

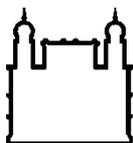
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA E DO RISCO DE TRANSMISSÃO
RESIDUAL DO VÍRUS DA HEPATITE A E DO PARVOVÍRUS B19 POR
TRANSFUSÃO SANGUÍNEA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

MARIANA MAGALDI DE SOUZA LIMA

Rio de Janeiro
Julho de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

MARIANA MAGALDI DE SOUZA LIMA

Avaliação da incidência e do risco de transmissão residual do vírus da hepatite A e do parvovírus B19 por transfusão sanguínea no estado do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Almeida Amado Leon

RIO DE JANEIRO

Julho de 2021

Lima, Mariana Magaldi de Souza.

Avaliação da incidência e do risco de transmissão residual do vírus da hepatite A e do parvovírus B19 por transfusão sanguínea no estado do Rio de Janeiro / Mariana Magaldi de Souza Lima. - Rio de Janeiro, 2021.

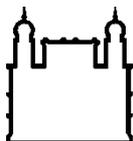
xix, 140f f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2021.

Orientadora: Luciane Almeida Amado Leon.

Bibliografia: f. 108-134

1. Transmissão residual. 2. Vírus da hepatite A. 3. Parvovírus B19. 4. Doadores de sangue. 5. Rio de Janeiro. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: MARIANA MAGALDI DE SOUZA LIMA

**AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA E DO RISCO DE TRANSMISSÃO RESIDUAL DO
VÍRUS DA HEPATITE A E DO PARVOVÍRUS B19 POR TRANSFUSÃO
SANGUÍNEA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Luciane Almeida Amado Leon

Aprovada em: 12/07/2021

EXAMINADORES:

Dra. Patrícia Carvalho de Sequeira - Presidente (Fundação Oswaldo Cruz)

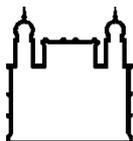
Dra. Carmen Baur Vieira (Universidade Federal Fluminense)

Dra. Claudete Aparecida Araújo Cardoso (Universidade Federal Fluminense)

Dr. Ivanildo Pedro de Sousa Junior (Fundação Oswaldo Cruz)

Dra. Debora Regina Lopes dos Santos (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, 12 de julho de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Medicina Tropical de Mariana Magaldi de Souza, sob orientação da Dra. Luciane Almeida Amado Leon. Ao décimo segundo dia do mês de julho de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: "Avaliação da incidência e do risco de transmissão residual do vírus da hepatite A e do parvovírus B19 por transfusão sanguínea no estado do Rio de Janeiro", no Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Patrícia Carvalho de Sequeira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Carmen Baur Vieira – UFF/RJ, Dr^a. Claudete Aparecida Araújo Cardoso – UFF/RJ e como suplentes: Dr. Ivanildo Pedro de Sousa Junior – IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Debora Regina Lopes dos Santos – UFRRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador Adjunto do Programa Dr. Marco Aurélio Pereira Horta, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 12 de Julho de 2021.

Dr^a. Patrícia Carvalho de Sequeira (Presidente da Banca):

Dr. Marco Aurélio Pereira Horta (Coordenador Adjunto do Programa):

Patrícia C. Sequeira, PhD
Pesquisadora em Saúde Pública
Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ
Matricula 1991974

Dedico este trabalho ao meu avô,
Antonio de Souza

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me acompanharam e apoiaram nesses dois anos de jornada e a todos que contribuíram na elaboração deste trabalho.

Primeiramente agradeço à minha mãe, Dayse Rose Magaldi de Souza, meu exemplo de força, determinação e coragem, e aos meus avós, Antônio de Souza e Maria Eni Magaldi de Souza, por absolutamente tudo que fizeram e que fazem por mim. Agradeço toda a força, apoio, amor e devoção que recebi durante toda a minha vida. Sem vocês eu não teria chegado nem na metade deste caminho.

Agradeço ao meu namorado, Gabriel Coutinho Melo, por todo o apoio e toda dedicação dados nos momentos mais difíceis desse caminho. Pelo amor, companheirismo, carinho, paciência e compreensão nos momentos de ausência e pelos conselhos nos meus momentos de fragilidade. Muito obrigada por tudo!

Aos meus amigos e colegas de laboratório Arthur Daniel Rocha Alves e Wagner Luis da Costa Nunes Pimentel Coelho, por todo o suporte profissional e emocional dados sempre que precisei. Muito obrigada pelo amor, carinho e amizade que recebi desde o primeiro momento de convivência. Sempre serei grata pela ajuda dedicada à realização deste trabalho e por todos os bons momentos que vivemos no ambiente de trabalho e fora dele!

Aos meus amigos de turma que fizeram do mestrado uma experiência infinitamente melhor e mais leve. Amanda Figueira, Ana Carolina Guimarães, Anne Aline Paiva, Juan Campos, Maria Clara Baptista, Raíssa Martins, Renata Malachini, Thiago Peixoto e Thiago Sousa, sem vocês teria sido muito mais difícil! Obrigada por todo apoio, companheirismo, carinho e bons momentos que tive o privilégio de viver.

Às minhas amigas Ana Beatriz da Silva Carvalho, Camila Duarte José, Domênica Miranda Hespanhol e Thais Rodrigues Vieitos, por estarem comigo nos momentos cruciais, me apoiando com todo amor e toda paciência.

À minha orientadora Dra. Luciane Almeida Amado Leon, pela orientação, confiança e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e por toda paciência e todo conhecimento passado durante essa trajetória. Agradeço por tudo!

Ao Dr. Luiz de Melo Amorim Filho e à toda equipe do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti do estado do Rio de Janeiro (Hemorio) pelo fornecimento de amostras e pela colaboração na realização deste estudo.

Ao Dr. Leonardo Bastos e à Msc. Camila Mattos do Programa de Computação Científica da Fiocruz (Procc/Fiocruz), pela colaboração na análise do banco de dados e na análise estatística deste estudo.

À Ana Carolina Sathler de Menezes, por toda disposição, prestatividade e ajuda nas etapas deste trabalho. Muito obrigada!

Ao curso de pós-graduação em Medicina Tropical e a todos os professores que me transmitiram seu valioso conhecimento e contribuíram na minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - pela concessão de bolsa de estudo e pelo apoio para a realização deste trabalho - Código de Financiamento 001.

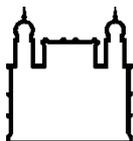
Ao programa INOVA – Geração de conhecimentos e à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelo apoio financeiro necessário para a realização deste estudo.

A todos os alunos, técnicos, tecnologistas e servidores do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) e aos servidores, alunos e trabalhadores da Fundação Oswaldo Cruz, do Instituto Oswaldo Cruz, do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, da Pós-graduação em Medicina Tropical e da Secretaria Acadêmica do Instituto Oswaldo Cruz.

À memória de Gabriel Barbosa de Abreu, eterno colega da Turma de Mestrado em Medicina Tropical 2019, e de todas as mais de 500.000 vidas perdidas durante a atual pandemia do SARS-CoV-2.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

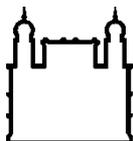
AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA E DO RISCO DE TRANSMISSÃO RESIDUAL DO VÍRUS DA HEPATITE A E DO PARVOVÍRUS B19 POR TRANSFUÇÃO SANGUÍNEA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Mariana Magaldi de Souza Lima

O vírus da hepatite A (HAV) é um vírus hepatotrópico que causa infecções agudas que podem levar à hepatite fulminante, cuja principal forma de tratamento é o transplante hepático. O parvovírus B19 (B19V) infecta células precursoras eritróides e pode causar, em indivíduos imunocomprometidos, aplasia de células vermelhas e hepatite aguda fulminante. Ambos os vírus são altamente resistentes aos processos de inativação viral utilizados na produção de hemoderivados e o risco de transmissão transfusional destes agentes no Brasil tem sido negligenciado. O objetivo deste estudo foi determinar a incidência e a prevalência das infecções por HAV e B19V em doadores de sangue do Rio de Janeiro e assim avaliar o risco de transmissão transfusional de ambos. Entre 2018 e 2019, foi analisado um total de 1.204 amostras de plasma de doadores de sangue do Rio de Janeiro e 42 amostras de plasma oriundas de doadores residentes no Vidigal e Rocinha, bairros onde foram relatados surtos de hepatite A, em 2017-2018. A detecção de HAV e B19V foi realizada por PCR e PCR em tempo real e os genótipos foram determinados por meio do sequenciamento e análise filogenética. O risco de transmissão transfusional foi calculado por meio da proporção entre o número de bolsas de sangue potencialmente transmissivas e o número total de bolsas liberadas para doação no Rio de Janeiro, em 2018-2019. As prevalências de HAV-RNA e B19V-DNA entre doadores do Rio de Janeiro foram, de 0,17% (n=2) e 0,33% (n=4), respectivamente, o que reflete em taxas de incidência de 1,66 e 3,32 a cada 1000 doadores, para HAV e B19V, respectivamente. As incidências de HAV (9,5%) e B19V (2,4%) foram significativamente maiores entre doadores do Vidigal/Rocinha quando comparadas a doadores do Rio de Janeiro em geral. Para o HAV, as 4 amostras do Vidigal/Rocinha foram classificadas como subgenótipos IA (n=2) e IB (n=2), e as 2 obtidas do Rio de Janeiro em geral foram classificadas como IB. Para B19V, as amostras sequenciadas (n=3) foram pertencentes ao subgenótipo 1a. Entre 2018-2019, o número estimado de bolsas infecciosas no estado foi de 605 para HAV, e de 880 para B19V. Os resultados indicam que HAV e B19V estão presentes em doadores de sangue do RJ e que a implantação de métodos de triagem para ambos pode ser considerada para melhoria da segurança de sangue e hemoderivados destinados à doação.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF THE INCIDENCE AND RISK OF RESIDUAL TRANSMISSION OF HEPATITIS A VIRUS AND PARVOVIRUS B19 BY BLOOD TRANSFUSION IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

MASTER'S DEGREE IN TROPICAL MEDICINE

Mariana Magaldi de Souza Lima

Hepatitis A virus (HAV) is a hepatotropic virus that causes acute infections that can lead to fulminant hepatitis, with liver transplantation as the main form of treatment. Parvovirus B19 (B19V) infects erythroid precursor cells and can cause red cell aplasia and acute fulminant hepatitis in immunocompromised patients. Both viruses are highly resistant to the processes of viral inactivation used in the production of hemoderivatives. The risk of transfusion transmission of these agents has already been described in several countries, whereas in Brazil it has been neglected. The aim of this study was to determine the incidence of HAV and B19V infections in blood donors from Rio de Janeiro and thus assess their risk of transfusion transmission. We analyzed a total of 1,204 plasma samples from blood donors from Rio de Janeiro and 42 plasma samples from donors from Vidigal and Rocinha neighborhoods, where hepatitis A outbreaks were recently reported. The detection of HAV and B19V was performed by PCR and real-time PCR and the genotypes were determined through sequencing and phylogenetic analysis. The risk of transfusion transmission was determined by the ratio between the number of potentially transmissible blood bags and the total number of bags released for donation in Rio de Janeiro, in 2018-2019. The prevalence of HAV-RNA and B19V-DNA found among donors in Rio de Janeiro were 0.17% (n=2) and 0.33% (n=4), respectively, which reflects in incidence rates of 1.66 and 3.32 per 1000 donors, for HAV and B19V, respectively. The incidences of HAV (9.5%) and B19V (2.4%) were significantly higher among Vidigal/Rocinha donors when compared to Rio de Janeiro donors in general. For HAV, four samples from Vidigal/Rocinha were classified as subgenotypes IA (n=2) and IB (n=2), and two obtained from Rio de Janeiro were classified as IB. For B19V, the samples (n=3) sequenced belonged to subgenotype 1a. Between 2018 and 2019, the estimated number of infectious bags in the state was 605 for HAV and 880 for B19V. These results indicate that HAV and B19V are present in the blood donor population of RJ and that the implementation of screening methods for these viruses can be considered to improve the safety of blood and hemoderivatives intended for donation.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Vírus da Hepatite A	20
1.1.1 Taxonomia e estrutura viral.....	20
1.1.2 Organização genômica e proteica.....	22
1.1.3 Variabilidade genômica	24
1.1.4 Replicação viral e síntese proteica.....	26
1.1.5 Patogênese e resposta imunológica.....	30
1.1.6 Manifestações clínicas.....	32
1.1.7 Epidemiologia.....	35
1.1.8 Tratamento e prevenção.....	39
1.1.9 Diagnóstico	42
1.1.10 Transfusão sanguínea e HAV	44
1.2 Parvovírus B19	46
1.2.1 Taxonomia e estrutura viral	46
1.2.2 Organização genômica e proteica	46
1.2.3 Variabilidade genômica	48
1.2.4 Replicação viral e síntese proteica	50
1.2.5 Patogênese e resposta imunológica	52
1.2.6 Manifestações clínicas	54
1.2.7 Infecção persistente	57
1.2.8 Epidemiologia	58
1.2.9 Tratamento e prevenção	59
1.2.10 Diagnóstico	61
1.2.11 Transfusão sanguínea e B19V	62
1.3 Hemoterapia no Brasil	63
1.3.1 Hemorrede e Ciclo do Sangue	65
1.3.2 O HEMORIO	66
1.4 Justificativa	68
2 OBJETIVOS	70
2.1 Objetivo Geral	70

2.2	Objetivos Específicos	70
3	MATERIAL E MÉTODOS	71
3.1	Considerações éticas.....	71
3.2	Desenho do estudo	71
3.3	População do estudo.....	72
3.3.1	Doadores de sangue do Rio de Janeiro	72
3.3.2	Doadores de sangue dos bairros Vidigal e Rocinha	72
3.4	Preparo dos <i>minipools</i> de plasma (<i>Pooling</i>)	72
3.5	Testes moleculares para pesquisa de HAV-RNA e B19V-DNA.....	73
3.5.1	Extração de ácidos nucleicos	74
3.5.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	75
3.5.2.1	Transcrição reversa do HAV-RNA.....	75
3.5.2.2	RT-PCR e Nested-PCR do HAV-RNA	75
3.5.2.3	Detecção do B19V-DNA	76
3.5.2.4	Semi-Nested PCR do B19V-DNA	77
3.6	PCR em tempo real e determinação de carga viral	78
3.6.1	PCR em tempo real e determinação de carga viral de HAV	78
3.6.2	PCR em tempo real e determinação de carga viral de B19V	79
3.7	Eletroforese em gel de agarose	80
3.8	Avaliação da presença de inibidores de PCR	81
3.9	Avaliação da infecciosidade das amostras de plasma por meio da detecção de partículas virais	81
3.10	Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética	81
3.11	Detecção de marcadores sorológicos específicos para HAV e B19V.....	82
3.12	Avaliação do risco de transmissão transfusional e análise estatística.	83
4	RESULTADOS	85
4.1	Detecção de HAV-RNA e B19V-DNA.....	85
4.1.1	Em doadores do Rio de Janeiro	85
4.1.2	Em doadores do Vidigal e Rocinha	86
4.2	Detecção de partículas virais infecciosas por meio do pré-tratamento com Benzonase®.	88

4.3	Sequenciamento e análise filogenética das amostras positivas para HAV-RNA e B19V-DNA.....	88
4.3.1	Sequenciamento e análise filogenética do HAV	89
4.3.2	Sequenciamento e análise filogenética do B19V	90
4.4	Detecção de anticorpos específicos para HAV e B19V	91
4.4.1	Em doadores do Rio de Janeiro	91
4.4.2	Em doadores do Vidigal e Rocinha	91
4.5	Avaliação do risco de transmissão transfusional.	94
4.5.1	Número esperado de bolsas contaminadas com HAV e B19V nos doadores do Rio de Janeiro	94
4.5.2	Número esperado de bolsas com potencial transmissivo de HAV e B19V no Rio de Janeiro	96
4.6	Avaliação do impacto de surtos epidêmicos de hepatite A nas prevalências de HAV e B19V.	98
5	DISCUSSÃO	99
6	CONCLUSÕES	107
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
8	ANEXOS	135
8.1	ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	135
8.2	ANEXO 2 - SEQUÊNCIAS PROTÓTIPOS DE HAV UTILIZADAS PARA A CONSTRUÇÃO DE ÁRVORE FILOGENÉTICA	140
8.3	ANEXO 3 - SEQUÊNCIAS PROTÓTIPOS DE B19V UTILIZADAS PARA A CONSTRUÇÃO DE ÁRVORE FILOGENÉTICA	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Características distintivas de vírus (a) “ <i>naked</i> ”, (b) quasi-envelopados e (c) envelopados convencionais..	21
Figura 1.2: Víriões do vírus da hepatite A nas formas “ <i>naked</i> ” e eHAV.	21
Figura 1.3: Estrutura do HAV-RNA e processamento da poliproteína P0.	23
Figura 1.4: Biogênese de víriões extracelulares quasi-envelopados (eHAV) e “ <i>naked</i> ”.	29
Figura 1.5: Curso típico da hepatite A.	31
Figura 1.6: Resultados clínicos da infecção pelo vírus da hepatite A (HAV).	33
Figura 1.7: Distribuição global da hepatite A.	36
Figura 1.8: Estrutura do genoma e mapa genético do B19V.	47
Figura 1.9: Esquema do ciclo de replicação do B19V.	52
Figura 1.10: Cursos clínico e imunológico após infecção por B19V.	54
Figura 1.11: Fluxograma do Ciclo do Sangue.	66
Figura 1.12: Mapa da Hemorrede do Rio de Janeiro atualizado em janeiro de 2021.	67
Figura 1.13: Esquema das etapas necessárias para realização do NAT multiplex HIV/HBV/HCV.	68
Figura 3.1: Fluxograma de análise das amostras de doadores obtidas individualmente, a partir de bolsas de plasma congelado.	73
Figura 3.2: Fluxograma de análise das amostras de doadores obtidas sob a forma de <i>minipools</i> de plasma.	74
Figura 4.1: Caracterização da população de 42 doadores de sangue oriundos dos bairros Vidigal e Rocinha, de acordo com sexo e faixa etária (n=42).	87
Figura 4.2: Árvore filogenética construída pelo método Máxima Verossimilhança utilizando o modelo Tamura-Nei com bootstrap de 1000 repetições, baseada nas sequências de 247pb da região VP1/2A do HAV com duas amostras detectadas em doadores do Rio de Janeiro, destacadas em azul, e quatro amostras detectadas em doadores do Vidigal/Rocinha, destacadas em vermelho.	89
Figura 4.3: Árvore filogenética construída pelo método Máxima Verossimilhança utilizando o modelo Tamura-Nei com <i>bootstrap</i> de 1000 repetições, baseada nas sequências de 476pb da região VP1/VP2 do B19V com três amostras detectadas em doadores do Rio de Janeiro, destacadas em azul.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Principais doenças causadas pelo B19V.	55
Tabela 3.1: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e <i>Nested-PCR</i> para a região-alvo VP1/2A, conforme De Paula et al., 2002.....	76
Tabela 3.2: Oligonucleotídeos utilizados na PCR e na <i>Semi-Nested-PCR</i> para NS1 e VP1/VP2, conforme Durigon et al., 1993.	78
Tabela 3.3: Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR em tempo real para detecção e quantificação de HAV-RNA, conforme Tourinho et al., 2015.	79
Tabela 3.4: Oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real para detecção e quantificação de B19V-DNA, conforme Alves et al., 2019.	80
Tabela 4.1: Cargas virais dos <i>minipools</i> positivos para B19V-DNA e de suas respectivas amostras individuais, por meio de PCR em tempo real.....	85
Tabela 4.2: Detecção de HAV-RNA de acordo com ano de doação, sexo e idade dos doadores de sangue dos bairros Vidigal e Rocinha.	87
Tabela 4.3: Cargas virais após o pré-tratamento com Benzonase® em três amostras positivas para B19V-DNA provenientes de <i>minipools</i> de plasma.	88
Tabela 4.4: Perfil de marcadores sorológicos e moleculares das amostras positivas para HAV-RNA, provenientes de doadores do Rio de Janeiro e do Vidigal/Rocinha.	92
Tabela 4.5: Perfil de marcadores sorológicos e moleculares das amostras positivas para B19V-DNA, provenientes de doadores do Rio de Janeiro e do Vidigal/Rocinha.	93
Tabela 4.6: Número estimado de bolsas de plasma contaminadas com HAV e B19V em doadores do Rio de Janeiro, de acordo com ano de coleta.	95
Tabela 4.7: Número estimado de bolsas de sangue com potencial transmissivo de HAV e B19V em doadores do Rio de Janeiro, de acordo com ano de coleta.	97
Tabela 4.8: Comparação entre as prevalências de HAV-RNA e B19V-DNA de doadores de sangue do Rio de Janeiro e dos bairros Vidigal e Rocinha.	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Temperatura em graus Celsius
µL	Microlitro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ALT	Alanina Aminotransferase
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
B19V	Parvovírus Humano B19
CAT	Crise aplástica transitória
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
eHAV	Vírions quasi-envelopados do vírus da hepatite A
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz

g	Gramas
HAV	Vírus da Hepatite A (do inglês, <i>Hepatitis A virus</i>)
HBV	Vírus da Hepatite B (do inglês, <i>Hepatitis B virus</i>)
HCV	Vírus da Hepatite C (do inglês, <i>Hepatitis C virus</i>)
HEMORIO	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HSH	Homens que fazem sexo com homens
HTLV	Vírus Linfotrópico T Humano (do inglês, <i>Human T-lymphotropic virus</i>)
IFN- γ	Interferon- γ
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ITRs	Repetições terminais inversamente idênticas (do inglês, <i>identical inverted terminal repeats</i>)
IVLs	Vesículas intraluminais (do inglês, <i>intraluminal vesicles</i>)
Kb	Quilobase
kDa	Quilodáltons
L	Litro
LADTV	Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mm	Milímetro
NAT	Teste de ácidos nucleicos (do inglês <i>nucleic acid amplification test</i>)
NCR	Região não codificadora (do inglês, <i>noncoding region</i>)
nm	Nanômetros
NS1	Proteína Não Estrutural 1 (do inglês, <i>non-structural protein 1</i>)
nt	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Matriz de leitura aberta (do inglês, <i>open reading frames</i>)
PA	Pará
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PNI	Programa Nacional de Imunização
PROCC	Programa de Computação Científica da Fiocruz
Pró-Sangue	Programa Nacional de Sangue e Hemoderivados
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa e em tempo real (do inglês, <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>Rybonucleic acid</i>)
RNA _m	RNA mensageiro
RNAseP	Ribonuclease P
RPM	Rotações por minuto
SBHH	Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
SINASAN	Sistema Nacional de Sangue
ssDNA	DNA de fita simples (do inglês, <i>single-stranded DNA</i>)

SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris/Acetato/EDTA
TIM1	Domínio de imunoglobulina e mucina de células T com proteína 1
UI	Unidades Internacionais
URSS	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
VLPs	Partículas semelhantes a vírus (do inglês, <i>Viral-Like Particles</i>)
VP	Proteína do vírion (do inglês, <i>virion protein</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da Hepatite A (HAV)

1.1.1. Taxonomia e estrutura viral

Comumente conhecido como vírus da hepatite A (HAV), a espécie *Hepatovirus A* pertencente à família *Picornaviridae* e ao gênero *Hepatovirus*, infecta hepatócitos e células epiteliais do intestino delgado de primatas¹.

