Na última década, o grupo de pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz buscou relacionar fatores virais aos diferentes padrões de infecções clínicas causados pelo HAV no Brasil (Dos Santos *et al.*, 2009a, 2009b). Contudo, fatores epigenéticos do hospedeiro associados a essa infecção no país permanecem elusivos, principalmente em relação à ALF.

Muitos fatores de risco têm sido avaliados com o objetivo de identificar pacientes que podem ter uma predisposição a um desfecho mais grave da doença. Os estudos epidemiológicos de surtos e casos esporádicos são importantes para investigar a disseminação do vírus e estabelecer diferentes fatores virais e socioambientais associados ao curso da infecção pelo HAV. Neste mesmo cenário, atualmente, estudos de caso-controle, de genes candidatos e de associações alélicas tem sido realizados com o objetivo de se investigar fatores genéticos do hospedeiro e o curso da doença (*Amini e Poustchi 2012; Mosbrugger et al., 2010*).

Variações no desfecho clínico da hepatite A destacam a importância de se identificar os mecanismos subjacentes da patogênese viral e da progressão da doença, bem como, de se estabelecer os fatores genéticos do hospedeiro que poderiam contribuir para predisposição a ALF. A análise de mutações genéticas em genes-chave e a análise da relação com a ALF induzida pelo HAV promoverá uma melhor compreensão da patogênese da doença.

3 – OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a variabilidade genética do HAV e o polimorfismo genético do hospedeiro em associação aos diferentes cursos clínicos da hepatite A

Objetivos específicos

3.1 – Avaliar, através de estudo transversal, a prevalência de marcadores de infecção aguda e passada em populações expostas ao HAV e possíveis fatores de risco a esta infecção.

3.2 – Otimizar o método de PCR em tempo real e avaliar o potencial de oligonucleotídeos sintéticos como curva padrão para detectar, quantificar e acompanhar a infecção precoce pelo HAV.

3.3 - Acompanhar a transmissão horizontal do HAV em ambiente domiciliar, através de métodos sorológicos e moleculares

3.4 – Investigar os fatores moleculares e imunogenéticos do hospedeiro responsáveis pela diversidade na gravidade da hepatite A.

3.4.1. Analisar o perfil genético de polimorfismos no gene *INFL3* associado aos diferentes desfechos clínicos da hepatite A.

3.4.2. Investigar a variabilidade genética do hospedeiro, incluindo polimorfismos genéticos do sistema imune, associados aos casos clássicos e de falência aguda do fígado (ALF) provocada pela infecção do vírus da hepatite A.

4 – ARTIGOS CIENTÍFICOS

Esta tese originou cinco artigos científicos que estão listados a seguir na ordem em que as publicações serão discutidas.

4.1 – **Tourinho, R.S.**; de Almeida A. J. ; Villar, L.M.; Murat, P.G.; Capelin, G. J. M.; Motta-Castro, A. R. C.; de Paula, V. S. Cross-Sectional Study of Hepatitis A Virus Infection in the Pantanal Population before Vaccine Implementation in Brazil: Usage of Non-Invasive Specimen Collection. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 7357-7369, 2015.

4.2 - **Tourinho, R.S.** ; Almeida, C. R. ; Lemos, A. S. ; Gardinali, N. R. ; Vieira, Y. R.; Schmidt-Chanasi, J. ; De Paula, V. S. Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR. *J. Genet . Genom. Res. , 2:013*, 2015.

4.3 - Lima L.R; Almeida, A. J. ; **Tourinho, R. S.** ; Hasselmann, B. ; Lewis-Ximenez, L. L. ; De Paula, V. S. . Evidence of person-to-person transmission of hepatitis A virus in household outbreaks. *PLoS One*, v. 9, e102925, 2014.

4.4 - **Tourinho RS**, Fabrício-Silva GM, Cardoso-Oliveira J, Lewis-Ximenes LL, de Almeida AJ, Pôrto LC, Pinto MA, De Paula VS. The effect of host *iINFL3* polymorphism on hepatitis A clinical outcomes. (*submetido*)

4.5 – **Tourinho, RS**; Vaughan, G; Rossi, L; Rahal, P; Valencio, C; Lewis-Ximenes, LL; Pinto, MA; Forbi, JC; Khudyakov, Y; de Paula, VS. Acute liver failure upon hepatitis A virus infection: Role of host nucleotide polymorphisms. (*submetido*)

ARTIGO 1 - Cross-Sectional Study of Hepatitis A Virus Infection in the Pantanal Population before Vaccine Implementation in Brazil: Usage of Non-Invasive Specimen Collection.

Int. J. Environ. Res. Public Health **2015**, *12*, 7357–7369; doi:10.3390/ijerph120707357

OPEN ACCESS

International Journal of
Environmental Research and
Public Health
ISSN 1660-4601
www.mdpi.com/journal/ijerph

Article

Cross-Sectional Study of Hepatitis A Virus Infection in the Pantanal Population before Vaccine Implementation in Brazil: Usage of Non-Invasive Specimen Collection

Renata Santos Tourinho ^{1,*}, Adilson José de Almeida ², Livia Melo Villar ², Paula Guerra Murat ³, Gina Jonasson Mousquer Capelin ³, Ana Rita Coimbra Motta Castro ³ and Vanessa Salete de Paula ¹

¹ Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Cx Postal 926. Av., Brasil 4365, CEP: 21045-900 Rio de Janeiro/RJ, Brazil; E-Mail: vdepaula@ioc.fiocruz.br

² Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Cx Postal 926. Av., Brasil 4365, CEP: 21045-900 Rio de Janeiro/RJ, Brazil; E-Mails: adilsonjoal@ioc.fiocruz.br (A.J.A.); lvillar@ioc.fiocruz.br (L.M.V.)

³ Departamento de Farmácia Bioquímica, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Cx Postal 549, Brazil; E-Mails: paulamurat@hotmail.com (P.G.M.); gina.jm@hotmail.com (G.J.M.C.); arcm.castro@hotmail.com (A.R.C.M.C.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: renatats@ioc.fiocruz.br; Tel.: +55-21-2562-1876; Fax: +55-21-2270-6397.

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 13 April 2015 / Accepted: 25 May 2015 / Published: 30 June 2015

Abstract: Population-based prevalence studies are essential tools for screening of hepatitis A and provide important data on susceptible groups. However, surveillance in isolated communities is difficult because of the limited access to these areas and the need for blood sample collection. This study aimed to determine the anti-HAV prevalence using oral fluid samples to provide an alternative tool for epidemiological studies that might be useful for vaccination-related decisions. The study population was composed of 224 volunteers from South Pantanal, aged 3 to 86 years old. This study was performed using oral fluids, previously standardized for anti-HAV antibody detection, which were collected using a ChemBio device. Eluates were tested using modified commercial EIA to detect anti-HAV antibodies. The overall prevalence was 79.1%, corresponding to 178 reactive EIA tests out

of 224 samples. The age stratified data revealed a prevalence of 47.8% between 0–10 years, 84% in 11–20 years and 91.9% in subjects older than 21 years. Results indicate that hepatitis A prevalence was higher in adolescents and adults, corroborating the literature reports. Thus, oral fluid samples could replace serum in HAV epidemiological studies in isolated communities as they are efficient at detecting anti-HAV antibodies.

Keywords: hepatitis A; epidemiology; oral fluid; vaccine

1. Introduction

Hepatitis A is one of the most frequently reported vaccine-preventable diseases and remains endemic in many areas of the world, especially in developing countries [1]. Hepatitis A virus (HAV) has been observed in heterogeneous pockets where susceptible or exposed individuals may co-exist. Therefore, there is a threat of a small and localized outbreak of HAV infection or even a larger outbreak in such areas [2].

The association of HAV infection with poor access to sanitation and hygiene behavior patterns, age-dependent clinical outcome of the disease, and lifelong immunity determine the different patterns of HAV infection observed around the world [3,4]. In areas marked by an increased prevalence rate of hepatitis A, the infection is primarily observed among children, and most of them present with asymptomatic to self-limiting disease, generating protective immunity against hepatitis A [5]. Conversely, in areas marked by an intermediate prevalence rate for hepatitis A, a limited proportion of the adult population is reported to be immune. As a result, community-wide epidemics, resulting from person-to-person transmission may occur [5]. Finally, in areas marked by a low prevalence rate for hepatitis A, residents may be at risk for infection by travel to areas where hepatitis A is endemic and ingestion of local contaminated foods [5]. Despite the mild course of the infection during childhood, hepatitis A may cause significant morbidity and mortality among adolescents and adults [6]. Fulminant hepatitis may also develop among individuals with a predisposing underlying liver disease [7].

As a result of the epidemiological pattern transition of hepatitis A in Brazil, two distinct epidemiological patterns may be observed: the North, Northeast, and Midwest regions with intermediate endemicity of hepatitis A and the South and Southeast regions with low endemicity [8,9]. This situation was highlighted in the discussion about universal mass hepatitis A vaccination program in the country. In early 2013, a vaccine against hepatitis A was incorporated into the routine children vaccination program in Brazil as a result of a cost-effective analysis to control HAV infection [5]. To determine whether the hepatitis A vaccine is effective as part of the national vaccination program, data regarding the prevalence and epidemiology of hepatitis A are essential.

In the epidemiological context, the use of oral fluids to determine HAV protection has been demonstrated to be appropriate because of its advantages and high accuracy for surveillance studies in different groups [10,11]. The advantages of oral specimen collection and evaluation of performance of several oral fluid collection devices in modified EIAs have led to increased interest in the use of oral fluid samples as a surrogate for serum samples. These aspects are very important, especially if we consider difficult-to-access areas where blood collection may be challenging, such as the Pantanal

region. Pantanal is a vast wetland area, located mostly in Brazilian territory, which is of great interest for epidemiological studies [12] as its hydrography can be a source element for hepatitis A virus transmission. Nevertheless, there are no data concerning local hepatitis A virus circulation in this region. Thus, the purpose of the present study was to determine the anti-HAV prevalence using oral fluid samples to provide an alternative tool for epidemiological studies that might be useful for vaccination-related decisions.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Aspects

Ethical permission for collecting and testing samples was provided by the FIOCRUZ Ethical Committee (number 536/2009), and written informed consent was obtained from each participant before enrollment in the study. The specimens and questionnaires were anonymous, and feedback was provided to all participants of the study, including their hepatitis results. All unprotected participants were advised to be vaccinated against hepatitis A.

2.2. Sample Collection and Processing

Matched serum and oral fluid samples were collected from each participant. Five milliliters (mL) of peripheral blood was drawn by venipuncture using hypodermic needles and multiple sterile vacuum blood collection tubes (Vacutainer system, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Subsequently, the samples were centrifuged at 1300 g at 25 °C for 5 min, and the sera were stored at -20 °C. Oral fluid samples were obtained by means of a commercial device, ChemBio® (ChemBio Diagnostic Systems Inc., New York, NY, USA), which consists of a sponge swab attached to a handle with a plastic tube containing 500 µL of a preservative solution. The swab was rubbed along the teeth/gum line for a minute. The collected oral fluid was concentrated at the bottom of a plastic tube after centrifugation at 1300 g at 25 °C for 10 min and stored at 2–8 °C until analysis.

2.3. Sample Screening

Total anti-HAV antibodies were detected by using a commercially available, solid-phase enzyme immunoassay (EIA) based on the principle of immunocapture (ImmunoComb®II HAV Ab, Origenics, Israel). The solid phase is a comb composed of 12 projections, each one being sensitized at two positions: an upper spot with a monoclonal anti-HAV antibody (internal control) and a lower spot with rabbit anti-human IgG and IgM antibodies.

The test was performed according to the manufacturer's instructions and adapted for oral fluid samples by adding 25 µL of oral fluid without sample diluents, as reported by Tourinho *et al.* [1]. The test results were visible as gray-blue spots on the surface of the projections, and the visual results were determined semi-quantitatively by comparing the intensity of the color of the lower spot on each projection with the color scale provided by the manufacturer. The samples results were classified according to the cut-off point (10 IU/L) of the test. A spot with an intensity greater to or equal than the cut-off point indicated the presence of protecting anti-HAV levels. A spot with an intensity slightly less than that of the cut-off was considered an equivocal result, and the sample was retested. A spot

with a lower intensity than that of the cut-off was considered negative. The ImmunoComb®II HAV Ab assay has a limit of detection of 10 IU anti-HAV antibodies/L, which is regarded as the minimum concentration of anti-HAV antibodies that indicates immunization has occurred. All of the samples were assayed three times, and identical visual readings for HAV were consistently observed by multiple investigators (three).

2.4. Studied Population

Encompassing approximately 140,000 km² across the territories of Brazil, Bolivia, and Paraguay, the Pantanal region is one of the world's largest freshwater wetland ecosystems [12]. In Brazil, where 85% of the total area of Pantanal is located, 65.5% of the area is situated in the State of Mato Grosso do Sul (MS), and it is known as South Pantanal [13,14]. The region is ecologically classified into sub-regions that differ in the degree of vegetation, flooding and physiognomy [15–17] (Figure 1).



Figure 1. Sub-regions of the Brazilian Pantanal area (adapted from Globo Rural-Edition[©] 288-October 2009).

This study was performed in four isolated communities of the Paraguay river basin sub-region, in areas that are 661 km far from the city of Campo Grande (MS). This region is sparsely populated, and it is characterized by wetlands that hinder access to the coastal communities; access is only available by boat. The whole population of the study area is estimated to be 691 individuals. The survey was conducted between April 2010 and June 2010, and a total of 224 paired serum and oral fluid samples were collected using a non-probability sampling method from all consenting occupants of households. The samples were placed into a cool box and returned to the laboratory after 15 days of collection for total anti-HAV screening test. The sociodemographic characteristics of each member of the study were obtained by means of questionnaires. No individual had a history of hepatitis A vaccination.

2.5. Statistical Analysis

Data are presented as frequencies. The performance of the laboratory tests with the collected oral fluid samples was determined by comparing the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values and their respective 95% confidence intervals (95% CI) with the serum results, which were used as a gold standard control. The linear and weighted kappa (k) statistic was used to evaluate the rate of agreement between the oral fluid and serum anti-HAV antibody status. According to the strength of the agreement, the k value was interpreted as follows [18]: <20%, poor; 21% to 40%, fair; 41% to 60%, moderate; 61% to 80%, good; and 81% to 100%, very good. To compare proportions, the chi-square (χ^2) test for independence with Yate's continuity correction, χ^2 for trends, and Fisher's exact test (when appropriate) were used. A two-tailed $p < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were performed with MedCalc for Windows, version 8.1.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) and GraphPad InStat version 3.05 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Study Design and Patients

This study was a population-based cross-sectional survey, and it was conducted in four isolated communities living in difficult-to-access areas of the Paraguay River basin, South Pantanal, Brazil: Serra do Amolar/São Lourenço, Paraguay Mirim, Porto da Manga, and Passo do Lontra.

3.2. Sociodemographic Characteristics of the Studied Population

In this seroepidemiological survey, a total of 224 matched serum and oral fluid samples were obtained from volunteers, 100 (43.9%) of which were female and 124 (56.1%) male. The age of the study population ranged from 3 to 86 years, with a mean age of 26.91 ± 17.35 years. Because of the lack of data on anti-HAV prevalence in the studied communities, as many volunteers as possible were recruited from among the local residents (Table 1).

Table 1. Sociodemographic characteristics of the study subjects ($n = 224$).

Variable	Studied Population (n)	Studied Population (%)
<i>Age group (years)</i>		
0–10	46	20.53%
11–20	50	22.32%
21–30	47	20.98%
31–40	26	11.61%
41–50	29	12.95%
>50	26	11.61%
<i>Gender</i>		
Female	100	43.90%
Male	124	56.10%

Table 1. Cont.

Variable	Studied Population (n)	Studied Population (%)
<i>Race/Ethnicity</i>		
Caucasian	67	29.91%
Brown	55	29.00%
Black	41	18.30%
Amerindian	37	16.52%
Asian	8	3.57%
Not reported	6	2.70%
<i>Educational level</i>		
None	19	8.48%
First grade	156	69.60%
Second grade	32	14.29%
Graduated	14	6.25%
Not reported	3	1.38%
<i>Family income</i>		
1 minimum salary	107	47.80%
2 minimum salary	95	42.40%
3 minimum salary	19	8.50%
Not reported	3	1.30%
<i>Community</i>		
Serra do Amolar/São Lourenço	45	20.09%
Paraguai-Mirim	60	26.78%
Porto da Manga	23	10.27%
Passo do Lontra	96	42.86%

3.3. Anti-HAV Antibodies Detection in Serum and Oral Fluid Samples

Total anti-HAV antibodies were detected in 181/224 serum samples by using a commercial immunoassay, ImmunoComb II HAV Ab (Orgenics), corresponding to a hepatitis A seroprevalence of 80.8%. The prevalence of total anti-HAV antibodies in oral fluid was 79.01%, corresponding to 177 reactive samples. Analysis of the test performance revealed the following results: sensitivity of 97.24% (95% CI: 0.936 to 0.991), specificity of 97.67% (95% CI: 0.877 to 0.999), positive predictive value of 99.44% (95% CI: 0.968 to 0.999), negative predictive value of 89.36% (95% CI: 0.768 to 0.964), and Kappa coefficient of 91.7% (95% CI: 0.851 to 0.982).

3.4. Factors Associated with Total Anti-HAV Positivity

According to bivariate analysis, age and ethnicity were found to be statistically associated with total anti-HAV positivity in serum samples. However, only age was a factor statistically related to anti-HAV positivity in oral fluid samples (Table 2).

Table 2. Factors associated with anti-HAV antibodies positivity in serum and oral fluid (ChemBio®) samples from individuals living in South Pantanal, Brazil ($n = 224$).

Variable	Serum			Oral Fluid (ChemBio®)		
	Positive ($n = 181$)	Negative ($n = 43$)	<i>p</i>	Positive ($n = 177$)	Negative ($n = 47$)	<i>p</i>
Age (years), median (interval)	27 (5.0–86.0)	10 (3.0–72.0)	<0.0001	26 (5.0–86.0)	11 (3.0–77.0)	<0.0001
Gender, n (%)			0.9175			0.9953
Male	101 (55.8)	23 (53.4)		98 (53.3)	26 (55.3)	
Female	80 (44.2)	20 (46.6)		79 (46.7)	21 (44.7)	
Race/Ethnicity, n (%)			0.0312			0.2797
Caucasian	33 (18.2)	14 (32.6)		51 (28.8)	16 (34.0)	
Brown	58 (32.0)	7 (16.3)		57 (32.2)	8 (17.0)	
Black	53 (29.3)	8 (18.6)		32 (18.1)	9 (19.3)	
Amerindian	26 (14.4)	11 (25.6)		26 (14.7)	11 (23.4)	
Asian	6 (3.3)	2 (4.6)		6 (6.4)	2 (4.2)	
NR ^a	5 (2.8)	1 (2.3)		5 (2.8)	1 (2.1)	
Domestic residents, n (%)			0.1589			0.7919
0–1	17 (9.4)	5 (11.6)		16 (9.0)	6 (12.8)	
2–3	56 (30.9)	4 (9.3)		53 (29.9)	7 (14.9)	
4–5	41 (22.7)	14 (32.6)		40 (22.6)	15 (31.9)	
6–7	33 (18.2)	9 (20.9)		32 (18.1)	10 (21.3)	
>7	33 (18.2)	10 (23.3)		35 (19.8)	8 (17.0)	
NR	1 (0.6)	1 (2.3)		1 (0.6)	1 (2.1)	
Educational level, n (%)			0.8396			0.7248
None	14 (7.7)	5 (11.6)		14 (7.9)	5 (10.7)	
First grade	127 (70.2)	29 (67.5)		126 (71.2)	30 (63.8)	
Second grade	28 (15.5)	4 (9.3)		25 (14.1)	7 (14.9)	
Graduated	10 (5.5)	4 (9.3)		10 (5.6)	4 (8.5)	
NR	2 (1.1)	1 (2.3)		2 (1.2)	1 (2.1)	
Familiar income (minimum salary), n (%)			0.7331			0.8599
≤1	82 (45.3)	25 (58.1)		81 (45.7)	26 (55.3)	
2	85 (47.0)	10 (23.3)		82 (46.3)	13 (27.7)	
3	12 (6.6)	7 (16.3)		12 (6.8)	7 (14.9)	
NR	2 (1.1)	1 (2.3)		2 (1.2)	1 (2.1)	
Drinking water (source), n (%)			0.2302			0.4174
Untreated (river)	56 (30.9)	11 (25.6)		56 (31.6)	11 (23.4)	
Treated (river) ^b	107 (59.2)	30 (69.8)		104 (58.6)	33 (70.2)	
Bottled (mineral water)	16 (8.8)	1 (2.3)		5 (2.8)	2 (4.2)	
NR	2 (1.1)	1 (2.3)		2 (1.2)	2 (4.2)	
History of hepatitis A, n (%)			0.0903			0.2506
No	161 (89.0)	42 (97.7)		159 (89.8)	44 (93.7)	
Yes	16 (8.8)	0 (0.0)		15 (8.5)	1 (2.1)	
NR	4 (2.2)	1 (2.3)		3 (1.7)	2 (4.2)	

Table 2. Cont.

Variable	Serum		p	Oral Fluid (ChemBio ^b)		p
	Positive (n = 181)	Negative (n = 43)		Positive (n = 177)	Negative (n = 47)	
Community, n (%)			0.0562			0.1157
Passo do Lontra	81 (44.8)	15 (34.2)		77 (43.5)	19 (40.4)	
Porto da Manga	22 (12.2)	1 (2.3)		22 (12.4)	1 (2.1)	
Paraguay-Mirim	43 (23.7)	17 (39.5)		43 (24.3)	17 (36.2)	
Serra do Amolar/São Lourenço	35 (19.3)	10 (23.3)		35 (19.7)	10 (21.3)	

^a Not Reported; ^b including treated water by chlorination, filtration and boiling.

The seroprevalence of HAV infection ranged from 70.2% in Caucasian individuals to 89.2% in brown subjects. The positivity for these antibodies in serum was higher in brown and black and subjects, 89.2% and 86.9%, respectively, compared with the other ethnicities of the study.

The proportions of anti-HAV positivity were considered to be similar in both types of biological samples by age group, with a maximum difference of 7.7% in the age group of 31–40 years old. The seroprevalence progressively increased from 50% in children 0–10 years up to 100% among individuals aged 31–40 years. A similar trend was observed for oral fluid samples, where disease prevalence ranged from 50% in children 0–10 years to 93.10% among individuals who were 41–50 years old. There was a significant increase in prevalence, approximately 40%, between the ages of 0–10 and 11–20 years of age, for both types of clinical specimens (Figure 2).

A difference in the anti-HAV positivity rate among the communities studied, which ranged from 71.67% (43/60) in the community of Paraguay-Mirim to 95.65% (22/23) in Porto da Manga, was also observed. The prevalence of HAV infection was higher in communities closer to urban centers, such as Passo do Lontra (84.38%) and Porto da Manga (95.65%), than in most remote and difficult-to-access communities, such as Paraguay-Mirim (71.67%) and Serra do Amolar/São Lourenço (77.78%) (Figure 3). Despite this variability, anti-HAV positivity was not significantly associated with a particular community.

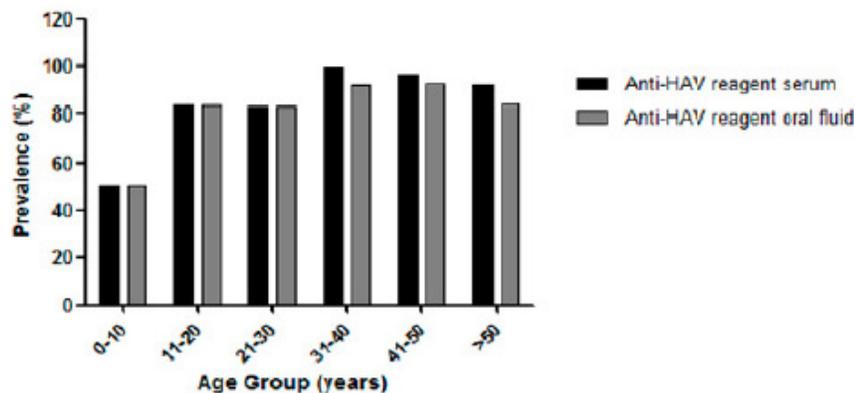


Figure 2. Total anti-HAV prevalence in serum and oral fluid by age group from individuals living in difficult-to-access areas of South Pantanal, Brazil.

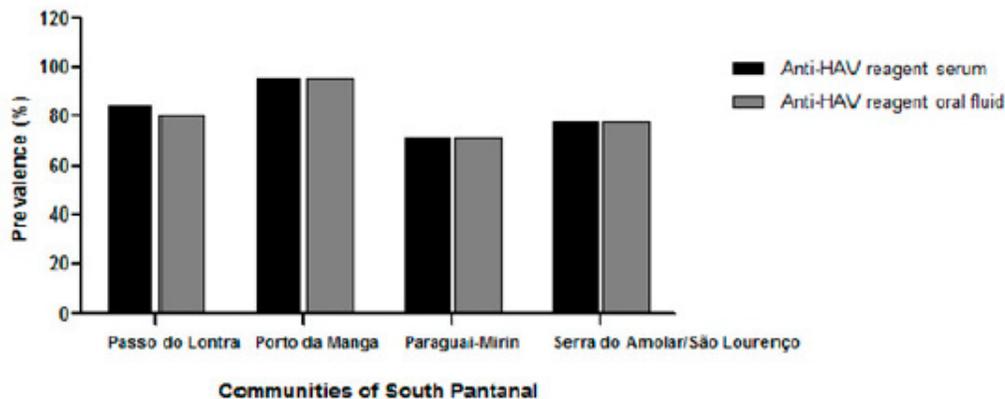


Figure 3. Total anti-HAV prevalence in serum and oral fluid by communities from individuals living in difficult-to-access areas of South Pantanal, Brazil.