A partícula viral, não possui envelope, apresenta diâmetro de 27 a 32nm, densidade flutuante de 1,32 a 1,34 g/cm³ em soluções de cloreto de césio e coeficiente de sedimentação de 160 S em soluções de sacarose. O vírion (partícula viral completa infecciosa) é composto por um capsídeo de simetria icosaédrica e pelo genoma de RNA, que codifica quatro proteínas estruturais, denominadas *Virion Protein* (VP) 1 a 4^{2,3}.

O HAV exibe alto grau de resistência a pHs baixos (entre 1,0 e 6,0) e estabilidade em diferentes temperaturas (25°C a 60°C), o que lhe confere estabilidade no ambiente e o torna capaz de permanecer viável por várias semanas em matéria fecal, e água e alimentos contaminados, assim como em superfícies que tiveram contato este conteúdo^{2,4,5}. O vírus também possui resistência aos desinfetantes de superfície mais comuns, como o éter e os detergentes não iônicos.

Estão descritas duas formas infecciosas para o vírus da hepatite A. A primeira delas consiste na forma não membranosa, ou vírion “*naked*”, que é eliminada nas fezes de indivíduos infectados e constitui-se de pequenos capsídeos icosaédricos com cerca de 27nm de diâmetro, nos quais o RNA viral é empacotado⁶⁻⁸. A segunda forma representa os vírions quasi-envelopados (eHAV), que são secretados de forma não lítica de células infectadas. Estes vírions são encontrados no sangue e em fluidos sobrenadantes de cultura de células infectadas pelo HAV, e são compostos por capsídeos contendo RNA viral encapsulado no interior de vesículas membranosas que não apresentam proteínas codificadas por vírus em sua superfície^{8,9}.

Em contraste aos vírions “*naked*”, os vírions eHAV possuem diâmetro maior, variando entre 50nm e 110nm (Figura 1.1). Em microscopia eletrônica, preparações de eHAV mostram vesículas membranosas contendo um ou dois, ou, ocasionalmente, três, capsídeos (Figura 1.2)^{8,9}. Além do HAV-RNA, estes capsídeos

contêm a proteína VP1pX predominantemente não processada, ao invés da sua forma madura, como se encontra nos vírions “*naked*” maduros. Além disso, é importante destacar que as membranas envolvem completamente o capsídeo, o que dificulta a detecção do antígeno viral e protege-o da neutralização mediada por anticorpos anti-HAV^{6,8,9}

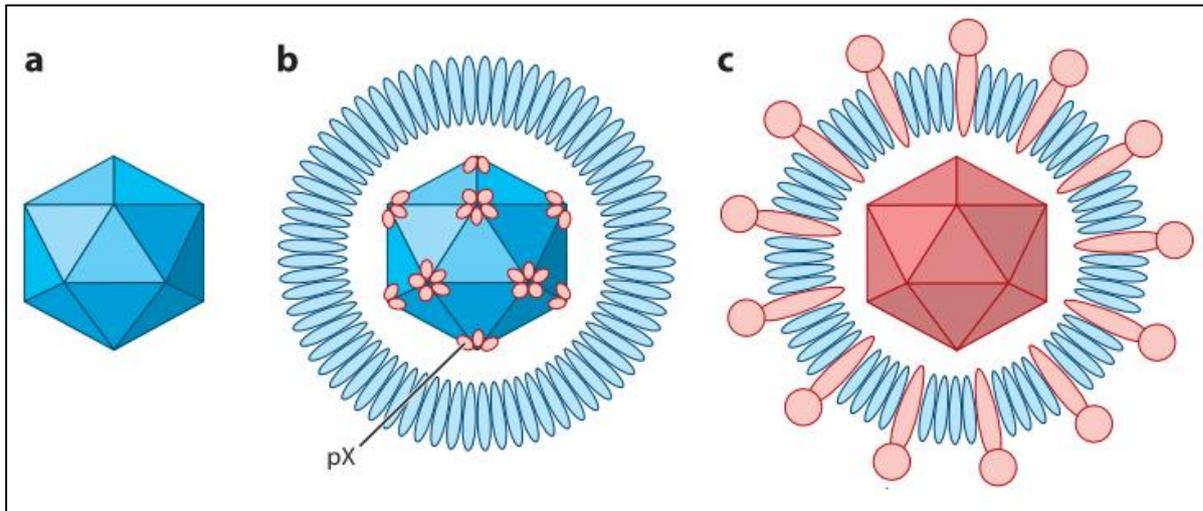


Figura 1.1: Características distintivas de vírus (a) “*naked*”, (b) quasi-envelopados e (c) envelopados convencionais. Os vírus quasi-envelopados, como o vírus da hepatite A (eHAV), são diferenciados de outros vírus com envelope pela falta de glicoproteínas virais na bicamada lipídica circundante, mas podem apresentar proteínas internas exclusivas, que não são encontradas em vírions “*naked*”. **Fonte:** Adaptado de Feng et al., 2014.

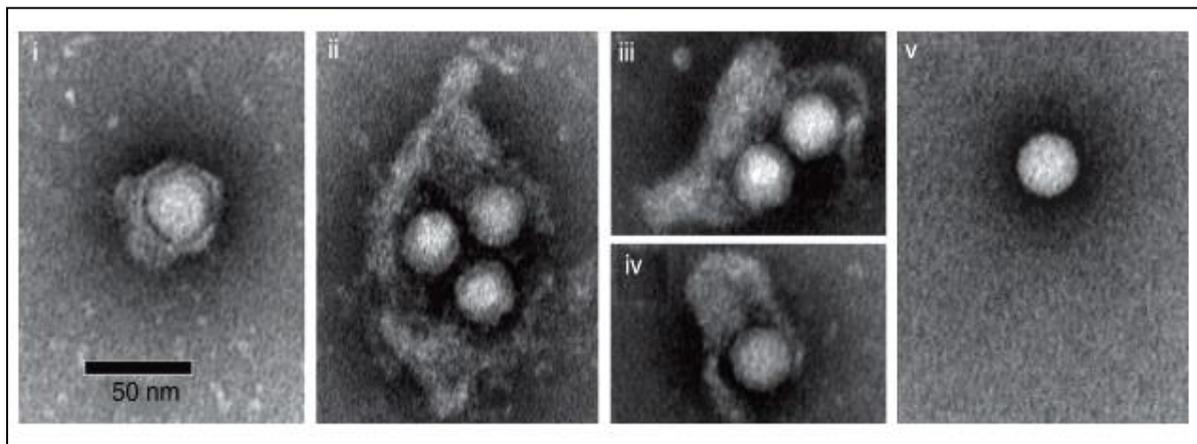


Figura 1.2: Vírions do vírus da hepatite A nas formas “*naked*” e eHAV. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando vírions quasi-envelopados (eHAV) (I-IV) e vírions não envelopados (“*naked*”) de 27nm de diâmetro (V), recuperados de fluido sobrenadante de células Huh-7.5 infectadas. **Fonte:** Adaptado de Feng et al., 2013.

1.1.2 Organização genômica e proteica

O genoma do HAV é composto por RNA de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 7,5Kb, que atua diretamente como RNA mensageiro para a tradução de proteínas e que apresenta uma única fase de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frames*) para uma grande poliproteína (P0) de aproximadamente 250kDa^{3,4,8}. O HAV-RNA é composto por uma região não codificadora (NCR, do inglês *noncoding region*) na extremidade 3', seguida pela ORF e por outra NCR na extremidade 5', covalentemente ligada a uma pequena proteína codificada por vírus, denominada 3B (ou VPg). A extremidade 3', por sua vez, assim como em RNAs mensageiros (RNAm) celulares, termina em uma cauda poli (A) relativamente longa^{3,8,10,11}.

A expressão gênica e a síntese da poliproteína P0 requerem o processamento de precursores intermediários e a maturação de proteínas individuais por meio de atividades proteolíticas, durante e após o processo de tradução. A P0 é processada em 10 proteínas maduras, sendo quatro estruturais e seis não estruturais, principalmente, pela ação de uma protease codificada pelo vírus, denominada 3C^{pro}^{4,11}.

A poliproteína P0 é composta por três regiões, denominadas P1, P2 e P3 (Figura 1.3A). A região P1 codifica as proteínas estruturais, denominadas VP0, VP3 e VP1pX, de forma que 60 cópias de cada uma dessas se reúnem e formam a proteína estrutural, VP4, formada a partir do processo de clivagem e maturação de VP0, que também resulta em VP2. Já nas regiões P2 e P3, são codificadas proteínas não estruturais que são necessárias para a síntese de RNA e montagem do vírion. A região P2 codifica as proteínas 2B e 2C, enquanto que o segmento P3 codifica as proteínas 3A, 3B (VPg), 3C^{pro} e 3D^{pol}, sendo a proteína 3C^{pro} a protease responsável pela maioria das clivagens que ocorrem dentro da poliproteína P0 (Figura 1.3)^{3,4,8,11}.

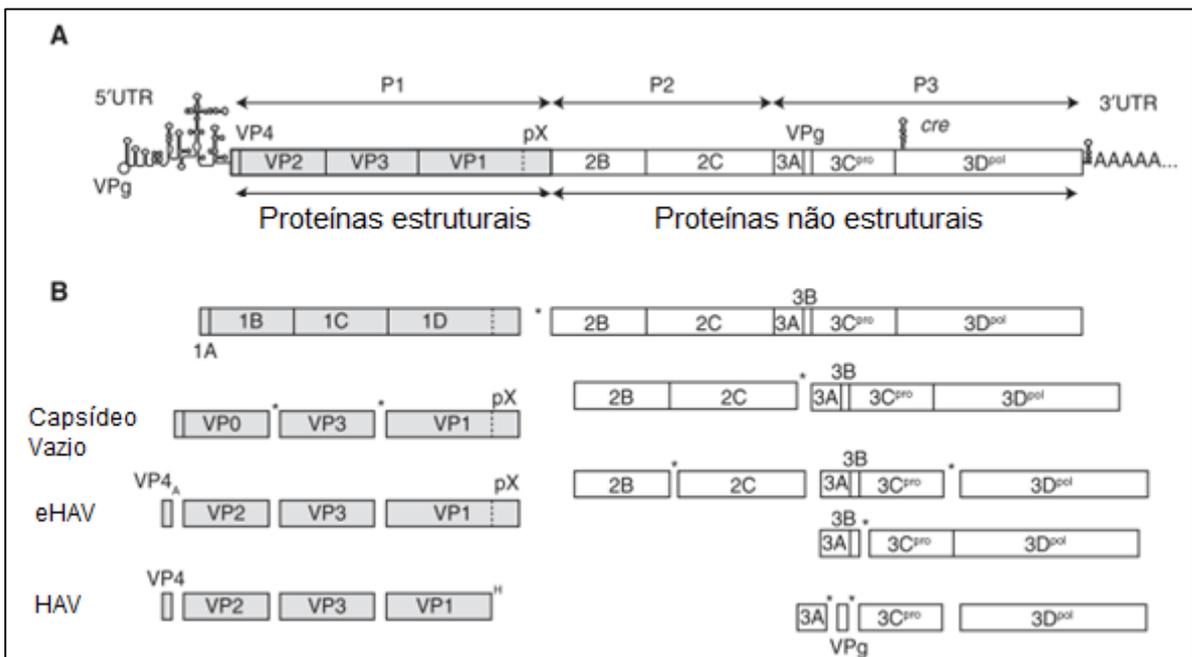


Figura 1.3: Estrutura do HAV-RNA e processamento da poliproteína P0. (A) Organização do genoma, mostrando a proteína 5' VPg ligada covalentemente à região não traduzida 5' (5' NCR) e a cauda poli (A), ligada à 3'NCR. A fase de leitura aberta (ORF) que codifica a poliproteína é mostrada como uma caixa, com locais de clivagem que levam à produção de proteínas estruturais maduras (coloração cinza) e não estruturais (coloração branca). (B) Processamento da poliproteína P0. O processamento das proteínas não estruturais resulta em múltiplos intermediários de processamento. A cinética não é conhecida em detalhes, mas a maioria dos eventos de clivagem é mediada pela proteinase 3Cpro (*), exceção da clivagem VP4-VP2, que é autocatalítica e ativada pelo empacotamento do RNA e excisão do domínio pX de VP1pX. Este processo ocorre após a perda da membrana do vírion eHAV, que é mediada por um processo desconhecido. **Fonte:** Adaptado de McKnight e Lemom, 2018.

Dentre as proteínas estruturais, a VP1pX é a maior, apresentando 38,5 kDa de massa e sendo encontrada nos intermediários iniciais no processo de morfogênese e também nos vírions eHAV liberado das células^{9,11,12}. O fragmento pX possui 8,3kDa de massa e é clivado da porção carboxi-terminal da proteína VP1pX, por meio da ação de uma protease ainda desconhecida (Figura 1.1)^{6,9,13,14}. Este processo resulta na proteína VP1 madura⁶.

A proteína estrutural VP1 contém 32,2kDa, é encontrada majoritariamente em vírions excretados de indivíduos infectados e participa da morfogênese do capsídeo viral, ao se reunir com VP0 e VP3⁶. As proteínas VP2 e VP3 consistem em proteínas estruturais de 222 e 246 resíduos de aminoácidos³, respectivamente. Por meio de interações com vesículas endossômicas, VP2 atua no recrutamento dos capsídeos do HAV recém-montados, permitindo sua liberação da célula infectada^{3,6,8}. A proteína VP4, por sua vez, consiste em uma pequena proteína que apresenta 21 ou 23 resíduos de aminoácidos e é resultante da autoclivagem de VP0. Acredita-se que esta proteína seja essencial para a montagem de pentâmeros em capsídeos vazios,

estando presente na superfície interna do capsídeo viral imaturo³. Além disso, VP4 também atua na entrada do genoma viral no citosol da célula hospedeira⁶.

As proteínas não estruturais estão associadas principalmente a membranas celulares. A proteína 2A está envolvida na morfogênese viral e, juntamente com a proteína VP1 como precursor, é responsável pela virulência do HAV. A proteína 2B é responsável pela atividade de helicase, proporcionando a abertura da hélice do genoma. A proteína 2C apresenta estrutura de hélice e promove rearranjos substanciais na membrana celular das células infectadas, por exemplo^{6,15,16}. No que se refere às proteínas codificadas pela região P3, a proteína 3A atua como uma âncora de membrana para a proteína 3B (VPg), que parece atuar como um iniciador para a síntese de RNA^{6,17}. A 3C^{pro} corresponde a uma cisteína protease e consiste em uma das primeiras proteases virais caracterizadas estruturalmente, enquanto que a 3D^{pol} corresponde a uma RNA polimerase dependente de RNA, contudo nunca foi observada sua expressão na forma ativa^{6,18,19}.

1.1.3 Variabilidade genômica

A estrutura do capsídeo do HAV é altamente conservada. Esta baixa diversidade antigênica reflete um alto grau de conservação nas sequências de aminoácidos das proteínas do capsídeo, de forma que todos os hepatovírus humanos formam um único sorotipo, apesar dos múltiplos genótipos^{8,20,21}.

Os experimentos iniciais de sequenciamento do genoma viral utilizaram um fragmento de 168 nucleotídeos (nt) da junção VP1/2A e revelaram uma variação genética entre as diferentes cepas do HAV²². A partir dos resultados iniciais obtidos, as distâncias genéticas entre as cepas foram desigualmente distribuídas, permitindo a classificação de variantes em vários genótipos, que exibiam uma diferença nucleotídica inferior a 15%. Sete genótipos de HAV, I a VII, foram então identificados. Posteriormente, estes sete genótipos foram reclassificados com base na região C-terminal da proteína VP3, na região N-terminal da proteína VP1 e também na junção entre as regiões VP1/2a^{4,20,23}. Esta reclassificação resultou nos seis genótipos, I a VI, da classificação atualmente utilizada e passou a considerar o genótipo VII um subgenótipo do genótipo II²³.

Os genótipos I, II e III são divididos em subgenótipos A e B, que possuem diferença genética entre si de aproximadamente 7 a 7,5% na região VP1/2A²⁰. Estes mesmos genótipos têm sido associados a infecções em seres humanos, enquanto

que os genótipos IV, V e VI são de origem símia^{4,20,23}, cujas cepas apresentam uma sequência P1 única e uma sequência de junção VP3/VP1 distinta^{4,22,24}. Os genótipos e subgenótipos de HAV apresentam uma distribuição geográfica particular, sendo o genótipo I o mais prevalente, seguido do genótipo III, e por último, do genótipo II^{4,23}.

Em todo o mundo, o genótipo I é o mais prevalente, sendo o subgenótipo IA o mais frequente^{4,23}. Este subgenótipo compreende a fração principal das cepas pertencentes ao genótipo I que circulam nas Américas, Europa, Ásia e África^{23,25-27}. Recentemente, ele foi associado a surtos epidêmicos ocorridos em países da Europa, Américas do Norte e do Sul e também da Ásia, principalmente em homens que fazem sexo com homens (HSH)²⁸⁻³⁰. O subgenótipo IB é predominante no Oriente Médio e no sul da África³¹⁻³³, contudo já foi associado a surtos de hepatite A na América do Sul, incluindo o Brasil³⁴⁻³⁷. Além disso, cepas pertencentes ao subgenótipo IB foram associadas a um grande surto de hepatite A na região leste da Espanha, sendo causado pelo consumo de moluscos originários da Peru, o que corrobora com os dados que indicam que ambos os subgenótipos circulam na América do Sul^{4,38,39}.

O genótipo II foi inicialmente encontrado na França, em 1979, e em Serra Leoa, em 1988. Ambas as cepas diferem uma da outra e das demais cepas de HAV em cerca de 17% e de 20% a 25%, respectivamente²⁰. Acredita-se que o subgenótipo IIA teve origem na África Ocidental, sendo endêmico do Benin. Contudo, somente cepas do subgenótipo IA foram detectadas na região centro-ocidental da África, sendo relatadas na Nigéria e em Camarões^{4,25,40,41}. Até os dias atuais, as razões da circulação limitada do genótipo II ao redor do mundo ainda não foram elucidadas e a detecção deste genótipo é raramente reportada.

A distribuição do genótipo III é global. Apesar de o subgenótipo IIIA ser considerado endêmico na Ásia, cepas já foram relatadas também nas Américas, na África e na Europa^{4,20,42-47}. Casos de infecções causadas por este subgenótipo foram recentemente reportados na Turquia, Espanha e Coreia do Sul^{42,44,45}. É interessante destacar que na Índia a maioria dos surtos epidêmicos de hepatite A relatados foram causados por infecções do subgenótipo IIIA, e que no Japão este subgenótipo, juntamente com o IIIB, co-circula amplamente com cepas pertencentes aos subgenótipos IA e IB⁴⁸⁻⁵¹.

Os três genótipos restantes, IV a VI, são cada um representado por uma única cepa recuperada a partir de uma espécie de macaco do Velho Mundo²⁰. Dois desses genótipos foram recuperados em uma instalação de primatas, localizada na antiga

União Soviética, a partir de um macaco *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*), importado da Indonésia (genótipo VI), e de um macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), importado do Quênia (genótipo V)^{20,24}. O genótipo IV foi recuperado nos Estados Unidos a partir de um macaco *Cynomolgus*, importado das Filipinas^{23,52}. As cepas de HAV de símios diferem geneticamente tanto entre si quanto das cepas que acometem seres humanos^{23,34}.

No Brasil, o genótipo I é o mais comumente encontrado. Estudos realizados em amostras clínicas obtidas a partir de pacientes brasileiros demonstraram maior prevalência do subgenótipo IA, assim como observado em âmbito mundial^{34,35,37}. Este mesmo subgenótipo, recentemente associado a surtos entre HSH em estudos de diferentes países, também foi detectado neste mesmo grupo de indivíduos no Brasil. Em 2019, Mello e colaboradores relataram a circulação de cepas de HAV pertencentes ao subgenótipo IA que estavam associadas a surtos epidêmicos ocorridos na Europa entre HSH, revelando a ocorrência de sua circulação no Rio de Janeiro⁵³. Além disso, também nesta cidade, este mesmo subgenótipo foi detectado em amostras de água utilizadas para consumo e também em esgoto bruto e tratado^{54,55}.

Ainda no cenário nacional, o subgenótipo IB tem sido relatado em associação a surtos de hepatite A ocorridos no país e também em casos isolados^{34,35,56,57}. Entre pacientes infectados com o genótipo I, o subgenótipo IB foi detectado em 35% e 70% dos indivíduos no noroeste do Brasil e no Rio de Janeiro, respectivamente^{37,58}. Além disso, dados relatam a co-circulação deste mesmo genótipo com o IA, sobretudo durante a ocorrência de surtos epidêmicos^{35,57}. No Rio de Janeiro, ambos os subgenótipos foram identificados durante a investigação de um surto de hepatite A ocorrido em uma creche, no ano de 2011³⁶. Ademais, um estudo realizado por Amado et al., 2018, mostrou a co-circulação de ambos os subgenótipos em bairros com relatos de surtos de hepatite A, além da detecção do subgenótipo IB em amostras de água local⁵⁴.

1.1.4 Replicação viral e síntese proteica

O vírus da hepatite A é caracterizado por não apresentar envelope viral, o que lhe confere a necessidade de ligação com um receptor presente nas células-alvo para que assim ocorra sua internalização e, conseqüentemente, o início do seu ciclo de replicação.

Em modelos animais, os antígenos do HAV podem ser detectados no estômago e nos intestinos delgado e grosso ao longo do curso da infecção, o que sugere que, possivelmente, algum passo da replicação viral ocorre no intestino^{4,59}. Embora a infecção normalmente resulte da ingestão de vírions “*naked*”, não está claro quais os tipos de células que são infectados primeiro, ou mesmo se há um local primário de replicação dentro do intestino^{11,59}. Apesar deste fato, uma vez infectado, a disseminação viral dentro do hospedeiro parece envolver a forma eHAV, uma vez que apenas esta forma é detectada no soro durante a infecção aguda⁹.

O domínio de imunoglobulina e mucina de células T contendo a proteína-1 (TIM1) é um receptor de fosfatidilserina envolvido na eliminação de células apoptóticas e que está associado à adsorção e entrada de muitos vírus envelopados que exibem fosfatidilserina em sua superfície^{11,60}. O receptor TIM1 foi inicialmente sugerido como um receptor de HAV, entretanto estudos posteriores mostram que sua presença não é um fator essencial para a entrada do vírus na célula-hospedeira. Nesse contexto, os mecanismos específicos de endocitose dos dois tipos de vírions ainda precisam ser analisados e estabelecidos^{7,8,61}.

O mecanismo de entrada de partículas eHAV na célula hospedeira se difere do mecanismo que os vírions “*naked*” apresentam, apesar de ambos compartilharem etapas posteriores do processo de entrada na célula-alvo, tais quais as interações do capsídeo com um receptor celular específico. Com relação ao eHAV, o processo de entrada ainda não é detalhadamente compreendido, porém acredita-se que ocorra por meio de uma via endocítica. Em contrapartida, acredita-se que os vírions “*naked*” interagem com o mesmo receptor, contudo sem a formação de um endossomo inicial^{8,11}.

A etapa final da entrada das partículas virais é a liberação do HAV-RNA através da membrana endossômica para o citoplasma da célula hospedeira, que ocorre de forma lenta e assíncrona^{11,62}. Acredita-se que esta liberação ocorra por meio da formação de um poro de membrana composto pela proteína VP4 miristoilada e o terminal amino da proteína VP1 que se estende do capsídeo após a ligação ao receptor^{8,11,63,64}. Entretanto, raios-X da estrutura do capsídeo viral recentemente observados mostraram a ausência de qualquer local de interação com receptores, o que levou à hipótese de que o HAV pode entrar e desnudar seu RNA por meio de um mecanismo completamente diferente de outros picornavírus, com o capsídeo possivelmente entrando no citosol intacto e sem revestimento intracelular^{7,11}.

Uma vez que o genoma viral é entregue ao citosol, o ciclo de replicação se inicia com a tradução de proteínas estruturais e não-estruturais necessárias para estabelecer um complexo de replicação do RNA. A proteína 3B (VPg) é removida do genoma logo após sua chegada ao citosol e a tradução da poliproteína P0 é iniciada de uma forma independente^{8,11,65}. A replicação do HAV-RNA ocorre lentamente, e, assim como em todos os vírus de RNA de polaridade positiva, ocorre no citoplasma e em estreita associação com membranas.

Observa-se que a superexpressão da proteína 2C leva à formação de rearranjos nas membranas intracelulares derivadas do retículo endoplasmático, o que possivelmente reflete no estabelecimento de um microambiente membranoso dentro do qual a síntese de RNA pode prosseguir^{8,11,16}. O RNA de polaridade positiva é transcrito para um intermediário de polaridade negativa, resultando em uma molécula de RNA duplex que então serve como molde para a produção de múltiplos novos produtos de RNA de fita (+) - em reações catalisadas pela polimerase 3D^{pol}. A replicação prossegue de forma não conservadora, isto é, com muito mais novas fitas (+) que fitas (-) de RNA^{8,11}. Fatores do hospedeiro estão envolvidos no estabelecimento e manutenção da maquinaria de replicação do HAV, mas não foram amplamente estudados.

Pouco se sabe a respeito da montagem do capsídeo viral do HAV e do empacotamento do seu RNA no interior da célula hospedeira. Três proteínas de capsídeo precursoras, VP0, VP3 e VP1pX, dobram-se e então se unem como subunidades de pentâmero para montar o capsídeo^{8,66}. A montagem adicional de 12 dessas subunidades de pentâmero em capsídeos completos depende da sequência de VP4 e a sequência de eventos que levam ao empacotamento de RNA não é bem compreendida, porém a clivagem na junção VP0 não prossegue até que o capsídeo imaturo tenha o RNA empacotado^{8,67}.

Vírions de eHAV quasi-envelopados são liberados das células infectadas de forma não lítica como pequenas vesículas extracelulares (exossomos), cujas membranas envolvem e protegem o capsídeo da ação de anticorpos neutralizantes^{8,9,11,68}. Estes vírions compartilham várias características com os vírus envelopados convencionais, mas não expressam glicoproteínas codificadas por vírus em sua superfície⁶⁸. O mecanismo de biogênese de secreção dos vírions eHAV ocorre por meio da via de corpo multivesicular em que os capsídeos virais são recrutados do local de replicação e empacotamento do HAV-RNA para as vesículas de exocitose, formando os corpos multivesiculares em um processo mediado por

complexos de classificação endossômica necessários para o transporte (ESCRT)^{8,68}. Corpos multivesiculares com vesículas intraluminais (IVLs, do inglês *intraluminal vesicles*) contendo capsídeos do HAV, então, se movem para a membrana plasmática, onde ocorre a fusão da mesma com a membrana dos corpos multivesiculares, o que resulta na liberação extracelular de ILVs como vírions eHAV (Figura 1.4). O vírus liberado através da membrana apical de hepatócitos é desprovido de suas membranas por meio da ação detergente dos sais biliares durante a passagem pela via biliar. A partir deste processo, o HAV é, então, eliminado nas fezes na forma de vírions “*naked*”^{8,11,68-70}.

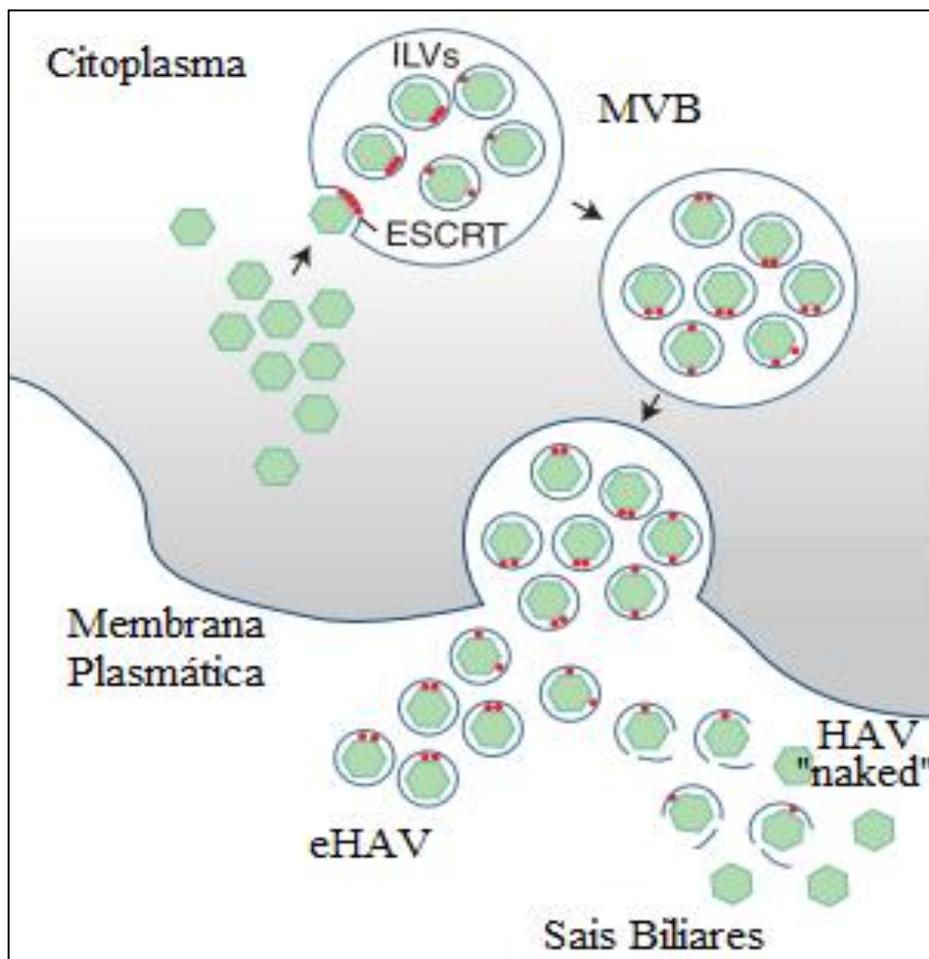


Figura 1.4: Biogênese de vírions extracelulares quasi-envelopados (eHAV) e “*naked*”. Após a montagem e empacotamento do RNA viral, os capsídeos são recrutados para a superfície dos endossomos por meio de interações VP2 e VP1pX com componentes dos complexos de classificação endossômica necessários para o sistema de transporte (ESCRT). O brotamento interno dos capsídeos no endossomo resulta em vesículas intraluminais (ILVs) e formação de corpos multivesiculares (MVBs). Os MBVs são transportados para a membrana plasmática, onde a fusão da membrana leva à liberação de vírions eHAV envoltos em membrana para o espaço extracelular. Os vírions eHAV que são liberados da membrana basolateral do hepatócito para os sinusóides hepáticos e circulam no sangue, enquanto o eHAV secretado através da membrana apical sofre conversão em vírions “*naked*” por meio da ação de sais biliares no sistema biliar proximal. **Fonte:** Adaptado de McKnight e Lemon, 2018.

1.1.5 Patogênese e resposta imunológica

A principal forma de transmissão da hepatite A consiste na via fecal-oral, por meio da ingestão de partículas virais. Após a ingestão de vírions, o HAV resiste ao ambiente estomacal ácido, passa pelo intestino e é chega ao fígado, órgão de tropismo. Contudo, não se sabe ao certo se ocorre replicação em um local primário dentro do trato gastrointestinal. Acredita-se que a partícula infectante chega à membrana basolateral dos hepatócitos, dentro do espaço de Disse, por meio da circulação portal, e então, dentro destas células, inicia sua replicação^{8,71}. Após a replicação, o vírus é secretado na bile e retorna ao trato gastrointestinal, sendo excretado nas fezes ou transferido novamente para o fígado por meio da circulação entero-hepática, até a sua neutralização por anticorpos anti-HAV^{71,72}.

O período de incubação da hepatite A é de, geralmente, 14 a 28 dias, podendo chegar até 50 dias. Durante esse período, são observadas viremia e excreção de altas concentrações de partículas virais pelas fezes (10^9 partículas virais por grama), que constituem a principal fonte de transmissão do HAV em razão da alta carga viral presente nas mesmas^{8,59,73,74}. Esta excreção fecal diminui rapidamente com o início dos sintomas e evidências bioquímicas de lesão hepática, tal qual a elevação das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), que ocorre simultaneamente ao aparecimento de anticorpos específicos^{8,71}. As elevadas concentrações de partículas virais nas fezes aumentam o risco de transmissão durante a fase prodrômica, antes dos sintomas ou manifestações bioquímicas. Além disso, o vírus também é liberado na saliva, porém em concentrações muito baixas⁷⁵.

O período virêmico dura em média 42 dias após o início das manifestações clínicas^{76,77}. Contudo, estudos demonstram que o RNA viral pode ser detectado em amostras de soro/plasma por até 490 dias após o início da icterícia, com cargas virais variando de 10^2 a 10^5 cópias/mL⁷⁶. O RNA viral também pode ser detectado em amostras de sangue total, com períodos de detecção de 42 a 70 dias^{76,77} e em amostras saliva de pacientes com hepatite A, sendo sua carga viral de 1 a 3 unidades/UI de log10 menores do que aqueles encontrados no soro⁷⁵. Apenas um estudo, até o momento, mostrou a detecção do HAV-RNA em amostras de urina⁷⁸. Compatível com a hepatite clínica, anticorpos IgM anti-HAV e, subsequentemente, IgG aparecem no soro e na saliva, acompanhados por uma redução acentuada da eliminação do vírus nas fezes e viremia (Figura 1.5). A detecção de anticorpos anti-

HAV IgM no soro de pacientes infectados ocorre por um período de 10 a 16 semanas, havendo pico na concentração dos mesmos entre 4 e 6 semanas após a infecção⁷⁹. Embora anti-HAV IgM seja detectável por até 6 meses, os anticorpos do tipo IgG são também encontrados no soro no início da infecção pelo vírus da hepatite A, e permanecem detectáveis durante toda a vida do indivíduo, conferindo-lhe imunidade (Figura 1.5)^{8,71,80}. Estes anticorpos neutralizantes reconhecem um pequeno número de epítopos próximos localizados nas proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3^{7,8,81}.

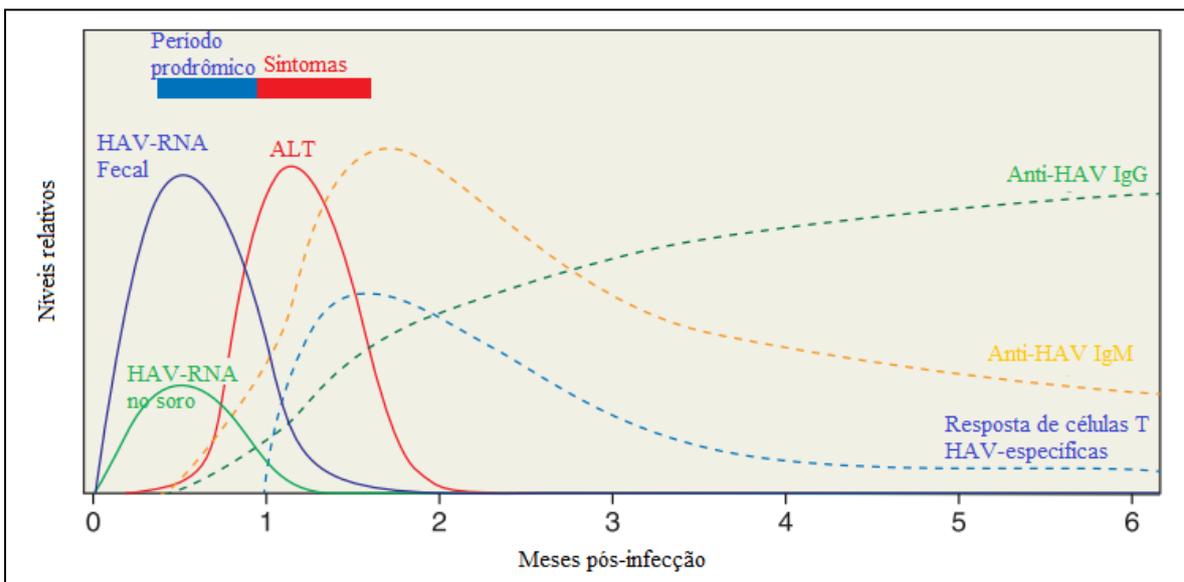


Figura 1.5: Curso típico da hepatite A. Após um período de incubação de 3 a 5 semanas posterior à infecção pelo HAV, os indivíduos infectados desenvolvem sintomas de hepatite com elevação dos níveis da enzima alanina aminotransferase sérica (ALT). A eliminação do vírus nas fezes e a viremia estão presentes e atingem o pico durante o período de incubação. Os anticorpos anti-HAV aparecem no soro primeiro como IgM e, posteriormente, como IgG. Respostas de células T específicas coincidem com a elevação dos níveis séricos de ALT. **Fonte:** Adaptado de Shin e Jeong, 2018.

De um modo geral, a resposta de linfócitos B frente à infecção pelo HAV é tardia, possivelmente devido ao sequestro dos antígenos virais no interior de endossomos e de sua seguinte liberação não lítica das células infectadas, levando à liberação apenas de vírions eHAV revestidos por membranas do hospedeiro que têm capacidade de desviar da ação neutralizante de anticorpos^{8,9,74}.

Em adultos, a infecção aguda pelo HAV comumente causa lesão hepática grave, enquanto que, em crianças, geralmente são observadas infecções subclínicas assintomáticas^{71,82}. No tecido hepático infectado, nota-se degeneração de hepatócitos e infiltração por células inflamatórias mononucleares, além de ativação das células de Kupffer e o rompimento dos canalículos biliares^{8,71}.

O mecanismo de lesão hepática durante o curso da hepatite A ainda não foi claramente elucidado. No entanto, é sabido que a lesão no tecido hepático não é

causada diretamente por efeito citopático do HAV, uma vez que a eliminação fecal máxima geralmente precede o pico dos níveis séricos de ALT e o início da doença, o que indica que a replicação por si só não causa lesão hepatocelular^{8,71}. A hipótese principal para o surgimento de lesão hepática consiste na ação de mecanismos imunomediados que envolvem respostas imunes inatas e adaptativas ao vírus^{71,82}. Os primeiros estudos sugeriram que a lesão hepática pode resultar de uma resposta robusta das células T, uma vez que células T CD8+ citotóxicas, específicas para vírus e produtoras de interferon- γ (IFN- γ), foram identificadas no sangue periférico e no fígado de humanos infectados^{8,83,84}. Porém, apesar de tais achados, ainda não se sabe exatamente qual é o papel das células T no desenvolvimento da lesão hepática característica da hepatite A, assim como quais são seus sinais de ativação e as moléculas efetoras envolvidas^{8,71}.

1.1.6 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da infecção pelo HAV variam de casos assintomáticos à falência hepática aguda, contudo não é observada progressão para hepatite crônica. A maior parte dos indivíduos que desenvolve a doença apresenta-se assintomática ou com formas sintomáticas leves, no entanto, um pequeno número de infectados desenvolve hepatite aguda grave com risco de morte, podendo evoluir ao óbito^{4,71,85}.

O desenvolvimento de hepatite sintomática está associado principalmente à idade do indivíduo infectado. São poucos os casos de crianças menores de 6 anos de idade que manifestam sinais clínicos de hepatite (menos de 30% dos casos), enquanto a maioria dos adultos (mais de 70% dos casos) desenvolvem sinais e sintomas que persistem por um período de duas a oito semanas (Figura 1.6)^{71,86}.

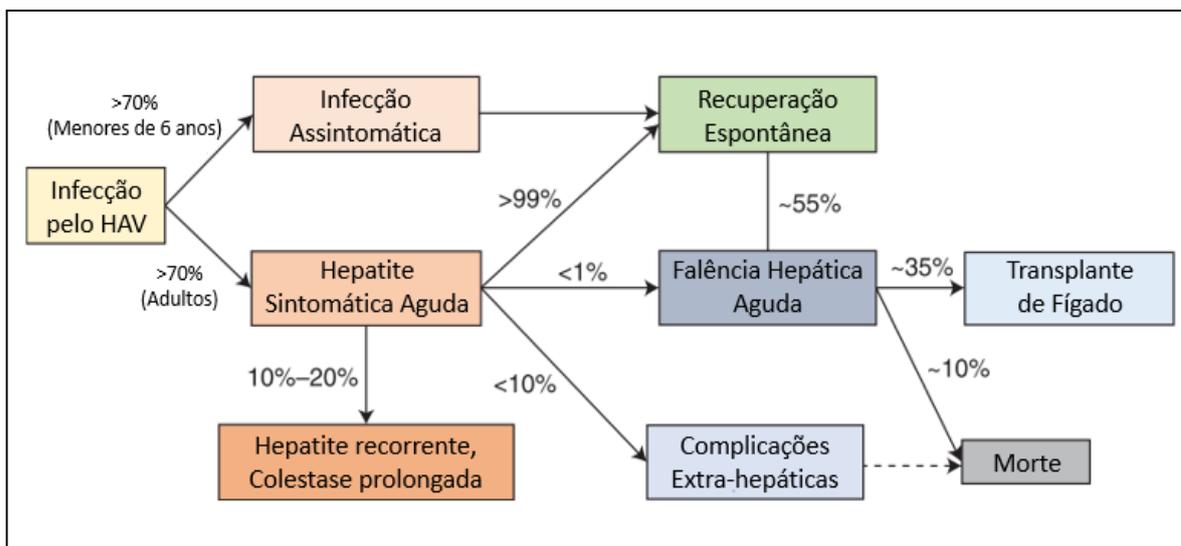


Figura 1.6: Resultados clínicos da infecção pelo vírus da hepatite A (HAV). As manifestações clínicas da infecção pelo HAV dependem, principalmente, da idade dos indivíduos. A maioria dos pacientes adultos desenvolve hepatite sintomática, enquanto a maioria das crianças menores de 6 anos não. Os sintomas comuns da hepatite são febre, mal-estar, náusea ou vômito, desconforto abdominal, colúria e icterícia. As complicações extra-hepáticas relatadas incluem lesão renal aguda, colecistite acalculosa, pancreatite, derrame pleural ou pericárdico, hemólise, hemofagocitose, aplasia de glóbulos vermelhos, artrite reativa aguda, erupção cutânea e manifestações neurológicas como mononeurite e síndrome de Guillain-Barré. **Fonte:** Adaptado de Shin e Jeong, 2018.

O período de incubação da hepatite A é de, geralmente, 14 a 28 dias, podendo chegar até 50 dias. Os sintomas, quando presentes, têm início abrupto com febre (52-91% dos casos), mal-estar (52-91%), náuseas e vômitos (26-87%), desconforto abdominal (37-65%), e, em seguida, observa-se colúria e icterícia (28-94%)^{8,71,87}. Menos frequentemente, também pode ser observado perda de apetite, anorexia, mialgia, artralgia, cefaleia, prurido e erupção cutânea. Ademais, no exame físico pode ocorrer hepatomegalia (78% dos casos)^{8,71}.

Laboratorialmente, a infecção pelo HAV se manifesta por meio de níveis elevados de bilirrubina total (pico médio de 7–13mg/dL), com predomínio de bilirrubina direta, de fosfatase alcalina (pico médio de 319– 335 UI/L) e de ALT (pico médio de 1952-3628 UI/L). O tempo de protrombina mostra-se prolongado e altos níveis de bilirrubina na ausência de hemólise indicam hepatite grave com risco potencial de falência hepática aguda⁷¹.

De uma maneira geral, cinco padrões clínicos são reconhecidos: 1) infecção assintomática, frequentemente presente em crianças menores de 6 anos; 2) infecção sintomática, com presença de colúria, frequentemente seguida de icterícia com predomínio de bilirrubina direta; 3) hepatite colestática, caracterizada por prurido, elevação prolongada de fosfatos alcalinos, gama glutamil transferase (GGT), bilirrubinemia e perda de peso; 4) hepatite A recorrente, manifestada pelo

reaparecimento dos marcadores clínicos, laboratoriais e virológicos da fase aguda após a resolução inicial da infecção; 5) hepatite fulminante, que em muitos casos requer transplante de fígado ou leva ao óbito⁸.

Dentre os pacientes sintomáticos, cerca de 10-20% desenvolvem hepatite recorrente, com duração de mais de 6 meses (Figura 1.6). Esta forma, contudo, é mais branda quando comparada à forma inicial da hepatite. A colestase prolongada é observada em 5-7% dos infectados, e se apresenta com fadiga e nível de bilirrubina total maior que 5mg/dL com predomínio de bilirrubina direta, com duração maior que 4 semanas^{8,71}. Em uma parcela menor dos infectados, de 0,015 a 0,5%, ocorre falência hepática aguda, sendo observadas taxas mais altas em adultos mais velhos (40-50 anos de idade) e em pacientes com doenças hepáticas crônicas subjacentes, com reserva funcional hepática limitada^{71,88,89}. Além disso, superinfecção de HAV ou coinfeção com outros vírus, incluindo os vírus das hepatites B, C e E, HIV e o vírus da dengue, bem como infecção por HAV em pacientes com doença hepática não viral crônica, pode afetar a história natural da doença básica e levar também à insuficiência hepática aguda^{8,90,91}.