4. Discussion

In Brazil, HAV infection accounts for the majority of viral hepatitis notifications. Changes in the epidemiological patterns have been described in some regions due to improvements in sanitation and socioeconomic conditions. Nevertheless, all three patterns can be identified even within a particular geographical region [8]. HAV infection has an intermediate prevalence in Brazil, and it is considered endemic to the country [19].

The issue of implementing a national vaccination program against hepatitis A in Brazil has been widely discussed in view of the difficulty of establishing a unified project in an area of continental dimensions and macro-regions with distinct epidemiological profile of the disease. In Brazil, HAV available vaccine is imported, and it has been recently evaluated for inclusion in the childhood vaccination schedule. For determination of national policies on vaccination, the results of epidemiological studies and cost-benefit must be carefully considered and the impact on public health must be balanced [2,20].

For epidemiological monitoring purposes, the use of oral fluid samples is of great importance because, as shown by different authors [21–26] this specimen type has many clinical advantages and appears to be accurate enough to be used in such situations. However, many of these studies have proposed the use of oral fluid as an alternative tool for blood samples. If the benefits of such clinical specimen have been demonstrated, and its efficiency in enzyme immunoassays has sometimes proven, why not use it as a substitute for blood collection?

As demonstrated in this study, oral fluid samples may, in fact, serve as a substitute for blood collection. However, it is important to select the most appropriate device for sample collection and field studies [1,27], providing accurate information to determine the epidemiological profile, the need for immunization and disease control strategies [28].

To determine the efficiency oral fluid samples and its applicability in field research as a substitute for serum, the first investigation of HAV infection in difficult-to-access communities was held in the South Pantanal. Using samples collected from different individuals belonging to these communities, we observed a close relationship between the HAV prevalence in oral fluid samples collected with

ChemBio® (79.01%) device and HAV seroprevalence (81.25%). The agreement between the results of oral fluid and the “gold standard” (serum) was 97.32% (sensitivity = 97.24% and specificity = 97.67%).

A high overall anti-HAV prevalence rate (81.25%) was found compared with that observed in the general population (55.7%) in the South and Southeast regions of Brazil. However, this rate was lower than the rate found in the North (92.8%) and more similar to the rate obtained in the Northeastern region of Brazil (76.5%) [29].

Although some studies have demonstrated that urban populations have lower rates of HAV infection than rural populations [30–32], in this study, communities closer to urban centers had a higher rate of HAV exposure than the rate observed among individuals from the rural areas (91.65% and 84.38% *versus* 71.67% and 77.78%, respectively). Similarly, Almeida and colleagues [33] found a higher HAV prevalence in urban areas (87.4%) compared with rural settlement areas of Cavunge (79.7%), a semiarid region of Bahia state in Northeast Brazil.

Furthermore, in the present investigation, people living in these communities reported having a low income. Despite the fact that anti-HAV positivity was not significantly associated with water source, the inhabitants of these rural areas do not have adequate facilities for sanitation and use river water for washing and consumption as well as for their personal hygiene. Urban communities are located near the hotel industry and farms, where poor sanitation conditions persist, and environmental sanitation projects either do not exist or are still under construction. Apart from sanitation facilities and hygiene conditions, the residents' houses are located close to each other, and the high population density in low-income urban communities can contribute to the spread of the hepatitis A virus.

The anti-HAV seroprevalence was significantly associated with age. Stratification by age revealed that although the overall prevalence was 81.25%, only 50% of children aged 0–10 years are immune to the disease. This rate is higher than that observed by De Alencar Ximenes and colleagues [8] in the capitals of the Northeast and Midwest regions of Brazil, 32% and 34%, respectively. However, the prevalence is lower (60%) than in individuals younger than 10 years in the Amazon region [34]. Data from these studies demonstrate a low prevalence in this age group in these regions.

Despite the prevalence of HAV infection having been linked to race/ethnicity, this association appears more to reflect a regional characteristic.

The combination of the collection and preservation of samples with the stabilizers in ChemBio® device methodology is considered as an important strategy to avoid problems of rapid degradation during antibody storage, as reported by Gröschl and colleagues [35] for other collectors.

5. Conclusions

The use of oral fluid specimens is a helpful tool for understanding the hepatitis A prevalence in areas where no data are available and might be useful for vaccination-related decisions since it is efficient in detecting susceptible individuals.

Acknowledgments

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) for the financial support.

Author Contributions

Renata Santos Tourinho carried out the epidemiological study, performed the immunoassays and drafted the manuscript. Adilson José de Almeida participated in the design of the study and performed the statistical analysis. Livia Melo Villar carried out and coordinated the epidemiological study in the community of Passo do Lontra. Paula Guerra Murat and Gina Jonasson Mousquer Capelin carried out and coordinated the epidemiological study in the community of Porto da Manga. Ana Rita Coimbra Motta Castro carried out and coordinated the epidemiological study in the communities of Paraguai-Mirim and Serra do Amolar/São Lourenço. Vanessa Salete de Paula conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors disclose no actual or potential conflicts of interest, including any financial, personal or other relationships with people or organizations within two years of the beginning of this study that could inappropriately influence the study.

References

1. Tourinho, R.S.; de Almeida, A.J.; Amado, L.A.; Villar, L.M.; Castro, A.R.; de Paula, V.S. Could oral fluid be used to evaluate anti-hepatitis A virus status in individuals living in difficult-to-access areas? *Vaccine* **2012**, *30*, 6421–6426.
2. Sartori, A.M.; de Soárez, P.C.; Novaes, H.M.; Amaku, M.; de Azevedo, R.S.; Moreira, R.C.; Pereira, L.M.; Ximenes, R.A.; Martelli, C.M. Cost-effectiveness analysis of universal childhood hepatitis A vaccination in Brazil: Regional analyses according to the endemic context. *Vaccine* **2012**, *30*, 7489–7497.
3. Jeong, S.H.; Lee, H.S. Hepatitis A: Clinical manifestations and management. *Intervirology* **2010**, *53*, 15–19.
4. Matheny, S.C.; Kingery, J.E. Hepatitis A. *Am. Fam. Phys.* **2012**, *86*, 1027–1034.
5. Shapiro, C.N.; Margolis, H.S. Worldwide epidemiology of hepatitis A virus infection. *J. Hepatol.* **1993**, *18*, S11–S14.
6. Mackinney-Novelo, I.; Barahona-Garrido, J.; Castillo-Albarran, F.; Santiago-Hernández, J.J.; Méndez-Sánchez, N.; Uribe, M.; Chávez-Tapia, N. Clinical course and management of acute hepatitis A infection in adults. *Ann. Hepatol.* **2012**, *11*, 652–657.
7. Jayakumar, S.; Chowdhury, R.; Ye, C.; Karvellas, C.J. Fulminant viral hepatitis. *Crit. Care Clin.* **2013**, *29*, 677–697.
8. De Alencar Ximenes, R.A.; Martelli, C.M.; Merchán-Hamann, E.; Montarroyos, U.R.; Braga, M.C.; de Lima, M.L.; Cardoso, M.R.; Turchi, M.D.; Costa, M.A.; de Alencar, L.C.; *et al.* Hepatitis Study Group. Multilevel analysis of hepatitis A infection in children and adolescents: A household survey in the Northeast and Central-west regions of Brazil. *Int. J. Epidemiol.* **2008**, *37*, 852–861.

9. Ximenes, R.A.; Pereira, L.M.; Martelli, C.M.; Merchán-Hamann, E.; Stein, A.T.; Figueiredo, G.M.; Braga, M.C.; Montarroyos, U.R.; Brasil, L.M.; Turchi, M.D.; *et al.* Methodology of a nationwide cross-sectional survey of prevalence and epidemiological patterns of hepatitis A, B and C infection in Brazil. *Cad. Saude Pública* **2010**, *26*, 1693–1704.
10. Parry, J.V. Detection of viral antibodies in saliva specimens as an alternative to serum. Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1989**, *27*, 245–246.
11. Morris-Cunnington, M.C.; Edmunds, W.J.; Miller, E.; Brown, D.W.G. A population-based seroprevalence study of hepatitis A virus using oral fluid in England and Wales. *Am. J. Epidemiol.* **2004**, *159*, 786–794.
12. Lopes, M.H. Prevenção da hepatite B e delta. *Braz. J. Infect. Dis.* **2006**, *10*, S72–S78. (In Portuguese)
13. Alho, C.J.R.; Lacher, T.E., Jr.; Gonçalves, H.C. Environmental degradation in the Pantanal ecosystem. *BioScience* **1988**, *38*, 164–171.
14. Moraes, A.S.; Resende, E.K.; Rodrigues, C.A.G.; Mauro, R.A.; Galdino, S.; Oliveira, M.D.; Crispim, S.M.A.; Vieira, L.M.; Soriano, B.M.A.; Abreu, U.G.P.; *et al.* Embrapa Pantanal: 25 anos de pesquisas em prol da conservação do Pantanal, os desafios do novo milênio. In *III Simpósio Sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal: O Desafio do novo Milênio*; Embrapa Pantanal: Corumbá, Brazil, 2001; p. 55. (In Portuguese)
15. Adámoli, J. Fisiografia do Pantanal. In *Recursos Forrageiros Nativos do Pantanal Mato-Grossense*; Allem, A.C., Valls, J.F.M., Eds.; Documento 8, Embrapa Cenargen: Brasília, Brazil, 1987; pp. 15–22.
16. Silva, J.V.; Abdon, M.M. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **1998**, *33*, 1703–1711. (In Portuguese)
17. Magalhães, N.W. O Pantanal: Aspectos gerais. In *Conheça o Pantanal*, 1st ed.; Cap 1, Terragraph: São Paulo, Brazil, 1992; pp. 7–12.
18. Altman, D.G. *Practical Statistics for Medical Research*; Chapman and Hall: London, UK, 1991.
19. Fiore, A.E.; Wasley, A.; Bell, B.P. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Recomm. Rep.* **2006**, *55*, 1–23.
20. FitzSimons, D.; Hendrickx, G.; Vorsters, A.; van Damme, P. Hepatitis A and E: Update on prevention and epidemiology. *Vaccine* **2010**, *28*, 583–588.
21. Parry, J.V. Simple and reliable salivary test for HIV and hepatitis A and B virus diagnosis and surveillance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1993**, *694*, 216–233.
22. McIntyre, P.G.; Laszlo, J.; Appleyard, K.; Ogden, G.R. Modified enzyme immunoassay to detect hepatitis C virus antibodies in oral fluid. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **1996**, *15*, 882–884.
23. Ochnio, J.J.; Scheifele, D.H.; Ho, M.; Mitchell, L.A. New, ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine and disease-induced hepatitis A virus-specific immunoglobulin G in saliva. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 98–101.
24. Oba, I.T.; Spina, A.M.M.; Saraceni, C.P.; Lemos, M.F.; Senhoras, R.C.F.A.; Moreira, R.C.; Granato, C.F.H. Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples. *Rev. Med. Trop. São Paulo* **2000**, *42*, 197–200.

25. Chohan, B.H.; Lavreys, L.; Mandaliya, K.N.; Kreiss, J.K.; Bwayo, J.J.; Ndinya-Achola, J.O.; Martin, H.L., Jr. Validation of a modified commercial enzyme-linked immunoassay for detection of human immunodeficiency virus type 1 immunoglobulin G antibodies in saliva. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2001**, *8*, 346–348.
26. Amado, L.A.; Villar, L.M.; de Paula, V.S.; de Almeida, A.J.; Gaspar, A.M.C. Detection of hepatitis A, B and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 149–155.
27. Chang, C.K.; Cohen, M.E.; Bienek, D.R. Efficiency of oral fluid collection devices in extracting antibodies. *Oral Microbiol. Immunol.* **2009**, *24*, 231–235.
28. Robertson, S.E.; Cutts, F.T.; Samuel, R.; Diaz-Ortega, J.L. Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries: A global review, Part II, Vaccination against Rubella. *Bull. World Health Organ.* **1997**, *75*, 69–80.
29. Clemens, S.A.; Da Fonseca, J.C.; Azevedo, T.; Cavalcanti, A.; Silveira, T.R.; Castilho, M.C.; Clemens, R. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in 4 centers in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2000**, *33*, 1–10.
30. Barzaga, N.G. Hepatitis A shifting epidemiology in South-East Asia and China. *Vaccine* **2000**, *18*, S61–S64.
31. Tufenkeji, H. Hepatitis A shifting epidemiology in the Middle East and Africa. *Vaccine* **2000**, *18*, S65–S67.
32. Arankalle, V.A.; Chadha, M.S. Who should receive hepatitis A vaccine? *J. Viral Hepat.* **2003**, *10*, 157–158.
33. Almeida, D.; Tavares-Neto, J.; Queiroz-Andrade, M.; Dias, C.; Ribeiro, T.; Silva, F.; Silva-Araújo, J.; Tatsch, F.; Paraná, R. Sociodemographical aspects of seroprevalence of hepatitis A virus in the settlement of Cavunge, a semi-arid region of Bahia State. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2006**, *39*, 76–78.
34. Braga, W.S.; Borges, F.G.; Barros Junior, G.M.; Martinho, A.C.; Rodrigues, I.S.; Azevedo, E.P.; Davis, G.H.; Queiroz, M.B.; Santos, S.H.; Barbosa, T.V.; *et al.* Prevalence of hepatitis A virus infection: The paradoxical example of isolated communities in the western Brazilian Amazon region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2009**, *42*, 277–281.
35. Gröschl, M.; Köhler, H.; Topf, H.G.; Rupprecht, T.; Rauh, M. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 478–486.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ARTIGO 2 - Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR



Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR

Renata Santos Tourinho¹, Camilla Rodrigues de Almeida¹, Andreza Salvio Lemos¹, Noemi Rovarís Gardinali¹, Yasmine Rangel Vieira¹, Jonas Schmidt-Chanasit² and Vanessa Salete de Paula^{1*}

¹Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Brazil

²Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin-BNI, Germany

*Corresponding author: Vanessa S de Paula, Pavilhão Helio e Peggy Pereira, sala B219, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Cx Postal 926, Av. Brasil 4365, CEP: 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Tel: 5521-2562-1876, Fax: 5521-2270-6397, E-mail: vdepaula@ioc.fiocruz.br

Short Communication

Hepatitis A, which presents a major health problem globally, is caused by hepatitis A virus (HAV). This virus, whose primary site of replication is the liver, is the most common agent causing acute liver disease worldwide [1]. Hepatitis E virus (HEV) is the most recently discovered of the hepatotropic viruses, its genome having been identified in 1991. Despite the similarity with hepatitis A virus in their pathogenesis and transmission form, HEV has a zoonotic potential [2].

Two major challenges of virus analysis include a lack of adequate information in infectivity and the difficulty to cultivate these viruses *in vitro*. Conservatively, immunological, nucleic acid-based methods, and cell culture have been applied as molecular techniques for virus analysis [3,4]. The disadvantages of these methods have incited for new detection approaches that are rapid, sensitive and specific as the real-time PCR technique. Real-time viral detection provides sufficient information regarding multiple steps in infection process at molecular level, which is valuable for the prevention and control of viral infections [5].

Conventionally, in absolute quantitative real-time PCR detection, the viral load is measured as copy number per cell or per total RNA/DNA following a transformation of the data using a standard curve. A standard curve is generated by performing a real-time PCR using a dilution series of template DNA made from plasmid DNA or, more recently, DNA oligonucleotides. The current literature suggests that there are advantages and disadvantages of using different templates for the construction of a standard curve in the absolute quantification [6]. As the results of our laboratory cost-benefits studies, we could

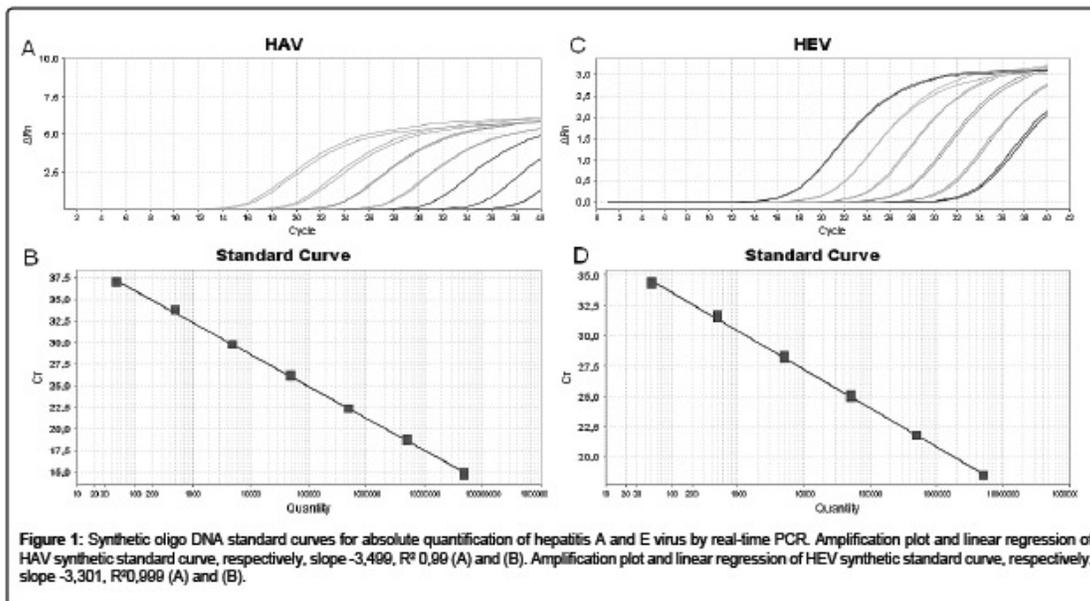
observe that, despite displaying reliable results, using plasmid DNA as template is more expensive and takes longer to synthesize than DNA oligonucleotides. The advantage of using DNA oligonucleotides is that it can be custom synthesized, and only requires the nucleotide sequence information.

Over the past decade, synthetic biology has taken advantage of a comprehensive inventory of biomolecular parts [7] and it is providing alternative diagnostic tools for viral detection and monitoring. This report highlights the application of synthetic standard curves for quantification of hepatitis A and E genomes by real-time PCR. The aim of this study was to examine the potential of two DNA oligos for hepatitis A (HAV) and hepatitis E virus (HEV) genomes quantification that could be adopted readily into established testing protocols.

The HPLC-pure oligonucleotides specifying the 89bp HAV (5' non-coding region) and 74bp HEV (ORF3 region) amplicons were custom synthesized by IDT* (Coralville, USA) (Table 1), corresponding to the same genome fragments used for plasmid DNA standard curve construction. Following manufacturer's specifications, the DNA oligo was dissolved in DNase/ RNase-free distilled water to 100pmol/uL which is equivalent, approximately, to 10¹³ DNA molecules/uL according to the Avogadro number calculation – ([DNAg/uL]/ Plasmid size (bp) x 660) x (6,022x10²³). The standard curves were generated by performing a TaqMan real time PCR, previously described by De Paula et al. and by Jothikumar et al. for HEV [8,9]. In this study, the plasmid standard curve was replaced to ultramer template ten-fold dilution series (10⁻¹-10⁻⁹). The specific primers and probes were used according to the literature above. After determining the dilution range for each synthetic curve, they were

Table 1: Hepatitis A and E synthetic standard curve sequences

Virus	Ultramer sequence	Size (bp)	Amount of oligo
HAV	5'-TTC GTG AGA GCC CTG GAA GAA AGA AGA CGT ATC AGA AAG CGT GAA AAA TGA GTA TGC GTG ATT TAA GAA CCC TGA ACC TGC AGC TGA TA-3'	89	4nmol
HEV	5'-TTC GTA GGG GTT GGT TGG ATG AAC GTA GCG AAG GGC TGA GAA TCA ATG CGT GTC ACC CCA GAA ACC ACC TTC GT-3'	74	5.1nmol



assayed along with plasmid DNA as standard curve to compare their quantification in copies/uL. Therewith, the absolute quantification using DNA oligo as standard curve could be performed using a panel of 14 HAV and HEV available samples with known quantification.

Firstly, in our experiments, we could observe that the range dilution for HAV synthetic curve was 10^6 - 10^9 molecules/uL and for HEV 10^4 - 10^7 molecules/uL (Figure 1). The difference between the dilution ranges of both oligo DNAs could be explained by HEV genome quantification results. It was detected non-specific amplification at high dilutions or at a low copy number. The Ct value of the HEV oligo DNA standard curve was leveled off at high Ct values due to low input DNA concentrations. Bowers and Dhar also reported it; however, this effect was apparent when the plasmid DNA and 500 bases *in vitro* transcribed RNA template were used as templates. The data from their study suggested that the size of the template used to generate standard curve should be very similar to the size of the amplicon which will reduce or eliminate the nonspecific amplification. In this report, we use this strategy but we could not observe similar results. Nevertheless, later data demonstrated that this effect did not have a directly influence on HEV genome absolute quantification due to the exclusion of non-specific amplification templates.

Following, it was assayed both plasmid and synthetic DNA curves with the panel samples. As the plasmid DNA curve was optimized for both viral genomes (range 2×10^2 - 10^4 ng/uL), they were used as "gold standard" curve to compare sample quantification for HAV and HEV. Samples quantification using each type of curve as standard was compared each other and the difference between their results were analyzed. HAV results demonstrated that quantification ratio between the two types of curves ranged from 0.83 to 2.14 times. The same comparison was performed for HEV samples and quantification ratio ranged from 1.87 to 2.23 times. Difference in absolute quantification between both types of curves, for HAV and HEV genomes, did not exceed one log. Furthermore, there was not discordance between qualitative results of tested samples.

Amplification efficiency values were similar for both types of curves, as indicated by the slopes of separate standard curves. The results of HAV absolute quantification demonstrated a slope average for plasmid DNA of -3,345, and oligo DNA of -3,499. For HEV, the slope average for plasmid DNA was -3,27 and for oligo DNA -3,301 ($R^2 > 0,99$ for all assays).

The absolute quantification of viral genomes by real time PCR has been become routine. Conventionally, a standard curve is generated using a dilution series of cloned genomic segment of the target virus as template, which is time consuming, and costly [6].

Recently, oligonucleotide representing the target gene has been used as template to generate a standard curve, as reported in this study and ISO/TS 15216-1:2013 that describe a method for quantification of levels of HAV from test samples of foodstuffs or food surfaces.

Our RT-PCR quantification methods were not compared with ISO/TS 15216-1:2013. However, the real-time PCR to hepatitis A, described here, have been used since 2007 to detect and quantify HAV from water, food, saliva, cell culture, serum, liver and stool samples with plasmid standard curve [10-15]. The results showed that the standard curve can be replaced for a synthetic curve.

The synthetic biology can overcome the biological limitations of plasmid curve. We could demonstrate that oligo DNA could be used as template of standard curve due to its similar results with the plasmid DNA curves (gold standard). Oligo DNAs standard curves could be a helpful alternative or laboratories that do not have enough space and financial conditions for molecular cloning. Due to these characteristics, they could be a very useful tool on viral diagnosis.

Financial Support

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). PAPES VI.

References

- Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, de Paula VS, Purdy MA, et al. (2014) Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect Genet Evol* 21: 227-243.
- Arends JE, Ghiseti V, Irving W, Dailon HR, Izopet J, et al. (2014) Hepatitis E: An emerging infection in high income countries. *J Clin Virol* 58: 81-88.
- Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK (1995) Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol* 49: 461-487.
- Lee HK, Jeong YS (2004) Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol* 70: 3632-3636.
- ISO/TS 15216-1: (2013) Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification.

6. Bowers RM, Dhar AK (2011) Effect of template on generating a standard curve for absolute quantification of an RNA virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 25:60-64.
7. Arkin AP, Schaffer DV (2011) Network news: innovations in 21st century systems biology. *Cell* 144: 844-849.
8. De Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, Luz SL, Silva LA, et al. (2007) Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res* 41: 1169-1176.
9. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR (2006) A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131: 65-71.
10. de Paula VS, Perse AS, Amado LA, de Moraes LM, de Lima SM, et al. (2009) Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 1167-1176.
11. de Paula VS, Gaspar AMC, Villar LM (2010) Optimization of Methods for Detecting Hepatitis A Virus in Food. *Food and Environmental Virology*. 2: 47-52.
12. Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Guimarães FR, Ferreira FF, et al. (2007) Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol* 45: 168-173.
13. Lima LR, De Almeida AJ, Tourinho Rdos S, Hasselmann B, Ximenez LL, et al. (2014) Evidence of hepatitis A virus person-to-person transmission in household outbreaks. *PLoS One* 9: e102925.
14. Amado LA, Marchevsky RS, de Paula VS, Hooper C, Freire Mda S, et al. (2010) Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication. *Int J Exp Pathol*. 91:87-97.
15. Amado LA, Villar LM, de Paula VS, Pinto MA, Gaspar AM (2011) Exposure to multiple subgenotypes of hepatitis A virus during an outbreak using matched serum and saliva specimens. *J Med Virol* 83: 768-775.