A mortalidade por hepatite A como consequência de insuficiência hepática aguda pode chegar a 90% em adultos e 74% em crianças que não são submetidos ao transplante de fígado necessário, embora a recuperação espontânea mesmo em um estágio avançado de insuficiência hepática seja possível. Com o transplante de fígado, no entanto, a taxa de sobrevivência em crianças nesta condição pode chegar a 80%^{8,92,93}.

Manifestações extra-hepáticas atípicas de hepatite A, apesar de não serem frequentes, já foram relatadas e incluem lesão renal aguda, incluindo glomerulonefrite, colecistite acalculosa, pancreatite, derrame pleural ou pericárdico, hemólise, hemofagocitose, aplasia pura de glóbulos vermelhos, artrite reativa aguda, erupção cutânea e manifestações neurológicas, como mononeurite, Síndrome de Guillain-Barré e mielite transversa^{71,94}.

Em gestantes, a hepatite A é geralmente benigna. Apesar deste fato, sobretudo durante o segundo e o terceiro trimestres da gestação, o HAV está associado à contração uterina em partos prematuros, o que pode ocorrer em razão da ação de citocinas pró-inflamatórias ou hiperbilirrubinemia⁷¹. Um estudo realizado em Israel com 13 gestantes demonstrou uma alta taxa de complicações gestacionais (69%), incluindo descolamento de placenta, ruptura prematura de membranas, sangramento vaginal e a contração prematura^{71,95}.

1.1.7 Epidemiologia

A hepatite A tem ampla distribuição mundial, sendo endêmica em muitas regiões e representando a causa mais comum de hepatite viral aguda ao redor do globo^{4,96}. Aproximadamente 1,5 milhão de casos de hepatite A ocorrem anualmente em todo o mundo, contudo, acredita-se que, muito provavelmente, esta taxa de infecção é subestimada em razão da forma frequentemente assintomática da infecção e das limitações em relação às informações epidemiológicas acerca do HAV em muitas regiões^{8,97,98}.

A principal forma de transmissão do HAV, em todo o mundo, consiste na via fecal-oral, que ocorre como resultado da ingestão de água e/ou de alimentos contaminados com o vírus ou pelo contato pessoa-pessoa com um indivíduo infectado^{8,99,100}. A eliminação prolongada do vírus nas fezes somada com fatores como aglomeração de pessoas, condições higiênicas inadequadas, compartilhamento de objetos, proporção de indivíduos suscetíveis à hepatite A e relações sexuais com contato anal-oral ou dígito-anal-oral facilitam a transmissão da doença¹⁰¹. No entanto, as melhorias gerais das condições socioeconômicas e de saneamento básico em todo o mundo estão deslocando a suscetibilidade à infecção pelo vírus, da infância para adultos jovens e até mais velhos, o que gera bolsões de indivíduos suscetíveis à infecção dentro desses grupos^{8,97,102}.

A associação do risco de infecção pelo HAV com os padrões de higiene e saneamento, a manifestação clínica da doença dependente da idade e a imunidade ao longo da vida do indivíduo determinam os diferentes padrões de infecção pelo vírus observados em todo o mundo^{8,97,102}. Geralmente, as regiões globais com alto índice socioeconômico apresentam níveis baixos de endemicidade de infecção pelo HAV (menos de 50% da população), enquanto as regiões com piores condições socioeconômicas têm níveis de endemicidade elevados (mais de 90% da população). As regiões socioeconomicamente intermediárias, por sua vez, geralmente mostram taxas de endemicidade médias ou baixas (Figura 1.7)^{99,103}.

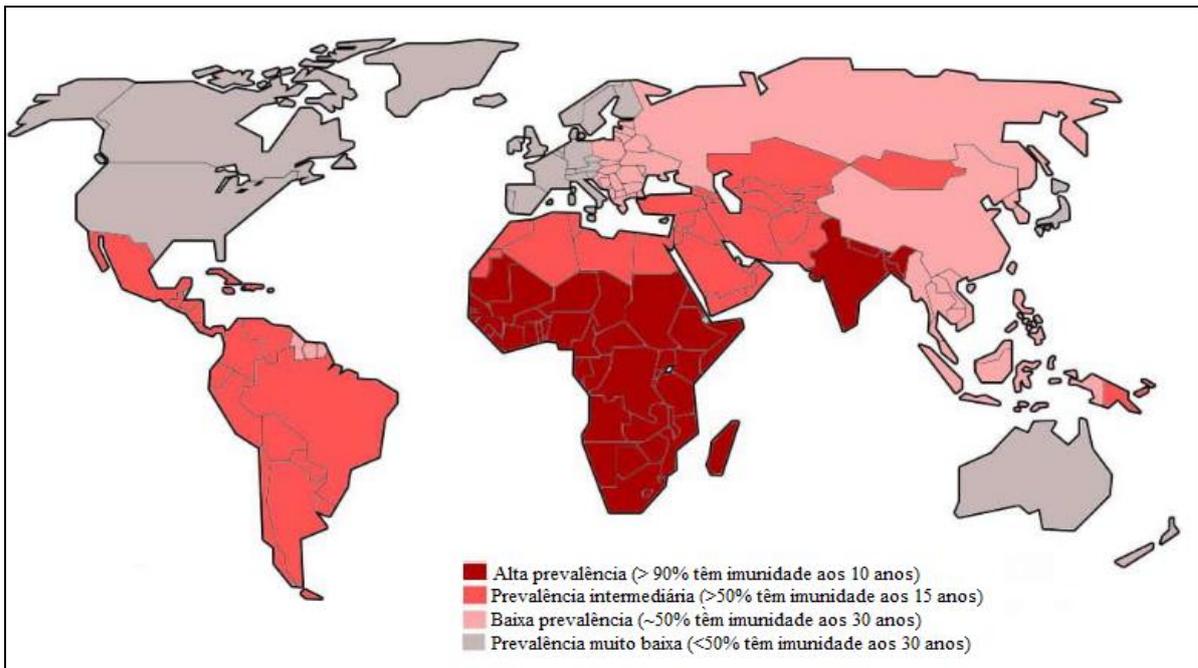


Figura 1.7: Distribuição global da hepatite A.

Fonte: Adaptado de Jefferies et al., 2018.

No continente africano, as informações sobre a infecção pelo HAV são limitadas. Os dados disponíveis mostram que a maior parte da África continua sendo uma região de alta endemicidade, em que grande parte da população desenvolve imunidade ao vírus e que surtos e epidemias de hepatite A são incomuns⁹⁹. Algumas das mais altas prevalências de HAV são observadas em países subsaarianos, onde estudos de soroprevalência mostram que quase 100% das crianças mais velhas e adultos apresentam IgG anti-HAV, e que o ponto médio de imunidade da população geral corresponde à idade de 5 anos, o que demonstra que mais da metade das crianças em idade pré-escolar já contraíram o HAV e desenvolveram imunidade como um resultado de sua infecção^{102,103}. No Norte da África e no Oriente Médio a tendência da infecção pelo HAV é a mesma, sendo observado um nível intermediário de soroprevalência anti-HAV em ambas as regiões^{97,102}.

Na Ásia, as taxas de soroprevalência do HAV variam consideravelmente entre os países, de maneira que alguns apresentam altas taxas e outros estão em processo de transição epidemiológica, passando para incidência intermediária ou baixa⁹⁷. As áreas de baixa endemicidade incluem o Japão e outros países, como Taiwan, onde, na capital, a prevalência de anticorpos anti-HAV na população adulta, foi reduzida de aproximadamente 90%, durante a década de 1970, para porcentagens quase nulas, nos dias atuais^{97,104}. Na maior parte do Sudeste Asiático e na Índia, a soroprevalência do HAV varia de alta para moderada, e dados

disponíveis mostram que o número de casos entre adolescentes e adultos tem aumentado muito, o que contribui para o risco de surtos nestes indivíduos⁹⁷.

A prevalência de hepatite A é em geral intermediária nas Américas, com exceção de países norte-americanos, como Estados Unidos da América (EUA) e Canadá. A América Latina caracteriza-se por ser uma região com prevalência da infecção pelo HAV intermediária, em que a transmissão na infância é menos frequente^{8,97,99}. Apesar das dificuldades em se estimar a incidência exata de hepatite A nesta região devido à alta proporção de infecção assintomática e aos diferentes programas de vigilância epidemiológica, dados de estudos recentes sugerem que o número de casos da infecção vem diminuindo em vários países da América do Sul^{97,99}. Na Argentina, Chile, Uruguai e também no Brasil, melhorias nos programas de saúde pública e nas condições sanitárias gerais e também a implementação da vacina foram os principais fatores responsáveis por promover esta mudança de endemicidade^{97,105,106}.

No continente europeu, a epidemiologia da infecção pelo HAV é caracterizada por países com endemicidade variável, nos quais a prevalência da infecção aumenta da Europa Ocidental para a Europa Oriental onde indivíduos com maior risco de adquirir o vírus são aqueles que viajam para regiões endêmicas, HSH e usuários de drogas injetáveis^{99,107-109}. Apesar deste fato, nos últimos anos, diversos países além do leste europeu, como Inglaterra, França, Alemanha, Holanda, Escócia e Suíça, relataram a ocorrência de surtos epidêmicos de hepatite A ocasionados por uma variedade de alimentos importados de regiões endêmicas, incluindo frutas vermelhas e frutos do mar, além do aumento no número de casos ocasionados especificamente pela transmissão por prática sexual entre HSH^{28,107,108,110}.

Surtos de hepatite A têm sido frequentemente relatados no grupo de HSH desde o ano de 2015²⁸. No início da década de 1980, a transmissão por práticas sexuais do HAV foi descrita e, ao longo do tempo, vem apresentando aumento em sua incidência neste grupo^{111,112}. Países da Europa e da Ásia, EUA, Argentina e Chile recentemente relataram surtos da infecção neste grupo específico^{28-30,113}. Em 2018, Ndumbi et al. documentaram um grande surto de hepatite A em países da União Europeia em que foram confirmados 1.400 casos da doença, com identificação de três novas cepas detectadas quase exclusivamente em jovens adultos do sexo masculino, dentre os quais 84% foram identificados como HSH¹¹⁰.

No Brasil, atualmente, os casos de hepatite A concentram-se, em sua maioria, nas regiões Norte e Nordeste, que juntas somam aproximadamente 56% do total de

casos confirmados em um período de 20 anos (de 1999 a 2019)¹¹⁴. Estas regiões apresentam menores níveis socioeconômicos e condições precárias de saneamento básico quando comparadas às demais regiões do país, o que reflete na maior endemicidade do HAV observada¹¹⁵. As regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, por sua vez, abrangem cerca de 18%, 15% e 11% dos casos notificados no país, respectivamente¹¹⁴. É importante destacar que, nas últimas décadas, os níveis endêmicos da infecção pelo HAV no Brasil diminuíram em razão, principalmente, das melhorias nas condições socioeconômicas, higiênicas e sanitárias, de maneira que a taxa de incidência de hepatite A no país tem mostrado tendência de queda, passando de 5,7 casos em 2009 para 0,4 por 100 mil habitantes em 2019 (redução de 93%)¹¹⁴⁻¹¹⁶.

A análise por regiões do país mostra que as taxas de incidência hepatite A não ultrapassaram 0,5 caso por 100 mil habitantes, com exceção da região Norte, que apresentou 0,8 caso por 100 mil habitantes¹¹⁴. No que se refere às capitais brasileiras, 11 dentre as 27 apresentaram taxas de incidência superiores à observada no cenário nacional, destacando Boa Vista (12,0), Porto Velho (1,9) e São Paulo (1,2), Curitiba (1,0), e Rio de Janeiro (0,9), que ocupam as cinco primeiras posições, respectivamente¹¹⁴.

Em 2019, segundo o Ministério da Saúde, a região Sudeste apresentou taxa de incidência de 0,5 por 100 mil habitantes, estando um pouco acima da taxa nacional de 0,4 por 100 mil habitantes¹¹⁴. As capitais Vitória (ES) e Belo Horizonte (MG) apresentaram taxas de 0 e 0,4 por 100 mil habitantes, respectivamente, ficando abaixo ou se igualando à taxa nacional. No entanto, as duas maiores cidades do país, São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ), apresentaram taxas de incidência acima da taxa detectada em todo o território nacional (1,2 e 0,9 por 100 mil habitantes, respectivamente)¹¹⁴. A tendência de queda da incidência da infecção pelo HAV no Brasil tem sofrido oscilações devido à ocorrência de surtos epidêmicos recentes entre 2017 e 2018 nestas duas importantes cidades.

O aumento da incidência da hepatite A no ano de 2017 foi resultado de um surto que ocorreu na capital paulista, com aumento de 14 vezes na taxa de incidência (de 0,4 para 5,6 por 100 mil habitantes)¹¹⁷. Neste mesmo ano, somente a cidade de São Paulo contabilizou 694 casos, o que representa um terço do número de registros em todo o país para o ano de 2015. A faixa etária mais afetada foi de 18 a 39 anos e a forma fecal-oral associada à prática sexual foi considerada a principal via de transmissão^{117,118}. Dados do ano de 2019 demonstram que a proporção de casos de

hepatite A no sexo masculino foi de 60,6%, permanecendo maior que a proporção observada no sexo feminino (39,4%), assim como relatado nos anos anteriores. Além disso, desde o ano de 2016 a faixa etária de 20 a 39 anos vem apresentando as maiores de taxas de incidência, sobretudo entre indivíduos do sexo masculino^{114,118}.

Na cidade do Rio de Janeiro, também foi relatado um aumento súbito de hepatite A no final de 2017, com 119 pessoas infectadas, quando no ano anterior, houve apenas 10 registros¹¹⁴. Tal aumento tem sido atribuído à ocorrência de surtos, sobretudo em razão de práticas sexuais e ao uso de água contaminada com o HAV^{119,120}. Recentemente Mello et al. detectaram, no Rio de Janeiro, cepas de HAV envolvidas nos surtos epidêmicos ocorridos na Europa entre HSH¹¹⁹. Estes dados, juntamente com os observados em São Paulo, indicam que o aumento da hepatite A entre homens, especialmente de 20 a 39 anos, principalmente na região Sudeste, está possivelmente relacionado à prática sexual. Ademais, em 2018, Amado et al. demonstraram a ocorrência de um surto de hepatite A também no Rio de Janeiro, em que foram confirmados 99 casos da infecção, com maior incidência em homens na faixa etária compreendida entre 20 e 29 anos, mostrando que a fonte de infecção pelo HAV por meio do consumo água ou alimentos contaminados também ocorre¹²⁰.

Outro aspecto epidemiológico importante da hepatite A no Brasil é a inclusão da vacina inativada contra a doença no calendário infantil de imunização, desde 2014, conforme abordado no item 1.1.8. Esta vacina está disponível na rede pública de saúde apenas para crianças de 1 a 5 anos, e, portanto, no momento, uma grande parcela da população de crianças mais velhas e de jovens adultos ainda permanece suscetível à infecção.

A transmissão da infecção pelo HAV pode ocorrer também, apesar de raros os casos, pela transfusão de sangue e hemoderivados provenientes de doadores infectados durante o período de viremia. Esta via de infecção tem sido relatada desde 1974 em diferentes grupos de risco, como em neonatos com transmissão secundária para os profissionais de saúde, entre pacientes com talassemia e hemofílicos¹²¹⁻¹²⁴. Dados acerca desta forma de transmissão serão melhor abordados nos próximos itens deste trabalho.

1.1.8 Tratamento e prevenção

Nenhum tratamento específico é necessário para a maioria dos pacientes que não apresentam formas graves da infecção, sendo prescritos apenas medicamentos sintomáticos. De uma maneira geral, são adotadas medidas gerais, como repouso

adequado (quando necessário) e dieta que evite alimentos que possam causar desconforto gastrointestinal, como alimentos gordurosos. O acompanhamento destes pacientes deve ser realizado pela dosagem periódica das transaminases e de bilirrubina, de modo que, quando estes valores estiverem próximos ou totalmente normais, o paciente recebe alta^{72,96}.

Nos casos de hepatite complicada por insuficiência hepática fulminante, o manejo é determinado pelas complicações que se desenvolvem e pela necessidade de transplante de fígado. Da mesma forma, as manifestações extra-hepáticas, como insuficiência renal e pancreatite, são tratadas de maneira rotineira. Nas formas colestáticas prolongadas, contudo, corticosteroides podem ser utilizados como recurso temporário para acelerar o desaparecimento da icterícia e aliviar o prurido^{72,96}.

A hepatite A é uma doença evitável por medidas profiláticas que englobam, principalmente, instalações sanitárias e habitacionais adequadas, medidas de higiene pessoal e de saneamento básico, bem como profilaxia passiva pré e pós-exposição com imunoglobulina, e imunização ativa por meio da vacina para hepatite A⁹⁴.

Para prevenir a transmissão fecal-oral da hepatite A, suprimentos adequados de água potável e descarte adequado de esgoto dentro das comunidades, combinados com práticas de higiene pessoal, como lavar as mãos regularmente, além do cuidado com alimentos (como frutas, verduras e mariscos cozidos inadequadamente ou crus) constituem medidas que atuam na redução da disseminação do vírus, sobretudo em áreas endêmicas^{8,96,100}.

A imunoprofilaxia passiva consiste na administração intramuscular de imunoglobulina humana, obtida a partir de amostras de plasma humano, e tem sido utilizada como ferramenta para profilaxia pré e pós-exposição contra a infecção pelo HAV, dentro de um curto prazo^{8,96,125-127}. Como medida profilática pré-exposição, a administração de imunoglobulina é eficaz dentro de horas após a injeção por um período de 12 a 20 semanas, a uma dose de 0,02mL e 0,06mL por quilogramas de peso corporal, respectivamente. A profilaxia pós-exposição também é alcançada horas após a injeção e apresenta eficácia de 80% a 90% quando administrada em até 14 dias após a exposição ao vírus^{8,126}. O uso da imunoprofilaxia passiva é indicado para indivíduos que possam estar em situações com maiores chances de infecção, como no caso de viajantes para áreas endêmicas e contatos domiciliares de pacientes infectados⁹⁶. Contudo, cabe ressaltar que a profilaxia pós-exposição

com vacinas inativadas, desde que administradas dentro de duas semanas da exposição, bem como o alto custo da imunoglobulina e a proteção de curto prazo proporcionada por ela, levou ao declínio de seu uso, de um modo geral⁸.

A imunização ativa para hepatite A é feita por meio da vacinação. Atualmente, dois tipos de vacina são usados em todo o mundo: vacinas inativadas por formalina monovalentes intramusculares, usadas na maioria dos países e que podem ser administradas em conjunto com outros imunizantes ativos, e as vacinas atenuadas, desenvolvidas na China para administração subcutânea em uma forma liofilizada^{8,125,128,129}. No ano de 2007, a China introduziu a vacinação em massa para crianças de 18 meses de idade, de forma que metade dessas crianças recebeu uma dose subcutânea da vacina atenuada e a outra metade recebeu duas doses intramusculares da vacina inativada, em um intervalo de seis meses^{8,128}. Neste estudo foram observadas taxas de eficácia de 90% a 95% para a vacina atenuada e de 95% a 100% para a vacina inativada¹²⁸. Outros estudos comparativos de imunogenicidade entre vacinas atenuadas e inativadas sugerem que, apesar de as taxas de soroconversão parecerem mais lentas nas atenuadas, ambas as vacinas induzem taxas de proteção semelhantes por pelo menos 8 anos^{87,98}.

As estratégias de imunização para a prevenção da hepatite A dependem da epidemiologia da infecção pelo HAV em cada região ao redor do mundo. Com o licenciamento das primeiras vacinas contra o vírus, a imunização foi inicialmente proposta para grupos de indivíduos com risco de infecção mais alto, como viajantes oriundos de regiões não endêmicas para regiões endêmicas, membros da família e contatos próximos de um indivíduo com infecção aguda, pacientes com doença hepática crônica, funcionários de creches, laboratórios e de companhias de água e esgoto, entre outros⁸. Esta estratégia ainda é válida em regiões com endemicidade de hepatite A baixa ou muito alta, porém não se mostra muito eficaz em áreas de endemicidade intermediária ou em áreas em transição epidemiológica, onde são observadas mudanças nos padrões específicos da idade da doença, o que resulta em uma proporção crescente de adolescentes e jovens adultos suscetíveis, muitas vezes em áreas urbanas ou classes socioeconômicas mais altas, entre os quais surtos podem ocorrer¹⁰⁰. Em tais regiões, a imunização em massa da população se mostra como uma estratégia mais eficaz.

A estratégia de vacinação em massa da população é atualmente adotada em diversos países e regiões do mundo. Tais locais, como Israel, Puglia (na Itália), Catalunha (na Espanha) e EUA, que implementaram a imunização universal em seus

programas de imunização, têm demonstrado um impacto positivo na incidência de hepatite A, de forma que foram observadas quedas de até 90% na detecção de novos casos na população geral^{8,100,130}. Após o sucesso observado nos países e regiões mencionados, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou, em 2012, a integração da vacinação universal em massa nos planos de imunização nacionais para crianças com idade de até 12 meses em regiões com incidência em queda ou em mudança epidemiológica de endemicidade alta para intermediária^{8,98}. Conseqüentemente, outros países, como Argentina, China, Grécia e Uruguai, também introduziram a vacinação em massa contra hepatite A em crianças pequenas^{8,131}.

No Brasil, no ano de 2014, após a realização de um estudo de custo-efetividade¹³², o Programa Nacional de Imunização (PNI), do Ministério da Saúde, implantou a vacinação contra a hepatite A de uma forma semelhante à do programa preconizado pela Argentina, disponibilizando uma dose única da vacina inativada monovalente para crianças de um a dois anos de idade, em todo o país^{133,134}. Em 2017, no entanto, o PNI ampliou a vacinação para crianças com menos de cinco anos de idade, objetivando atingir as crianças que não foram vacinadas no início do programa^{135,136}.

1.1.9 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da hepatite A deve incluir hemograma, avaliação do tempo de protrombina e das enzimas hepáticas, além da dosagem de bilirrubina total no soro. Normalmente, os níveis de bilirrubina sérica total permanecem abaixo de 10mg/dL, mas níveis de 20mg/dL com predomínio de bilirrubina direta podem ocasionalmente ser observados^{90,137}. Ademais, o diagnóstico bioquímico também é estabelecido pela medição dos níveis séricos das enzimas hepáticas fosfatase alcalina, AST e ALT. Indivíduos sintomáticos frequentemente apresentam elevações de bilirrubina e destas enzimas, de forma que níveis muito altos de ALT (~10.000UI/L) podem ser detectados^{71,138,139}. As concentrações de ALT e AST fornecem uma avaliação quantitativa dos danos ao tecido hepático durante a infecção aguda. A ALT está localizada principalmente no fígado e é limitada ao citosol dos hepatócitos, enquanto AST é encontrada nas mitocôndrias (80%) e também no citosol (20%) destas células. A compartimentação destas enzimas pode explicar o padrão de aminotransferases observado em muitas formas de doença hepática, uma vez que, durante a hepatite aguda, os níveis de ALT, presente no

citossol, são significativamente maiores do que os níveis de AST, majoritariamente presente em mitocôndrias, resultando em uma alta proporção dos níveis de ALT/AST (>1,4) na maioria dos casos¹³⁷.

O diagnóstico clínico de pacientes com hepatite A inclui principalmente a presença de hepatomegalia durante o exame e em exames de imagem, em que podem ser observados espessamento da parede da vesícula biliar em mais de 3mm com heterogeneidade arterial, estreitamento periportal e aumento dos linfonodos peri-hepáticos (>7 mm de diâmetro)^{71,140}. O espessamento da parede da vesícula biliar está associado a níveis elevados de bilirrubina e pode ser um fator independente de hepatite grave^{71,141}.

Os achados clínicos e laboratoriais bioquímicos são, contudo, inespecíficos e não permitem a diferenciação da hepatite A de outras formas de hepatite aguda ou de injúria hepática^{71,72,137}. Portanto, os testes sorológicos são essenciais para a confirmação do diagnóstico.

A detecção de anticorpos IgM no soro de pacientes por meio de imunoenaios é o principal método de diagnóstico da infecção pelo HAV. A presença destes anticorpos na maior parte dos indivíduos no início do quadro clínico mostra que sua detecção constitui a principal ferramenta para confirmação da hepatite A aguda, contudo de 6% a 11% dos sintomáticos não apresentam IgM anti-HAV detectável no início do curso clínico, especialmente durante a fase sintomática inicial^{71,139,142}. Apesar disso, os anticorpos IgM são detectáveis em ambos pacientes assintomáticos e sintomáticos, sendo que nestes últimos, esses anticorpos aparecem dentro de uma a duas semanas do início dos sintomas, período que se correlaciona com a fase de maior aumento das enzimas hepáticas^{8,125}. A especificidade da detecção de anticorpos anti-HAV IgM para confirmação do diagnóstico de hepatite A gira em torno de 99-100%¹⁴³.

Anticorpos anti-HAV IgG aparecem simultaneamente com anti-HAV IgM, porém passam a dominar a resposta humoral e persistem por muitos anos, fornecendo proteção frente a reinfecções. Estes anticorpos são detectados por meio de ensaios imunoenzimáticos anti-HAV total, capazes de detectar IgM e IgG ao mesmo tempo. Tais ensaios não distinguem infecção aguda de infecção passada, sendo necessário o teste específico para anti-HAV IgM para a confirmação do diagnóstico^{71,137,144}. No entanto, apesar de não ser possível distinguir infecção aguda e passada, a detecção de anticorpos IgG permite avaliar a resposta à vacina da

hepatite A, assim como pode também ser usada em estudos epidemiológicos de soroprevalência de infecção pelo HAV.

O ensaio imunoenzimático, ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) atualmente é o teste para diagnóstico sorológico mais utilizado, sendo considerado padrão-ouro para detectar anticorpos anti-HAV em soro¹⁴⁵. Ensaios imunocromatográficos podem ser utilizados como teste rápido para detecção de IgM e IgG separadamente, no entanto, seu uso é incomum^{146,147}.

Os ensaios imunológicos não são eficazes para o diagnóstico da infecção durante o período de janela imunológica, que antecede a produção e consequente detecção de anticorpos anti-HAV. No decorrer deste período, o diagnóstico pode ser realizado por meio de testes moleculares capazes de detectar o genoma viral, tais quais a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR, do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) e a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real. Estes métodos têm um importante papel na detecção precoce de casos de hepatite A durante surtos da doença e também em casos de hepatite aguda de etiologia desconhecida^{137,148}.

A amplificação do RNA viral por RT-PCR é atualmente o método mais sensível e amplamente utilizado para a detecção do HAV-RNA em amostras de diferentes naturezas, como soro, plasma, saliva, fezes e amostras ambientais¹³⁷. Este método geralmente é baseado na detecção da região 5'NCR do genoma viral^{149,150} ou na região VP1/2A^{35,137,151,152}. A técnica de PCR em tempo real, por sua vez, permite detectar e quantificar a carga viral do HAV presente nas amostras analisadas de forma rápida e com alta sensibilidade, sendo muito útil em situações que necessitem de testagem em larga escala, como nos casos de surtos¹³⁷. Esta técnica é baseada nas metodologias *Sybr Green*® e *Taqman*®, sendo esta última a mais comumente utilizada em protocolos que detectam a região 5'NCR do HAV-RNA^{137,153,154}.

É importante salientar que, apesar da alta sensibilidade e rapidez, o diagnóstico molecular da hepatite A não é utilizado em laboratórios clínicos ou rotineiramente em bancos de sangue, sendo mais comumente utilizado em laboratórios de pesquisa.

1.1.10 Transfusão sanguínea e HAV

Os dados acerca da prevalência do HAV-RNA e de anticorpos anti-HAV IgM em doadores de sangue são limitados em todo o mundo. Em 2002, um estudo

conduzido nos EUA detectou a presença de HAV-RNA em 1,2% dos *minipools* de plasma analisados (30/2.600), resultando em uma taxa de detecção de aproximadamente 0,005% (1/20.000) entre os doadores de sangue¹⁵⁵. Mais tarde, na Índia, Gadgil e colaboradores demonstraram uma prevalência de HAV-RNA de 0.24% em doadores de sangue no período entre os anos de 2004 e 2005, sendo os doadores maiores de 25 anos de idade os mais afetados¹⁵⁶. Ainda no continente asiático, um estudo realizado na China encontrou uma prevalência de anticorpos anti-HAV IgM em 0,079% dos doadores de sangue atendidos no segundo semestre de 2012, entre julho e dezembro¹⁵⁷.

Recentemente, na França, foi relatado um aumento na taxa de detecção de HAV-RNA entre doadores de sangue de 0.86/10⁶ doadores, em 2016, para 9.4/10⁶ doadores, em 2017, após a ocorrência de surtos epidêmicos de hepatite A, em que os casos confirmados da doença aumentaram de 701, em 2015, e 666, em 2016, para aproximadamente 2.980 casos durante os primeiros dez meses de 2017¹⁵⁸. No Brasil, contudo, os dados sobre a prevalência de HAV-RNA e de anticorpos anti-HAV entre doadores de sangue, bem como o impacto de surtos epidêmicos de hepatite A neste grupo de indivíduos, ainda permanecem escassos.

A transmissão transfusional da infecção pelo HAV é rara, porém tem sido relatada desde a década de 1970. Entre 2007 e 2012, na Coreia do Sul, um estudo retrospectivo demonstrou a ocorrência de notificação de 15 casos de hepatite A em doadores de sangue após a doação. Deste total de 15 doações, ao todo 44 hemocomponentes foram produzidos e entregues a diferentes hospitais e, dentre os receptores destes hemoderivados, descobriu-se que um receptor de concentrado de plaquetas estava infectado com o vírus da hepatite A, sendo sua transmissão associada à transfusão recebida¹⁵⁹. Em 2016, Hettmann e colaboradores demonstraram a ocorrência de um surto de hepatite A associado a transfusão sanguínea na Hungria, um ano após a ocorrência de um surto entre HSH neste país¹⁶⁰. No cenário nacional, recentemente, um estudo produzido pelo nosso grupo de pesquisa relatou dois casos de transmissão do HAV por transfusão sanguínea com hemoderivados oriundos de um único doador de sangue infectado¹⁶¹. Cabe ressaltar que um dos receptores era portador de hepatite C crônica e evoluiu para óbito alguns dias após a transfusão, devido a uma hepatite fulminante.

1.2 Parvovirus B19 (B19V)

1.2.1 Taxonomia e estrutura viral

A espécie *Erythroparvovirus Primata 1*, anteriormente conhecido como Parvovirus Humano B19 (B19V), é um vírus pertencente à família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae* e gênero *Erythroparvovirus*, que apresenta tropismo por células progenitoras eritróides da medula óssea e que infecta a maioria dos seres humanos^{162,163}.

O vírion possui entre 18 e 26nm de diâmetro, entre 5,5 e 6,2x10⁶kDa de peso molecular e densidade flutuante de 1,41g/mL em solução de cloreto de cézio^{162,164}. A partícula viral não apresenta envelope e o capsídeo possui simetria icosaédrica, consistindo em 60 capsômeros dispostos em 20 faces triangulares, compostos por duas proteínas estruturais (VP1 e VP2)¹⁶⁵. O B19V apresenta resistência a pH entre 3 e 9, à temperatura de 56°C por 60 minutos, a raios gama e solventes orgânicos e agentes oxidantes^{164–168}.

1.2.2 Organização genômica e proteica

O genoma do B19V constitui-se por uma fita simples de DNA com polaridades positivas e negativas equivalentes na partícula viral, com aproximadamente 5.600 nucleotídeos de comprimento, e que codifica uma proteína não estrutural importante (NS1) e duas proteínas estruturais (VP1 e VP2)^{165,169}. O B19V-DNA é flanqueado nas suas extremidades por repetições terminais inversamente idênticas (ITRs, do inglês *identical inverted terminal repeats*), com comprimento de 365 nucleotídeos cada (Figura 1.8)^{170,171}. Essas sequências terminais são palindrômicas imperfeitas e capazes de levar à formação de uma estrutura de fita dupla em ambas as extremidades do genoma viral (pinos terminais), atuando como iniciadores (*primers*) para a síntese da fita complementar^{170,172}.

O B19V apresenta em seu DNA um único promotor (P6), responsável pela transcrição de nove RNA mensageiros (RNAm) sobrepostos, que codificam as proteínas estruturais (VP1 e VP2) e não estruturais (NS1, 11kDa e 7,5kDa). Os RNAm 1 e 1' traduzem a proteína NS1, os RNAm 2 e 2' traduzem a proteína de 7,5kDa, os RNAm 3 e 3' não apresentam produto conhecido para sua transcrição, os RNAm 4 e 5 traduzem a proteína VP1 enquanto os RNAm 6 e 7 a proteína VP2 e, por fim, os RNAm 8 e 9 transcrevem a proteína de 11kDa (Figura 1.8)^{170,173–175}.

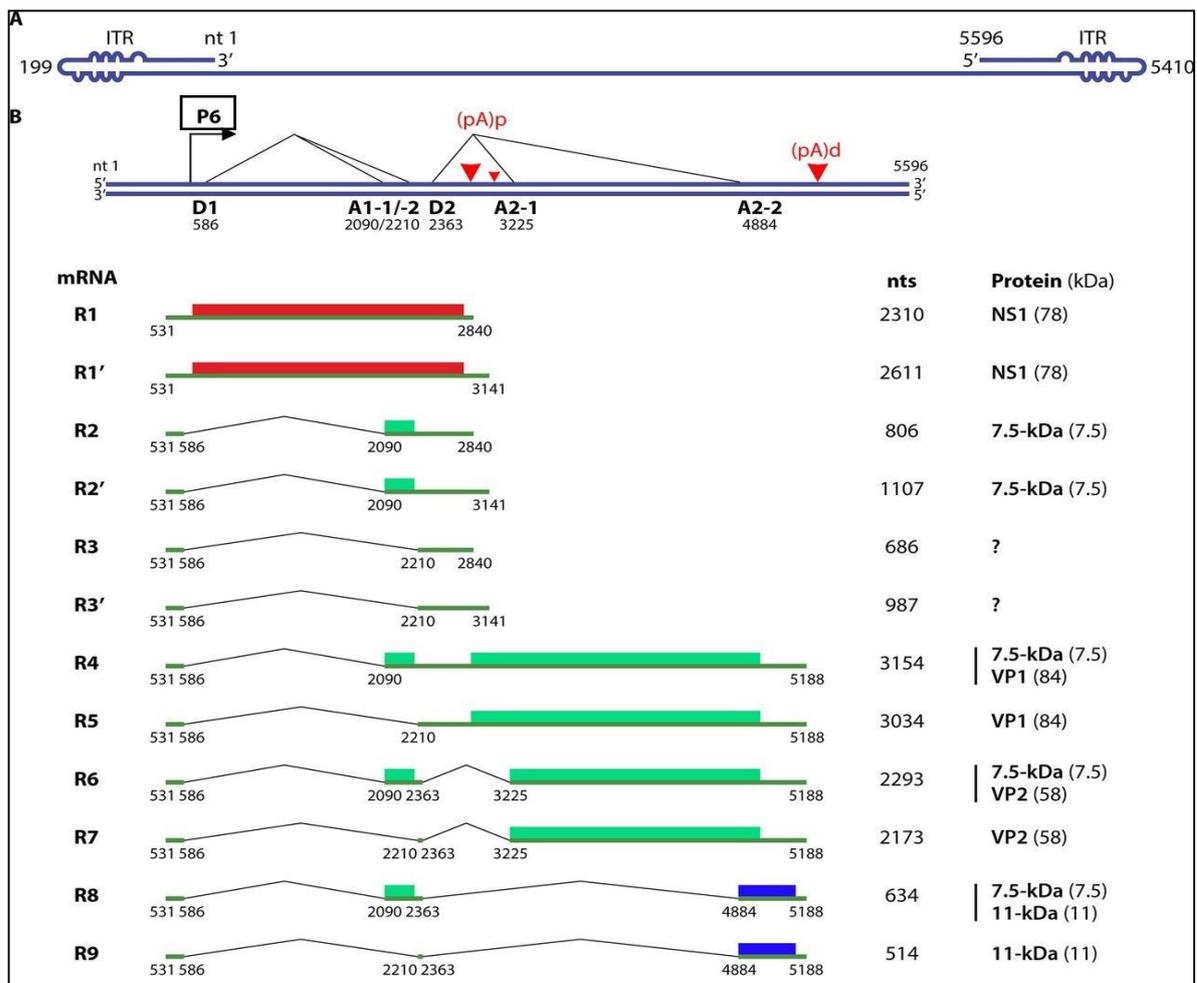


Figura 1.8: Estrutura do genoma e mapa genético do B19V. (A) Diagrama esquemático da estrutura genômica do B19V demonstrando as ITRs presentes em cada extremidade do genoma viral. (B) Representação esquemática da forma replicativa do genoma do B19V evidenciando os RNAm transcritos e as respectivas proteínas codificadas. **Fonte:** Adaptado de Ganaie e Qiu, 2018.

As duas proteínas estruturais que compõem o capsídeo do B19V, VP1 e VP2, são codificadas pela metade 3' (amino terminal) do genoma viral, entretanto, a VP2 é a proteína predominante, compreendendo 95-96% do capsídeo viral^{170,175}. Apesar de mais abundante, esta proteína possui uma estrutura de leitura mais curta que a da proteína VP1, sendo codificada pela sequência entre os nucleotídeos 3225 até 4889 e tendo 58kDa de peso molecular. A proteína VP1 é menos abundante, compondo entre 5-6% da estrutura do capsídeo, e é codificada entre os nucleotídeos 2444 e 4889, de forma que é composta por 992 aminoácidos e apresenta 84kDa de peso molecular^{171,175}.

A diferença estrutural de VP1 para VP2 consiste na adição de 226 aminoácidos em sua região amino terminal, denominada região única de VP1 (VP1u), isto é, VP2 corresponde à região C terminal de VP1^{171,175}. A proteína VP1 não é essencial para a formação do capsídeo do B19V, entretanto, a região VP1u é

crítica para o transporte do mesmo na célula infectada, principalmente pela região da fosfolipase A2, que auxilia na entrada da partícula viral na célula alvo^{176,177}. A VP2 possui domínios de automontagem, que, na ausência de DNA viral pode se automontar e produzir partículas semelhantes a vírus (VLP, do inglês *Viral Like Particles*), que são altamente estáveis e semelhantes fisicamente, antigenicamente e imunogenicamente aos vírions completos^{172,176,178}.

Dentre as proteínas não estruturais, a principal é a proteína NS1, que é composta por 671 aminoácidos, com sequência nucleotídica entre 436 e 2451, e peso molecular de 78kDa. A NS1 está localizada no núcleo das células infectadas com B19V e apresenta-se como uma proteína multifuncional, iniciando e mediando aspectos da replicação viral^{174,175}.

O B19V expressa outras duas proteínas não estruturais, conhecidas por 11kDa e 7,5kDa¹⁷⁴. A proteína de 11kDa está localizada entre os nucleotídeos 4890 e 5174, é mais encontrada no citoplasma que no núcleo das células infectadas pelas partículas virais e participa da sinalização celular. A proteína de 7,5kDa é codificada pela sequência entre os nucleotídeos 2090 e 2308 e sua função biológica ainda é desconhecida^{173,174,179}.

1.2.3 Variabilidade genômica

Até o ano de 2002, a variabilidade genética entre isolados de B19V era considerada muito baixa, com diferença nucleotídica menor que 2% entre os isolados. Neste mesmo ano, uma nova análise filogenética de eritroparvovírus humanos revelou uma organização em três diferentes genótipos que se distinguem em pelo menos 9% de divergência nucleotídica em todo o genoma viral^{170,171,180,181}.

O genótipo 1 inclui o protótipo B19V e é subdividido em 1a e 1b, sendo atualmente o genótipo mais comum entre a população mundial^{181,182}. As infecções causam uma gama de doenças nos seres humanos, incluindo eritema infeccioso em crianças, crise aplástica transitória em pacientes com anemia hemolítica crônica e hidropsia fetal em mulheres grávidas¹⁸³⁻¹⁸⁵. O genótipo 2 (cepas Lali e A6) do B19V é atualmente o menos encontrado quando comparado aos outros dois. O genótipo 3 também é dividido em dois subgenótipos, 3a (cepa V9) e 3b (cepa D9.1), e mostra-se como o mais diverso dentre os três genótipos do B19V, o que sugere uma provável história evolutiva mais longa^{165,181,182,186}. Todos os três genótipos do B19V constituem um único sorotipo e apresentam propriedades biológicas, antigênicas e patogênicas semelhantes e, apesar de raros relatos, é possível que mais de um

genótipo infecte o mesmo hospedeiro simultaneamente, sugerindo casos de coinfeção ou superinfecção^{165,172,181,183,186,187}.

A distribuição dos genótipos depende da origem geográfica, da população e dos tipos de amostra. O genótipo 1 é prevalente em todo o mundo, de forma que a grande maioria das amostras do B19V caracterizadas atualmente pertence a este genótipo^{170,176,180}. O genótipo 2 é encontrado esporadicamente nos EUA, na América do Sul e na Europa, onde era o genótipo mais comum até metade de século XX. Um estudo realizado por Norja et al., em 2006, a partir de amostras de tecidos humanos sugeriu que os genótipos 1 e 2 circulavam com igual frequência no norte europeu até a década de 40, momento em que o genótipo 1 passou a apresentar aumento em sua frequência de detecção, sobrepondo a do genótipo 2 que atualmente é encontrado em indivíduos mais idosos, nascidos antes do ano de 1973. Após este período, casos relatados desse genótipo na população foram escassos^{170,188-190}. O genótipo 3 ocorre principalmente em algumas regiões geográficas, como norte e oeste da África, sendo também já identificado em isolados da França, Brasil, Índia e África do Sul^{180-183,191}.

No Brasil, os três genótipos já foram relatados. Estudos realizados no país demonstraram uma distribuição clássica entre os três genótipos, sendo o genótipo 1 o mais frequentemente encontrado^{183,192-197}. O genótipo 2 foi o menos relatado, estando ausente em grande parte dos estudos realizados no país. Sanabani et al., em 2006, relataram a presença do genótipo 2 em amostras de medula óssea provenientes de um paciente hospitalizado com alterações hematológicas no estado de São Paulo¹⁹². Em 2011, em um estudo realizado por Garcia et al., o genótipo 2 também foi encontrado em indivíduos mais velhos que apresentavam citopenia de origem desconhecidas, com idades de 49 a 73 anos¹⁹⁷. O genótipo 3 foi o segundo genótipo mais frequente em estudos nacionais, destacando-se o subgenótipo 3b, que foi relatado em estudos realizados em Belém (PA), em São Paulo (SP) e em Niterói (RJ), a partir de amostras de indivíduos com desordens hematológicas¹⁹³, com anemia aguda após a realização de um transplante renal¹⁹⁸, e de uma paciente infectada pelo vírus HIV durante um período epidêmico de eritema infeccioso¹⁹⁹, respectivamente. Recentemente, Alves et al. (2020), em uma investigação da infecção pelo B19V em pacientes brasileiros transplantados de fígado, constatou que o genótipo 3 foi o mais detectado. Em 2012, Costa et al. relataram coinfeção entre os genótipos 1a e 3b em amostras de medula óssea obtidas de pacientes com leucemia¹⁸³.

1.2.4 Replicação viral e síntese proteica

O ciclo de replicação do B19V inclui a ligação da partícula viral a receptores presentes nas células hospedeiras, seguida de internalização, translocação do genoma para o núcleo celular, replicação do DNA viral e transcrição de seu RNA, montagem do capsídeo e, por fim, lise da célula hospedeira com liberação dos vírions maduros.

O B19V possui tropismo acentuado por células eritróides humanas, replicando-se no núcleo de precursores eritróides na medula óssea. Contudo, o receptor para o B19V, denominado antígeno P, também encontra-se em megacariócitos, em células endoteliais, miocárdicas placentárias e hepáticas fetais, o que sugere susceptibilidade dessas células ao B19V²⁰⁰. Entretanto, nem todas as células que expressam este antígeno são susceptíveis à entrada do vírus, o que indica que o antígeno P é necessário, mas não suficiente para a entrada do B19 na célula hospedeira, necessitando da ligação a um co-receptor ainda desconhecido^{200,201}. Entretanto, em 2016, Servant-Delmas e Morinet sugeriram a atividade de um complexo de integrinas $\alpha 5\beta 1$ como co-receptor para a entrada do B19V nas células¹⁷⁶.

A ligação do vírus à célula-alvo ocorre por meio da proteína VP2, que se liga diretamente ao antígeno P. Após esta ligação, o capsídeo viral sofre uma transformação conformacional que leva à exposição da região VP1u da proteína VP1, cujo domínio de fosfolipase A2 permite a entrada do vírus na célula²⁰²⁻²⁰⁵. O processo de endocitose da partícula viral é iniciado e a subunidade $\beta 1$ do complexo co-receptor integrina $\alpha 5\beta 1$, presente nas vesículas de endocitose, atua na modulação de uma rede de microtúbulos que permite o tráfego intracelular dessas vesículas pelo citosol até o núcleo celular, onde o genoma viral é liberado e ocorrem os processos de replicação, transcrição e empacotamento²⁰⁶.

Após a entrada do vírus no núcleo da célula hospedeira, é necessário que a mesma esteja na fase S da mitose para que a replicação viral ocorra¹⁶⁶. Ao entrar no núcleo celular, o DNA de fita simples (ssDNA, do inglês *single stranded DNA*) é convertido em uma forma replicativa de fita dupla que atua como modelo para replicação e transcrição do DNA viral, de modo que as sequências palindrômicas ITRs atuam como *primers* para a DNA polimerase da célula hospedeira, iniciando a replicação e formando uma fita complementar²⁰⁷. Intermediários de fita dupla são

então formados e, posteriormente, são enzimaticamente clivados e geram o ssDNA²⁰⁸.