ARTIGO 3 - Evidence of person-to-person transmission of hepatitis A virus in household outbreaks



Evidence of Hepatitis A Virus Person-to-Person Transmission in Household Outbreaks

Lyana Rodrigues Lima¹, Adilson José De Almeida^{2,3}, Renata dos Santos Tourinho¹, Bárbara Hasselmann², Lia Laura Lewis Ximenez², Vanessa Salete De Paula^{1*}

1 Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, **2** Ambulatório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, **3** Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Setor de Hematologia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Abstract

The person-to-person transmission of the hepatitis A virus primarily occurs in enclosed spaces, particularly in the presence of inadequate hygiene conditions and a high proportion of susceptible individuals. Thus, intimate family contact stands out as a risk factor for HAV infection dissemination. The present study aimed to evaluate the occurrence of household HAV transmission. Blood samples were collected from patients with hepatitis A (index cases) and their family members (contacts) that were referred to an ambulatory care clinic specializing in viral hepatitis. A total of 97 samples were collected from 30 families with a confirmed hepatitis A case (index case). Serological and molecular techniques for the diagnosis of hepatitis A were conducted on all samples. HAV infection (anti-HAV IgM + and/or HAV RNA +) was detected in 34.3% (23/67) of the contacts; 34.3% (23/67) of the contacts were immune to HAV, and 31.4% (21/67) were susceptible. In the household contacts, HAV immunity was significantly associated with older age; susceptibility to infection and HAV infection were associated with younger age. Household outbreaks were detected in 16/30 families studied. Co-circulation of subgenotypes IA and IB was found in the household outbreaks, and person-to-person transmission was evidenced in six of the household outbreaks, with 100% homology between the index case and contact strains. The results demonstrated the relevance of HAV household transmission, reaffirming the need for hepatitis A vaccine administration in susceptible contacts and effective infection control procedures to prevent the extension of household outbreaks.

Citation: Lima LR, Almeida AJD, Tourinho RdS, Hasselmann B, Lewis Ximenez LL, et al. (2014) Evidence of Hepatitis A Virus Person-to-Person Transmission in Household Outbreaks. *PLoS ONE* 9(7): e102925. doi:10.1371/journal.pone.0102925

Editor: Yuri E. Khudyakov, Centers for Disease Control and Prevention, United States of America

Received: April 16, 2014; **Accepted:** June 23, 2014; **Published:** July 22, 2014

Copyright: © 2014 Lima et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. All HAV nucleotide sequences obtained from this work were deposited in the Genbank with the accession numbers (KF357524–KF357561).

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: vdepaula@bc.focruz.br

Introduction

Hepatitis A is an inflammatory liver disease that annually affects approximately 1.4 million individuals worldwide [1]. The disease is transmitted primarily via the fecal-oral route, and its incidence rate is strongly correlated with socioeconomic conditions and access to safe drinking water [2,3]. Brazil currently has an intermediate incidence rate of hepatitis A, affecting approximately 7,000 people per year [4], the decline in the country's hepatitis A incidence has been attributed to recent improvements in sanitation and environmental planning. As a result of the decreased incidence, the number of susceptible adolescents and adults has increased, leading to a higher risk of outbreaks in these age groups where the disease tends to be symptomatic [5,6]. Although hepatitis A has great impact on the Brazilian health, does not exist yet a program of routine childhood vaccination in the country.

The hepatitis A virus (HAV) is a *Hepatovirus* member of the *Picornaviridae* family and has a positive single-stranded RNA genome approximately 7.5 kb in length [7]. HAV has a single antigenic serotype that provides lifelong immunity after natural infection and follow the use of an inactivated vaccine. Despite the lack of antigenic variability, there are six viral genotypes of HAV

(I–VI); three of the genotypes (I–III) are associated with human infections, and three (IV–VI) are associated with simian infections [8]. All the human genotypes (I–III) are divided into two subgenotypes (A and B), which exhibit a nucleotide variation of approximately 7.5% [9]. Recently, a new subgenotype IC has been proposed [10].

HAV transmission generally occurs through the fecal-oral route by ingestion of contaminated food, water, or through person-to-person contact. Person-to-person transmission is facilitated by close indoor contact where inadequate hygiene practices and a high proportion of susceptible individuals may exist. In recent years, many studies of indoor hepatitis A outbreaks have been published globally, but these studies are limited to outbreak investigations in daycare centers, nurseries, or schools [11,12,13]. Daycare centers and schools play an important role in the transmission network of HAV because of the tendency of children less than 6 years of age to develop asymptomatic infection and spread the disease among susceptible contacts [14]. However, our literature review identified few published reports investigating HAV transmission in the household environment, a favorable location for the exposure of susceptible individuals to infected

individuals [15,16,17]. Within the domiciliary environment, the virus can spread through intimate contact between family members as seen for several pathogens [18,19]. This study aimed to investigate the occurrence of the HAV transmission in the household environment.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study was approved by the FIOCRUZ Ethics Committee (number: 135.261). All the subjects participating in the study or the responsible parent of the under the age subjects signed a consent form after being provided all the necessary and sufficient information to make an informed decision.

Study population and sample collection

The study was conducted in the Viral Hepatitis Ambulatory of the Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, from November 2012 to April 2013. Patients who tested positive for anti-HAV IgM were invited to participate. Blood samples were collected from hepatitis A patients (index cases) and their family members (household contacts). Five milliliters of total blood from each individual was obtained by venipuncture, collected into sterile tube, and centrifuged. The serum was separated and stored at -20°C .

Demographics, clinical, and laboratory data collection

For the epidemiologic evaluation, the following variables were obtained from the medical records of the index cases and their household contacts: age, sex, relationship between index cases and household contacts, presence or absence of symptoms, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) serum levels.

Household outbreak definition

For this study, a household outbreak was defined as the occurrence of two or more cases of hepatitis A in a single domiciliary environment. Thus, the presence of IgM anti-HAV and/or HAV RNA detected in the index case and in at least one of household contacts was characterized as a household outbreak.

Serological tests for household samples

The serum samples for all household contacts were analyzed for specific antibodies against HAV (IgM and total anti-HAV) using an enzyme linked immunosorbent test (ETI-IGMK PLUS and ETI-AB-HAVK PLUS, DiaSorin, Italy). The results were recorded as positive or negative according to the standard procedures recommended by the manufacturer.

Detection of HAV RNA in serum samples

Regardless of the serological test results, qualitative PCR and real-time PCR were performed on all the collected serum samples. The viral RNA was extracted from 140 μL of serum using the QIAmp Viral RNA Kit (Qiagen, Valencia, Spain). Reverse transcription was performed at 55°C for 1 h using 10 μL of RNA, random primers (Invitrogen, Rockville, MD, USA), and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The VP1/2A region was amplified using a nested PCR as described elsewhere [11]. The PCR products were loaded onto a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide to visualize the bands of an expected length of 247 bp. HAV RNA was quantified from 5 μL of cDNA using the TaqMan Real-time PCR assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A specific synthetic ultramer

(5' TTCGTGAGAGCCCTGGAAGAAAGAACGATATCAGAAAGCGTGAAAAATGAGTATGCCGT GATTTAAGAACCCTGAACCTGCAGCTGATA3') was used for the standard curve construction, and specific primers for the 5' HAV non-coding region and a single-labeled 5' FAM probe were used as described previously [20].

Sequencing and phylogenetic analysis

Amplicons were purified using the QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Valencia, Spain) according to the manufacturer's recommendations. The nucleotide sequencing reaction was performed in both directions for HAV RNA positive samples with a Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an automatic DNA sequencer (ABI Prism 3730, Applied Biosystems). The sequences obtained were edited using the Bioedit program and deposited in Genbank with access numbers between KF357524 and KF357561. The phylogenetic tree was constructed using the maximum-likelihood method and the Tamura-3-parameter with gamma distribution incorporating invariable sites (T92 +G+I) in the MEGA software package with 2000 replicates. The calculation of the nucleotide identity between the isolates from the index cases and their household contacts was also performed using the MEGA software package.

Statistical Analysis

The data are expressed as frequencies, means \pm standard deviations (SD), or medians and ranges (if quantitative variables were not normally distributed). In the bivariate analysis, we used the Chi-square (χ^2) test for independence with Yate's continuity correction to compare proportions and nonparametric (Mann-Whitney U test) statistics to compare medians. For continuous variables with normal distributions (Kolmogorov-Smirnov test), homoscedasticity was tested by the Levene's test, and the unpaired Student's t -test was used to compare the means. The kappa (k) statistic was used to calculate the rate of agreement between the results of the nested PCR and real-time PCR. Based on the strength of the agreement, the k value was interpreted as follows <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12011942-bib0080>: <20%: poor; 21–40%: fair; 41–60%: moderate; 61–80%: good; and 81–100%: very good. A two-tailed p value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using MedCalc for Windows, version 8.1.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Results

Demographic, clinical, and laboratory data

A total of 97 patients from 30 families were included; 44 (45.4%) of the patients were male, and 53 (54.6%) were female. This population consisted of 30 index cases and 67 household contacts, ranging from 1–4 household contacts per index case. Frequencies of 1, 2, 3, and 4 household contacts per index case were observed in 8 (26.7%), 10 (33.3%), 9 (30.0%), and 3 (10.0%) cases, respectively. Approximately 48.4% (47/97) of the subjects were symptomatic or reported symptoms consistent with acute hepatitis, such as fever, nausea, vomiting, jaundice, and dark urine. Among the index cases, 43.3% (13/30) of the subjects were male, and 56.7% (17/30) were female, with a median age of 14.0 years (4–43.0 years); all patients had symptoms consistent with acute hepatitis. The median ALT and AST values of index cases were 186.0 U/L (16.0 to 1,530.0 U/L) and 115.0 U/L (10.0 to 1,800.0 U/L), respectively. Among all the household contacts included in this study, 46.3% (31/67) of the subjects were male,

Table 1. Demographic, clinic and laboratory data.

Data	Index case (n = 30)	Household contacts (n = 67)	Population (n = 97)
Gender, n (%):			
Male	13 (43.3)	31 (46.3)	44 (45.4)
Female	17 (56.7)	36 (53.7)	53 (54.6)
Age (years):			
Median (range)	14.0 (4.0–43.0)	27.0 (1.0–67.0)	17.0 (1.0–67.0)
ALT (U/L):			
Median (range)	186.0 (16.0–1,530.0)	23.0 (4.0–1,840.0)	37.0 (4.0–1,840.0)
AST(U/L)			
Median (range)	115.0 (10.0–1,800.0)	35.0 (15.0–1,540.0)	4.0 (10.0–1,800.0)
Clinic, n (%):			
Symptomatic	30 (100.0)	17 (25.4)	47 (48.4)
Asymptomatic	0 (0.0)	50 (74.6)	50 (51.6)

doi:10.1371/journal.pone.0102925.t001

and 53.7% (36/67) were female; the median age was 27.0 years (1.0 to 67.0 years), and 25.4% (17/67) were symptomatic (Table 1).

Serological status of the household contacts

Hepatitis A cases were confirmed in 25.4% (17/67) of the household contacts after testing positive for IgM anti-HAV. In the household contacts, 67.2% (45/67) were positive for total anti-HAV antibodies, and 32.8% (22/67) were negative. Among the household contacts infected by HAV, 14 had symptoms, and three were asymptomatic.

Detection of HAV RNA in serum samples

All samples included in this study (n = 97) were tested by qualitative nested PCR and quantitative real-time PCR. HAV RNA was detected by qualitative PCR in 40.2% (39/97) of samples and by real-time PCR in 48.4% (47/97). The rate of agreement (Kappa index) between the qualitative PCR and real-time PCR results was 79.3%, indicating good agreement between these methods.

Analyzing only the index cases (n = 30), HAV RNA was detected in 80.0% (24/30) and 93.3% (28/30) of the serum samples by qualitative-PCR and real-time PCR, respectively. The median viral load of the index case samples was 10^3 copies/ml (10^2 – 10^6 copies/ml). Among the household contacts (n = 67), HAV RNA was detected in 22.4% (15/67) of the serum samples by nested PCR. Of the fifteen samples testing positive by nested PCR, 12 were IgM anti-HAV-positive, two were positive for total anti-HAV antibodies, and one was negative for total anti-HAV antibodies.

HAV RNA was detected in 19 household contacts (28.4%) by real-time PCR. The median viral load of the household contact samples was 10^3 copies/ml (10^2 – 10^5 copies/ml). Fourteen household samples had HAV RNA simultaneously detected by nested PCR and real-time PCR, whereas five samples had HAV RNA detected only by real-time PCR. Of these five samples, three showed reactivity for total anti-HAV antibodies, and two were reactive for only IgM anti-HAV. One sample from a household contact that tested positive by nested PCR tested negative by real-time PCR.

Using molecular biology tools (nested PCR and real-time PCR), it was possible to detect HAV RNA in 20 household contacts. The number of infected household contacts detected by molecular

biology was slightly higher than that found by serology (17 household contacts infected).

Detection of household outbreaks and analysis of factors associated with HAV infection

To determine the number of the household outbreaks of hepatitis A in this study, the serology and molecular biology results were analyzed together; not all individuals reactive for IgM anti-HAV had HAV RNA detected, and not all individuals with HAV RNA detected in the serum sample were reactive for IgM anti-HAV. Altogether, sixteen household outbreaks were detected, involving 16 index cases and 23 household contacts. Compared with analyzing the results separately, the combined analysis of the serology and molecular biology results gave a higher number of household contacts affected by HAV.

In the bivariate analysis, age and aminotransferase levels were associated with hepatitis A status (infected vs. non-infected) among the household contacts (Table 2).

Molecular characterization of HAV isolates and investigation of HAV household transmission

All 39 HAV isolates obtained belonged to the genotype I; 36 belonged to subgenotype IA and three to subgenotype IB (Figure 1). The strains from different household outbreaks showed a nucleotide similarity ranging from 87.4–100%. The sequencing analysis from the index cases and their household contacts was obtained for 10 families; in six families, the circulating strains within the household environment had a high nucleotide identity (100%), suggesting that the strains infecting the index case and the corresponding household contact were the same (Table 3).

Discussion

Hepatitis A is an endemic disease in developing countries that primarily affects children and is transmitted through the fecal-oral route. The probability of fecal-oral transmission increases with extended and close personal contact between infected and susceptible individuals. The prolonged shedding of HAV before and after the onset of symptoms, in association with the lack of good hygienic practices and the sharing of objects in the domiciliary environment, may contribute to a more suitable scenario for person-to-person HAV transmission, as previously

Table 2. Analysis of factors related to HAV infection among household contacts (n = 67).

	Hepatitis A		P-value
	Presence (n = 23)	Absence (n = 44)	
Age (years):			
Mean ± SD	17.4 ± 14.4	31.5 ± 18.2	<0.0001 [†]
Gender, n (%):			
Male	13 (56.5)	18 (40.9)	0.3376
Female	10 (43.5)	26 (59.1)	
ALT (U/L):			
Median (range)	38.0 (11.0–1,840.0)	22.0 (4.0–87.0)	0.0041
AST (U/L):			
Median (range)	44.0 (22.0–1,540.0)	33.0 (15.0–64.0)	0.0036
Kinship-index case, n (%):			
Father/Mother	10 (43.5)	22 (50.0)	0.7803
Siblings	7 (30.4)	10 (22.7)	
Other*	6 (26.1)	12 (27.3)	

*Grandfather, uncle, sister-in-law, boyfriend and others.

[†]Infected versus noninfected (susceptible and immune individuals). SD, standard deviation.

doi:10.1371/journal.pone.0102925.t002

reported for several diseases with fecal-oral transmission [18,19,21]. Although person-to-person transmission is common in hepatitis A, few studies have evidenced this mode of transmission [16,17]. In this study, index cases and contacts were investigated to detect possible hepatitis A household outbreaks. Clinical and serological investigations were conducted among the household contacts of the index cases. Seventeen household contacts were IgM anti-HAV-positive, 22 were susceptible to HAV, and 28 exhibited immunity to HAV. Despite having found whole families with positive serology for HAV infection, these data are not sufficient to confirm the household transmission of HAV in these outbreaks. For this reason, we performed the detection, quantification, and sequencing of HAV RNA to establish the epidemiological relationships between the isolates. HAV RNA was detected by nested PCR in 40.2% (39/97) of the samples, and real-time PCR was able to detect HAV RNA in 48.4% (47/97) of the samples. Real-time PCR had a higher sensitivity than nested PCR [20,22], and thus, samples with a low viral load were negative by nested PCR.

HAV RNA was also investigated in the household contacts that were seronegative or had previous immunity to hepatitis A; one anti-HAV-negative and five IgG anti-HAV-positive household contacts had HAV RNA detected in their serum samples. These findings demonstrate the importance of molecular biology techniques for the early diagnosis of HAV infection during the viral incubation phase and for the detection of the virus for longer periods than are commonly described [23,24]. With HAV RNA detection, the number of infected household contacts increased from 17 to 23, and the number of household outbreaks detected also increased from 13 to 16.

In this study, a significant difference between the mean age of the contacts with and without hepatitis A was observed. Younger household contacts had a higher frequency of HAV infection, corroborating recent studies showing an increase in the age at which HAV infection occurs [4,25,26]. However, the presence of previous immunity was associated with older (>20 years of age) household contacts; this finding was in accordance with many epidemiological studies reporting a strong association between age

and anti-HAV prevalence [5,26,27,28]. Phylogenetic analysis of HAV isolates obtained from household outbreaks revealed a co-circulation of the subgenotypes IA and IB. Several studies have reported the co-circulation of subgenotypes IA and IB in Brazil [11,12,29]. In 10 families, it was possible to sequence HAV RNA from the index cases and their household contacts. When a similarity nucleotide matrix was performed, 100% homology between the index case and contact strains was observed in six of the families, suggesting that person-to-person transmission may

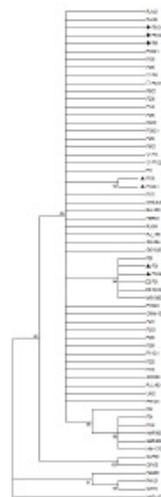


Figure 1. Phylogenetic analysis of 39 HAV isolates based on 168 nucleotides of VP1/2A (position 3024–3191), constructed by the method of Maximum Likelihood. The value of bootstrap was calculated from 2,000 replicates. Strains marked by symbols refer to families who had isolates with high nucleotide identity. doi:10.1371/journal.pone.0102925.g001

Table 3. Nucleotide similarity matrix between HAV isolates obtained in serum samples from individuals involved in the household outbreaks.

	F2I	F2C2	F2C1	F3I	F3C2	F4I	F4C1	F5I	F5C1	F6I	F6C1	F6C2	F7I	F7C2	F8I	F8C1	F9I	F9C2	F10I	F10C1	F15I	F15C3	
F2I																							
F2C2	0,000																						
F2C1	0,037	0,037																					
F3I	0,006	0,006	0,031																				
F3C2	0,006	0,006	0,031	0,000																			
F4I	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025																		
F4C1	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025	0,000																	
F5I	0,090	0,090	0,077	0,097	0,097	0,112	0,112																
F5C1	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025	0,000	0,112	0,112															
F6I	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025	0,000	0,112	0,000															
F6C1	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025	0,000	0,112	0,000	0,000														
F6C2	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025	0,000	0,112	0,000	0,000	0,000													
F7I	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025	0,000	0,112	0,000	0,000	0,000	0,000												
F7C2	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025	0,000	0,112	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000											
F8I	0,000	0,000	0,037	0,006	0,006	0,031	0,031	0,090	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031									
F8C1	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025	0,000	0,112	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,031								
F9I	0,089	0,089	0,089	0,096	0,096	0,126	0,126	0,024	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126	0,089	0,126							
F9C2	0,031	0,031	0,044	0,025	0,025	0,000	0,112	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,126						
F10I	0,037	0,037	0,037	0,031	0,031	0,006	0,006	0,105	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,037	0,006	0,118	0,006					
F10C1	0,037	0,037	0,037	0,031	0,031	0,006	0,006	0,105	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,037	0,006	0,118	0,006	0,000				
F15I	0,089	0,089	0,089	0,096	0,096	0,126	0,126	0,024	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126	0,089	0,126	0,000	0,126	0,118	0,118			
F15C3	0,031	0,031	0,043	0,024	0,024	0,037	0,037	0,097	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037	0,031	0,037	0,110	0,037	0,044	0,044	0,110		

doi:10.1371/journal.pone.0102925.t003

have occurred. However, in three families, the index cases and their household contacts were infected by different subgenotypes of HAV, suggesting different sources of infection. Wu et al., 2014 showed through ultra-deep pyrosequencing (UDPSs) of HAV 5'-untranslated region (5'UTR) that minor nucleotide substitutions of this region can occur in HAV strains derived from a single source outbreak, and that these nucleotide substitutions were different from those of the sporadic case. So, UDPS analysis might be a new analytical tool for the source of hepatitis A outbreaks [30]. Person-to-person transmission is the predominant mode of HAV spread when there is prolonged and intimate contact between susceptible individuals and those with HAV infection. One of the main risk factors for acquiring this infection is family life [31], especially for children without proper hygienic habits. In the six families in which person-to-person transmission was suggested, four presented children as index cases (4–7 years), reinforcing that the person-to-person transmission might have occurred.

Although the person-to-person transmission of HAV has been described for indoor environments, there is no current work in Brazil using nucleotide similarity between the strains to provide evidence for such transmission in the household environment. Person-to-person transmission has been suggested by molecular epidemiology studies of household outbreaks caused by other fecal-oral transmission agents, such as rotavirus and enterovirus

71; these studies have reported a nucleotide identity of over 99% among strains circulating in symptomatic family members [18,32]

Indoor hepatitis A outbreaks represent a public health problem, requiring the investigation of the etiology and rapid action measures to control the infection. The results of this study demonstrate the relevance of HAV transmission in the household environment and support the need for the implementation of the hepatitis A vaccine not only in children but also in susceptible household contacts as a means of preventing the spread of the disease and reducing the disease impact on susceptible individuals in contact with infected persons.

Acknowledgments

We would like to thank the staff of Ambulatório de Hepatites Virais and Ph.D. Adilson Almeida for his help in conducting the statistical analyses.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LRL AJA RST BH LLLX VSP. Performed the experiments: LRL RST. Analyzed the data: AJA BH. Contributed reagents/materials/analysis tools: LLLX VSP. Contributed to the writing of the manuscript: LRL AJA RST VSP. Permission to collect biological samples: LLLX.

References

- World Health Organization. (2013) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/en/index.html>. Accessed 05 may 2013.
- Jacobsen KH, Koopman JS (2004) Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol Infect* 132(6):1005–1022.
- Jacobsen KH, Koopman JS (2005) The effects of socioeconomic development on worldwide hepatitis A virus seroprevalence patterns. *Int J Epidemiol* 34(3):600–609.
- Brasil. Ministério da Saúde (2012) Secretaria de Vigilância em Saúde. Apresentação do dia Mundial da luta contra a hepatite. Hepatites virais no Brasil. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.
- Vitali CL, Souto EJ, Gaspar AM (2008) Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. *J Viral Hepat* 15 Suppl 2: 22–25.
- Jacobsen KH, Wiersma ST (2010) Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28: 6653–6657.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH (1973) Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 182(4116):1026–1028.
- Lu T, Ching KZ, de Paula VS, Nakano T, Siegl G, et al. (2004) Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol* 85: 2943–2952.
- Robertson BH, Averhoff F, Cromean TL, Han X, Khograzet B, et al. (2000) Genetic relatedness of hepatitis A virus isolates during a community-wide outbreak. *J Med Virol* 62: 144–150.
- Blanco Fernández MD, Torres C, Riviello-López G, Poma HR, Rajal VB, et al. (2012) Analysis of the circulation of hepatitis A virus in Argentina since vaccine introduction. *Clin Microbiol Infect* 18: E548–551.
- De Paula VS, Baptista MI, Lampe E, Niel C, Gaspar AM (2002) Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 66: 22–27.
- Amado IA, Villar LM, de Paula VS, Pinto MA, Gaspar AM (2011) Exposure to multiple subgenotypes of hepatitis A virus during an outbreak using matched serum and saliva specimens. *J Med Virol* 83: 768–775.
- McFarland N, Dryden M, Ramsay M, Tedder RS, Ngai SL, Team WHO (2011) An outbreak of hepatitis A affecting a nursery school and a primary school. *Epidemiol Infect* 139(3):336–343.
- Naiman OV, Armstrong GL, Han XH, Williams I, Bell BP, et al. (2005) Hepatitis A molecular epidemiology in the United States, 1996–1997: sources of infection and implications of vaccination policy. *J Infect Dis* 191: 957–963.
- Sato T (1988) Sequentially-occurring transmission of hepatitis A in a family. *Tohoku J Exp Med* 155(4):387–388.
- Victor JC, Surdina TY, Suleimenova SZ, Favorov MO, Bell BP, et al. (2006) Person-to-person transmission of hepatitis A virus in an urban area of intermediate endemicity: implications for vaccination strategies. *Am J Epidemiol* 163(3):204–210.
- Kumbhani J, Ejide S, Tedder RS, Ngai SL (2012) Outbreak of hepatitis A in an extended family after importation by non-immune travellers. *Epidemiol Infect* 140: 1813–1820.
- Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, et al. (2008) Acute encephalitis caused by intrafamilial transmission of enterovirus 71 in adult. *Emerg Infect Dis* 14: 828–830.
- Roma F, Panayiotou J, Pachoula J, Kafritsa Y, Constantinidou C, et al. (2009) Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori* infection in Greece. *J Clin Gastroenterol* 43: 711–715.
- De Paula VS, Diniz-Mendes I, Villar LM, Luz SL, Silva LA, et al. (2007) Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res* 41(6):1169–1176.
- Somani SK, Aggarwal R, Naik SR, Srivastava S, Naik S (2003) A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 10: 446–449.
- Costa-Mantoli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercoff R, Casane D, et al. (2002) Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol* 76: 9516–9525.
- Costa-Mantoli M, Monpocho S, Nicand E, Aleman MH, Billaud S, et al. (2002) Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J Viral Hepat* 9: 101–106.
- De Paula. Laboratory diagnosis of Hepatitis A (2012). *Future Virology*. 2012;7(5):461–472.
- Kurkela S, Pehody R, Kafatos G, Andrews N, Barbara C, et al. (2012) Comparative hepatitis A seroepidemiology in 10 European countries. *Epidemiol Infect* 140(12):2172–2181.
- Vitali CL, Yoshida CF, Lemos ER, Teixeira CS, Gaspar AM (1998) Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(1):1–5.
- Ximenes RA, Pereira LM, Martelli CM, Merchán-Hamann E, Stein AT, et al. (2010) Methodology of a nationwide cross-sectional survey of prevalence and epidemiological patterns of hepatitis A, B and C infection in Brazil. *Cad Saude Publica* 26: 1695–1704.
- Vitali CL, Ospina FL, Artimios S, Melgajo JG, Cruz OG, et al. (2012) Declining prevalence of hepatitis A virus antibodies among children from low socioeconomic groups reinforces the need for the implementation of hepatitis A vaccination in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 652–658.
- Villar LM, Morais IM, Aloix R, Melo MM, Calado IA, et al. (2006) Cocirculation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res* 39(7):873–881.
- Wu S, Nakamoto S, Kanda T, Jiang X, Nakamura M, et al. (2014) Ultra-deep sequencing analysis of the hepatitis A virus 5'-untranslated region among cases of the same outbreak from a single source. *Int J Med Sci* 11(1):60–64.
- World Health Organization (2000) Hepatitis A vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 75(5): 38–44.
- Banerjee I, Primrose Gladstone B, Iturriza-Gomara M, Gray JJ, Brown DW, et al. (2008) Evidence of intrafamilial transmission of rotavirus in a birth cohort in South India. *J Med Virol* 80: 1858–1863.

ARTIGO 4 - The effect of host *iINFL3* polymorphism on hepatitis A clinical outcomes

THE EFFECT OF HOST *INFL3* POLYMORPHISM ON HEPATITIS A CLINICAL OUTCOMES

Tourinho RS¹, Fabrício-Silva GM², Cardoso-Oliveira J², Lewis-Ximenes LL³, de Almeida AJ³, Pôrto LC², Pinto MA¹, De Paula VS¹

¹Lab. Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, HPP, Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, Cx. Postal 926, Cep 21045-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

²Lab. De Histocompatibilidade e Criopreservação, Policlínica Piquet Carneiro, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Av. Marechal Rondon, 381 Térreo Cep.: 20950-003, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

³Ambulatório de Hepatites Virais, Pav. 108, Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, Cx. Postal 926, Cep 21045-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

***Corresponding author:** PhD Vanessa Salette de Paula, Pavilhão Helio e Peggy Pereira, sala B219, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Cx Postal 926. Av. Brasil 4365, CEP: 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel (+55 21) 2562-1876; E-mail address: vdepaula@ioc.fiocruz.br

FINANCIAL SUPPORT: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ABSTRACT. Virus-specific characteristics may be responsible for diseases outcomes, but currently host genetic characteristics have been associated with virologic response and treatment. In this setting, *INFL3* gene, have examined the relationship between SNPs and disease course in hepatitis infected patients. However, whether *INFL3* polymorphism influences the most severe hepatitis A cases is still unknown. So, this study aimed to compare the genetic profile of *INFL3* SNPs to different hepatitis A outcomes. It was enrolled into the study 122 patients: 101 acute and 21 acute liver failure. *INFL3* polymorphism profiles were compared to different risk factors and only clinical outcomes were statistically associated ($p < 0.05$). A statistic significant difference was observed among alleles

and genotypes frequencies for *INFL3* rs8099917 between acute and ALF cases, regardless of viral genotype. Higher frequency of *INFL3* TT genotype of rs8099917 SNP was observed in acute HAV patients (72%), implying that *INFL3* plays a role in viral control. Conversely, higher frequency of G allele of rs8099917 SNP was detected in patients with severe HAV outcome (52.4%); suggesting that *INFL3* plays a role predicting disease progression. Understanding how host factor influences the immune response to viral infection provides opportunities to control these diseases and for the development of effective therapeutics, which justifies the study of this *locus*.

1- BACKGROUND

Hepatitis A virus (HAV) infection is the most common cause of acute hepatitis worldwide, causing 1.5 million new cases per year [1, 2].

Hepatitis A infection is a dynamic state of the interactions between viruses and host immune response, and the natural course varies greatly among different individuals, while some patients had frequent hepatitis flares with more rapid progression of liver disease, others have a relative benign prognosis [3,4,5,6].

Despite advances in therapy and vaccine development, viral hepatitis infections still account for morbidity and mortality worldwide. Virus-specific characteristics such as viral load and genotype may be responsible for the disease outcome, but through these years host genetic characteristics have been associated with virologic response and disease outcome [7]. Several risk factors have been investigated with the aim of identifying patients who may be predisposed to a worse outcome. In this setting, gene-wide association studies, as *INFL3* region, have examined the relationship between SNPs and disease course in patients with hepatitis infection. The variation on hepatitis A clinical outcomes

highlights the importance of identification of a mechanism underlying the progression of these viruses exposure for prevention against HAV-fatal liver disease [7].

The impact of genetic variation near the interferon λ -3 (*IFNL3*) gene, for response in HCV infected patients, was shown recently. Shortly after the discovery of the interferon λ -3, it was reported that these IFNs can inhibit HCV and HBV replication [8,9]. *INFL3* plays an important role for the initiation and regulation of immune responses against HCV [11,12] and, therefore, does also can affect HAV infection, as observed for HCV?.

INFL3 production is regulated at the genetic level, and the analysis of this cytokine gene polymorphisms and how they relate to HAV susceptibility and severity may help in our understanding of disease aetiopathogenesis [13] and outcome [14]. This study is a pioneer in the Brazilian population since, to date, no data on the association between *IFNL3* genotypes and HAV infected patients was published in the literature. In addition, fulminant hepatitis cases have not been studied as the immunogenetic *INFL3* SNPs level.

2 - STUDY DESIGN

2.1 Studied Population

The studied population was composed by mixed-ethnic individuals routinely monitored by the Viral Hepatitis Ambulatory from Oswaldo Cruz Institute, between August 2011 and January 2013. Healthy control samples were obtained from Hebert de Souza Blood Bank patients, at Rio de Janeiro State University (UERJ).

Acute Liver Failure (ALF) samples were collected between 2004 and 2014 from patients with hepatic failure underwent liver transplantation at Rio de Janeiro.

We evaluated 122 patients with different clinical patterns of disease, including 101 acute and 21 ALF HAV cases. All subjects enrolled in this study were native Brazilians and lived in the same geographical area, at Rio de Janeiro. The healthy controls were previously screening for HIV, Syphilis, hepatotropic viruses (hepatitis A, B, C, D and E), Chagas disease and HTLV I/II. They were included in the study to demonstrate the *INFL3* polymorphism frequency in the health population. Acute patients were characterized by a self-limited hepatitis observed in a 6 months follow up. Acute hepatitis A cases were considered by the presence of anti-HAVIgM (+). The study also included cases of ALF who developed clinical and laboratorial signals of liver failure (INR > 1.0, encephalopathy, flapping) between 7 days and 12 weeks after the onset of jaundice [4]. To exclude other host risk confounders involved in hepatitis A development, all patients selected were (1) free of other hepatic virus co-infection (2) or HIV co-infection, (3) hepatitis A vaccination, (4) not born in Brazil.

2.2 Samples collection and testing

Peripheral blood samples were obtained from all patients for serological and virological tests.

All serum specimens were stored at -20°C before testing. Viral hepatitis antibodies and antigens were assayed using ELISA commercially available kits, as manufacturer's instructions (ETI- HAV-IgMKPLUS, DiaSorin, EUA; VikiaHBsAg,

Biomerieux, França; Anti-HBc, anti-HBcIgM, Biokit, Spain; anti-HCV, DiaSorin, Italian; anti-HEV BioKit, Spain).

Viral genetic material was purified from serum samples using the QIAamp® RNA viral purification/QIAamp® (QIAGEN, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. HAV genotypes were determined by sequencing the nested PCR products for VP1/2A region according to de Paula *et al.*, (2001) [15].

2.3 *INFL3* Genotyping

INFL3 polymorphism was accessed using buffy coat, extracted from peripheral blood collected in EDTA vacutainer tubes (BD, Franklin Lakes, USA). Genomic DNA isolated was accessed using GFX Genomic blood DNA purification kit (Amersham Biosciences, NJ, USA), as manufacturer's instructions.

Three *INFL3* SNPs (rs12979860, rs12980275 and rs8099917) were chosen according to previous reports [7,10,17,18]. SNPs genotyping was performed using allelic discrimination assays from Applied Biosystems according to the manufacturer's instructions. Genotyping for rs8099917 was performed using predesigned assays (ID C_11710096_10) [19]. The genotypes of rs12979860 and rs12980275 SNPs were tested using ABI TaqMan SNP genotyping assays. Before performing the PCR reactions, DNA was added with allelic discrimination assay mix and TaqMan Universal PCR mastermix to MicroAmp optical 96-Well reaction plates (Applied Biosystems). Briefly, PCR primers and two allelic-specific probes were used to detect a specific SNP target. Real-Time PCR reactions were performed using the ABI Prism 7300HT (Applied Biosystems). After preheating for 10 min. at 95°C, 40 cycles of 15 seconds at 95°C and one minute at 60°C followed.

Data were analyzed using the ABIPRISM SDS software v.2.2.1 (Applied Biosystems).

2.4 Statistical Analyses

Data were expressed as the mean \pm SD or median (range) and n (%), as appropriate. Allelic and genotypic frequencies were calculated and compared to different risk factors - hepatitis type, group, clinical outcome, viral genotypes- using Epi-Info version 3.5.1 (CDC/OMS 1996 - <http://www.cdc.gov/epiinfo/>). In order to test Hardy-Weinberg equilibrium, observed and expected frequencies of various genotypes were compared by using Arlequin (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>). The chi-square test with Yates' correction was used to compare allele and genotype frequencies among groups. Fisher exact test were used when appropriated. The odds ratio (OR) was calculated to indicate the associated risk and presented with 95% confidence intervals (CI). A p value <0.05 on a two-tailed test was considered statistically significant.

3 - RESULTS

3.1 Patients non-genetic data

The sociodemographic characteristics showed that the subjects enrolled into the study were 53.3% (n=65) male and 46.7% (n=57) female. The mean age of the subjects were similar between groups: 20 ± 10.9 years old (median, 18) for acute and 22.6 ± 14.6 (median, 21) for ALF. Genotype analysis showed that all HAV

infected subjects presented genotype I. *INFL3* SNPs had no association to viral genotypes ($p=0.086$) when data between groups were compared.

3.2 Host *INFL3* genotypes and its association with hepatitis clinical outcomes

No departure from the Hardy-Weinberg distribution was observed for each genotype ($p>0.05$) in control subjects and in patients with hepatitis A infection. Genotyping of rs12979860, rs12980275, and rs8099917 in the acute and ALF groups were successfully performed, except for one sample from an acute patient.

Statistic results showed that only clinical outcome were significant associated with *INFL3* SNP rs8099917 $p=0.043$. The distribution of IL-28B gene genotypes and alleles are shown in Table 1.

Irrespective of group, rs8099917 TT genotype was the most frequently identified in more than 67.0% of patients followed by rs12980275 AG and rs12979860 CC (44.3%); whereas, rs8099917 GG was the less frequently one (0.02%). rs8099917 GG genotype was observed in only two subjects of the acute group and it was not observed in any patient with ALF outcome.

Comparing acute and ALF subjects, it could be observed that only the frequency of rs8099917 genotypes were different among these groups ($p=0.04$). The frequency of rs8099917 TT genotype was significant higher in acute than in ALF patients (72.7%/47.6%, 72/10), while for rs8099917 TG an inverse proportion occurred (25.3%/52.4%, 25/11). Allelic frequency of this SNP demonstrated that rs8099917 G allele was presented almost three times more in ALF subjects than in acute ones.

4 - DISCUSSION

Many efforts have been made to optimize treatment of severe hepatitis A cases through patient preselecting based on outcome predictors, but the use of both host- and virus-related as isolate variables that predict immune response have not proved to be clinically useful [20]. The polymorphisms near the *INFL3* gene, which encodes for IFN- λ 3 and may be implicated in the modulation of innate immune response, were found to be significantly associated with treatment-related resolution of chronic viral hepatitis C [21]. Scientists from Europe and America add *INFL3* genotyping into the guideline for HCV diagnosis and treatment [21], but little is known about the importance of these *INFL3* polymorphisms for HAV infected patients, mainly in ALF patients. Until the present time, no study associated *INFL3* polymorphism and HAV outcomes. What is difficult to prove is the wide individual variability of outcomes in the natural history of these diseases, for which genetic factors are likely to play a role [22,23].

Optimization of therapeutic algorithms, based on an accurate patient preselecting by response predictors, might help in overcoming fail treatment and avoiding the death cases caused by ALF. *INFL3* genetic preselecting patient factor, as shown by Lampertico *et al.* (2013) [20], has major advantages over classical constitutional or virus-related outcomes predictors, since may vary during the natural course of hepatitis, imposing a close patient monitoring to detect the appropriate timing of intervention.

In our study, to determinate the potential influence of the *INFL3* polymorphism on HAV infection outcomes in a natural history setting, we genotyped three polymorphisms (rs12979860, rs12980275, and rs8099917) in two

groups comprising subjects who spontaneously cleared HAV infection (acute) and who presented ALF induced by HAV.

Compared to some previous studies [24,25], our results demonstrated that *INFL3* polymorphisms are significantly associated with HAV outcomes. Higher frequency of *INFL3* rs8099917 polymorphism variant alleles was detected in patients with severe hepatitis A outcomes, implying that *INFL3* plays a role in disease progression. Conversely, higher frequency of *INFL3* rs8099917 TT genotype was observed in acute hepatitis A patients, suggesting that *INFL3* plays a role in viral control.

Fathy and colleagues reported that patients with TT genotype showed significantly higher sustained virologic response (SVR) rate than minor allele (TG/GG) carriers (74% vs. 26%, $P=0.004$). Logistic regression analysis revealed that TT carriers had 2.8 higher chance for SVR achievement than G allele carriers TG/GG (OR=2.8, 95% CI=1.4-5.6, $P=0.004$), as similar observed in our study. Although the mechanism by which *INFL3* influences the response to hepatitis A viral infection has not been elucidated in our study, it is likely that the relationship is not specific to HCV infection.

This is the first Brazilian study to focus on the *INFL3* polymorphism to hepatitis A infection outcome. Thus, these results complement the data already published in the literature since reports the *INFL3* polymorphism profile in a mixed-ethnic population and do not focus on a specific community with homogenous ethnic groups. This is also the first study to report the association between *IFNL3* genotypes and ALF patients that tried to fetch an immunogenetic explanation for those patients who develop abruptly acute fulminant outcome. Therewith, It was

observed evidences of *INFL3* SNPs influence on hepatitis A outcomes. Understanding how the host factor influences the immune response to viral infection provides new future opportunities to control these diseases and for the development of effective therapeutics, which justifies the study of this *locus*.

FUNDING

This research was supported by the Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ).

COMPETING INTERESTS

The authors disclose no actual or potential conflicts of interest, including any financial, personal or other relationships with people or organizations within two years of the beginning of this study that could inappropriately influence the study.

ETHICAL ASPECTS

Ethical permission for collecting and testing samples was provided by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee (222/03) which complied with standards of the Helsinki Declaration and current ethical guidelines. A written informed consent was obtained from each participant for genetic material usage before entering into the study.

Table 1 – The distribution of rs12979860, rs12980275 and rs8099917 *INFL3* alleles and genotypes in patients with different clinical outcomes of hepatitis A.

Polymorphism	Acute* vs. ALF		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	Healthy controls n=189 (%)	
	n= 100 (%)	n= 21 (%)					
<i>INFL3 rs12979860</i>							
(genotype)							
			0.824	0.662			
CC	46 (46.0)	8 (38.1)				64 (33.9)	
CT	37 (37.0)	10 (47.6)				95 (50.3)	
TT	17 (17.0)	3 (14.3)				30 (15.9)	
<i>INFL3 rs12979860</i>							
(allele)							
C	83 (83.0)	18 (85.7)	0.985	0.526	1.228	(0.304-7.216)	223 (59.0)
T	54 (54.0)	13 (61.9)	0.673	0.339	1.384	(0.480-4.203)	
<i>INFL3 rs12980275</i>							
(genotype)							
			0.171	0.917			
AA	43 (43.0)	8 (38.1)					67 (35.4)
AG	44 (44.0)	10 (47.6)					96 (50.8)
GG	13 (13.0)	3 (14.3)					26 (13.8)
<i>INFL3 rs12980275</i>							
(allele)							
A	87 (87.0)	18 (85.7)	0.844	0.554	0.896	(0.213-5.406)	230 (60.8)
G	57 (57.0)	13 (61.9)	0.864	0.435	1.225	(0.425-3.729)	
<i>INFL3 rs8099917</i>							
(genotype)*							
			6.272	0.043			
TT	72 (72.7)	10 (47.6)					131 (69.3)
TG	25 (25.3)	11 (52.4)					53 (28.1)
GG	2 (2.0)	0 (0.0)					5 (2.6)
<i>INFL3 rs8099917</i>							
(allele)							
T	97 (98.0)	21 (100.0)	0.778	0.679		**	315 (83.3)
G	27 (27.3)	11 (52.4)	0.046	0.025	2.933	(0.994-8.619)	

* a sample was not typed.

** Undefined.

5 - REFERENCES

1. Martin A, Lemon SM (2006) Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*, 43 (2): S64-S172.

2. Center for Disease Control and Prevention (2008) Travelers' health; yellow book. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC. Available at <http://wwwn.cdc.gov/travel/yellowbookch4-HepB.aspx>.
3. Martin MP, M (2005) Immunogenetics of viral infections. *Curr Opin Immunol* 17(5):510-6.
4. O'Grady JG, Schalm SW, Williams R (1993) Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 342 (8866): 273-5.
5. Weitz M, Siegl G (1985) Variation among hepatitis A virus strains I genomic variation detected by T1 oligonucleotide mapping. *Virus Res* 4:53-67.
6. Tanaka J (2000). Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 18: 57-60
- Vaughan G, Rossi LMC, Forbi JC, de Paula VS, Purdy MA, Xia G, Khudyakov YE (2014) Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and Evolution. *Infection, Genetics and Evolution* 21 (2014) 227–243.
7. Chen J, Wang L, Li Y, Cai B, Fu Y, *et al.*, (2012) Association Analysis between SNPs in IL-28B Gene and the Progress of Hepatitis B Infection in Han Chinese. *PLoS ONE* 7(12): e50787. doi:10.1371/journal.pone.0050787
- Thursz M, Yee L and Khakoo S(2011) Understanding the host genetics of chronic hepatitis B and C. *Semin Liver Dis*31(2): 115-127.
8. Bouzgarrou N, HassenE, BahriO, GabboujS, MamiNB, Triki Hand Chouchane L (2011) Combined effect of pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms on susceptibility to liver cirrhosis in Tunisian HCV-infected patients. *Hepatol Int*5(2): 681-687.

9. Ollier WE (2004) Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine* 28(4-5):174-8.
10. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR (2000) Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 31(4):828-33.
11. De Paula VS, Arruda E, Vitral CL, Gaspar AM (2001) Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the Western Region of the Brazilian Amazon Basin. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96:1123-8.
12. Motta-Castro AR, Martins RM, Yoshida CF, Teles SA, Paniago AM, Lima KM, Gomes SA (2005) Hepatitis B virus infection in isolated Afro-Brazilian communities. *J Med Virol.* Oct; 77(2):188-93.
13. Kim SU, Song KJ, Chang HY, Shin E-C, Park JY, *et al.*, (2013) Association between IL28B Polymorphisms and Spontaneous Clearance of Hepatitis B Virus Infection. *PLoS ONE* 8(7): e69166. doi:10.1371/journal.pone.0069166
14. van den Berg CHBS, Grady BPX, Schinkel J, van de Laar T, Molenkamp R, *et al.*, (2011) Female Sex and IL28B, a Synergism for Spontaneous Viral Clearance in Hepatitis C Virus (HCV) Seroconverters from a Community-Based Cohort. *PLoS ONE* 6(11): e27555. doi:10.1371/journal.pone.0027555.
15. Yu ML, Huang CF, Huang JF, Chang NC, Yang JF, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Chang WY, Li YN, Wu MS, Dai CY, Juo SH and Chuang WL (2011) Role of interleukin-28B polymorphisms in the treatment of hepatitis C virus genotype 2 infection in Asian patients. *Hepatology* 53(1): 7-13.

16. Lampertico P, Viganò M, Cheroni C, Facchetti F, Invernizzi F, Valveri V, Soffredini R, Abrignani S, De Francesco R, Colombo M (2013) IL28B polymorphisms predict interferon-related hepatitis B surface antigen seroclearance in genotype D hepatitis B e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. HEPATOLOGY Mar; 57(3):890-6. doi: 10.1002/hep.25749. Epub 2012 Dec 20. Lavanchy D. (2004) Hepatitis B, virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. J Viral Hepat. 11:97–107.
17. McMahon BJ. (2009) The natural history of chronic hepatitis B virus infection. HEPATOLOGY 49:S45–55.
18. Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, Hussain SK, Kirk GD, Hoots WK, *et al.*, (2010) IL28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. J Infect Dis. 202:1749–53.
19. Martín-Carbonero L, Rallón NI, Benito JM, Poveda E, González-Lahoz J, Soriano V (2012) Does interleukin-28B single nucleotide polymorphisms influence the natural history of hepatitis B? AIDS Res Hum Retroviruses 28:1262–4.
20. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, *et al.*, (2010) Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. Gastroenterology 139:499–509
21. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, *et al.*, (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature 46:399-401.

22. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, *et al.*, (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-a and ribavirin therapy. *Nat Genet*41:1100-1104.
23. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, *et al.*, (2009) Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-a and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*41:1105-1109.
24. Fabris C, Falletti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Bignulin S, *et al.*, (2011) IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with livercirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the developmentof HCC. *J Hepatol*.54:716–22.

ARTIGO 5 - Acute liver failure upon hepatitis A virus infection: Role of host nucleotide polymorphisms

ACUTE LIVER FAILURE UPON HEPATITIS A VIRUS INFECTION: ROLE OF HOST NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS

Renata Tourinho^a, Gilberto Vaughan^b, Livia Rossi^c, Paula Rahal^c, Carlos Valencio^c, Lia Laura Lewis-Ximenes^d, Marcelo Pinto^a, Joseph C. Forbi^b, Yury Khudyakov^b, Vanessa Salete de Paula^{a*}

^aLaboratorio de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, HPP, Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

^bLaboratory branch, Division of Viral Hepatitis, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.

^cDepartment of Biology, Institute of Bioscience, Language and Exact Science, São Paulo State University, São José do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil.

^dLaboratorio de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

*Corresponding author: Vanessa de Paula, Ph.D. Pavilhão Helio e Peggy Pereira, sala B219, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Cx Postal 926. Av. Brasil 4365, CEP: 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel +55 21 2562-1876; E-mail address: vdepaula@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT. Upon hepatitis A virus (HAV) infection, most cases develop mild or asymptomatic disease. However, some patients can progress to a serious, life-threatening disease characterized by rapid deterioration of the liver, hepatic encephalopathy, and coagulopathy known as acute liver failure (ALF). HAV infection features a dynamic interplay of viral and host factors that in conjunction are responsible for a wide range of disease outcomes. Rare hepatitis A clinical presentations have been associated with host-specific factors. Thus, molecular identification of predisposing alleles for HAV severe disease is important for patient management. Here, twenty eight human nucleotide variations, including single nucleotide polymorphisms (SNP) and insertions, associated with HAV infection were characterized in a cohort of ALF and classical HAV cases. No single polymorphism was shared by ALF cases. Data mining analysis suggested that eight SNPs were found to be in statistically significant association with clinical outcome of hepatitis A. These eight significant SNPs were: TGFbeta1 rs1800469; ABCB1 rs1045642; IL10 rs1800871 (IL10b); and TNF-alpha rs1799964 and rs1800630 (TNF-alpha a and b). Understanding how host factor influences the immune response to viral infection provides opportunities to control these diseases

and for the development of effective therapeutics, which justifies the study of this genes

Keywords: Acute liver failure; hepatitis a; nucleotide polymorphism.

1. BACKGROUND

Hepatitis A virus (HAV) infection is the commonest cause of acute hepatitis worldwide, representing an important public health problem. It is estimated that 1.5 million cases of HAV infection occur every year [1,2]. The natural course of infection greatly varies among individuals, and while most patients are presented with a relatively benign disease [3] ³, some can progress to an unusual, severe liver disease and death⁴⁻⁷. [4-8]. Acute liver failure (ALF) is characterized by rapid deterioration of the liver, hepatic encephalopathy, coagulopathy and death. Approximately, 0.5-1% of acute HAV infections result in ALF [9,10] ¹⁰. HAV infection features a dynamic interplay of viral and host factors that in conjunction determine disease outcome. Nevertheless, the molecular mechanisms responsible for the wide range of HAV-related disease presentation are not completely understood [11] ¹¹.

Predisposition to unfavorable disease outcome has been studied in HAV acute infected patients. Several studies suggest that host genetic factors may play an important role in clinical presentation of HAV infection. Indeed, development of ALF upon HAV infection among member of the same family supports the role of host factors [12,13]. Certain alleles in the CYP2E1 gene are more frequent in HAV cases, and have been associated with an increased risk of liver disease [14] ¹⁴. Moreover, ALF cases exhibit higher frequencies of genetic polymorphisms in

positions -1031C and -863A in the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter region [15] [15](#). Other genetic susceptibility factors predisposing to severe forms of HAV-induced hepatitis have been reported in HAV-induced ALF in children. The study identified a 6-amino-acid insertion in the virus cellular receptor, TIM1/HAVCR1, associated with severe liver disease [16] [16](#). Genome-Wide Association Study (GWAS) analyzing the relationship between infection, disease progression and patient's background under different scenarios linked polymorphisms in ABCB1, TGFB1, and XRCC1 genes with susceptibility to HAV infection in Mexican Americans [17] [17](#). Recently, whole human genome sequencing of unrelated HAV-associated ALF cases identified several candidate alleles. Polymorphisms in MST1R, DNAH12, GPC1, NCR3LG1, NFATC4, RELN, STXBP1, TTC40 genes, all important genes in hepatic physiology, were associated with ALF [18] [18](#).