O processo de transcrição inicia-se no promotor P6, que transcreve nove RNAm que codificam para as proteínas do B19V. Dentre esses nove RNAm, oito sofrem processamento pós-transcricional (*splicing*), inclusive os que codificam as proteínas estruturais VP1 e VP2, que dependem desse processamento, uma vez que suas fases de leitura aberta são sobrepostas. Apenas o RNAm que transcreve para a proteína NS1 não sofre processamento pós-transcricional^{175,204}.

A tradução das proteínas virais ocorre no citosol da célula hospedeira após o processamento e o transporte dos RNAm para este local. Depois de traduzidas, as proteínas são direcionadas novamente para o núcleo celular, onde serão montadas as novas partículas virais. Ao final de todo o processo, ocorre a liberação das partículas por meio de lise celular (Figura 1.9)^{165,209}.

A proteína NS1 possui importante papel no processo de replicação do DNA viral¹⁷⁹. A mesma atua como ativador da transcrição ao recrutar vários fatores de transcrição celular e apresenta propriedades de helicase e endonuclease, clivando o DNA recém sintetizado e atuando como motor para o processo de formação do capsídeo viral^{170,171,210}.

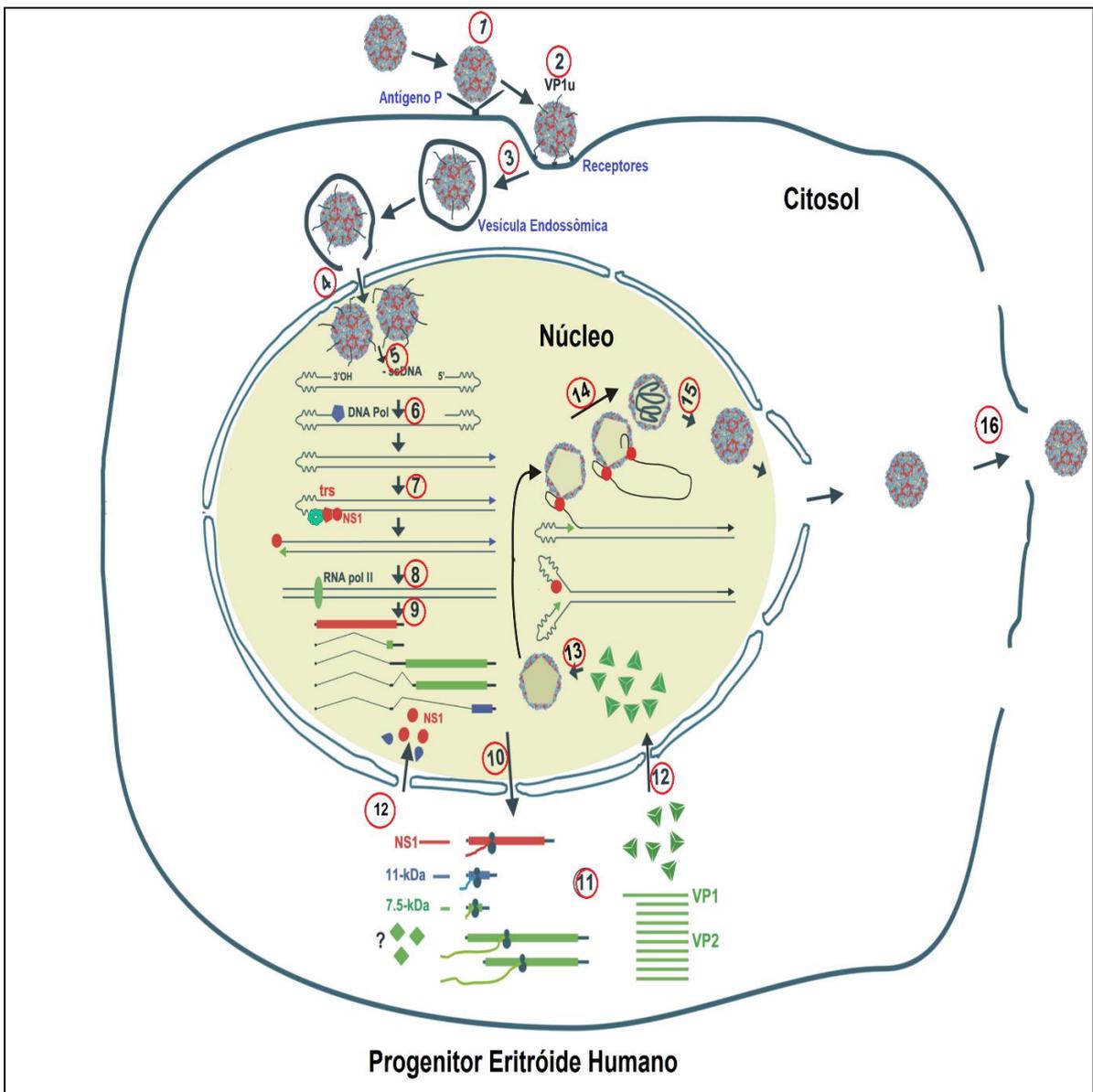


Figura 1.9: Esquema do ciclo de replicação do B19V. O vírus interage com o antígeno P (etapa 1) e sofre uma mudança conformacional que expõe a região VP1u, que em seguida se liga a um co-receptor ainda desconhecido (etapa 2). Em seguida, vírus é endocitado (etapa 3) e, por meio da atividade com complexo co-receptor integrina $\alpha 5\beta 1$, é transportado até o núcleo celular, onde o vírion libera o DNA viral (etapas 4 e 5). A seguir ocorre o processo de transcrição do DNA viral (etapas 6 a 9). Após a transcrição no núcleo, os RNAm seguem para o citosol, onde ocorre a tradução das proteínas virais (etapas 10 e 11). Depois de traduzidas, as proteínas virais retornam para núcleo (etapa 12) e o processo de montagem da partícula viral é realizado (etapas 13 a 15). Por fim, as partículas virais são liberadas da célula hospedeira por lise celular (etapa 16). **Fonte:** Adaptado de Ganaie e Qiu, 2018.

1.2.5 Patogênese e resposta imunológica

Em 1985, Anderson e colaboradores demonstraram que o período de incubação do B19V nos indivíduos infectados varia de 4 a 14 dias, com a viremia ocorrendo de 6 a 8 dias após a exposição ao vírus e persistindo por 6 a 7 dias²¹¹. Durante o período virêmico, partículas virais também estão presentes na secreções nasofaríngeas e na saliva, o que facilita a disseminação do vírus^{212,213}.

O B19V é transmitido principalmente pela via respiratória, por meio da inalação de aerossóis. Outras vias de transmissão, entretanto, já foram relatadas. O B19V também pode ser transmitido por meio de transfusão sanguínea e de hemoderivados, por meio de transplante de órgãos, como rins, fígado e coração de doadores infectados, e por transmissão vertical da mãe para o feto, devido à passagem do vírus pelo cordão umbilical em razão do seu tropismo por células sanguíneas mitoticamente ativas presentes neste local^{172,214–216}.

A infecção por B19V apresenta um curso clínico bifásico: após a viremia inicial, cerca de uma semana após inalação do vírus, são observados sinais inespecíficos, como febre, calafrios, mal-estar, cefaleia e mialgia; no segundo momento, ocorrem sinais clínicos mais específicos, tais quais eritema, prurido e artralgia (Figura 1.10)¹⁷². No período de viremia, ocorre a redução abrupta de reticulócitos, sendo de 0,8% a 0,2% em indivíduos saudáveis (Figura 1.10) e dos níveis de hemoglobina, que chegam a apresentar queda acentuada em indivíduos com crise aplástica transitória (variação de 8g/dL para 4g/dL) e redução irreversível em indivíduos com anemia grave, sendo necessária administração de hemoderivados para os mesmos¹⁸⁵.

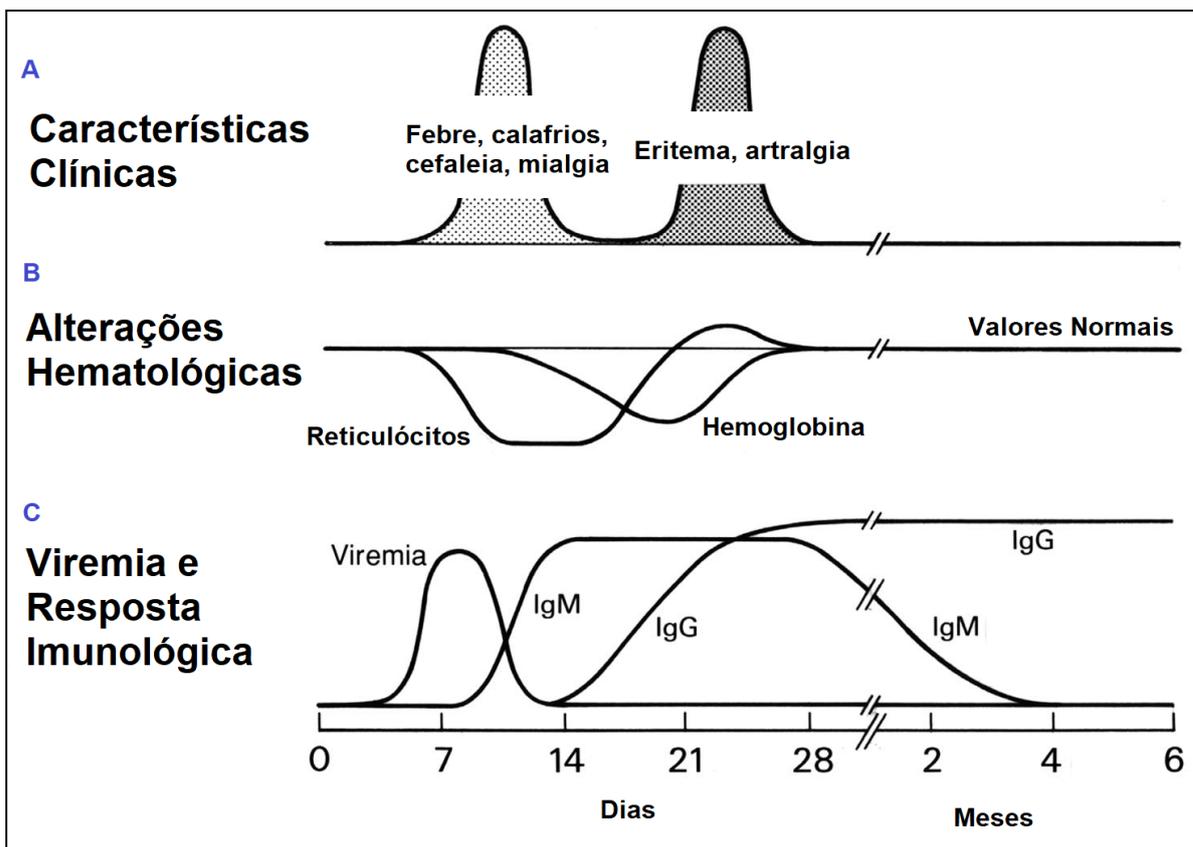


Figura 1.10: Cursos clínico e imunológico após infecção por B19V. (A) Características clínicas e (B) alterações hematológicas observadas; (C) Viremia e produção de anticorpos IgM e IgG durante a infecção. **Fonte:** Adaptado de Heegaard e Brown, 2002.

O curso padrão da história natural padrão da infecção por B19V em indivíduos imunocompetentes é mediado por anticorpos neutralizantes. O processo de recuperação envolve a produção de anticorpos IgM anti-B19V de 10 a 12 dias após a infecção, o que coincide com o início da queda da viremia, cujo pico apresenta uma carga viral no sangue de 10^{11} - 10^{14} cópias do genoma/mL. Os anticorpos IgM permanecem detectáveis por aproximadamente 4 meses após a infecção. Aproximadamente 14 dias após a infecção surgem anticorpos IgG anti-B19V, que persistem por toda a vida do indivíduo, protegendo-o contra reinfecções (Figura 1.10)^{172,176,185,217,218}. Além disso, anticorpos da classe IgA também podem ser encontrados e, provavelmente, atuam na proteção da infecção pela via nasofaríngea²¹⁹.

1.2.6 Manifestações clínicas

A infecção causada pelo B19V caracteriza-se por ser, geralmente, aguda e autolimitada, sendo comumente assintomática ou apresentando apenas sinais e sintomas inespecíficos em adultos e crianças imunocompetentes²²⁰. Manifestações clínicas, entretanto, quando presentes, estão associadas às condições imunológicas

e hematológicas do indivíduo, e possuem um amplo espectro de variação (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Principais doenças causadas pelo B19V.

Doença	Evolução Clínica	Grupo de Indivíduos
Eritema Infeccioso	Aguda	Crianças saudáveis
Poliartropatia	Aguda	Adultos saudáveis
Hidropsia Fetal	Aguda/crônica	Fetos
Crise Aplástica Transitória	Aguda	Pacientes com distúrbios hemolíticos
Anemia Persistente	Crônica	Pacientes imunocomprometidos

Fonte: Adaptado de Qiu et al., 2017.

Em crianças, a manifestação clínica mais comum é o eritema infeccioso, também chamado de quinta doença²²¹. Os sintomas não específicos, na maior parte dos casos, passam despercebidos e geralmente incluem febre, calafrios, coriza, mialgias, cefaleia e náusea. O sinal característico do eritema infeccioso é o exantema facial de média intensidade na região das bochechas, também conhecido como “face em bofetada”, que se inicia cerca de 18 dias após a infecção e 8 dias após a viremia¹⁷². Já em pacientes adultos, a erupção cutânea típica do eritema infeccioso raramente é observada, sendo mais comum a presença de artralrias^{165,222}.

A poliartropatia é a manifestação clínica mais comum em adultos imunocompetentes. Sua presença é observada em 60% das mulheres e 30% dos homens com a infecção primária pelo B19V, e em 10% das crianças com eritema infeccioso^{220,223}. Acredita-se que as poliartropatias associadas ao B19V são imunologicamente mediadas, pois seu surgimento coincide com o aparecimento de anticorpos circulantes. Além disso, os sintomas articulares comprometem as articulações das mãos, tornozelos, joelhos e punhos simetricamente, o que pode ser confundido com doença de Lyme ou artrite reumatoide^{172,222}.

A infecção causada pelo B19V durante o período de gestação é considerada uma situação clínica grave, uma vez que pode gerar agravos severos, como o aborto espontâneo, durante o primeiro trimestre da gestação, e a hidropsia fetal não imune, a partir de segundo trimestre da gestação⁶⁵. A hidropsia fetal ocorre como consequência de uma grave anemia desencadeada pela transmissão transplacentária do B19V, que resulta em falência cardíaca, acúmulo de fluidos e formação de um edema generalizado. A infecção do feto acarreta na interrupção da eritropoiese e gera uma anemia fetal grave, podendo causar também, apesar de raros os casos, miocardite associada ao B19V, insuficiência cardíaca e necrose miocárdica^{165,222,224,225}. Estudos realizados pelo Laboratório de Saúde Pública do

Reino Unido e pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC, do inglês *Center for Disease Control and Prevention*) mostraram que a transmissão transplacentária ocorreu em aproximadamente 30% dos casos de infecção pelo B19V em gestantes^{226,227}, de forma que o risco de desenvolvimento de hidropsia fetal após esta infecção varia de 0 a 24%^{228,229}.

Pacientes que apresentam diminuição da produção de eritrócitos, como nos casos de deficiência de ferro, anemia falciforme e talassemias, ou aqueles que apresentam aumento da perda de eritrócitos, possuem um risco potencial elevado para o desenvolvimento da crise aplástica transitória (CAT)¹⁸⁵. A CAT é considerada a primeira doença associada à infecção pelo B19V e é caracterizada pela interrupção abrupta da produção de precursores eritróides na medula óssea, ocorrendo de 10 a 15 dias, e podendo originar um quadro de anemia grave^{165,167,185,230}. É importante ressaltar que, além da linhagem eritróide, outras linhagens de células sanguíneas podem ser afetadas, resultando em trombocitopenia, neutropenia ou pancitopenia^{167,231,232}. Os sintomas da CAT geralmente consistem em palidez, fraqueza e letargia e diminuem a partir do aparecimento de anticorpos específicos, sendo limitada a aproximadamente duas semanas de duração²³³. Apesar de autolimitada, a anemia causada pela CAT pode gerar quadros ocasionalmente fatais de insuficiência cardíaca congestiva, acidentes cerebrovasculares e sequestro esplênico agudo²³⁴. O tratamento da CAT compreende a transfusão de hemácias, porém, se estas transfusões não estiverem disponíveis ou não forem administradas com urgência, o quadro de anemia observado pode ser fatal¹⁶⁵.

Pacientes imunocomprometidos que apresentam baixos níveis ou ausência de anticorpos neutralizantes estão mais propensos a desenvolverem anemia crônica em decorrência da infecção pelo B19V²²⁵. Nesses pacientes, ocorre a replicação permanente do vírus na medula óssea, com detecção de viremia persistente¹⁷⁰. Os indivíduos geralmente acometidos incluem pacientes com deficiências imunológicas congênitas ou adquiridas (como pacientes infectados pelo HIV que não estejam fazendo uso da terapia antirretroviral), pacientes em tratamento quimioterápico contra o câncer, pacientes que realizaram transplante de órgãos e de medula óssea, e pacientes em tratamento para doenças autoimunes^{167,170}. Os sinais clínicos observados geralmente incluem palidez e fadiga, e a interrupção do tratamento imunossupressor ou citostático pode ser realizada na tentativa de reverter o quadro^{170,235}. Além disso, a administração de imunoglobulinas também pode ser realizada como tratamento¹⁷⁰.

Existem outras doenças e condições associadas à infecção pelo B19V, porém seus mecanismos ainda não estão bem esclarecidos^{170,225}. Em casos raros, podem ser observadas formas de vasculite, glomerulonefrite, miocardite e hepatite aguda²³⁶⁻²³⁸. Ademais, foram descritos cursos graves de encefalite e insuficiência cardíaca aguda, contudo o papel etiológico do B19V permanece desconhecido nestes casos¹⁷⁰.

1.2.7 Infecção persistente

A ausência de uma resposta imunológica neutralizante eficiente, observada sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, mas também presente em indivíduos imunocompetentes, pode gerar falha na eliminação do vírus, o que pode acarretar na infecção persistente, uma condição frequentemente associada ao B19V^{176,239}. O B19V-DNA é capaz de persistir na medula óssea, no sangue e em tecidos específicos dos indivíduos (tais quais coração, fígado, linfonodos, tireoide, pulmão, rins, testículos, tecidos sinoviais etc.) mesmo após a resolução da infecção aguda, podendo levar à ocorrência de doenças crônicas, como anemia ou artropatias crônicas, ou ocorrendo de forma totalmente assintomática^{176,239,240}.

A persistência do B19V é caracterizada pela detecção do B19V-DNA no sangue do indivíduo por mais de 16 semanas e, geralmente, em indivíduos imunocompetentes, se apresenta com carga viral baixa. Por essa razão, nesse caso, o melhor método de detecção e quantificação é a PCR em tempo real (qPCR, do inglês, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) devido à sua alta sensibilidade no que se refere a cargas virais baixas^{241,242}.

Em tecidos, a detecção do B19V-DNA deve ser analisada conjuntamente com a detecção de anticorpos específicos anti-B19V no soro, para avaliar se a carga viral detectada está associada a uma infecção aguda ou a uma infecção persistente. Neste contexto, se um indivíduo apresenta carga viral com valor menor que 10^4 cópias/mL, anticorpos IgM ausentes e IgG presentes, considera-se a infecção como sendo persistente, porém, se a carga viral for maior ou igual a 10^4 cópias/mL com anticorpos IgM e IgG reativos, a infecção é considerada aguda^{240,243}.

Como o DNA do B19V pode ser detectado por um longo período após a infecção aguda, os tecidos em que o vírus persiste são considerados uma fonte alternativa para a liberação do DNA viral. Dessa forma, a presença do B19V-DNA no sangue não está necessariamente atrelada à replicação ativa do vírus, mas também ao dano tecidual que pode levar à liberação passiva de DNA viral^{241,243}.

Até o presente momento, a ocorrência da infecção persistente pelo B19V em sangue e tecidos não possui uma explicação. Alguns autores sugerem a hipótese de que o genoma viral se integra ao genoma da célula infectada e, assim, resulta na detecção persistente do DNA viral^{176,244,245}.

1.2.8 Epidemiologia

O parvovírus B19 apresenta ampla distribuição mundial, sendo detectado em diferentes países. Epidemias são relatadas em intervalos de aproximadamente 4 a 5 anos e a infecção causada por este vírus pode ocorrer em qualquer faixa etária, contudo a prevalência observada em crianças é maior quando comparada à da população adulta. A faixa etária em quem a infecção é tipicamente contraída corresponde dos 5 aos 15 anos, porém adultos suscetíveis também podem se infectar^{165,170}.

Relatos na literatura indicam que a prevalência de anticorpos anti-B19V na população de centros urbanos varia de acordo com a faixa etária, aumentando de 15% a 35% em crianças menores de 5 anos de idade para 30% a 80% em crianças, adolescentes e jovens adultos de 5 a 20 anos, e chegando até 90% na população acima dos 50 anos de idade^{165,225}. Entre indivíduos que residem em comunidades isoladas ou em áreas remotas, entretanto, anticorpos foram encontrados em uma parcela menor da população, variando de 4,7% a 10,7%^{225,246}.

A frequência de detecção de anticorpos IgG relatada em adultos imunocompetentes mostra-se variada, de acordo com estudos realizados em diferentes países, sendo de 60% a 70% na Inglaterra e no País de Gales²⁴⁷, de 50% a 52% na Índia, EUA, Japão e Espanha^{217,248–250}, e chegando a aproximadamente 44% no Chile e na República Tcheca^{251,252}. Em gestantes não infectadas pelo B19V, a taxa de soroconversão anual corresponde a 1,5%^{185,253}. Além disso, dados descritos na literatura sugerem que 65% das gestantes americanas apresentam anticorpos IgG e que a taxa de infecção aguda durante a gravidez, com presença de IgM, varia de 1% a 2%^{253–255}.

No Brasil, são poucos os relatos recentes acerca dos aspectos clínicos e epidemiológicos do B19V. Alguns estudos soropidemiológicos mostram que a infecção pelo vírus é comum em alguns estados do país, sobretudo nas áreas urbanas, onde as taxas de prevalência global detectadas foram de aproximadamente 43% e 72% para os municípios de Belém (PA) e do Rio de Janeiro (RJ), respectivamente^{246,256}. No que se refere a infecções exantemáticas gerais, Oliveira

et al. (2002), encontraram uma prevalência de 32% de infecção pelo B19V entre pacientes que apresentavam quadros exantemáticos não definidos, no município de Niterói, também situado na área urbana do estado do Rio de Janeiro²⁵⁷. No país, adultos dos 31 aos 40 anos de idade constituem o grupo de indivíduos em que se encontram as mais altas prevalências de anticorpos IgG anti-B19V, correspondendo a 72% dos mesmos.