Variations on hepatitis A clinical outcomes highlight the importance of identifying the underlying mechanisms of viral pathogenesis and disease progression as well as, establishing the host genetic factors that could contribute to ALF predisposition. Analysis of genetic mutations, such as single nucleotide variations - SNVs and INDELS, in key genes and examination of their relationship to HAV-induced ALF will further our understanding of disease pathogenesis. Here, all twenty eight human nucleotide variations reported in the literature, including single nucleotide polymorphisms (SNP) and insertions, associated with HAV infection were characterized in a cohort of ALF and classical HAV cases.

2. STUDY DESIGN

Patients and controls

The cohort included individuals routinely monitored by the Viral Hepatitis Ambulatory from Oswaldo Cruz Institute, between August 2011 and January 2013. Ethical permission for collecting and testing samples was provided by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee (222/03) which complied with standards of the Helsinki Declaration and current ethical guidelines. A written informed consent was obtained from each participant for genetic material usage before enrollment in the study. A total of 64 samples were analyzed in this study, 27 ALF cases (12 non-viral, 11 HAV ALF and 4 HBV ALF) and 37 classical HAV cases. Blood samples from 27 ALF cases, according to O'Grady *et al.*, 1993 [19] criteria¹⁹, who underwent liver transplantation were collected between 2004 and 2010. Briefly, whole blood from each individual was obtained by venipuncture, centrifuged and serum aliquots were stored at -70°C until use. Viral hepatitis antibodies were assayed using commercially available ELISA kits, following the manufacturer's instructions. Acute viral hepatitis patients were characterized by self-limited hepatitis during a 6 months follow up. HAV cases were identified by the presence of anti-HAV IgM antibodies (ETI- HAV-IgMKPLUS, DiaSorin, USA).

Viral genotyping

Viral genomes were purified from serum samples using the MagNA Pure LC system. HAV RNA was submitted to One-Step RT-PCR (QIAGEN, Valencia, CA, USA) using primers for the HAV VP1/2A junction (Table 1). PCR products were used as templates for Nested-PCR using internal primers (Quanta BioSciences). PCR amplification was conducted in a LightCycler 480 (Roche) and melting curve

analysis was performed to identify positive samples. Sequencing (both DNA strands) was carried out with the corresponding internal primers. Sequence contigs were assembled SeqMan Pro software (DNASTAR inc). Viral genotypes were inferred by neighbor-joining phylogenetic analysis using MEGA v5 software package [20] ²⁰ with 1000 bootstraps replicates.

DNA extraction and host polymorphism genotyping

Genomic DNA was extracted from whole blood using an automated system (MAGNA Pure LC system; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) and the Total Nucleic Acid Isolation kit® (Roche), according to the manufacturer's instructions. Polymorphisms at selected positions were amplified by polymerase chain reaction (PCR), using their respective primers sets (Table 1). Sequencing was carried out in an automated 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using Dye Terminator (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Chromatograms were analyzed using SeqMan Pro software (DNASTAR inc., Madison, WI, USA) and genotypes were determined by the characteristic nucleotide peak. Double peaks were interpreted as heterozygote and single peaks as homozygote genotypes.

Data mining Analysis

The data mining algorithms was applied to extract association rules between variations of the DNA sequence and disease outcome, i.e. ALF. For the process of generating association rules, we used a tool [21] ²¹ previously developed by our group. In this tool, the algorithm AprioriMR was chosen for data

mining due to its higher stability when applied to multiple attributes. The analysis contained 64 records and 40 attributes, three related to the disease ("Outcome", "Etiology" and "Fulminant cases") and 28 related to genetic polymorphisms. The effectiveness of the tool was verified through experimental tests and parameters set at 40%. After data standardization, the base contained 96 attributes, of which 84 were related to the SNPs. Association rules were generated using 6 attributes at a time: Outcome: State patient; Etiology: Hepatitis Type; Fulminant cases: Disease Severity; SNP: genotypes; SNP_esq: allele_1; and SNP_dir: allele_2. The generated rules were subjected to a filter, where redundant or irrelevant results to the initial goal were removed through the use of inclusive or restrictive templates, in which inclusive templates represent the desired result, i.e., the general format of rules to be generated. Finally, information from the association was obtained as support values (frequency of simultaneous occurrence) and confidence, which informs the frequency of survivals on the occurrence.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Socio-demographic and epidemiological data

The baseline clinical and biochemical characteristics of the cases and healthy controls in the study groups were summarized in Table 3. It was investigated the distribution all polymorphisms current described in the literature that seem to e associated with ALF outcome. It was examined 27 patients with viral and non-viral ALF and 37 controls in a cross-sectional case-control study. The 27 ALF patients had severe liver insufficiency and underwent to liver transplantation. Viral ALF A (HAV infection) were diagnosed by serology, without

other apparent causes for ALF. Samples included in this study were tested by qualitative PCR for HAV VP1/2A junction. Genotype analysis showed that all hepatitis A patients were infected by genotype IA.

Host-genetic data

Eight SNPs were found to be in statistically significant association with clinical outcome of hepatitis A (Table 3). These eight significant SNPs were: TGFbeta1 rs1800469; ABCB1 rs1045642; IL10 rs1800871 (IL10b); and TNF-alpha rs1799964 and rs1800630 (TNF-alpha a and b).

Data mining analysis showed, for the TGFbeta1 rs1800469 polymorphism, 9.4% of all patients presented together the T/T genotype and acute liver failure outcome. Of all patients, who presented T/T genotype for TGFbeta1 rs1800469 polymorphism, 85.7% were referred to transplant due to ALF outcome. C/T and C/C genotypes were more prone to auto-limited hepatitis, 64.3% of individuals with C/T genotype and 46.4% with C/C genotypes presented acute outcome. TGFbeta1 is a multifunctional cytokine that regulates proliferation and differentiation of a wide variety of cell types. It plays a crucial role in the pathogenesis of liver injury during acute hepatitis A infection. As observed by Zhang and colleagues (2012), individuals carrying the functional T allele of TGFbeta1 rs1800469 are more prone to have been infected with HAV. The TT genotype of TGFB1 rs1800469 (C-509T), located at nucleotide -509 in the TGFbeta1 promoter, is associated with higher plasma levels of TGFB1 with C-509T responsible for 8.2% of additive genetic variance (Grainger *et al.*, 1999). The T allele of C-509T alters TGFbeta1 transcription activity by influencing affinity of transcription factor Yin Yang 1 for its

promoter (Silverman *et al.*, 2004). Excessive release of TGFbeta1 in serum during acute hepatitis A infection can markedly inhibit antigen-specific T cell activation and proliferation as well as humoral response (Li *et al.*, 2006). This may explain why carriers of the TGFbeta1 rs1800469 TT genotype are more prone to ALF outcome.

For ABCB1 rs1045642 SNP, TT genotype was predominantly observed in acute cases, 63.6% respectively. This fact could be explained because ABCB1 gene is involved in multidrug resistance and antiapoptosis. Up-regulated expression of ABCB1 in human hepatocytes and bile ductules in viral hepatitis may offer protection against the accumulation of toxic bile constituents and render these cells resistant to oxidative stress. Individuals with one or two copies of T allele seems to be less prone to HAV infection, suggesting that ABCB1 rs1045642 may affect the individual's susceptibility to HAV infection via the protective effect of ABCB1 in liver during viral hepatitis (Zhang *et al.*, 2012).

Approximately 50% of the observed interindividual variability in IL-10 production can be explained by genetic factors (Reuss *et al.*, 2002). The polymorphisms in the promoter region of the IL-10 gene on chromosome 1 (1q31) determined the variability in IL-10 production (Eskdale *et al.*, 1998). The proximal promoter contains three common single nucleotide polymorphisms (SNPs) at positions 1082 (rs1800896, A/G), 819 (rs1800871, T/C), and 592 (rs1800872, A/C) bp from the transcription start site. As IL-10 expression levels seem to be important for the pathophysiology of ALF, naturally occurring sequence variations in the IL-10 gene promoter may impact liver damage and potentially disease progression of ALF. It was reported that serum IL-10 levels were higher in individuals with ALF

than in those with hepatitis or healthy controls (Yumoto *et al.*, 2002), and a significant rise in IL-10 secretion was seen in monocytes from patients with ALF (Antoniades *et al.*, 2007). There is a biphasic response to IL-10 secretion, where an early rise is paralleled by release of pro-inflammatory mediators (Osuchowski *et al.*, 2006), the second peak in IL-10 occurs in the later stages of endotoxaemia, leading induce monocyte deactivation (van Dissel *et al.*, 1998). During the pathophysiological progression of ALF, monocyte deactivation is associated with the exacerbation of liver inflammation and poor outcome (Antoniades *et al.*, 2005).

Regarding IL-10 polymorphisms, only IL-10 rs1800872 (“IL-10c”) showed significant association in data mining analysis of the present study. The AA genotype for IL-10 rs1800872 polymorphism was observed in 61.5% of acute cases; and AC genotype in 59.1% of the ALF patients. This association is similar to Yan and colleagues (2009) findings in their HBV-related acute liver failure study. Their results showed the A-592C polymorphism is a nuclear protein binding site, and the disease susceptible of -592C allele had a higher transcription activity compared with -592A allele. -592C allele was associated with higher luciferase reporter gene activity and IL-10 protein production, and the high circulating levels of IL-10 was suggested as a marker of ALF with viral and nonviral aetiology.

Data mining analysis showed, for all subjects who presented TC genotype for the TNF-alpha rs1799964 (TNF-alpha a, T-1031C) polymorphisms, 58.3% presented ALF outcome compared to 34.6% of acute cases. On the other hand, for all subjects who presented CA genotype for the TNF-alpha rs1800630 (TNF-alpha b, C-863A) polymorphism, 55.6% presented ALF outcome compared to 33.3% of acute cases. Tumor necrosis factor (TNF) is an inflammatory cytokine that may be

associated with massive hepatic necrosis. In a mouse model of fulminant hepatitis, TNF played an important role in mediating the death of hepatocytes, and anti-TNF antibody inhibited injury (Trautwein *et al.*, 1998). There are variations in the production rates of cytokines among individuals. Some of the individual differences in cytokine production may be related to polymorphisms in the cytokine genes themselves, or in genes that regulate cytokine gene transcription. Higuchi and colleagues (1998), reported that in vitro stimulated mononuclear cells from Japanese individuals with -1031C and -863A alleles produced higher concentrations of TNF- α than such cells from individuals who had the -1031T and -863C alleles. In the present study, ALF patients had higher frequencies of positions -1031C and -863A in the TNF- α promoter region. It seems likely that positions -1031C and -863A in the TNF- α promoter region are important for TNF production and the prognosis of TNF-related disease.

4. CONCLUSION

Thus, it was observed that specific polymorphisms of the TGF-beta1, ABCB1; IL10, and TNF-alpha genes can influence the clinical outcomes of hepatitis A. Understanding how host factors influence the immune response to viral infection offers new opportunities to control hepatitis A and for the development of effective therapies, which justifies the study of these genes.

Table 1- Viral and host genome primers sequences used in the present study.

Target Gene	Chromossome	Inicial genome position	Final genome position	Foward primer	Reverse primer
<i>Viral Genome</i>					
VP1/2A HAV PCR		2822	3277	GACAGATTCTACATTGGATTGGT	CCATTTCAAGATCCACACACT
VP1/2A HAV Nested		2847	3234	CTATTGAGATTGCAAATTACAAT	AACTCATTATTTCATGCTCCT
<i>Human Genome</i>					
TGFBeta1	19	41354241	41354541	GGTCGCAGGGTTGAGTGACAG	AGGGTCTGTCAACATGGGGGC
XRCC1	19	43553272	43553572	CTTGGGGACCTTAGAAGGTGACA	CCCCCTACCCCTCAGACCCACG
ABC81 (MDR1)	7	87509179	87509479	GAATGTTCAAGTGGCTCCGAGCAC	CCCAGGCTGTTTATTGAAGAGAGACTTAC
TIM1 (HAVCR1)	5	157052415	157052715	TCCAACCGTCACGACTGTTGCA	GTTGTGTTGAAACAGTCATTGTCTGC
CYP2E1	10	133534890	133535190	CCTATTGGGCTCAAGCGATCCTC	GGCCAGGAAGGTCTCGAACTCC
TTC40	10	134739938	134740238	AGCACCTCAAGCTGGGACA	AAACTGTTTATATCTGCAGGATCTGGG
RELN	7	103234629	103234929	CATCATGCTATTGTGCTTAAGTGCCTT	GCCTTCAAGTATGCCAAGTTGTCA
NCR3LG1	11	17390293	17390593	AGCAGCAGTTGTGGTTTCTCTGG	CACAGGGCTGAACCTTGTCTTGG
STXBP1	9	130422193	130422493	CACAGTCCGCTCACTCTCATCAGT	CCTGCCTAGTTTGGCTCAGCC
GPC1a	2	241404368	241404668	CAGCCACCTCTCACACCCCT	AGCTCTGGCTCCGTCTTCACTC
GPC1b	2	241404912	241405212	CGGGTGAGCACCTGCGGA	CATCGAAGCTGCGCAGCTGG
GPC1c	2	241405532	241405832	TATAGGCATGCGCCATCACGC	TTCATTATATCAGAACAAGGATCTCGAGGAAAG
DNAH12a	3	57391441	57391741	GGCTTCAATCATATGAGCCAATTCCT	GCATAATGTTGAGCACCAGAGACTGATAA
DNAH12b	3	57457095	57457395	CTAATTTGCTCTCTGTTTTACACCTCC	GAGAACTGGGGATTGGGAGATCC
MST1Ra	3	49924622	49924922	AGGAACAAGGTGGAGGGCCACT	GTGCAGCTGCCAGCAACTACAT
MST1Rb	3	49933311	49933611	TAGGCCCTCTGCCGTGTTT	GCAGTATATTGGGCTGGGCGC
NFATC4	14	24838751	24839051	GAGTGAGCAAGATTGAGCATAAACAGCTAC	GGCCTGTTGACTTTTTATGATCTGG
HLA-DQA1	6	32636445	32636745	TGAGCACTGAGAAGAATTACCCAGC	GGAAATTTTCCCTGAGTTGATTTCCC
ESR1a	6	151807792	151808092	TCTGAGCCTTCTGCCCTGCG	TTGTGCTGTCCAGGTACACC
ESR1b	6	151842050	151842350	TCCAGGGTTATGTGGCAATGACG	TTATTTCAAGAACATTAGAGACCAATGCTC
IL-10a	1	206773402	206773702	AGCAACACTCCTCGCCGCAA	GGGGTGAAGAAGTTGAAATAACAAGG
IL-10b	1	206773139	206773439	TTTCTTCTATGTGCTGGAGATGGTGAC	ATATGCTAGTCAGGTAGTGCTCACCATGAC
IL-10c	1	206772912	206773212	GGTGGGGACAGCTGAAGAGGT	CAAGTAAAAATGAGGGGTGGGCTA
TNF-alpha(a)	6	31574381	31574681	GGATAAGGGCTCAGAGACTTCAGG	CCCCAGAGGTCTCTGTAAACCCAT
TNF-alpha(b)	6	31574549	31574849	TAGCGGCTCTGAGGAATGGTTAC	CTTCTAAACGTCCCTGTATTCATAC
miR-164a	5	160485261	160485561	CAGGCCCTGACTGCAAGGAGG	TGAGACTCTGCTTCTGTCTCCAGTCT
TLR3	4	186082770	186083070	CAATTTCAATAAGGCCAGGTCAAGTAC	TGCCTACTCCCCAAGATTGATG
TANK	2	61138465	61138765	GAAGTAACTAGACATTGCTAGGTCCCA	CACCTACCCACTCCCATCTCTCAC

Table 2 – Host genetic polymorphisms associated to Acute liver Failure outcome included in the present study.

Gene	Chr	Location	rs Number	Population	Associated allele	Association	Reference
<i>TGFBeta1</i>	19	41354391	rs1800469	Mexican Americans	C/T	Increased risk of HAV infection , it plays a crucial role in the pathogenesis of liver injury during acute hepatitis A infection.	Zhang et al., 2012.
<i>XRCC1</i>	19	43553422	rs1799782	Mexican Americans	C/T	Increased risk of HAV infection , it is a major DNA repair gene involved in efficient repairs of single-strand DNA breaks and base excision to correct DNA damage caused by oxidative stress and inflammation.	Zhang et al., 2012.
<i>ABCB1 (MDR1)</i>	7	87509329	rs1045642	Mexican Americans	C/T	Decreased risk of HAV infection , Up-regulated expression of ABCB1 in human hepatocytes and bile ductules in viral hepatitis may offer protection against the accumulation of toxic bile constituents and render these cells resistant to oxidative stress.	Zhang et al., 2012.
<i>TIM1 (HAVCR1)</i>	5	157052565	-	Argentinean	insMTTVP	Susceptibility to severe hepatitis A virus infection , TIM-1 protein containing the 157insMTTVP insertion polymorphism bound HAV more efficiently. Tim-1 has been found to be an important T cell costimulatory molecule that regulates the activation of and the induction of tolerance in T cells.	Kim et al., 2011
<i>CYP2E1</i>	10	133535040	rs6413432	Indian	A/T	Prognostic marker for assessing the predisposition of patients to liver disease.	Deka et al., 2010
<i>TTC40</i>	10	134740088	rs118132336	Asian, White and Latino	T/A	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>RELN</i>	7	103234779	-	Asian, White and Latino	T/C	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>NCR3LG1</i>	11	17390443	rs78608838	Asian, White and Latino	C/A	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>STXBP1</i>	9	130422343	-	Asian, White and Latino	C/T	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>GPC1</i>	2	241404518	-	Asian, White and Latino	C/TT	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>GPC1</i>	2	241405062	-	Asian, White and Latino	G/A	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>GPC1</i>	2	241405682	-	Asian, White and Latino	C/G	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>DNAH12</i>	3	57391591	-	Asian, White and Latino	T/C	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>DNAH12</i>	3	57457245	-	Asian, White and Latino	C/T	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>MST1R</i>	3	49924772	-	Asian, White and Latino	G/A	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>MST1R</i>	3	49933461	-	Asian, White and Latino	C/T	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>NFATC4</i>	14	24838901	-	Asian, White and Latino	A/AGGGGGTGCT	Prognostic marker for HAV acute liver Failure.	Long et al., 2014
<i>HLA-DQA1</i>	6	32636595	rs9272346	Chinese	G/A	May confer a protective effect against Acute Liver Failure in women	Yu et al., 2014
<i>ESR1</i>	6	151807942	rs2077647	Chinese	T/C	[c30I; c453-397I] haplotype may be a risk factor for genetic susceptibility to HBV-related ALF	Yan et al., 2012
<i>ESR1</i>	6	151842200	rs2234693	Chinese	C/T	[c30I; c453-397I] haplotype may be a risk factor for genetic susceptibility to HBV-related ALF	Yan et al., 2012
<i>IL-10 gene</i>	1	206773552	rs1800896	Chinese	A/G	Variant were significantly higher in HBV-related ALF patients than in blood donors and asymptomatic HBV carriers	Yan et al., 2009
<i>IL-10 gene</i>	1	206773289	rs3021097/ rs1800871	Chinese	C/T	Variant were significantly higher in HBV-related ALF patients than in blood donors and asymptomatic HBV carriers	Yan et al., 2009
<i>IL-10 gene</i>	1	206773062	rs1800872	Chinese	A/C	Variant were significantly higher in HBV-related ALF patients than in blood donors and asymptomatic HBV carriers	Yan et al., 2009
<i>TNF-alpha</i>	6	31574531	rs1799964	Chinese	C/T	The allelic frequencies of positions -1031C and -863A in the ALF patients were significantly higher compared to findings in control subjects	Tsuchiya et al., 2004
<i>TNF-alpha</i>	6	31574699	rs1800630	Chinese	A/C	The allelic frequencies of positions -1031C and -863A in the ALF patients were significantly higher compared to findings in control subjects	Tsuchiya et al., 2005
<i>mi R-164a</i>	5	160485411	rs2910164	Chinese	C/G	The GG genotype is reversely associated to Acute-on-chronic liver failure	Jang et al., 2013
<i>TLR3</i>	4	186082920	rs3775291	-	C/T	Risk factor for the development of Acute-on-chronic liver failure	Rong et al., 2013
<i>TANK</i>	2	61138615	rs3820998	Chinese	G/T	G>T variant is a protective factor in the development of Acute-on-chronic liver failure	Song et al., 2012

Chr-Chromosome

Table 3 – Social, clinical, virological data and host polymorphism genotyping of the study population.

Social, Clinical and Virological data										Host polymorphism genotyping																									
Identification	Age	Gender	HE*	Outcome	ALT	AST	INR**	Etiology	Outcome	Viral Genotyping	TGFBeta1	XRCC1	ABC1 (MDR1)	TTC40	RELN	NCR3LG1	STXB1	GPC1b	GPC1c	DNAH12a	DNAH12b	MST1Ra	MST1Rb	NFATC4	HLA-DQA1	ESR1a	ESR1b	IL-10b	IL-10c	TNF-alpha(a)	TNF-alpha(b)	miR-164a	TLR3	TANK	
FHN-1	22	F	2	SURVIVAL	381	567	3,3	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CC	TA	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CT	TC	AC	CT	AC	CC			
FHN-2	20	F	2	SURVIVAL	314	562	2,1	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CC	TC	AC	CC	AC	GG			
FHN-3	6	M	4	SURVIVAL	292	357,5	7,8	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TC	CT	TC	AC	CT	AC	CG	CT	GG	
FHN-4	52	F	3	DEATH	283	410	6,8	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	CC	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CC	TC	AC	TT	CC	CG			
FHN-5	20	F	2	DEATH	122	412	18,2	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CT	TT	TT	CA	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CT	TT	AA	TT	CC	CG	CC	GG	
FHN-6	48	F	4	DEATH	572	3038	1,7	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	CC	TT	AA	CT	AC	CG				
FHN-7		F	ND	ND	ND	ND	ND	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TC	CT	CC	CC	TT	CC		CC		
FHN-8	11	F	1	SURVIVAL	1842	1662	3,5	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	CT	CC	CC	TT	CC	CG				
FHN-9	27	F	4	DEATH	2667	5888	4,8	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CT	AA	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TC	CT	CC	CC	TT	AC	GG	CC		
FHN-10	9	F	2	DEATH	1806	1490	8,8	Non-viral	ALF	ND	TT	CC	CT	TT	TT	CA	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	TT	TC	AC	CT	CC	CG			
FHN-11	14	F	3	DEATH	1393	1773	ND	Non-viral	ALF	ND	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CT	CC	CT	CC	GG	TT	GG		
FHN-12	32	F	4	DEATH	1033	642	6	Non-viral	ALF	ND	TT	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CT	TC	AC	CT	AC	GG			
FHB-1	26	M	4	DEATH	810	458	3,5	hepatitis B	ALF	A1	CC	CC	CT	TA	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	CC	CC	CC	CT	CC	CG	CT	GG		
FHB-2	31	F	2	SURVIVAL	314	562	2,1	hepatitis B	ALF	A1	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	CC	TC	AC	CT	CC	CG				
FHB-3	45	M	3	SURVIVAL	700	530	7,5	hepatitis B	ALF	A1	TT	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TT	CT	TC	AC	CT	AC	CG	CT	GT	
FHB-4	64	M	4	DEATH	775	1003	14,6	hepatitis B	ALF	D3	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TT	CT	CC	CC	CT	AC	GG			
FHA-1		ND	ND	ND	ND	ND	ND	hepatitis A	ALF	IA	CC	CC	TT	AA	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	CT	CC	CC	TT	CC					
FHA-2	47	M	4	DEATH	1709	2638	1,5	hepatitis A	ALF	IA	CC	CT	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CT	TC	AC	CT	AC	GG			
FHA-3	7	M	2	DEATH	1562	5611	2,5	hepatitis A	ALF	IA	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TT	CT	TT	AC	TT	CC			GG	
FHA-4	1	F	2	DEATH	668	171	6,3	hepatitis A	ALF	IA				TT		CC	CC							No											
FHA-5	5	F	4	SURVIVAL	326	331	6,7	hepatitis A	ALF	IA	CC	CC	CT	AA	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TC	TT	CC	CC	TT	CC	GG		GT	
FHA-6	17	M	2	SURVIVAL	200	120	1,7	hepatitis A	ALF	IA	TT	CC	TT	TT	TT	CC	CC	CC	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TT	TT	AA	TT	CC	CG				
FHA-7	14	M	4	DEATH	877	1790	4,3	hepatitis A	ALF	IA	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG						No	CC	CT	CC	CC	CT	CC			TT		
FHA-8	14	M	4	DEATH	313	330	8,6	hepatitis A	ALF	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC			CC	GG	No	GG	TT	TT	TC	AC	TT	CC	GG			
FHA-9	10	M	2	SURVIVAL	305	52	1,5	hepatitis A	ALF	IA	TT	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TT	TT	TC	AA	CT	CC	GG		TT	
FHA-10	28	F	4	DEATH	16	93	2,2	hepatitis A	ALF	IA	TT	CC	TT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TC	CT	TC	AC	TT	AC	GG			
FHA-11	14	M	2	SURVIVAL	357	346	1,5	hepatitis A	ALF	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	TT	TC	AC	CT	CC	CG	CT		
Pat-1	53	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TC	CT	CC	CC	TT	CC	CC			
Pat-2			0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CT	TC	AC	CT	CC	CG	CC	GT	
Pat-3	82	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	TT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CC	CC	CC	TT	CC	GG			
Pat-4			0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	TT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TC	CT	TC	AC	TT	CC	GG	CC	GT	
Pat-5			0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TT	CC	CC	TT	CC	CG				
Pat-6	38	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	TT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	CT	AC	CC	CC	CC	CC		GG		
Pat-7	9	F	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No		TC	CT	TC	AC	CT	AC	GG			
Pat-8	15	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	CC	CC	TC	AC	TT	CC	GG		GG		
Pat-9	19	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No			CC	CC	CC	TT	CC	GG			
Pat-10	25	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	TT	TT	AA	CT	AC	CG	TT	GG	
Pat-11	30	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TT	TT	AA	CT	AC	CC				
Pat-12	34	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	TT	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No		TC							GG	TT	
Pat-13	66	F	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TT	TT	CC	CC	TT	CC	CC			
Pat-14	30	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TC	CT	CC	CC	TT	CC	CG	TT	GT	
Pat-15	24	F	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TT	CT	TT	AA	TT	CC	CG			
Pat-16	13	F	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG		CC	CC	CT	CC	GG	TT	GT		
Pat-17	21	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	TT	TT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TT	TT	CT	CT	CC	CC	CC			
Pat-18	24	F	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	TT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TT			CC	CC	GG	TT	GG		
Pat-19	27	M	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	TT	TT	AA	TT	CC	CG			
Pat-20	18	F	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	TT	TT	TT	CA	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TT	TT	AA	TT	CC	CG			GG	
Pat-21	31	F	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No		TC	CT		AC	TT					
Pat-22			0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	AA	TC		CC	TT	AC					
Pat-23			0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	CC	TT	TT	AA	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	CC	CT	CC	CC	CT	CC	GG			
Pat-24			0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CT	AA	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	CC	TT	CC	TC	AA	TT	CC	CC	CT	GT	
Pat-25	67	F	0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TT	TT	CC	CC	TT	CC	CG			
Pat-26			0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CC	CC	CC	TT	TT	AA	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TC	CC	TC	AA	TT	AC	CG	CT	GG	
Pat-27			0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	CT	TT	TT	CC	CC	GG	CC	TT	CC	GG	CC	No	GG	TT	CT	TC	CT	CC	GG				
Pat-28			0	SURVIVAL	ND	ND	ND	hepatitis A	Acute	IA	CT	CC	CC	TT	TT	CC	CC	GG																	

References

1. Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*. 2006;43:S164-72.
2. WHO. Hepatitis A, Fact sheet N°328. 2014.
3. Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:38-58.
4. Willner IR, Uhl MD, Howard SC, Williams EQ, Riely CA, Waters B. Serious hepatitis A: an analysis of patients hospitalized during an urban epidemic in the United States. *Annals of internal medicine*. 1998;128:111-4.
5. Brown GR, Persley K. Hepatitis A epidemic in the elderly. *Southern medical journal*. 2002;95:826-33.
6. Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Saisho H, Saotome N, Suzuki K, et al. Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA: strains from fulminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions. *Gut*. 2002;51:82-8.
7. Fujiwara K, Yokosuka O, Fukai K, Imazeki F, Saisho H, Omata M. Analysis of full-length hepatitis A virus genome in sera from patients with fulminant and self-limited acute type A hepatitis. *Journal of hepatology*. 2001;35:112-9.
8. Santos DR, Villar LM, Paula VS, Lima GS, Gaspar AM. Hepatitis A virus subgenotypes dissemination during a community outbreak in a surrounding region of Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103:254-8.
9. O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet*. 1993;342:273-5.
10. Vaughan G, Forbi JC, Xia GL, Fonseca-Ford M, Vazquez R, Khudyakov YE, et al. Full-length genome characterization and genetic relatedness analysis of hepatitis A virus outbreak strains associated with acute liver failure among children. *Journal of medical virology*. 2014;86:202-8.

11. Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, de Paula VS, Purdy MA, Xia G, et al. Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;21:227-43.
12. Yalniz M, Ataseven H, Celebi S, Poyrazoglu OK, Sirma N, Bahceitoglu IH. Two siblings with fulminant viral hepatitis A: case report. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2005;48:173-5.
13. Ajmera V, Xia G, Vaughan G, Forbi JC, Ganova-Raeva LM, Khudyakov Y, et al. What factors determine the severity of hepatitis A-related acute liver failure? *Journal of viral hepatitis*. 2011;18:e167-74.
14. Deka M, Bose M, Baruah B, Bose PD, Medhi S, Bose S, et al. Role of CYP2E1 gene polymorphisms association with hepatitis risk in Northeast India. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2010;16:4800-8.
15. Tsuchiya N, Tokushige K, Yamaguchi N, Hasegawa K, Hashimoto E, Yamauchi K, et al. Influence of TNF gene polymorphism in patients with acute and fulminant hepatitis. *Journal of gastroenterology*. 2004;39:859-66.
16. Kim HY, Eyheramonho MB, Pichavant M, Gonzalez Cambaceres C, Matangkasombut P, Cervio G, et al. A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:1111-8.
17. Zhang L, Yesupriya A, Hu DJ, Chang MH, Dowling NF, Ned RM, et al. Variants in ABCB1, TGFB1, and XRCC1 genes and susceptibility to viral hepatitis A infection in Mexican Americans. *Hepatology*. 2012;55:1008-18.
18. Long D, Fix OK, Deng X, Seielstad M, Luring AS. Whole genome sequencing to identify host genetic risk factors for severe outcomes of hepatitis a virus infection. *Journal of medical virology*. 2014;86:1661-8.

19. O'Grady JG, Williams R. Classification of acute liver failure. *Lancet*. 1993;342:743.
20. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 2011;28:2731-9.
21. Valencio CR. Multi-relational algorithm for mining association rules in large databases. 12th INTERNATIONAL CONFERENCE ON PARALLEL AND DISTRIBUTED COMPUTING, APPLICATIONS AND TECHNOLOGIES Gwangju: IEEE Computer Society; 2011, p. 269-74.
22. Thio CL, Thomas DL, Carrington M. Chronic viral hepatitis and the human genome. *Hepatology*. 2000;31:819-27.
23. Karra VK, Gumma PK, Chowdhury SJ, Ruttala R, Polipalli SK, Chakravarti A, et al. IL-18 polymorphisms in hepatitis B virus related liver disease. *Cytokine*. 2015;73:277-82.

5 – DISCUSSÃO

No Brasil, a infecção pelo HAV é responsável pela maioria das notificações de hepatite viral. Mudanças nos padrões epidemiológicos têm sido descrito em diversas regiões devido a melhorias no saneamento e condições socioeconômicas, assim como em diversos países em desenvolvimento. Com isso, houve um aumento no número de indivíduos suscetíveis e, conseqüentemente, na ocorrência de surtos em faixas etárias mais avançadas, o que é preocupante, pois a doença tende a ser mais grave em idades mais elevadas (Vital *et al.*, 2012; 2008).

A questão da implementação de um programa nacional de vacinação contra a hepatite A no Brasil foi amplamente discutida, tendo em conta a dificuldade de estabelecer um projeto unificado em uma área de dimensões continentais e macro-regiões com perfil epidemiológico distinto da doença. Concomitantemente a essa ampla discussão, o presente estudo teve início em 2011, quando a vacina ainda não tinha sido incluída no calendário nacional de imunização infantil.

Nesses últimos anos, muitos fatores de risco têm sido avaliados com o objetivo de identificar pacientes que podem ter uma predisposição a um desfecho mais grave da hepatite A. Os estudos epidemiológicos de surtos e casos esporádicos são importantes para investigar a disseminação do vírus e estabelecer diferentes fatores virais e socioambientais associados ao curso da infecção pelo HAV. No entanto, estudos de caso-controle, de genes candidatos e de associações alélicas tem sido realizados para investigar fatores genéticos do hospedeiro e o curso da doença.

Neste panorama, com o objetivo de compreender a patogênese do HAV e verificar fatores de predisposição à severidade da hepatite A, fatores virais e do hospedeiro foram avaliados no presente estudo, então dividido em duas partes:1) Estudar a disseminação do HAV em estudos transversais de prevalência e de transmissão horizontal - composição da população amostral para estudo

epigenético; 2) Investigar os fatores moleculares e imunogenéticos do hospedeiro responsáveis pela diversidade na gravidade da hepatite A.

A primeira investigação epidemiológica foi realizada em áreas de difícil acesso do Pantanal Sul matogrossense entre casos esporádicos de hepatite A (**Artigo 1**). Este estudo foi conduzido em 2010, quando políticas públicas de vacinação contra hepatite A estavam sendo avaliadas no Brasil. Para a determinação e controle de políticas nacionais de vacinação, os resultados de estudos epidemiológicos e de custo-benefício devem ser cuidadosamente considerados e o impacto sobre a saúde pública deve ser avaliado (Sartori *et al.*, 2012; FitzSimons *et al.*, 2010,). Desta forma, é necessário um maior conhecimento sobre a circulação e a infecção pelo HAV não apenas durante surtos epidêmicos, mas também entre os casos esporádicos, em todos seus aspectos, epidemiológicos, sorológicos, moleculares e genéticos, para que medidas efetivas de controle sejam adotadas.

Para fins de controle epidemiológico, a utilização de amostras de fluido oral é de grande importância porque, conforme demonstrado por diferentes autores (Amado *et al.*, 2006; Chohan *et al.*, 2001; Ochnio *et al.*, 1997; McIntyre *et al.*, 1996; Parry *et al.*, 1993) este tipo de amostra tem muitas vantagens clínicas e parece ser suficientemente precisa para ser usado em tais situações. No entanto, muitos destes estudos propuseram a utilização de fluido oral como uma ferramenta alternativa para amostras de sangue.

Para determinar a eficiência das amostras de fluido oral e sua aplicabilidade na pesquisa de campo como um substituto ao soro, a primeira investigação da infecção pelo HAV em comunidades de difícil acesso foi realizado no Pantanal Sul matogrossense. Usando amostras coletadas de diferentes indivíduos pertencentes a essas comunidades, observou-se uma semelhança entre a prevalência HAV em amostras de fluido oral coletadas com ChemBio® (79,01%) e a soroprevalência (81,25%) do HAV. A concordância entre os resultados de fluido oral e o "padrão-ouro" (soro) foi de 97,32% (sensibilidade = 97,24% e especificidade = 97,67%).

Uma maior prevalência de anticorpos anti-HAV (81,25%) foi encontrada em comparação com o observado na população geral (55,7%) das regiões Sul e Sudeste do Brasil. No entanto, esta taxa foi menor do que a taxa encontrada nas regiões Norte (92,8%) e semelhante à taxa obtida na região Nordeste do Brasil (76,5%) (Clemens *et al.*, 2000). Embora alguns estudos tenham demonstrado que populações urbanas têm menores taxas de infecção pelo HAV do que as populações rurais (Barzaga, 2000; Tufenkeji, 2000; Arankalle e Chadha, 2003), neste estudo, as comunidades mais perto de centros urbanos tiveram uma maior taxa de exposição ao HAV do que a observada entre os indivíduos das áreas rurais (91,65% e 84,38% vs 71,67% e 77,78%, respectivamente). Da mesma forma, Almeida e colaboradores (2006) encontraram uma prevalência HAV maior nas áreas urbanas (87,4%) em comparação com áreas de assentamentos rurais de Cavunge (79,7%), uma região semi-árida do Estado da Bahia no Nordeste do Brasil.

Neste estudo, apesar da positividade de anticorpos anti-HAV não ter sido significativamente associada com fonte de água, os habitantes destas zonas rurais não têm instalações adequadas para o saneamento e usam a água do rio para consumo, bem como para a sua higiene pessoal. As comunidades urbanas estão localizadas perto a indústria hoteleira e fazendas, onde as precárias condições de saneamento persistem, ou não existem projetos de saneamento ambiental. Além das instalações de saneamento e condições de higiene, as casas dos moradores estavam localizadas próximas uns as outras, e a alta densidade populacional em comunidades urbanas de baixa renda pode contribuir para a propagação do HAV pessoa-a-pessoa.

A soroprevalência de anticorpos anti-HAV foi significativamente associada com a idade. A estratificação por idade revelou que, embora a prevalência global tenha sido de 81,25%, apenas 50% das crianças de 0-10 anos estão imunes à infecção. Esta taxa é mais elevada do que a observada por De Alencar Ximenes e colaboradores (2008) nas capitais das regiões Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, 32% e 34%, respectivamente. No entanto, é menor do que em indivíduos menores

de 10 anos na região amazônica (60%) (Braga *et al.*, 2009). Os dados destes estudos demonstram uma baixa prevalência nessa faixa etária nessas regiões.

Apesar das condições propícias para transmissão do HAV, não foi identificado nenhum surto epidêmico nesta população durante o estudo. No entanto, em casos de surtos, é de extrema importância a utilização de técnicas rápidas e sensíveis para detecção dos casos assintomáticos ou no início da infecção. Dentro deste contexto, o método de PCR em tempo real, padronizado em nosso laboratório, foi otimizado utilizando oligonucleotídeos sintéticos como curva padrão para detectar, quantificar e acompanhar a infecção precoce pelo HAV (**Artigo 2**).

Dois grandes desafios da análise viral incluem a falta de informação adequada sobre a infectividade e a dificuldade de se cultivar estes vírus *in vitro*. Essas dificuldades incitaram o desenvolvimento de novas abordagens para detecção rápida, sensível e específica desses vírus.

A detecção viral por PCR em tempo real fornece informações suficientes sobre várias etapas no processo de infecção a nível molecular, o que é valioso para a prevenção e controle de infecções virais (ISO/TS 15216-1, 2013). A quantificação absoluta de genomas virais por PCR em tempo real tem se tornado uma rotina. Convencionalmente, na detecção absoluta por PCR em tempo real, a carga viral é medida como número de cópias por célula ou por RNA/DNA total seguindo a transformação dos dados por meio de uma curva padrão. Tal curva padrão é gerada utilizando diluições seriadas de um segmento genômico clonado de um determinado vírus como molde, o que é demorado e dispendioso (Bowers e Dhar *et al.*, 2011).

Recentemente, oligonucleotídeos que representam um gene alvo têm sido utilizados como molde para gerar uma curva padrão, como relatado no nosso segundo estudo e no ISO/TS 15.216-1:2013, que descreve um método para a quantificação do HAV a partir de amostras teste de gêneros alimentícios ou da superfície de alimentos. A vantagem do uso de oligodeoxirribonucleotídeos é que

eles podem ser sintetizados de forma personalizada, o que requer apenas a informação da sequência de nucleótidos.

O método de quantificação por RT-PCR do presente estudo não foi comparado com a norma ISO/TS 15216-1: 2013. No entanto, o teste de PCR em tempo real descrito aqui tem sido utilizado desde 2007 para detectar e quantificar o HAV em amostras de água, alimentos, saliva, cultura de células, soro, fígado e fezes utilizando plasmídeo como curva padrão (Amado *et al.*, 2011; de Paula *et al.*, 2010; Amado *et al.*, 2010 de Paula *et al.*, 2009; Villar *et al.*, 2007).

Os resultados mostraram que a curva padrão produzida a partir de plasmídeos pode ser substituída por oligodeoxirribonucleotídeos sintéticos. Foi possível demonstrar que o oligonucleotídeo em questão pode ser usado como molde para a curva padrão devido aos resultados semelhantes entre as curvas de DNA e plasmidial (padrão-ouro). Os oligonucleotídeos de DNA como curva padrão poderiam ser uma alternativa útil a laboratórios que não têm espaço suficiente e condições financeiras para a clonagem molecular.

Estudo anterior, publicado por de Paula e colaboradores em 2007, mostrou que ambos os métodos, de nested-PCR (convencional) e de RT-PCR (quantitativo), são eficientes para detecção do HAV. Contudo, o PCR em tempo real apresenta algumas vantagens como rapidez e maior sensibilidade. Uma vez que o PCR em tempo real otimizado para a região 5' NC do HAV possui inúmeras vantagens sobre o PCR convencional (de Paula *et al.*, 2007), tal ferramenta foi utilizada no nosso terceiro estudo (**Artigo 3**).

Tal trabalho foi realizado em casos de surtos intradomiciliares em áreas urbanas da cidade do Rio de Janeiro. Como relatado, a hepatite A é uma doença endêmica em diversos países em desenvolvimento que afeta principalmente crianças e é transmitida por via fecal-oral. A probabilidade de transmissão fecal-oral aumenta com contato pessoal prolongado entre indivíduos infectados e suscetíveis. A prolongada excreção do HAV antes e após o início dos sintomas, em associação com a falta de boas práticas de higiene e o compartilhamento de

objetos no ambiente domiciliar, contribuem para um cenário de transmissão pessoa-a-pessoa, como reportado para várias doenças de transmissão fecal-oral (Roma *et al.*, 2009; Hamaguch *et al.*, 2008; de Paula *et al.*, 2007). Embora a transmissão pessoa-a-pessoa seja comum na hepatite A, poucos estudos têm evidenciado este modo de transmissão (Kumbang *et al.*, 2012; Victor *et al.*, 2006). Neste estudo, os casos índices e os contactantes foram investigados para detectar possíveis surtos domésticos de hepatite A.

As investigações clínicas e sorológicas foram realizadas entre os contatos intradomiciliares dos casos índices. Dezessete contatos domiciliares foram positivos para IgM anti-HAV, 22 eram susceptíveis ao HAV, e 28 apresentaram imunidade para HAV. Apesar de ter encontrado famílias inteiras com sorologia positiva para infecção pelo HAV, estes dados não são suficientes para confirmar a transmissão familiar do vírus nestes focos. Por esta razão, foi realizada a detecção, quantificação e sequenciamento do RNA do HAV para estabelecer as relações epidemiológicas entre os isolados. O HAV RNA foi detectado por Nested-PCR em 40,2% (39/97) das amostras, e por PCR em tempo real em 48,4% (47/97) das amostras. O PCR em tempo real tem uma sensibilidade superior ao nested-PCR (de Paula *et al.*, 2007; Somani *et al.*, 2003; Costa-Mattioli *et al.*, 2002), e, por tal razão, as amostras com uma baixa carga viral foram negativas por Nested-PCR.

Devido a otimização do PCR em tempo real, o HAV RNA também foi investigado nos contatos domiciliares que eram soronegativos ou tinham imunidade prévia para hepatite A; um contactante anti-HAV negativo e cinco anti-HAV IgG positivos tiveram o HAV RNA detectado em suas amostras de soro. Estes resultados demonstram a importância das técnicas de biologia molecular para o diagnóstico precoce de infecção pelo HAV, durante a fase de incubação viral e para a detecção do vírus por períodos mais longos do que são normalmente descritos (de Paula, 2012; Kurkela *et al.*, 2012). Com a detecção do HAV RNA, o número de contatos domiciliares infectados aumentou de 17 para 23, e o número de focos domésticos detectados também aumentou de 13 para 16.

Neste estudo, uma diferença significativa entre a média de idade dos contatos com e sem hepatite A foi observado. Os contactantes domiciliares mais novos apresentaram maior frequência de infecção pelo HAV, corroborando com estudos recentes que mostram um aumento na idade em que a infecção pelo HAV ocorre (Ministério da Saúde, 2012; Ximenes *et al.*, 2010; Vitral *et al.*, 1998). No entanto, a presença de imunidade passada foi associada com contactantes domiciliares mais velhos (20 anos de idade); esse achado está de acordo com muitos estudos epidemiológicos que relatam uma forte associação entre idade e prevalência de anti-HAV (Vital *et al.*, 2012; Ximenes *et al.*, 2010; Vitral *et al.*, 2008; Vitral *et al.*, 1998).

A análise filogenética dos isolados de HAV, obtidos de surtos domésticos, revelou uma co-circulação dos subgenótipos IA e IB. Vários estudos têm relatado a co-circulação de subgenótipos IA e IB no Brasil (Amado *et al.*, 2011; Villar *et al.*, 2006; de Paula *et al.*, 2002). Em 10 famílias, foi possível sequenciar o HAV RNA a partir dos casos-índice e seus contactantes domiciliares. Quando uma matriz de similaridade de nucleótidos foi realizada, 100% de homologia entre as cepas dos casos índice e dos contactantes foi observada em seis das 16 famílias, sugerindo que a transmissão pesso-a-pessoa pode ter ocorrido. No entanto, em três famílias, os casos índice e seus contactantes domiciliares foram infectados por diferentes subgenótipos de HAV, sugerindo diferentes fontes de infecção. Wu e colaboradores, em 2014 demonstraram, através do pirosequenciamento de alta-eficiência (UDPSs) da região 5' não codificante do HAV, que pequenas substituições nucleotídicas desta região podem ocorrer em cepas do HAV derivadas de uma única fonte de um surto, e que estas substituições nucleotídicas foram diferentes dos casos esporádicos. Assim, a análise de UDPS pode ser uma nova ferramenta analítica para o estudo da origem dos surtos de hepatite A.

A transmissão pessoa-a-pessoa é o modo predominante de propagação do HAV quando o contato entre indivíduos suscetíveis e infectados é íntimo e prolongado. Um dos principais fatores de risco para adquirir a infecção é a vida familiar (31), especialmente para as crianças sem hábitos de higiene adequados.

Nas seis famílias em que a transmissão pessoa-a-pessoa foi sugerida, quatro apresentaram crianças como casos-índice (4-7 anos), reforçando que a transmissão pessoa-a-pessoa pode ter ocorrido. Embora a transmissão pessoa-a-pessoa do HAV seja descrita para ambientes internos, não há estudos em curso no Brasil usando a similaridade de nucleotídeos entre cepas para fornecer evidências dessa transmissão no ambiente doméstico. A transmissão pessoa-a-pessoa tem sido sugerida por estudos de epidemiologia molecular de surtos domésticos causados por outros agentes de transmissão fecal-oral, como rotavírus e enterovírus 71; estes estudos têm relatado uma identidade nucleotídica de mais de 99% entre as cepas circulantes em membros sintomáticos de uma mesma família (Hamaguchi *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2008).

Surtos intradomiciliares de hepatite A representam um problema de saúde pública, exigindo a investigação da etiologia e medidas de ação rápidas para controlar a infecção. Os resultados deste estudo demonstram a relevância da transmissão do HAV no ambiente doméstico e apoiam a necessidade da implementação da vacina contra hepatite A, não só em crianças, mas também em contactantes domiciliares suscetíveis, como meio de evitar a propagação da doença e reduzir a impacto da mesma sobre os indivíduos suscetíveis em contato com pessoas infectadas.

A hepatite A, assim como as hepatites virais como um todo, se encontra num estado dinâmico de interações entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro. O curso natural dessas infecções varia muito entre diferentes indivíduos de uma mesma família, por exemplo. Enquanto alguns pacientes apresentam extensão no quadro clínico com progressão mais rápida da doença hepática, outros têm um prognóstico relativamente benigno (Lee *et al.*, 2013). Durante os últimos anos, o Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz tem estudado o genoma do HAV entre casos esporádicos e surtos epidêmicos de hepatite A. No entanto, sabe-se que o curso clínico de uma infecção não só varia de acordo com fatores virais, mas, como também, com fatores do hospedeiro, principalmente, os genéticos (**Artigos 4 e 5**) (Vaughan *et*

al., 2014). Assim, iniciamos uma nova linha de pesquisa visando estudar os fatores do hospedeiro.

Em colaboração com o Laboratório de Criopreservação e histocompatibilidade da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, foi possível investigar a influência dos polimorfismos no gene *INFL3* nos diferentes desfechos clínicos da hepatite A (**Artigo 4**). Neste estudo, foi utilizado um total de 122 amostras das quais 101 eram provenientes de casos esporádicos de hepatite A e 21 casos de ALF.

Muitos esforços estão sendo feitos para otimizar o tratamento dos casos graves de hepatite virais por meio da pré-seleção de pacientes. No entanto, o uso isolado de variáveis virais que predizem a resposta imune não tem provado ser clinicamente útil (Afdhal *et al.*, 2011). A otimização de algoritmos terapêuticos, com base numa pré-seleção de pacientes, pode ajudar a superar falhas no tratamento e evitar os casos de morte causadas pela ALF. A utilização de fatores genéticos na pré-seleção de pacientes, como demonstrado por Lampertico *et al.*, (2013), tem grandes vantagens sobre os clássicos fatores virais preditores dos desfechos clínicos, já que este pode variar durante o curso natural da hepatite. Tal pré-seleção genética possibilitaria um monitoramento mais íntimo do paciente e a detecção do momento mais adequado para intervenção.

Os polimorfismos próximos ao gene *INFL3*, que codifica para o IFN- λ 3 e pode estar implicado na modulação da resposta imune inata, foram significativamente associados com a resolução no tratamento da hepatite C crônica (McMahon, 2009). Cientistas europeus e americanos adicionaram a genotipagem do *INFL3* para a orientação do diagnóstico e do tratamento (McMahon, 2009) da hepatite C, mas pouco se sabe sobre a importância desses polimorfismos para pacientes infectados com HAV, principalmente em pacientes com falência hepática fulminante (Martín-Carbonero *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2010).

Em nosso quarto estudo, para determinar a possível influência do INFL3 sobre os diferentes desfechos clínicos da hepatite A, três SNPs (rs12979860, rs12980275 e rs8099917) próximos a este gene foram genotipados em dois grupos que compreenderam indivíduos com resolução espontânea da infecção pelo HAV (aguda) e que apresentaram ALF induzida por este mesmo vírus.

Em comparação com alguns estudos prévios (Honda *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2009), nossos resultados demonstraram que determinado polimorfismo no gene INFL3 está significativamente associado com os desfechos clínicos da hepatite A. A frequência mais elevada do alelo variante G no polimorfismo rs8099917 do gene *INFL3* foi detectada em pacientes com desfechos graves da hepatite A, o que pode indicar o INFL3 desempenha um papel na progressão da doença. Por outro lado, a maior frequência do genótipo rs8099917 TT no gene INFL3 foi observada em pacientes com hepatite A aguda, o que sugere que o INFL3 pode desempenhar um papel no controle viral.