Infecções maternas primárias confirmadas sorologicamente apresentam uma taxa de transmissão vertical variando em torno de 25% a 50%. Ademais, infecções transmitidas pela via nosocomial, apesar da baixa frequência, também já foram descritas, assim como a transmissão entre os profissionais de laboratório que manipulam o vírus²⁵⁸⁻²⁶⁰.

No caso de doadores de sangue, a presença de anticorpos IgG anti-B19V tem sido detectada em 50% a 60% dos indivíduos^{195,196,225,261}. Contudo, apesar da frequente detecção destes anticorpos nestes indivíduos e na população em geral, a detecção do B19V-DNA ou de viremia é raramente relatada e varia de acordo com a sensibilidade do método diagnóstico utilizado²²⁵. As taxas de detecção do genoma viral e dos anticorpos neutralizantes para o vírus no soro de doadores de sangue, tanto no cenário internacional quanto no nacional, serão descritas nos próximos itens deste trabalho.

1.2.9 Tratamento e prevenção

Até o presente momento, não existe um tratamento específico para a infecção causada pelo B19V. A maior parte dos casos em crianças e adultos imunocompetentes apresenta resolução espontânea, não requerendo terapia específica^{185,189}. Em algumas situações, como no caso de pacientes imunocomprometidos, entretanto, a infecção pode ser grave e levar à necessidade de cuidados clínicos, como a administração de hemoderivados.

Nos casos de pacientes que apresentam poliartropatias, por exemplo, pode ser necessário o uso de fármacos anti-inflamatórios para amenizar as dores nas articulações decorrentes da infecção¹⁷². Em situações que envolvem complicações hematológicas, como as de crise aplásica transitória e de aplasia eritrocitária crônica, transfusões de eritrócitos podem ser necessárias, bem como nos casos de hidropsia fetal, em que transfusões intrauterinas são eficazes na redução de aproximadamente 18% da mortalidade^{172,189,262}.

A imunização passiva por meio de terapia intravenosa com imunoglobulinas é, atualmente, o tratamento indicado para os pacientes que apresentam condições graves desencadeadas pela infecção viral e para o caso de infecção persistente, sobretudo a associada à anemia crônica^{172,263}. A administração passiva de anticorpos anti-B19V promove a neutralização do vírus e a consequente retomada da produção de eritrócitos e do aumento do hematócrito. Contudo, à medida que o tratamento é interrompido, ou que a titulação dos anticorpos administrados diminui, podem ocorrer recaídas e reaparecimento dos sintomas, caso o indivíduo infectado ainda não seja capaz de produzir anticorpos neutralizantes por si só^{165,189,264–266}.

O Cidofovir, um composto antiviral com atividade contra famílias de vírus de DNA fita dupla que infectam humanos, incluindo vírus que não codificam sua própria DNA polimerase, vem sendo avaliado para uma possível atividade contra o B19V. Sua ação incide sobre a DNA polimerase viral, no caso de vírus de DNA fita dupla. No caso do B19V, um vírus de DNA fita simples que utiliza a polimerase da célula infectada, o Cidofovir também teve ação eficientemente inibidora na replicação do DNA viral, de maneira dose-dependente²⁶⁷. No entanto, a toxicidade demonstrada na utilização deste composto impediu seu uso generalizado no tratamento de infecções pelo B19V, e levando, assim, a pesquisas de desenvolvimento de outros compostos, como o Brincidofovir^{265,267,268}. Esta droga consiste em uma forma modificada do Cidofovir que apresenta uma atividade mais potente contra vírus de DNA dupla fita, melhor biodisponibilidade e com ausência de toxicidade, o que torna o Brincidofovir uma alternativa para tratar infecções por B19V, porém estudos complementares ainda precisam ser realizados^{268–270}.

Outro componente que tem sido avaliado para tratar a infecção pelo B19V é a hidroxiureia, um fármaco antiproliferativo utilizado no tratamento da anemia falciforme que atua de forma análoga a um antiviral “viostático”, por, aparentemente, esgotar os desoxirribonucleotídeos intracelulares disponíveis para a replicação viral. Apesar de ser observado um efeito protetor mensurável contra manifestações hematológicas graves causadas pelo B19V nesses indivíduos, uma investigação clínica adicional ainda é necessária^{271–273}.

A busca por agentes antivirais diretos também vem sendo considerada. A partir do conhecimento sobre o ciclo de replicação e dos detalhes da maquinaria molecular envolvida, obtém-se a identificação de alvos cuja inibição impediria a replicação viral ou, pelo menos, os efeitos citotóxicos virais²⁶⁵. Um estudo recente

relatou a busca por compostos que sejam capazes de inibir a atividade da proteína NS1, cuja atividade é essencial para o processo de replicação viral do B19V²⁷⁴.

Para prevenção do B19V, até o momento, não existem vacinas. No entanto, uma vacina recombinante composta pelas proteínas VP1 e VP2 expressas como VLP vem sendo estudada. Estudos iniciais demonstraram que voluntários vacinados que receberam duas doses da vacina via intramuscular desenvolveram anticorpos neutralizantes para o B19V, em ensaio clínico de fase I, de forma que os mesmos foram detectados no soro destes voluntários por um período de 6 meses após a terceira dose da vacina^{275,276}. Apesar dos dados iniciais promissores, as avaliações de segurança mostraram o surgimento de reações moderadas nos voluntários durante o primeiro ensaio clínico, e de erupções cutâneas no local da aplicação durante o segundo ensaio clínico, de maneira a descontinuar a vacina²⁷⁷.

1.2.10 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da infecção pelo B19V por meio da observação de sinais e sintomas é dificultado em razão da ausência de um padrão exantemático típico, o que pode ser confundido com o de outras doenças exantemáticas, como sarampo e rubéola¹⁷².

No que se refere ao diagnóstico laboratorial, a detecção de anticorpos IgM e IgG no soro constitui o principal método diagnóstico para infecção pelo B19V. Este método pode ser combinado com a detecção molecular em amostras de sangue ou de tecidos para um resultado mais preciso, uma vez que a formação de complexos anticorpos-vírus em amostras altamente virêmicas pode gerar resultados transitoriamente falso-negativos^{165,167,189}.

Atualmente, existe uma grande variedade de testes sorológicos comerciais para o diagnóstico da infecção pelo B19V. Estes testes apresentam sensibilidade de 90% a 100% e especificidade de 70% a 96%, e utilizam-se de antígenos sintéticos, obtidos a partir da expressão das proteínas VP1 e VP2 em sistemas recombinantes, de maneira que a conformação antigênica gerada é análoga à do vírus nativo^{278–281}. A detecção de anticorpos apenas do tipo IgM anti-B19V, ou de anticorpos IgM e IgG simultaneamente no soro de pacientes, permite a interpretação de uma provável infecção ativa ou recente, enquanto a detecção apenas de anticorpos IgG sugere diagnóstico de infecção passada, ou, quando combinada com a detecção molecular do B19V-DNA, infecção persistente. Em indivíduos imunocomprometidos,

entretanto, a detecção molecular do B19V-DNA pode ser necessária devido à deficiência na produção de anticorpos^{172,176,282}.

Em razão das dificuldades de se cultivar o B19V *in vitro*, em culturas de células convencionais, e para auxiliar a interpretação dos métodos sorológicos já preconizados, foram desenvolvidos métodos moleculares para detecção do B19V-DNA, geralmente baseados na amplificação do genoma por meio de PCR e de PCR em tempo real¹⁹⁶. Estas metodologias utilizam conjuntos de oligonucleotídeos capazes de detectar diferentes regiões do genoma viral, incluindo as que codificam as proteínas NS1, VP1 e VP2^{196,283,284}.

Os ensaios moleculares qualitativos (PCR convencional) apresentam limite de detecção de 10^2 a 10^5 cópias/mL, enquanto que a Nested-PCR, uma metodologia que utiliza duas reações sequenciais de PCR com conjuntos de nucleotídeos distintos, apresenta limite de detecção superior, de 1 a 10 cópias/mL^{279,285–290}. Os ensaios moleculares quantitativos (PCR em tempo real), por sua vez, são baseados nas metodologias *Sybr Green*® e *TaqMan*® e se mostram mais sensíveis que os qualitativos, além de não necessitarem do uso de gel de agarose e brometo de etídio, reduzindo assim as chances de contaminação, e de possuírem capacidade de serem padronizadas *in house*^{222,284,291}. Recentemente, foi desenvolvido um protocolo de quantificação em tempo real *in house*, pela equipe do laboratório em que este estudo foi realizado²⁹¹.

Recentemente, Molenaar-de Backer et al., 2016, apresentaram um método que permite diferenciar quando o B19V-DNA detectado no sangue é resultante da replicação viral ativa ou da viremia derivada da liberação passiva do genoma viral de tecidos²⁴³. Este método utiliza uma endonuclease que promove a degradação de DNA ou RNA livres (“DNA *naked*”), tornando-os incapazes de serem detectados por PCR, enquanto que o genoma viral encapsidado não é afetado por sua ação e, assim, pode ser normalmente detectado. Em se tratando da infecção pelo B19V, esta metodologia permite diferenciar infecção aguda de infecção persistente, podendo ser utilizada no auxílio da interpretação de achados laboratoriais²⁹².

1.2.11 Transfusão sanguínea e B19V

O B19V é encontrado em populações de doadores de sangue em diversos países, durante todo o ano, embora sua prevalência e sazonalidade sejam variáveis em diferentes populações e regiões geográficas²⁹³. Recentemente, no ano de 2019, um estudo realizado na África do Sul encontrou prevalência de 0,9% de B19V-DNA

entre doadores de sangue, dentre os quais 64% apresentaram resultados positivos para IgG, chamando atenção para a presença de infecções persistentes²⁹⁴. Neste mesmo ano, na Austrália, Styles e colaboradores demonstraram a presença do B19V-DNA em 0,26% das amostras de soro coletadas entre junho e setembro de 2016²⁹⁵. No Brasil, a frequência de detecção de material genético do B19V em doadores de sangue varia de acordo com as regiões do país: 0,21% na região Centro-Oeste, 1,0% na região Sudeste e 1,9% no Sul^{195,296,297}. Estes estudos, contudo, utilizaram tamanhos populacionais reduzidos, sendo eles de 477 doadores no Centro-Oeste, de 100 no Sudeste e de 480 doadores no Sul. As cargas virais encontradas foram consideradas suficientes para contaminar *pools* de plasma utilizados para fracionamento e derivados de plasma, geralmente preparados a partir de misturas de muitos doadores de sangue^{298,299}.

A transmissão do B19V por meio de produtos derivados de sangue é favorecida por duas características importantes: a infecção persistente na medula óssea de indivíduos assintomáticos e a replicação prolongada após a infecção inicial, que pode ocorrer durante vários anos^{188,300}. Estes dois fatores devem ser avaliados no que se refere à atenção aos doadores e à segurança do sangue doado, uma vez que a infecção pelo B19V é frequentemente assintomática, o que torna possível que doadores apresentem o vírus circulante no sangue no momento da doação e não saibam da infecção³⁰¹. Os relatos de transmissão de B19V por meio de transfusão sanguínea são raros, mas geralmente causam doenças hematológicas graves como anemia grave, trombocitopenia grave e crise eritróide^{293,302,303}.

1.3 Hemoterapia no Brasil

O primeiro banco de sangue do Brasil foi efetivamente fundado em 1941, no Instituto Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, com a finalidade de obter sangue para abastecimento interno e para atender às demandas transfusionais de hospitais próximos, sobretudo mediante às necessidades crescentes durante a Segunda Guerra Mundial^{304,305}. Nos anos seguintes, outros bancos de sangue foram fundados em todo o país e, em 1945, foi fundado o primeiro banco de sangue privado do país, localizado em um bairro nobre da cidade do Rio de Janeiro e chamado Banco de Sangue do Rio de Janeiro³⁰⁴⁻³⁰⁶.

As políticas de regulação da hemoterapia no Brasil sofreram uma série de alterações desde a sua implantação. O advento do HIV na década de 1980 foi um

dos principais fatores que impactaram nesse sentido. O controle da transmissão deste vírus pela via transfusional tornou-se possível a partir de 1985, ano em que os hemocentros passaram a realizar o teste de detecção nas bolsas de sangue coletadas³⁰⁴⁻³⁰⁶. A detecção do vírus, contudo, não era obrigatória e os custos da testagem em massa eram elevados, o que levou à grande maioria dos serviços privados de hemoterapia a não aderirem aos testes anti-HIV sistematicamente.

Apenas no ano de 1988 foi promulgada a Lei 7.649 de 25 de janeiro, que estabelecia a obrigatoriedade do cadastramento dos doadores de sangue, bem como a realização de exames laboratoriais no sangue coletado, visando prevenir a propagação de doenças, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), sífilis, Doença de Chagas, malária para zonas endêmicas e hepatite B. Mais tarde, em 1993, os testes para hepatite C e para o Vírus Linfotrófico T Humano I e II (HTLV I e II) tornaram-se obrigatórios, por meio da portaria nº 1.376 de 19 de novembro de 1993³⁰⁴⁻³⁰⁸.

O marco governamental que demonstra o compromisso e as responsabilidades dos agentes públicos envolvidos com a segurança e disponibilidade dos produtos hemoterápicos consiste na Lei nº 10.205 de 2001, também conhecida como Lei do Sangue, que regulamenta processos relativos à coleta, processamento, armazenagem, conservação, distribuição e uso do sangue e seus derivados. Ademais, a política nacional brasileira de sangue e hemoderivados é regida pela Constituição Federal de 1988, que proíbe qualquer natureza de comercialização de material biológico de origem humana, e pelas normas técnicas contidas na Portaria nº 158, de 4 de fevereiro de 2016, que redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos e objetiva regulamentar a atividade hemoterápica no país^{304,305,309-312}.

A Lei do Sangue também organiza um complexo sistema que se estrutura em rede, de forma a incluir tanto os serviços produtores de hemoderivados quanto os de procedimentos transfusionais. Este sistema compreende o Sistema Nacional de Sangue (SINASAN), que é coordenado pelo Ministério da Saúde e é composto pelas redes municipais e estaduais dos serviços de hemoterapia^{309,310}. Ademais, os requisitos de boas práticas aplicadas à fabricação de hemoderivados e aos procedimentos transfusionais são determinados pela autoridade reguladora nacional, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 75, de 02 de maio de 2016.

1.3.1 Hemorrede e Ciclo do Sangue

A rede que estrutura os serviços hemoterápicos no Brasil, denominada Hemorrede, compreende um conjunto de serviços de hemoterapia e hematologia, organizados de forma hierarquizada e regionalizada, de acordo com o nível de complexidade das funções que desempenham e a sua área de abrangência quanto à assistência à saúde. Em todo o país, a Hemorrede é composta por serviços públicos e contratados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), sendo eles: Hemocentro Coordenador, Hemocentros Regionais, Núcleos de Hemoterapia, Unidades de Coleta e Transfusão, Pontos de Coleta e Agências Transfusionais.

Dentro da Hemorrede, a obtenção e o fornecimento do sangue e seus hemoderivados englobam diversos procedimentos que unidos compõem o chamado “Ciclo do Sangue”. Este ciclo compreende um conjunto de etapas que se estende desde a captação, conscientização e cadastro do doador, até a etapa de distribuição dos hemoderivados e os consequentes procedimentos transfusionais. O Ciclo do Sangue também percorre as triagens clínica e hematológica, que avaliam principalmente as condições físicas e de saúde do doador no momento anterior à doação, bem como a coleta de sangue em si e os testes de triagem laboratorial das amostras obtidas, em que são feitos exames imunohematológicos (como tipagem sanguínea e determinação do Fator Rh), e sorológicos e moleculares (como os de detecção dos agentes infecciosos anteriormente citados no item 1.1.2) (Figura 1.11)^{311,313}.

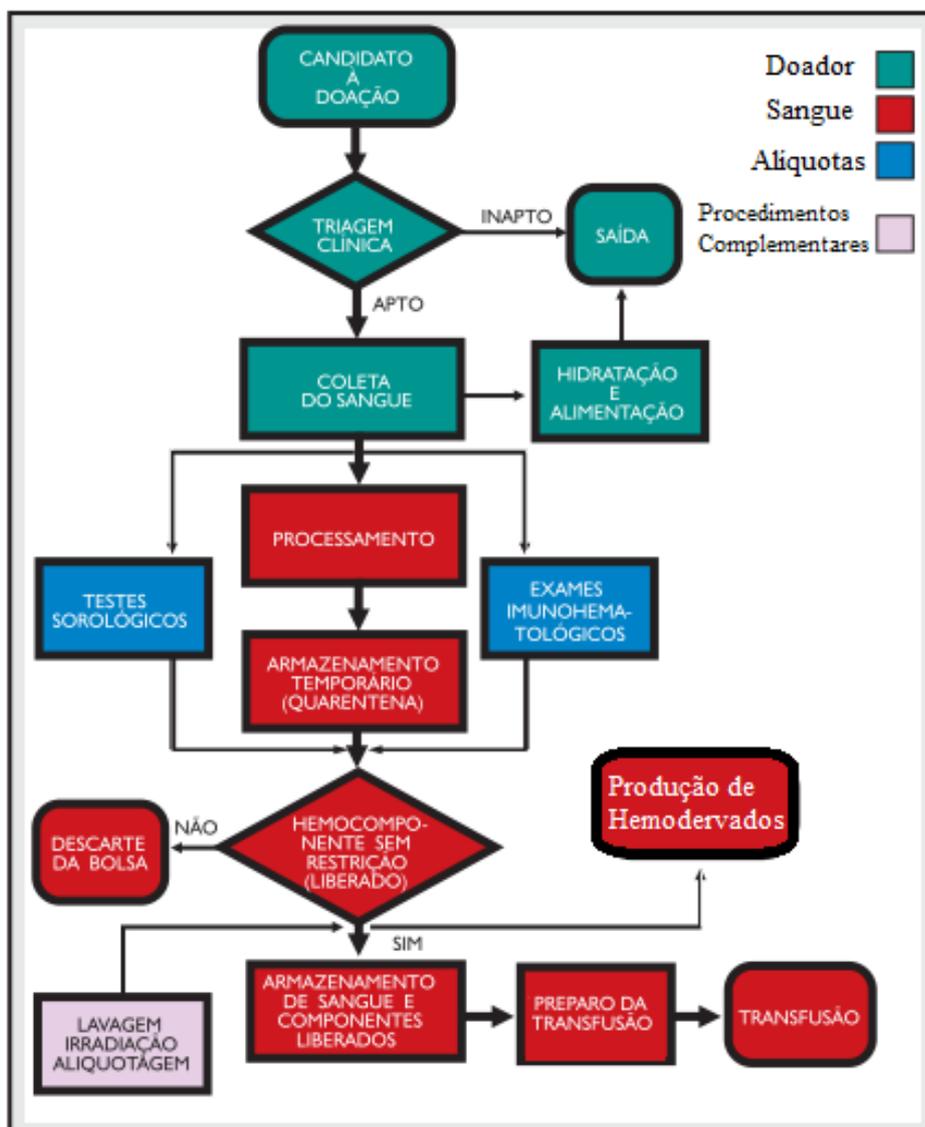


Figura 1.11: Fluxograma do Ciclo do Sangue.

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2004.

1.3.2 O HEMORIO

O Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO) foi fundado no ano de 1944, na cidade do Rio de Janeiro, inicialmente como um banco de sangue. Desde sua criação, este banco de sangue apresentava características de hemocentro, uma vez que tinha função de fornecer e distribuir sangue e derivados para os hospitais de emergência próximos. Em 1956, a partir da implantação de um serviço de hematologia ligado a este banco de sangue, foi originado o Instituto de Hematologia, que posteriormente recebeu o nome de Arthur de Siqueira Cavalcanti³¹⁴.

O HEMORIO abastece diversas unidades de saúde da Região Metropolitana do Rio de Janeiro (cerca de 200) e recebe, em média, 350 doadores voluntários de

sangue por dia. Além disso, este hemocentro possui um serviço de hematologia que conta com mais de 10 mil pacientes que realizam tratamento de doenças hematológicas³¹⁴.

O estado do Rio de Janeiro, além do Hemocentro Coordenador (HEMORIO), conta com uma Hemorrede composta por 4 Hemocentros Regionais, 21 Núcleos de Hemoterapia, 1 Unidade de Coleta e Transfusão e 65 Agências Transfusionais, além de 15 Serviços de Hematologia localizados nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói (Figura 1.12).



Figura 1.13: Mapa da Hemorrede do Rio de Janeiro atualizado em janeiro de 2021.
Fonte: http://www.hemorio.rj.gov.br/html/Hemorrede_mapa.htm#2

Conforme recomendado pelo Ministério da Saúde, visando reduzir o risco transfusional de agentes infecciosos no serviço de hemoterapia e obedecendo à Portaria nº158/2016, o HEMORIO realiza os testes laboratoriais de pesquisa e controle dos agentes infecciosos HIV, HTLV I e II, HBV, HCV, *Treponema pallidum* (sífilis) e *Trypanossoma cruzi* (Doença de Chagas) por meio de metodologias sorológicas e moleculares.

Dentre os testes realizados, é importante destacar uma das metodologias utilizadas, que consiste em um teste de ácidos nucleicos (NAT, do inglês *nucleic acid amplification test*) capaz de detectar simultaneamente o ácido nucléico de alguns agentes virais, tais quais HIV, HBV e HCV, nas amostras de doadores de sangue atendidos na unidade. Este teste compreende uma metodologia molecular nacional que tem como base as reações de PCR em tempo real e é composto pelas etapas dispostas no fluxograma abaixo ilustrado (Figura 1.13).