Fathy e colaboradores (2015) relataram que pacientes com genótipo rs8099917 TT apresentaram taxa significativamente mais elevada de resposta virológica sustentada (RVS) do que aqueles portadores do alelo minoritário TG/GG (74% vs. 26%, $P = 0,004$). A análise de regressão logística revelou que os portadores do genótipo TT para tal SNP tiveram 2,8 vezes mais chance de obter a SVR do que portadores do alelo G (TG / GG, OR = 2,8; IC95% = 1,4-5,6, $P = 0,004$), como observado similarmente em nosso estudo.

Este é o primeiro estudo brasileiro a associar o polimorfismo no gene INFL3 e os diferentes desfechos clínicos da hepatite A. Assim, estes resultados complementam os dados já publicados na literatura uma vez que relatam o perfil de polimorfismo *INFL3* em uma população etnicamente mista e não se concentra em uma comunidade específica com grupos étnicos mais homogêneos. Este também é o primeiro estudo a relatar a associação entre genótipos de IFNL3 e pacientes com ALF que tenta buscar uma explicação imunogenética para aqueles pacientes que desenvolvem abruptamente tal desfecho clínico.

Recentemente, o sequenciamento completo do genoma humano de casos relacionados e não relacionados a infecção pelo HAV identificou vários alelos candidatos associados com o desfecho mais grave da doença. Polimorfismos nos genes MST1R, DNAH12, GPC1, NCR3LG1, NFATC4, RELN, STXBP1, TTC40, IL-10, TLR3, TANK, miR-146a, ESR1, HLA-DQA1, todos genes importantes na fisiologia hepática, foram associados a ALF.

Por tal razão, em parceria com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, buscamos ampliar nosso estudo genético do hospedeiro em pacientes com hepatite A. Neste estudo, todos as vinte e oito variações nucleotídicas para o genoma humano relatadas na literatura, incluindo polimorfismos de nucleótidos único (SNP) e inserções, associadas com a ALF foram caracterizadas em uma coorte com casos clássicos (n=37) e fulminantes (n=27) induzidos pelo HAV (**Artigo 5**). Oito SNPs foram associados estatisticamente ($p < 0.05$) aos diferentes desfechos clínicos da hepatite A. Estes foram: TGFbeta1 rs1800469; ABCB1 rs1045642; IL10 rs1800871 (IL10b); and TNF-alpha rs1799964 and rs1800630 (TNF-alpha a and b).

Os resultados obtidos foram analisados por “data mining” (mineração dos dados), processo que tem como objetivo reconhecer padrões e regras implícitas que descrevem o comportamento de um banco de dados, identificar as correlações entre seus diferentes atributos (Han e Kamber, 2006; Kantardzic, 2011)

A análise de “data mining” demonstrou que, para o polimorfismo rs1800469 do gene TGF-beta1, de todos os pacientes que apresentaram o genótipo TT, 85.7% foram encaminhados para transplante devido à ALF induzida pelo HAV. Já os demais genótipos foram associados a hepatite auto-limitada uma vez que, 64.3% dos indivíduos com genótipo CT e 46.4% com genótipo CC apresentaram hepatite A aguda. TGFbeta1 é uma citocina multifuncional que regula a proliferação e diferenciação de uma ampla variedade de tipos de células. Ele desempenha um papel crucial na patogênese da lesão hepática durante a hepatite

A aguda. Como observado por Zhang e seus colaboradores (2012), indivíduos portadores do alelo funcional T no polimorfismo rs1800469 do gene TGFbeta1 são mais propensos a infecção pelo HAV. O genótipo de TT rs1800469 TGFb1 (C-509T), localizado no nucleotídeo -509 no promotor do gene, está associado com níveis plasmáticos mais elevados de TGFB1, sendo a variante C-509T responsável por 8.2% da variação genética (Grainger *et al.*, 1999). O alelo variante T altera a atividade de transcrição do TGFbeta1 por influência na afinidade do fator de transcrição Yin Yang 1 pelo seu promotor (Silverman *et al.*, 2004). A liberação excessiva de TGFbeta1 no soro durante a infecção da hepatite A pode inibir significativamente proliferação e a ativação antígeno-específica de células T, bem como a resposta humoral (Li *et al.*, 2006). Isso pode explicar por que os portadores do genótipo TT rs1800469 TGFbeta1 são mais propensos a ALF.

Para o polimorfismo rs1045642 no gene ABCB1, o genótipo TT foi predominantemente observado em casos agudos, 63.6%, respectivamente. Este fato pode ser explicado porque o gene ABCB1 está envolvido na resistência a múltiplas drogas e antiapoptose. A supraregulação de ABCB1 em hepatócitos humanos e ductulos biliares na hepatite viral pode oferecer proteção contra o acúmulo de componentes biliares tóxicos e tornar essas células resistentes ao estresse oxidativo. Indivíduos com uma ou duas cópias do alelo T parecem ser menos propensos a infecção pelo HAV, sugerindo que rs1045642 ABCB1 pode afetar a susceptibilidade do indivíduo a este vírus através do efeito protetor de ABCB1 no fígado durante a hepatite viral (Zhang *et al.*, 2012).

Aproximadamente 50% da variabilidade interindividual observada na produção da IL-10 pode ser explicada por fatores genéticos (Reuss *et al.*, 2002). Os polimorfismos na região promotora do gene codificador da IL-10 no cromossomo 1 (1q31) determinam a variabilidade na produção desta citocina (Eskdale *et al.*, 1998). O promotor proximal contém três polimorfismos de um único nucleotídeo mais comuns, nas posições -1082 (rs1800896, A/G), -819 (rs1800871, T/C), e -592 (rs1800872, A/C) a partir do local de início da transcrição. Os níveis de expressão da IL-10 parecem ser importantes para a fisiopatologia da ALF, uma

vez que variações da sequência no promotor podem ter um impacto danoso no fígado e na progressão da ALF. Níveis séricos mais altos de IL-10 foram encontrados em indivíduos com ALF do que naqueles com hepatite auto-limitada ou em controles saudáveis (Yumoto *et al.*, 2002), e um aumento significativo nos níveis de secreção desta citocina foi observado em monócitos de pacientes com ALF (Antoniades *et al.*, 2007). Há uma resposta bifásica à seleção de IL-10, em que um aumento inicial é acompanhado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios (Osuchowski *et al.*, 2006), o segundo pico de IL-10 ocorre nas fases posteriores da endotoxemia, induzindo a desativação de monócitos (van Dissel *et al.*, 1998). Durante a progressão fisiopatológica da ALF, a desativação de monócitos está associada com a exacerbação da inflamação no fígado e o mau prognóstico (Antoniades *et al.*, 2005).

Em relação aos polimorfismos no gene IL-10, apenas o SNP rs1800872 ("IL-10c") revelou associação significativa na análise de "data mining". O genótipo AA para o polimorfismo IL-10 rs1800872 foi observado em 61.5% dos casos agudos; e o genótipo AC em 59.1% dos pacientes com ALF. Esta associação é similar aos achados de Yan e colaboradores (2009) em seu estudo sobre falência hepática aguda relacionada ao HBV. Os resultados mostraram que o sítio A-592C é um local de ligação de proteínas nucleares, e o alelo -592C tem uma atividade de transcrição mais elevada em comparação com o alelo -592A. O alelo -592C foi associado com a atividade mais elevada do gene repórter de luciferase e a circulação de altos níveis de IL-10 foi sugerida como um marcador para ALF de etiologia viral e não viral.

A análise de "data mining" demonstrou que, para todos os indivíduos que apresentaram genótipo TC no polimorfismo rs1799964 do gene TNF-alfa (TNF-alfa A, T-1031C), 58,3% apresentaram o desfecho de ALF em comparação com 34,6% dos casos agudos. Por outro lado, em todos os indivíduos que apresentavam genótipo CA para o polimorfismo rs1800630 do gene TNF-alfa (TNF-alfa-B, C-863A), 55,6% apresentaram o desfecho de ALF em comparação com 33,3% de casos agudos. O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina inflamatória que

pode ser associada com a necrose hepática maciça. Em ratos de laboratório com hepatite fulminante pode-se observar que o TNF desempenhou um papel importante na mediação da morte dos hepatócitos, e anticorpo anti-TNF inibiu a lesão (Trautwein *et al.*, 1998). Há variações nas taxas de produção de citocinas entre indivíduos. Higuchi e colaboradores (1998) relataram que células mononucleares de indivíduos japoneses estimuladas *in vitro* com alelos -1031C e -863A produziram concentrações mais elevadas de TNF- α do que tais células a partir de indivíduos portadores dos alelos -1031T e -863C. Em nosso estudo, os pacientes com ALF tinham freqüências mais elevadas dos alelos -1031C e -863A na região promotora do TNF- α . Parece provável que as posições -1031C e -863A são importantes para a produção de TNF e o prognóstico de doenças relacionadas com o TNF.

Com isso, observou-se que não só fatores virais são importantes mas, também, que polimorfismos específicos nos genes INFL3, TGF-beta1, ABCB1; IL10, e TNF-alpha influenciam no desfechos clínicos da hepatite A. Entender como fatores do hospedeiro influenciam a resposta imune à infecção viral oferece novas oportunidades para controlar a hepatite A e para o desenvolvimento de terapias eficazes, o que justifica o estudo destes genes.

6 – CONCLUSÕES

- A prevalência em populações sem condições sanitárias do Pantanal Sul Matogrossense corrobora com os dados da literatura que relatam o deslocamento da infecção para idades mais avançadas aumentando o número de crianças suscetíveis. Apesar das condições propícias para transmissão do HAV, não foi identificado nenhum surto epidêmico nesta população durante o estudo.
- Os oligodeoxirribonucleotídeos sintéticos para constituição de curvas padrões podem ser uma alternativa útil a laboratórios que não têm espaço suficiente para a clonagem molecular. Devido a estas características, estes poderiam ser de suma importância no diagnóstico viral.
- Os resultados deste estudo demonstram a relevância da transmissão do HAV no ambiente intradomiciliar e apoiam a necessidade da implementação da vacina contra hepatite A, não só em crianças, mas também em contactantes domiciliares suscetíveis, como meio de evitar a propagação da doença e reduzir a impacto da mesma sobre os indivíduos suscetíveis em contato com pessoas infectadas.
- A frequência mais elevada do alelo variante no polimorfismo rs8099917 do gene *INFL3* foi detectada em pacientes com desfechos graves da hepatite A, o que sugere que o *INFL3* desempenha um papel na progressão da doença. Por outro lado, a maior frequência do genótipo rs8099917 TT no gene *INFL3* foi observada em pacientes com hepatite A aguda, o que sugere que o *INFL3* pode desempenhar um papel no controle viral.
- Polimorfismos específicos nos genes: TGF-beta1, portadores do genótipo TT rs1800469 TGFbeta1 são mais propensos a ALF; ABCB1; alelo T (rs1045642) tem efeito protetor no fígado; IL10 (rs1800872) e TNF-alpha (rs1799964), sugeridos como marcadores de prognóstico da ALF, foram associados com os diferentes desfechos clínicos da hepatite A.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuzwaida AR, Sidoni M, Yoshida CF, Schatzmayr HG. 1987. Seroepidemiology of hepatitis A and B in two urban communities of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 29(4):219-23.
- Acharya SK, Batra Y, Hazari S, Choudhury V, Panda SK, Dattagupta S. 2002. Ethio-pathogenesis of acute hepatic failure: Eastern versus Western countries. *J Gastroenterol Hepatol* 17: S268-S273.
- Afdhal NH, McHutchison JG, Zeuzem S, Mangia A, Pawlotsky JM, Murray JS, et al. (2011) Hepatitis C pharmacogenetics: state of the art in 2010. *Hepatology* Y53:336-345.
- Aguirre S, Malirat V, Scodeller E, Mattion N. 2011. First full-length genomic sequence of a hepatitis A virus isolated in Argentina shows recombination between subgenotypes IA and IB. *Virus Res* 155(1):316-24.
- Akriviadis EA, Redeker AG. 1989. Fulminant hepatitis A. In: *Intravenous drug users with chronic liver disease*. *Ann Intern Med* 110: 838-839.
- Almeida D, Tavares-Neto J, Queiroz-Andrade M, Dias C, Ribeiro T, Silva F, Silva-Araújo J, Tatsch F, Paraná R. 2006. Sociodemographical aspects of seroprevalence of hepatitis A virus in the settlement of Cavunge, a semi-arid region of Bahia State. *Rev Soc Bras Med Trop* (39)76–78.
- Amado LA. 2010. Saliva como espécime clínico para o estudo da hepatite A: aplicações no diagnóstico, na epidemiologia molecular e na patogênese. Tese de Doutorado, pós-graduação *strictu sensu* em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 131 fls.
- Amado LA, Villar LM, De Paula VS, De Almeida AJ, Gaspar AMC. 2006. Detection of hepatitis A, B and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 149-155.

- Amado LA, Villar LM, de Paula VS, Pinto MA, Gaspar AM. 2011. Exposure to multiple subgenotypes of hepatitis A virus during an outbreak using matched serum and saliva specimens. *J Med Virol* 83(5):768-75.
- Amini M, Poustchi H. 2012. Hepatitis C virus spontaneous clearance: immunology and genetic variance. *Viral Immunol.* Aug;25(4):241-8. doi: 10.1089/vim.2011.0052. Epub 2012 Jul 23.
- Antoniades CG, Berry PA, Carey I, Scalori A, Wendon J, Vergani D. 2007. Evidence of endotoxin tolerance and severely impaired T-helper 1 response in acute hepatic failure. *Hepatology* 46: 614A.
- Antoniades CG, Wendon J, Vergani D. 2005. Paralysed monocytes in acute on chronic liver disease. *J Hepatol* 42: 163–165.
- Arankalle VA, Sarada Devi KL, Lole KS, Shenoy KT, Verma V, Haneephabi M. 2006. Molecular characterization of hepatitis A virus from a large outbreak from Kerala, India. *Indian J Med Res* 123(6):760-9.
- Arankalle VA, Chadha MS.. 2003. Who should receive hepatitis A vaccine? *J Viral Hepat* 10:157–158.
- Asher LV, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassell RA, Young GD. 1995a. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Med Virol* 47(3):260-8.
- Assis SB, Souto FJ, Fontes CJ, Gaspar AM. 2002. Prevalence of hepatitis A and E virus infection in school children of an Amazonian municipality in Mato Grosso State. *Rev Soc Bras Med Trop* 35(2):155-158.
- Baba M, Hasegawa H, Nakayabu M, Fukai K, Suzuki S. 1993. Cytolytic activity of natural killer cells and lymphokine activated killer cells against hepatitis A virus infected fibroblasts. *J Clin Lab Immunol* 40 (2): 47-60.

- Banerjee I, Primrose Gladstone B, Iturriza-Gomara M, Gray JJ, Brown DW, Kang G. 2008. Evidence of intrafamilial transmission of rotavirus in a birth cohort in South India. *J Med Virol* 80(10):1858-63.
- Barzaga, N. G., 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in South- East Asia and China. *Vaccine* 18: S61-S64.
- Battegay, M., Gust, I.D., Feinstone, S.M., Hepatitis A virus. In: Mandell, G.L., Bennett, J., Dolin, R., 1995. Principles and practice of infectious diseases. 4. Ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, P. 1636-1656.
- Bernal W, Lee WM, Wendon J, Larsen FS, Willians R. 2015. Acute Liver Failure: A curable disease by 2024? *J Hepatol* 62, S112-120.
- Bernal W, Wendon J. 2013. Acute Liver Failure. *N Engl J Med* 369: 2525-2534.
- Blanco Fernández MD, Torres C, Riviello-López G, Poma HR, Rajal VB, Nates S, Cisterna DM, Campos RH, Mbayed VA. 2012. Analysis of the circulation of hepatitis A virus in Argentina since vaccine introduction. *Clin Microbiol Infect* 18(12):E548-551.
- Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS. 2000. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 182: 12–17.
- Bowers RM, Dhar AK. 2011. Effect of template on generating a standard curve for absolute quantification of an RNA virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mol and Cel Probes* 25, 60e64.
- Brack K, Berk I, Magulski T, Lederer J, Dotzauer A, Vallbracht A. 2002. Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. *J Virol* 76 (23): 11920-30.
- Bradley DW, Fields HA, Mccaustland KA, Cook EH, Gravelle CR, Maynard JE. 1978. Biochemical and biophysical characterization of light and heavy

density hepatitis A virus particle: evidence HAV is a RNA virus. *J Med Virol* 2: 175-187.

Braga WS, Borges FG, Barros Junior GM, *et al.*, 2009. Prevalence of hepatitis A virus infection: the paradoxical example of isolated communities in the western Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(3):277-81.

Casanova JL, Abel L. 2004. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev* 4:55-66.

Casanova JL, Abel L. 2005. Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception. *J Exp Med* 202:197-201.

Cástková J, Benes C. 2009. Increase in hepatitis A cases in the Czech Republic in 2008 - an update. *Euro Surveill* 14(3).

Cástková, J, Benes C, 2009. Increase in hepatitis A cases in Czech Republic in 2008 – an update. *Euro Surveil* 14(3) pii:19091.

CDC (Centers For Disease Control And Prevation), disponível em: www.cdc.gov, acessado em 1998.

CDC (Centers For Disease Control And Prevention). 1999. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendation of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48(Rr-12): 1-37.

CDC (Centers For Disease Control And Prevention). 2006. Epidemiology and prevention of viral hepatitis A to E- An Overview CDC. Disponível em: www.cdc.gov, acessado em 2007.

CDC (Centers For Disease Control And Prevention). 2009. Surveillance for acute viral hepatitis – United States, 2007. *Surveillance Summaries. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 58(SS23)

- Chadha MS, Lole KS, Bora MH, Arankalle VA. 2009. Outbreaks of hepatitis A among children in western India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103(9):911-6.
- Chohan BH, Lavreys L, Mandaliya KN, Kreiss JK, Bwayo JJ, Ndinya-Achola JO, Martin HL jr. 2001. Validation of a modified commercial enzyme-linked immunoassay for detection of human immunodeficiency virus type 1 immunoglobulin G antibodies in saliva. *Clin and Diag Lab Immunology* 8: 346-348.
- Clemens SA, Da Fonseca JC, Azevedo T, Cavalcanti A, Silveira TR, Castilho MC, Clemens R. 2000. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in 4 centers in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 33:1-10.
- Cohen L, Bénichou D, Martin A. 2002. Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J Virol* 76(15):7495-505.
- Cohen JI, Feinstone S, Purcell RH. 1989. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J. Infect. Dis.* 160: 887–890.
- Conference report. 2010. Hepatitis A and E: Update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 28: 583-588.
- Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferré V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J. 2003a. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 84(Pt 12):3191-201.
- Costa-Mattioli M, Ferré V, Casane D, Perez-Bercoff R, Coste-Burel M, Imbert-Marcille BM, Andre EC, Bressollette-Bodin C, Billaudel S, Cristina J. 2003b. Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. *Virology* 311(1):51-9.

- Costa-Mattioli M, Ferre V, Monpoeho S, Garcia L, Colina R, Billaudel S, Vega I, Perez-Bercoff R, Cristina J. 2001a. Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *J Gen Virol* 82(Pt 11):2647-52.
- Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Schvoerer C, Besse B, Aleman MH, Billaudel S, Cristina J, Ferré V. 2001b. Genetic analysis of hepatitis A virus outbreak in France confirms the co-circulation of subgenotypes Ia, Ib and reveals a new genetic lineage. *J Med Virol* 65(2):233-40.
- Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercoff R, Casane D, Colina R, Garcia L, Vega I, Glikman G., Romanowsky V, Castello A, Nicand E, Gassin M, Billaudel S, Ferre V. 2002a. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol* 76: 9516-9525.
- Cristina J, Costa-Mattioli M. 2007. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Res* 127(2):151-157.
- Cuthbert JA. 2001. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev* 14(1):38-58.
- Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cancado EL, Porta G, Goldberg AC, Donaldson PT. 2002. Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol* 37, 302-308
- De Alencar Ximenes RA, Marteli CM, Merchán-hamann E, Montarroyos UR, Braga MC, De Lima ML, Cardoso MR, Turchi MD, Costa MA, De Alencar LC, Moreira RC, Figueredo GM, Pereira LM. 2008. Multilevel analysis of hepatitis A infection in children and adolescents: a household survey in the Northeast and Central-west regions of Brazil. *Int J Epidemiol* 37:852-81.

De Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, Luz SL, Silva LA, Jesus MS, da Silva NM, Gaspar AM. 2007. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res* 41(6):1169-76.

De Paula VS, Perse AS, Amado LA, de Moraes LM, de Lima SM, Tourinho RS, Gaspar AM, Pinto MA. 2009. Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28(10):1167-76.

De Paula VS. 2012. Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virol* 7 (5): 461-72.

De Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, Gaspar AMC. 2002. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 66: 22-27.

Deka M, Bose M, Baruah B, Bose PD, Medhi S, Bose S, et al. 2010. Role of CYP2E1 gene polymorphisms association with hepatitis risk in Northeast India. *World j of gastroenterol* 16:4800-8.

Desbois D, Couturier E, Mackiewicz V, Graube A, Letort MJ, Dussaix E, Roque-Afonso AM. 2010. Epidemiology and genetic characterization of hepatitis A virus genotype IIA. *J Clin Microbiol* 48(9):3306-3315.

Diel R., Schneider S. 2001. Transmission of hepatitis A in hamburg, Germany, 1998-1999 – A prospective population based study. *Eur J Epidemiol* 17:175-182.

Dinelli MI, Fisberg M, Moraes-Pinto MI. 2006. Anti-hepatitis A virus frequency in adolescents at an outpatient clinic in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48(1):43-4.

Domingués A, Oviedo M, Carmona G, Jansá JM, Borrás E, Salleras L, Plasència A. 2008. Epidemiology of hepatitis A before and after the introduction of a universal vaccination program in Catalonia, Spain. *J Viral Hepat* 15:51-6.

- dos Santos DC, Martinho JM, Pacheco-Moreira LF, Araújo CC, Oliveira BC, Lago BV, Pinto MA, Paula VS. 2009. Fulminant hepatitis failure in adults and children from a Public Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis* 13(5):323-329.
- Dotzauer A, Heitmann A, Laue T, Kraemer L, Schwabe K, Paulmann D, Flehmig B, Vallbracht A. 2012. The role of immunoglobulin A in prolonged and relapsing hepatitis A virus infections. *J Gen Virol.* Apr;93(Pt 4):754-60. doi: 10.1099/vir.0.038406-0. Epub 2011 Dec 14.
- Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW. 1998 Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9465–9470.
- Fainboin L, Canero Velasco MC, Marcos CY, Ciocca M, Rouy A, Theiler G, Capucchio M, Nuncifora S, Sala L, Zelazko M. 2001. Protracted, but not acute, hepatitis A virus infection is strongly associated with HLA-DRB1301, a marker for pediatric autoimmune hepatitis. *Hepatology* 33, 1512-1517.
- Fainboin L, Marcos CY, Pando M, Capucchio M, Reyes GB, Galoppo C, Badia I, Remondino G, Ciocca M, Ramonet M, et al., 1994. Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1*1301) haplotype. *Hum Immunol* 41, 146-150.
- Faridi, M. M., Shah, N., Ghosh, T. K., Sankaranarayanan, V. S., Arankalle, V., Agarwal, A., Sathiyasekaran, M., Bhattacharya, N., Vasanthi, T., Chatterjee, S., Choudhury, J, Mitra, M., 2009. Immunogenicity and safety of live attenuated hepatitis A vaccine: a multicentric study. *Indian Pediatr* 46:29-34.
- Fathy MM, Abo Taleb ME, El Hawary MS, Nabih MI, Aref WM, Makhlof MM. 2015. Assessment of interleukin 28B genotype as a predictor of response to combined therapy with pegylated interferon plus ribavirin in HCV infected

Egyptian patients. Cytokine. Aug;74(2):268-72. doi:
10.1016/j.cyto.2015.05.003. Epub May 21.

Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, Zhang Y, Kaplan GG. 1998 The human homolog of HAVCR-1 codes for hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol* 72, 6621-6628.

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

Ferreira CT, Leite JC, Taniguchi A, Vieira SM, Pereira-Lima J, da Silveira TR. 2004. Immunogenicity and safety of an inactivated hepatitis A vaccine in children with Down syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39(4):337-340.

Ferreira CT, Pereira-Lima J, Barros FC. 1998. Hepatitis A antibodies in two socioeconomically distinct populations of Porto Alegre, Southern Brazil. *J Trop Pediatr* 44(3):184-185.

Fiaccadori FS, Soares CM, Borges AM, Cardoso D. 2006. Prevalence of hepatitis A virus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, by molecular and serological procedures, 1995-2002. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(4):423-6.

Fiore AE, Wasley A, Bell BP. 2006. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.*, May 19, 55(RR-7):1-23.

FitzSimons D, Hendrickx G, Vorsters A, van Damme P. 2010. Hepatitis A and E: Update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 28:583–588

Fleischer B, Fleischer S, Maier K, Wiedmann KH, Sacher M, Thaler H, *et al.*, 1990. Clonal analysis of infiltrating T lymphocytes in liver tissue in viral hepatitis A. *Immunology* 69: 14-19.

- Flisiak R, Prokopowicz D, Jaroszewicz J, Flisiak I. 2005. Plasma transforming growth factor-beta(1) in acute viral hepatitis. *Med Sci Monit.* Jun;11(6):CR304-308. Epub 2005 May 25.
- Forbi JC, Esona MD, Agwale SM. 2013. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from Nigeria. *Intervirology* 56(1):22-6.
- Fujiwara K, Kojima H, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Omata M, Yokosuka O. 2011. Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. *J Med Virol* 83(2):201-7.
- Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Saisho H, Saotome N, Suzuki K, et al. 2002. Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA: strains from fulminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions. *Gut* 51:82-8.
- García-Aguirre L, Cristina J. 2008. Analysis of the full-length genome of hepatitis A virus isolated in South America: heterogeneity and evolutionary constraints. *Arch Virol* 153(8):1473-1478.
- Gauss-Muller V, Jurgensen D, Deutzmann R. 1991. Autoproteolytic cleavage of recombinant 3C proteinase of hepatitis A virus. *Virology* 182:861-864.
- Gayotto LCC, Quarentei AA, Cabral GL. 1991. Soroepidemiologia das hepatites A e B nas regiões dos rios Bia e alto Juruá, Amazônia ocidental. *Gastroenterol Endosc Dig* 10:13-16.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 46:399-401.
- Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet* 1999;8:93-97.

- Hadler SC. 1991. Global impact of hepatitis A virus infection: changing patterns. *In* Hollinger, F. B., Lemon, S. M., Margolis, H. S. (ed.), viral hepatitis and liver disease, Williams e Wilkins, p. 14–20.
- Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, Nishimura Y, Shimizu H, Yamada M. 2008. Acute encephalitis caused by intrafamilial transmission of enterovirus 71 in adult. *Emerg Infect Dis* 14(5):828-30.
- Han J, Kamber M, Pei J. 2006. Data mining: concepts and techniques. San Francisco: Morgan Kaufmann.
- Heitmann A, Laue T, Schottstedt V, Dotzauer A, Pichl L. 2005. Occurrence of hepatitis A virus genotype III in Germany requires the adaptation of commercially available diagnostic test systems. *Transfusion* 45(7):1097-105.
- Hess G, Faatz E, Melchior W, Bayer H. 1995. Analysis of immunoassays to detect antibodies to hepatitis A virus (anti-HAV) and anti-HAV immunoglobulin M. *J. Virol Meth* 51: 221-228
- Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, *et al.*, Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- α gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998; 51:605–12.
- Hollinger FB, Emerson SU. 2007. Hepatitis A Virus. *Fields Virology*, 5 ed., 911-40.
- Hollinger FB. 1992. International symposium on active immunization against hepatitis A. Vienna, 27-29 January 1992. *Vaccine* 10 Suppl 1:S6-7.
- Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, *et al.* 2010. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 139:499–509.

Hoofnagle JH, Carithers RL, Shapiro C, Ascher N. 1995 Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology*. 21:240-52.

Hussain Z, Das BC, Husain SA, Asim M, Chattopadhyay S, Malik A, Poovorawan Y, Theamboonlers A, Kar P. 2005. Hepatitis A viral genotypes and clinical relevance: Clinical and molecular characterization of hepatitis A virus isolates from northern India. *Hepatol Res* 32(1):16-24.

ISO/TS 15216-1:2013. Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification

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

Jacobsen, K. H., Koopman, J. S., 2004. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol Infect* 132:105-1022.

Jacobson SK, Buttery R, Parry JV, Perry KR, Wreghitt TG. 1995. Investigation of a hepatitis A outbreak in a primary school by sequential saliva sampling. *Clin Diagn Virol* 3: 173–180.

Kantardzic M. 2011. Data mining: concepts, models, methods, and algorithms. John Wiley e Sons.

Kim HY, Eyheramonho MB, Pichavant M, Gonzalez Cambaceres C, Matangkasombut P, Cervio G, et al. 2011. A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans. *The Journal of clinical investigation*. 121:1111-8.

Klevens RM, Miller JT, Iqbal K, Thomas A, Rizzo EM, Hanson H, Sweet K, Phan Q, Cronquist A, Khudyakov Y *et al.*, . 2010. The evolving epidemiology of hepatitis a in the United States: incidence and molecular epidemiology from population-based surveillance, 2005-2007. *Arch Intern Med* 170(20):1811-8.

- Koff RS. 1992. Clinical manifestation and diagnosis of hepatitis A virus infection. *Vaccine* 10: S15-S17.
- Koff RS. 1998. Hepatitis A. *Lancet* 351: 1643-1649.
- Krebs LS, Ranieri TM, Kieling CO, Ferreira CT, Silveira TR. 2011. Shifting susceptibility to hepatitis A among children and adolescents over the past decade. *J Pediatr (Rio J)* 87(3):213-8.
- Kulkarni MA, Walimbe AM, Cherian S, Arankalle VA. 2009. Full length genomes of genotype IIIA Hepatitis A Virus strains (1995-2008) from India and estimates of the evolutionary rates and ages. *Infect Genet Evol* 9(6):1287-94.
- Kumbang J, Ejide S, Tedder RS, Ngui SL. 2012. Outbreak of hepatitis A in an extended family after importation by non-immune travellers. *Epidemiol Infect* 140(10):1813-20.
- Kurkela S, Pebody R, Kafatos G, Andrews N, Barbara C, et al. 2012. Comparative hepatitis A seroepidemiology in 10 European countries. *Epidemiol Infect* 140(12):2172–2181
- Lednar MW, Lemon MS, Kirkpatrick WJ. 1985. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Amer J Epidemiol* 122: 226-233.
- LeDuc JW, Lemon SM, Keenan CM, Graham RR, Marchwicki RH, Binn LN. 1983. Experimental infection of the New World owl monkey (*Aotus trivirgatus*) with hepatitis A virus. *Infect Immun* 40 (2): 766-72.
- Lee HJ, Jeong HS, Cho BK, Ji MJ, Kim JH, Lee AN, Lee KR, Cheon DS. 2010. Evaluation of an immunochromatographic assay for the detection of anti-hepatitis A virus IgM. *Virol J* 7:164.

- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* ;24:99-146.
- Liu W, Zhai J, Liu J, Xie Y. 2010. Identification of recombination between subgenotypes IA and IB of hepatitis A virus. *Virus Genes* 40(2):222-4.
- Locarnini S, Omata M. 2006. Molecular virology of hepatitis B virus and the development of antiviral drug resistance. *Liver Int* 26 Suppl 2:11-22.
- Lu L, Ching KZ, De Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, Robertson BH. 2004. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (Cf53/Berne Isolate). *J Gen Virol* 85: 2943– 2952.
- Maier K, Gabriel P, Koscielniak E, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehmig B, et al. 1988. Human gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes sensitized during hepatitis A virus infection. *J Virol* 62 (10): 3756-63.
- Manry J, Quintana-Murci L.. 2013. A genome-wide perspective of human diversity and its implications in infectious disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Jan 1;3(1):a012450. doi: 10.1101/cshperspect.a012450.
- Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, Hussain SK, Kirk GD, Hoots WK, et al. 2010. IL28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. *J Infect Dis*.202:1749–53.
- Martín-Carbonero L, Rallón NI, Benito JM, Poveda E, González-Lahoz J, Soriano V. 2012. Does interleukin-28B single nucleotide polymorphisms influence the natural history of hepatitis B? *AIDS Res HumRetroviruses*28:1262–4.
- Martin A, Lemon SM. 2006. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* 43 (2): S64-S172.

- Mbayed VA, Sookoian S, Alfonso V, Campos RH. 2002. Genetic characterization of hepatitis A virus isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Med Virol* 68(2):168-74.
- McIntyre PG, Laszlo J, Appleyard K, Ogden GR. 1996. Modified enzyme immunoassay to detect hepatitis C virus antibodies in oral fluid. *Eur J Microbiol and Infect Dis* 15:882-884.
- McMahon BJ. 2009. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 49:S45–55.
- Melnick JL. 1982. Classification of hepatitis A virus as enterovirus type 72 and hepatitis B as hepadna virus type. *Intervirology* 8: 105-106.
- Midthun K, Ellerbeck E, Gershman K, *et al.* 1991. Safety and immunogenicity of a live attenuated hepatitis A virus vaccine in seronegative volunteers. *J Infect Dis* 163(4):735-9.
- Mindikoglu AL, Regev A, Schiff ER. Hepatitis B virus reactivation after cytotoxic chemotherapy: the disease and its prevention. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4:1076-81.
- Ministério da Saúde. 2008. Secretaria de Vigilância em Saúde. Hepatites virais: O Brasil está atento. Brasília, DF.
- Ministério da Saúde. 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico- Hepatites Virais, Brasília, DF.
- Ministério da Saúde. 2012a. Secretaria de Vigilância em Saúde. Apresentação do dia Mundial da luta contra a hepatite. Hepatites virais no Brasil. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasília, 25 de julho de 2012.

- Ministério da Saúde. 2012b. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico- Hepatitis Virais, Brasília, DF.
- Mitsui T, Tsukamoto Y, Hirose A, Suzuki S, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, Endo K, Takahashi M, Okamoto H. 2006. Distinct changing profiles of hepatitis A and E virus infection among patients with acute hepatitis, patients on maintenance hemodialysis and healthy individuals in Japan. *J Med Virol* 78(8):1015-24.
- Miyamura T, Ishii K, Kanda T, Tawada A, Sekimoto T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F *et al.* 2012. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: Recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatol Res* 42(3):248-53.
- Mongillo M, Chiara F, Ranzato M, Trevisan A. 2010. Strategy for hepatitis A seroprevalence survey in a population of young people. *Vaccine* 28(43): 6985-8.
- Montalbano M, Slapak-Green GI, Neff GW. 2005. Fulminant hepatic failure from herpes simplex virus: post liver transplantation acyclovir therapy and literature review. *Transplant Proc.*37:4393-6.
- Mor Z, Srur S, Dagan R, Rishpon S. 2010. Hepatitis A disease following the implementation of universal vaccination: Who is at risk? *J Viral Hepat* 17:293-297.
- Morais LM, De Paula VS, Arantes MR, *et al.*, 2006. Early infection and asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care center in Rio de Janeiro, Brazil: should attending children under two years of age be vaccinated? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(4):401-5.
- Munné MS, Vladimirovsky S, Otegui L, Soto S, Brajterman L, Castro R, Velasco MC, Bonnano A, Fernández E, Remondegui C *et al.* 2007. Molecular

- characterization of hepatitis A virus isolates from Argentina. *J Med Virol* 79(7):887-94.
- Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. 2006. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin. Microbiol. Rev* 19(1):63-79.
- Nguyen CT, Tran TT. 2009 Hepatitis vaccination and prophylaxis. *Clin Liver Dis* 13(2):317-29.
- Normann A, Badur S, Onel D, Kilic A, Sidal M, Larouzé B, Massari V, Müller J, Flehmig B. 2008a. Acute hepatitis A virus infection in Turkey. *J Med Virol* 80(5):785-90.
- Normann A, Jung C, Vallbracht A, Flehmig B. 2004. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J Med Virol* 72(1):10-6.
- O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. 1989. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*. 97:439-45.
- O'grady J.1992. Management of acute and fulminant hepatitis A. *Vaccine* 10(1): S21-S23.
- Oba IT, Spina AMM, Saraceni CP, Lemos MF, Senhoras RCA, Moreira RC, Granato CFH. 2000. Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples. *Rev Med Trop São Paulo* 42(4) 197-200.
- Ochnio JJ, Scheifele DH,, Ho M, Mitchell LA. 1997. New, ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine and disease-induced hepatitis A virus-specific immunoglobulin G in saliva. *Journal of Clin Microbiol* 35(1): 98–101.
- Ostapowicz G1, Lee WM. 2000.Acute hepatic failure: a Western perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 15(5):480-8.

- Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, Badia I, Daruich J, Findor J, Tanno H, Cañero-Velasco C, Fainboim L. 1999. Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* Dec;30(6): 1374-80.
- Pannuti CS, de Mendonça JS, Pereira ML, Carvalho MJ, Amato Neto V. 1985. Sporadic acute viral hepatitis A, B and non-A non-B. A prospective study of 150 consecutive cases in São Paulo, Brazil. *Trop Geogr Med* 37(2):136-8.
- Parry JV. 1993. Simple and reliable salivary test for HIV and hepatitis A and B virus diagnosis and surveillance. *Ann N Y Acad Sci* 694: 216-233.
- Paul JR, Havens WP, Sabin AB, Philip CB. 1945. Transmission experiments in infectious hepatitis. *J of A Med Assoc* 1128: 911-915.
- Pereira FEL, Gonçalves CS. 2003. Hepatitis A. *Rev Soc Bras Med Trop* 36 (3): 387-400.
- Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Caylà J, Tortajada C, Lite J, Bosch A, Pintó RM. 2011a. Hepatitis a virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence. *Emerg Infect Dis* 17(4):734-7.
- Pham, B., Duval, B., De Serres, G., Gilca, V., Tricco, A. C., Ochnio, J., Scheifele, D. W., 2005. Seroprevalence of hepatitis a infection in a low endemicity country: a systematic review. *BMC Infect Dis* 5: 56.
- Pinho JR, Sumita LM, Moreira RC, de Souza VA, Saraceni CP, Oba IT, Carvalho MC, Pannuti CS. 1998. Duality of patterns in hepatitis A epidemiology: a study involving two socioeconomically distinct populations in Campinas, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40(2):105-106.
- Pinto MA, Marchevsky RS, Baptista ML, de Lima MA, Pelajo-Machado M, Vitral CL, Kubelka CF, Pissurno JW, Franca MS, Schatzmayr HG *et al.*, . 2002.

- Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: early detection of HAV antigen and viral fate. *Exp Toxicol Pathol* 53(6):413-20.
- Pinto MA, Marchevsky RS, Pelajo-Machado M, Santiago MA, Pissurno JW, Franca MS, et al. 2000. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in liver and splenic T lymphocyte rise are associated with liver histological damage during experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*. *Exp Toxicol Pathol* 52 (1): 3-10.
- Pintó RM, Alegre D, Domínguez A, El-Senousy WM, Sánchez G, Villena C, Costafreda MI, Aragonès L, Bosch A. 2007. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiol Infect* 135(2):270-3.
- Poddar U, Thapa BR, Prasad A, Singh K. 2002. Changing spectrum of sporadic acute viral hepatitis in Indian children. *J Trop Pediatr* 48: 210–213.
- Provost PJ, Emini EA, Lewis JA, *et al.*, Progress toward the development of hepatitis A virus particles. In: Zuckerman AJ, ed., 1988. *Viral hepatitis and liver disease*. New York: Alan R. Liss: 83-6.
- Provost Pj, Wolanski BS, Miler WJ, Ittensohn OL, McAleer WJ, Hilleman MR. 1975. Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326 (38578). *Proc Soc Exp Biol Med* 148:532-539.
- Quintana-Murci L, Alcaïs A, Abel L, Casanova JL. 2007. Immunology in natura: clinical, epidemiological and evolutionary genetics of infectious diseases. *Nat Immunol*. Nov;8(11):1165-71.
- Rahaman SM, Chira P, Koff RS.1994. Idiopathic autoimmune chronic hepatitis triggered by hepatitis A. *Am J Gastroenterol*. Jan;89(1):106-8.
- Redondo N, Sanz MA, Steinberger J, Skern T, Kusov Y, Carrasco L. 2012. Translation directed by hepatitis A virus IRES in the absence of active eIF4F complex and eIF2. *PLoS One* 7(12):e52065. Robertson, B. H., Jansen, R.

- W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O. V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H. S., Isomura, S., Ito, K., *et al.*, 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 73:1365–1377.
- Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T. 2002. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors: a twin study. *Genes Immun* 3: 407–413.
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K. 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 73 (Pt 6):1365-77.
- Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, Umetsu DT. 2009. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev.* May;229(1):259-70. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00772.x.
- Roma E, Panayiotou J, Pachoula J, Kafritsa Y, Constantinidou C, Mentis A, Syriopoulou V. 2009. Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori* infection in Greece. *J Clin Gastroenterol* 43(8):711-5.
- Romanò, L., Paladini, S., Tagliacarne, C., Zappa, A., Zanetti, A. R., 2009. The changing face of the epidemiology of type A, B and D viral hepatitis in Italy, following the implementation of vaccination. *Vaccine* 27:3439-3442.
- Ross BC, Anderson DA, Gust ID. 1991. Hepatitis A virus and hepatitis A infection. *Advanc Virus Re.* 39: 209-253.
- Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M. 2000. Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population. *Tissue Antigens.* Dec;56(6):522-9.

- Santos DR, Villar LM, Paula VS, Lima GS, Gaspar AM. 2008. Hepatitis A virus subgenotypes dissemination during a community outbreak in a surrounding region of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(3):254-8.
- Santos RG, Alissa F, Reyes J, Teot L, Ameen N. 2005. Fulminant hepatic failure: Wilson's disease or autoimmune hepatitis? Implications for transplantation. *Pediatr Transplant* 9(1):112-6.
- Sartori, A.M.; de Soárez, P.C.; Novaes, H.M.; Amaku, M.; de Azevedo, R.S.; Moreira, R.C.; Pereira, L.M.; Ximenes, R.A.; Martelli, C.M. 2012. Cost-effectiveness analysis of universal childhood hepatitis A vaccination in Brazil: Regional analysis according to the endemic context. *Vaccine*, 30, 7489–7497.
- Sasbón JS, Buamscha D, Gianivelli S, Inventarza O, Devictor D, Moreira R, Cambaceres C, Salip G, Ciocca M, Cuarterolo M, Vladimírsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, González J, Munné MS. 2010. Clinical implications of hepatitis A virus ribonucleic acid detection and genotyping in acute liver failure in children in Argentina. *Pediatr Crit Care Med*. May;11(3):385-9. doi: 10.1097/PCC.0b013e3181ceadca.
- Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R. 2004. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol*. 40:247-54.
- Siegl G, Frösner GG, Gauss-Muller, Tratschin JD, Deinhardt F. 1981. The physicochemical properties of infection hepatitis A virion. *J. Gen. Virol* 57: 331-341.
- Silberstein E, Xing L, van de Beek W, Lu J, Cheng H, Kaplan GG. 2003. Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin-and mucin-like regions. *J Virol*. Aug;77(16):8765-74.

- Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, et al. 2004. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 169:214-219.
- Sjogren MH, Tanno H, Fay O, Sileoni S, Cohen BD, Burke DS, Feighny RJ. 1987. Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann Intern Med* 106: 221–226.
- Somani SK, Aggarwal R, Naik SR, Srivastava S, Naik S. 2003. A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 10(6):446-9.
- Stapleton JT, Lemon SM. 1987. Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on hepatitis A virus. *J Virol* 61(2):491-8.
- Sulbaran Y, Gutierrez CR, Marquez B, Rojas D, Sanchez D, Navas J, Rovallo E, Pujol FH. 2010. Hepatitis A virus genetic diversity in Venezuela: exclusive circulation of subgenotype IA and evidence of quasispecies distribution in the isolates. *J Med Virol* (11):1829-34.
- Tami C, Silberstein E, Manangeeswaran M, Freeman GJ, Umetsu SE, DeKruyff .H., Umetsu DT, Kaplan GG, 2007. Immunoglobulin A (IgA) is a natural ligand of hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1), and the association of IgA with HAVCR1 enhances virus-receptor interactions. *J Virol* 81:3437-3446.
- Tanaka J. 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 18: 57-60.
- Tjon GM, Coutinho RA, van den Hoek A, Esman S, Wijkmans CJ, Hoebe CJ, Wolters B, Swaan C, Geskus RB, Dukers N, Bruisten SM. 2006. High and persistent excretion of hepatitis A virus in immunocompetent patients. *J Med Virol* 78(11):1398-1405.

- Tjon GM, Wijkmans CJ, Coutinho RA, Koek AG, van den Hoek JA, Leenders AC, Schneeberger PM, Bruisten SM. 2005. Molecular epidemiology of hepatitis A in Noord-Brabant, The Netherlands. *J Clin Virol* 32(2):128-136.
- Tourinho RS, de Almeida AJ, Amado LA, Villar LM, Castro AR, de Paula VS. 2012. Could oral fluid be used to evaluate anti-hepatitis A virus status in individuals living in difficult-to-access areas? *Vaccine* 30(45):6421-6.
- Trautwein C, Rakemann T, Brenner DA, Streetz K, Licato L, Manns M, et al. 1998. Concanavalin A-induced liver cell damage. Activation of intracellular pathway triggered by tumor necrosis factor in mice. *Gastroenterology* 114:1035–45.
- Trey C, Davidson CS. 1970. The management of fulminant hepatitis failure. *Prog Liver Dis* 3:282-298.
- Tufenkeji H. 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in the Middle East and Africa. *Vaccine* 18: S65-S67.
- Vallbracht A, Hofmann L, Wurster KG, Flehmig B. 1984. Persistent infection of human fibroblasts by hepatitis A virus. *J Gen Virol* 65 (Pt 3): 609-15.
- Vallbracht A, Maier K, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehmig B, Fleischer B. 1989. Liver-derived cytotoxic T cells in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 160 (2): 209-17.
- van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwapperberg K, Frolich M. 1998. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 351: 950– 953.
- Vaughan G, Rossi LMC, Forbi JC, de Paula VS, Purdy MA, Xia G., Khudyakov YE. 2014. Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and Evolution. *Infection, Genetics and Evolution* 21 :227–243.

- Vento S, McFarlane BM, McSorley CG, Ranieri S, Giuliani-Piccari G, Dal Monte PR, Verucchi G, Williams R, Chiodo F, McFarlane IG. 1988. Liver autoreactivity in acute virus A, B and non-A, non-B hepatitis. *J Clin Lab Immunol.* Jan;25(1):1-7.
- Victor JC, Surdina TY, Suleimenova SZ, Favorov MO, Bell BP, et al. 2006. Person-to-person transmission of hepatitis A virus in an urban area of intermediate endemicity: implications for vaccination strategies. *Am J Epidemiol* 163(3):204–210.
- Vidal AE, Boiteux S, Hickson ID, Radicella JP. 2001. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J.* Nov 15;20(22):6530-9.
- Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Guimarães FR, Ferreira FF, Shubo TC, Miagostovich MP, Lampe E, Gaspar AM. 2007. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol.* 45(2):168-73.
- Villar LM, Morais LM, Aloise R, Melo MM, Calado IA, Lampe E, Gaspar AM. 2006. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res* 39(7):873-81.
- Villar, L. M., Esteves da Costa, M. D. O. C, De Paula, V. S., *et al*, 2002. Hepatitis A outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(3):301-5.
- Vitral CL, Ospina FL, Artimos S, Melgaço JG, Cruz OG, de Paula VS, Luz SB, Freire M, Gaspar LP, Amado LA *et al.*, 2012. Declining prevalence of hepatitis A virus antibodies among children from low socioeconomic groups reinforces the need for the implementation of hepatitis A vaccination in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(5):652-8.

- Vitral CL, Souto FJ, Gaspar AM. 2008. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. *J Viral Hepat* 15 Suppl 2:22-5.
- Vitral CL, Gaspar AMC, Souto FJD. 2006. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002 - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(2): 119-127.
- Vizzotti C, González J, Gentile A, Rearte A, Ramonet M, Cañero-Velasco MC, Pérez Carrega ME, Urueña A, Diosque M. 2014. Impact of the single-dose immunization strategy against hepatitis A in Argentina. *Pediatr Infect Dis J*. Jan;33(1):84-8. Doi: 10.1097/INF.0000000000000042.
- Wasley A, Samandari T, Bell BP. 2005. Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination. *JAMA* 294(2):194-201.
- Weilandt R, Paulmann D, Schlottau K, Vallbracht A, Dotzauer A. 2011. Mutational modifications of hepatitis A virus proteins 2B and 2C described for cell culture-adapted and attenuated virus are present in wild-type virus populations. *J Med Virol*. May;83(5):768-75. doi: 10.1002/jmv.22045.
- WHO. 2000. Hepatitis A. Who/Cds/Csr/Edc,7. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsredc2007/en/index.html>. Acessado em: 2008.
- Wu S, Nakamoto S, Kanda T, Jiang X, Nakamura M, et al. 2014 Ultra-deep sequencing analysis of the hepatitis A virus 5'-untranslated region among cases of the same outbreak from a single source. *Int J Med Sci* 11(1):60–64.
- Ximenes RA, Pereira LM, Martelli CM, Merchán-Hamann E, Stein AT, Figueiredo GM, Braga MC, Montarroyos UR, Brasil LM, Turchi MD *et al.*, . 2010. Methodology of a nationwide cross-sectional survey of prevalence and epidemiological patterns of hepatitis A, B and C infection in Brazil. *Cad Saude Publica* 26(9):1693-704.

- Yan Z, Tan W, Zhao W, Dan Y, Wang X, Mao Q, Wang Y, Deng G. 2009. Regulatory polymorphisms in the IL-10 gene promoter and HBV-related acute liver failure in the Chinese population. *J Viral Hepat* 16:775–783.
- Yang N, Chu DL, Wong MM, Qi H, Wu RS, Kong RY. 2011. Major human Hepatitis A virus genotype in Hong Kong marine waters and detection by real-time PCR. *Mar Pollut Bull* 62(12):2654-2658.
- Yotsuyanagi H, Lino S, Koike K, Yosuda K, Hino K, Kurokawa K., 1993. Duration of viremia in human hepatitis A viral infection as determined by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 40: 35-38.
- Yumoto E, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Fujiwara K, Hanafusa T, Yumoto Y, Tanimoto T, Kurimoto M, Tanaka N, Tsuji T. 2002. Serum gamma-interferon-inducing factor (IL-18) and IL-10 levels in patients with acute hepatitis and fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* Mar 17(3): 285-94.
- Zago-Gomes MP, Stantolin GC, Perazzio S, Aikawa KH, Gonçalves CS, Pereira FE. 2005. Prevalence of anti-hepatitis A antibodies in children of different socioeconomic conditions in Vila Velha, ES. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(4):285-9.
- Zhang L, Yesupriya A, Hu DJ, Chang MH, Dowling NF, Ned RM, Udhayakumar V, Lindegren ML, Khudyakov Y. 2012. Variants in ABCB1, TGFB1, and XRCC1 genes and susceptibility to viral hepatitis A infection in Mexican Americans. *Hepatology*. Apr;55(4):1008-18. doi: 10.1002/hep.25513.
- Zhuang FC, Qian W, Mao ZA, Gong YP, Jian Q, Jian LM, Chen NL, Chai SA, Mao JS. 2005. Persistent efficacy of live attenuated hepatitis A vaccine (H2-strain) after a mass vaccination program. *Chin Med J (Engl)* 118:1851-1856