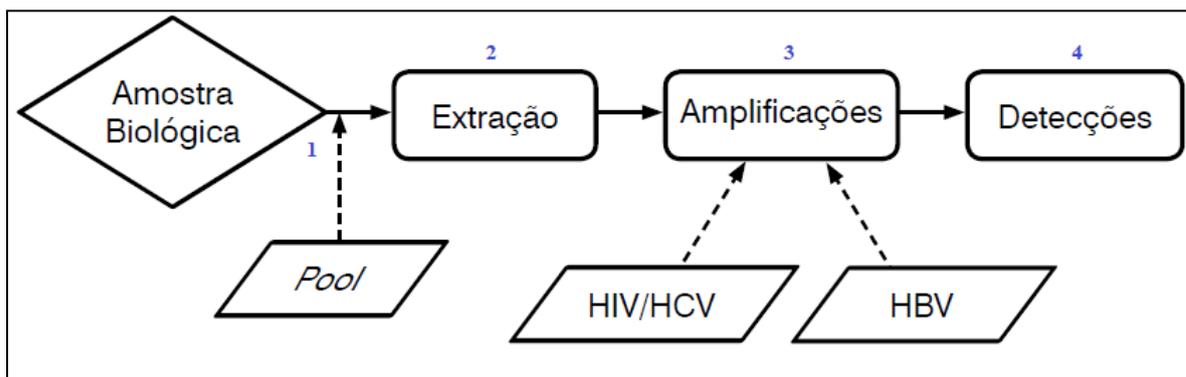


Figura 1.14: Esquema das etapas necessárias para realização do NAT multiplex HIV/HBV/HCV. As amostras de sangue são processadas por meio da técnica de *pooling* (1), que mistura alíquotas de plasma oriundas de seis doadores distintos para, em seguida, ser realizada a extração dos ácidos nucleicos virais (2). A etapa seguinte consiste na amplificação (3) dos genomas virais, em dois módulos (HIV/HCV e HBV), que serão detectados por PCR em tempo real (4). **Fonte:** Adaptado do manual de instruções do Kit NAT HIV/HBV/HCV Bio-Manguinhos, 2019.

Os testes NAT foram desenvolvidos para detecção de ácido nucleico viral durante o período de janela imunológica, que antecede a produção de anticorpos, o que aumenta a segurança transfusional. Algumas etapas desta metodologia foram utilizadas para realização do presente estudo, conforme será descrito na sessão “Material e Métodos”.

1.4 Justificativa

O vírus da hepatite A e o parvovírus B19 não possuem envelope, característica que confere aos mesmos uma alta resistência aos processos de inativação viral utilizados comumente na produção de hemoderivados, incluindo a inativação térmica por aquecimento, lavagem com detergentes e solventes e irradiação¹⁵⁷. O risco de transmissão de ambos os vírus por transfusão sanguínea ocorre, principalmente, durante o período de viremia, que é caracterizado por uma grande quantidade de partículas virais circulantes no sangue e que antecede o

aparecimento de sintomas, o que impede que o doador perceba que está infectado e, dessa forma, acabe realizando a doação.

De uma maneira geral, a transmissão de doenças infecciosas por meio de transfusão sanguínea tem sido reduzida nos serviços de hemoterapia em razão da adoção de uma triagem clínica cuidadosa, além da evolução dos métodos sorológicos e moleculares para detecção dos agentes causadores de tais doenças.

A triagem da infecção pelo B19V por meio da detecção de seu genoma entre *pools* de plasma de doadores de sangue é atualmente recomendada como um processo de controle em alguns países da Europa, como Alemanha e Holanda, e também da América do Norte, como os EUA. A Farmacopeia Europeia exige que as cargas de DNA de B19V sejam inferiores a 10^4 UI/mL nos *pools* de plasma destinados à produção de hemoderivados. Além disso, a Farmacopeia Europeia afirma que o plasma humano que sofre inativação viral também deve ser negativo para HAV por meio de um teste NAT que seja capaz de detectar 100UI/mL de HAV-RNA. Nos EUA, o FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda uma estratégia similar para o teste de triagem de B19V, entretanto, ainda não há requisitos para a triagem do HAV nos bancos de sangue do país.

No Brasil, o vírus da hepatite A e o parvovírus B19 não estão incluídos nos testes de triagem realizados em doadores de sangue, sendo estes destinados apenas para detecção dos vírus HIV, HBV, HCV e HTLV, e dos agentes etiológicos da sífilis e da Doença de Chagas, além da malária nas áreas do país consideradas endêmicas.

A partir do panorama exposto e tendo em vista o possível risco de transmissão das infecções causadas por HAV e B19V por meio de sangue e hemoderivados, a hipótese do presente estudo é que estes dois vírus podem potencialmente ser detectados na população de doadores de sangue analisada, e, por esse motivo, existe um risco residual de transmissão transfusional de ambos. Desta forma, o presente estudo visa avaliar a incidência e a prevalência da infecção pelo HAV e pelo B19V entre doadores de sangue e o risco de sua transmissão por transfusão sanguínea, preenchendo lacunas no cenário epidemiológico regional atual dessas infecções e contribuindo para o estabelecimento de medidas de vigilância e intervenção da transmissão de infecções nos serviços de hemoterapia do país.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a incidência e a prevalência da infecção pelos vírus da Hepatite A e Parvovírus B19 em doadores de sangue do Rio de Janeiro e avaliar o risco de transmissão residual desses vírus por transfusão sanguínea.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Detectar, por meio de métodos moleculares, a presença de HAV-RNA e B19V-DNA em amostras de plasma;
- II. Determinar os genótipos de HAV e B19V obtidos destes doadores de sangue;
- III. Avaliar o impacto de surtos epidêmicos de hepatite A no risco de transmissão transfusional;
- IV. Avaliar o risco de transmissão transfusional de HAV e B19V em bancos de sangue.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

O presente estudo faz parte do projeto de pesquisa intitulado “Estudo da infecção pelo Parvovírus humano B19 e das hepatites virais A e E em plasma de doadores de sangue”, realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV), cuja aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-Fiocruz) (CAAE: 17579919.0.0000.5248, Número do Parecer: 3.523.916) encontra-se no anexo 1 deste documento.

Os doadores de sangue do presente estudo foram oriundos do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti do estado do Rio de Janeiro (HEMORIO) e todos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Desenho de estudo

Este trabalho consiste em um estudo transversal, realizado a partir de amostras de doadores de sangue do estado do Rio de Janeiro, as quais foram selecionadas de forma que a amostragem utilizada fosse representativa dessa população e permitisse a realização do presente estudo de forma mais econômica e precisa.

Para definição do N amostral, foi realizada, em parceria com o Programa de Computação Científica da Fiocruz (PROCC/Fiocruz), uma revisão sistemática para identificar estudos sobre a incidência das infecções pelo B19V e pelo HAV entre doadores de sangue na região sudeste do Brasil, tendo como base a população de adultos entre 18 e 60 anos com uma margem de erro de 0,5% e intervalo de confiança de 95%. Foi identificado apenas um único estudo relacionado à detecção do B19V-DNA nesta população, demonstrando uma incidência de 1,0%²⁹⁶, enquanto que, para o HAV, foram encontrados apenas dados de soroprevalência. Portanto, utilizando esta incidência encontrada, foi estimado um N mínimo de 1.000 amostras para a realização deste estudo, conforme o método de amostragem de Thompson³¹⁵.

Para definição do período do estudo, a amostragem foi estratificada em 23 meses, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019, visando incluir períodos epidêmicos e não epidêmicos de hepatite A.

3.3 População de estudo

3.3.1 Doadores de sangue do Rio de Janeiro

Foram selecionadas amostras de plasma de doadores de sangue atendidos no serviço de hemoterapia do HEMORIO, que foram negativas para doenças infecciosas transmitidas por via parenteral, rotineiramente testadas na triagem em bancos de sangue no Brasil (HIV-1/2, HCV, HBV, HTLV-I/II, sífilis e Doença de Chagas).

No período entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019, foram obtidas 1.204 amostras de plasma de doadores de sangue oriundos do HEMORIO. Dentre este total de doadores, 100 amostras de plasma foram obtidas individualmente, a partir de bolsas de plasma fresco congelado. As outras 1.104 amostras foram obtidas por meio de *minipools* de plasma, compostos por amostras de seis diferentes doadores, totalizando 184 *minipools*, previamente preparados no serviço de hemoterapia do HEMORIO, conforme descrito a seguir no item 3.4.

3.3.2 Doadores de sangue dos bairros Vidigal e Rocinha

Com a finalidade de avaliar se a ocorrência de surtos epidêmicos de hepatite A, no Rio de Janeiro, influenciou na frequência de detecção desse vírus entre doadores de sangue e, conseqüentemente, no risco de transmissão transfusional, foram incluídas no estudo todas as amostras de plasma de doadores (n=42) atendidos no HEMORIO, residentes nos bairros Vidigal e Rocinha, nos quais foram relatados surtos de hepatite A entre julho de 2017 e fevereiro de 2018.

Estas amostras também foram obtidas individualmente a partir de bolsas de plasma fresco de cada um dos doadores atendidos no HEMORIO e também foram avaliadas quanto à presença de B19V-DNA, uma vez que este período de surto coincidiu com um período epidêmico de B19V na cidade do Rio de Janeiro.

3.4 Preparo dos *minipools* de plasma (*Pooling*)

O processo de preparo dos *minipools* de plasma (*pooling*) é realizado na rotina de processamento de amostras do HEMORIO por meio da plataforma automática JANUS® Automated Workstation (Perkin Elmer®, Massachusetts, EUA).

Nesta plataforma, inicialmente, a partir de tubos primários de flebotomia a vácuo do tipo preparador de plasma, inseridos no equipamento e dedicados à realização do NAT, foram coletados 100µL de plasma provenientes de seis doadores de sangue distintos. Após esta etapa, foram obtidos tubos secundários de poliestireno contendo as seis amostras de plasma já misturadas entre si, isto é, os *minipools* de plasma, que seguem para a etapa de extração de ácidos nucleicos, conforme descrito no item 3.5.1.

3.5 Testes moleculares para pesquisa de HAV-RNA e B19V-DNA

As amostras de doadores obtidas diretamente a partir de bolsas de plasma fresco congelado (n= 100) amostras de doadores do Rio de Janeiro; n = 42 amostras de doadores do Vidigal/Rocinha) e as amostras obtidas em *minipools* de plasma (n= 1.104 amostras em 184 *minipools*) foram submetidas a diferentes fluxogramas de análise, conforme mostram as Figuras 3.1 e 3.2 a seguir:

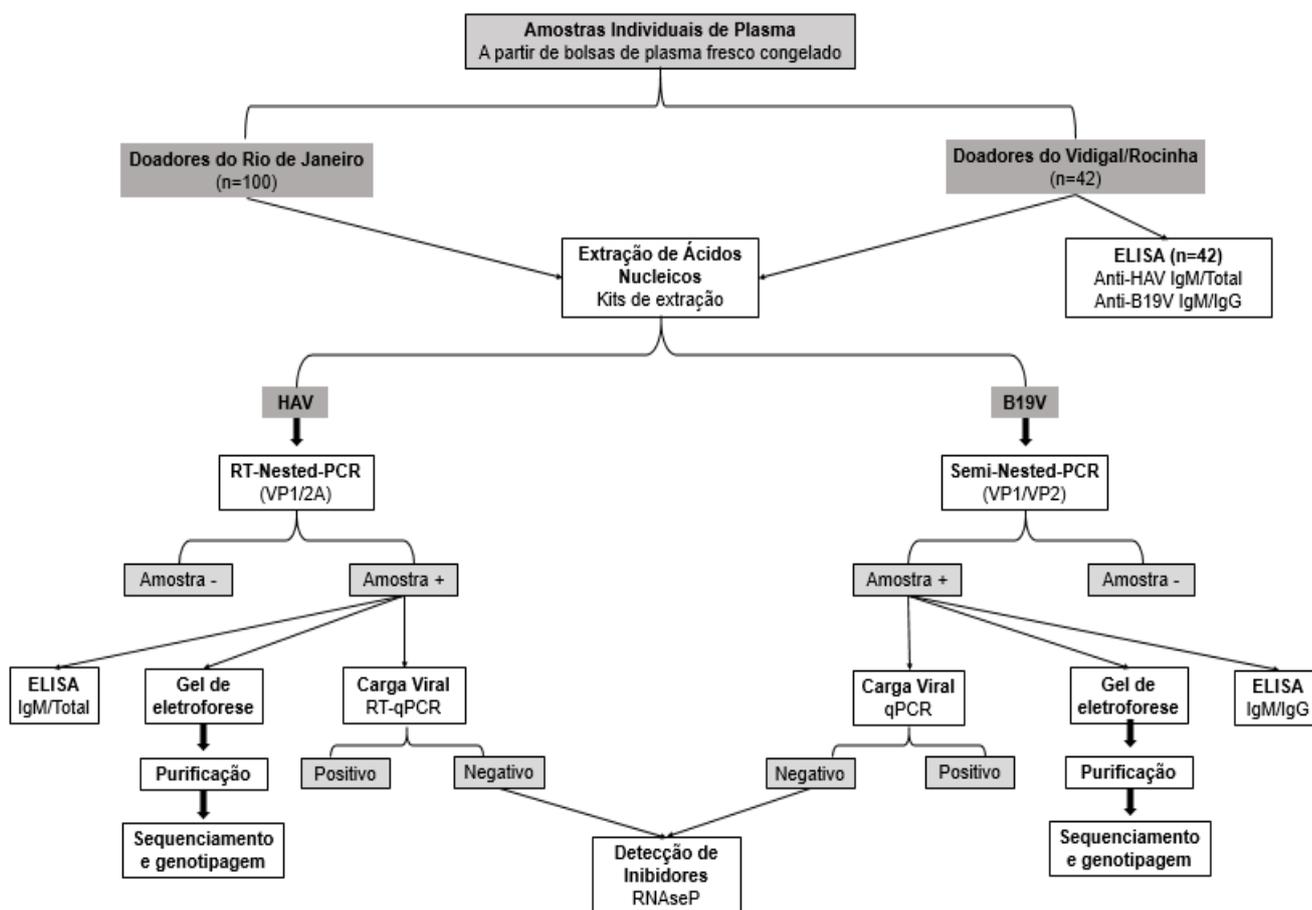


Figura 3.1: Fluxograma de análise das amostras de doadores obtidas individualmente, a partir de bolsas de plasma congelado.

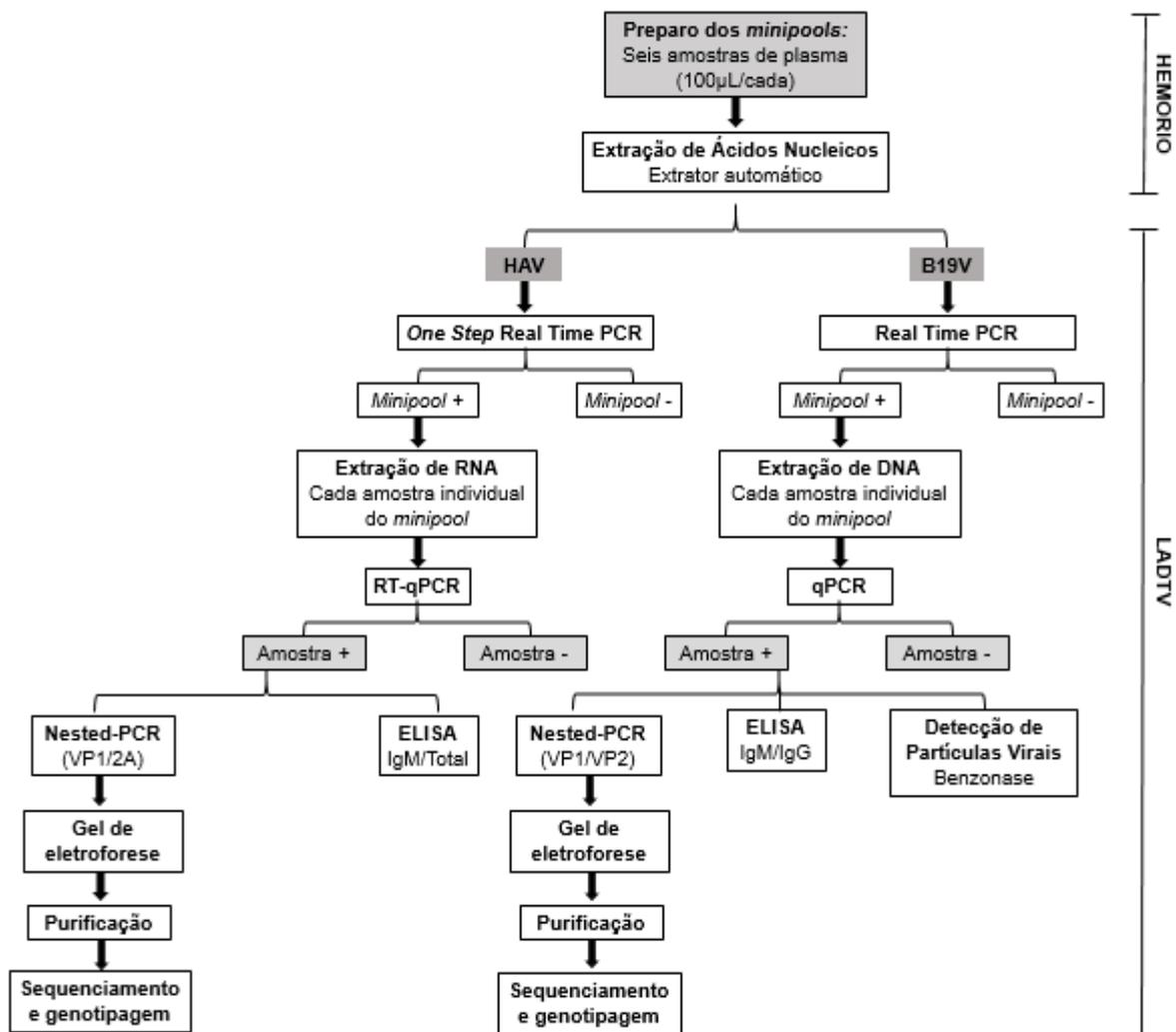


Figura 3.2: Fluxograma de análise das amostras de doadores obtidas sob a forma de *minipools* de plasma.

3.5.1 Extração de ácidos nucleicos

As amostras de doadores obtidas por meio de *minipools* de plasma tiveram a etapa de extração de ácidos nucleicos realizada previamente no serviço do HEMORIO, por meio do equipamento extrator automático BioRobot® MDx (Qiagen, Hilden, Alemanha). Posteriormente, eram realizados no banco de sangue, os testes de triagem NAT para HIV, HCV e HBV, utilizando o Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) em cada *minipool* de plasma recém preparado e alocado em tubos de poliestireno secundários (item 3.4), conforme as etapas indicadas pelo fabricante.

Nas amostras individuais de plasma, tanto as obtidas diretamente de bolsas de plasma fresco congelado, quanto as provenientes da abertura dos *minipools* considerados positivos, o HAV-RNA e o B19V-DNA foram extraídos por meio dos

kits de extração QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hillden, Alemanha) e QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hillden, Alemanha), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

3.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a extração dos ácidos nucleicos, foram realizados RT-Nested-PCR e Nested-PCR para a pesquisa de HAV e de B19V, respectivamente, de acordo com a metodologia descrita a seguir:

3.5.2.1 Transcrição reversa do HAV-RNA

Para síntese do DNA complementar (cDNA), em 10µL do RNA viral foi adicionado o mix contendo 0,5µL de RNAsin (1U/ul) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2µL de *random primer* (20 pmol/µL) (Invitrogen, Rockville, MD, EUA) e 1µL de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) (1,25 mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 4µL do tampão da enzima (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2µL de ditioneitol (DTT) (0,1M) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 1µL da enzima SuperScript III (1U/ul) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram submetidas a uma etapa inicial de 5 minutos a 25°C, seguida de incubação à temperatura de 50°C durante 60 minutos e, por último, a uma etapa final de 70°C por 20 minutos para ocorrer a transcrição reversa do RNA³⁵. Ao final, o material foi estocado à -20°C.

3.5.2.2 PCR e Nested-PCR do HAV-RNA

Buscando detectar o HAV-RNA, foi utilizado um protocolo Nested-PCR para amplificação de um fragmento de 247pb da região VP1/2A do genoma viral, conforme descrito por De Paula et al. (2002)³⁵. Na reação de RT-PCR foi preparado um mix contendo: 9,5µL de água RNA/DNase free (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2,5µL de tampão da Taq polimerase (10X) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) a 25mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 4µL dNTPs (1,25mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1µL de oligonucleotídeos F-06 e de F-07 (5mM) (Tabela 3.1), 0,5µL de Taq polimerase (2,5U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5µL do cDNA. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador de forma que, após a desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, foram submetidas a 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 40°C por 30 segundos para hibridização dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para

síntese do DNA. Após o último ciclo, uma etapa de 72°C por 7 minutos foi acrescentada para alongamento final das cadeias de DNA.

Para a Nested-PCR, foram preparados mix contendo: 13,5µL de água RNA/DNase free (1U/ul) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2,5µL de tampão da Taq polimerase (10X) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5 µL de MgCl₂ a 25Mm (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 4µL dNTP's (1,25mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1µL de cada um dos oligonucleotídeos F-08 e F-09 (5Mm) (Tabela 3.1), 0,5µL Taq polimerase (2,5U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 2µL do produto do RT-PCR. As amostras foram colocadas no termociclador e após a desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, foram submetidas a 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 48°C por 30 segundos para hibridização dos oligonucleotídeos, 72°C por 1 minuto para síntese do DNA e, por último, seguiu-se uma elongação adicional de 72°C por 7 minutos.

Como controle positivo, foi utilizado HAV-RNA extraído a partir do HAV purificado, obtido após cultivo (carga viral de 10⁷cópias/mL) e oriundo do acervo do LADTV, e, como controle negativo, foi utilizada água DNase/RNase free, em cada reação.

Os iniciadores utilizados nas reações descritas acima encontram-se listados na Tabela 3.1 a seguir:

Tabela 3.1: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e Nested-PCR para a região-alvo VP1/2A, conforme De Paula et al., 2002.

Reação	Direção	Iniciador	Localização (nt)	Sequência (5'-3')	Amplicon
PCR	Senso	F-06	+2897	CTATTCAGATTGCAAATTAYAAT	391pb
	Antisenso	F-07	-3288	AAYTTCATYATTTTCATGCTCCT	
Nested-PCR	Senso	F-08	+2949	TATTTGTCTGTYACAGAACAATCAG	— 247pb
	Antisenso	F-09	-3196	AGGRGGTGGAAAGYACTTCATTTGA	

3.5.2.3 Detecção do B19V-DNA

A presença de B19V-DNA nas amostras de plasma foi avaliada por PCR, conforme descrito por Durigon et al. (1993)³¹⁶, utilizando oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 284pb da região NS1 do genoma viral. Para amplificação desta região, foi preparado um mix de reação utilizando 13,5µL de água DNase/RNase free (Invitrogen, Califórnia, EUA), 2,5µL de tampão 10x (Invitrogen, Califórnia, EUA), 2µL de dNTP (10 mM) (Invitrogen, Califórnia, EUA), 0,75µL de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen, Califórnia, EUA), 0,25µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL)

(Invitrogen, Califórnia, EUA), 0,5µL de oligonucleotídeo senso (P1 F) (5µM) e 0,5µL de oligonucleotídeo antisenso (P6 R) (5µM) (Integrated DNA Technologies, Iowa, Estados Unidos da América). Em seguida, 5µL de DNA extraído das amostras foi aplicado à reação.

A termociclagem consistiu em: incubação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de incubação a 94°C por 45 segundos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e extensão final com incubação a 72°C por 7 minutos. Após a reação, os produtos de PCR foram armazenados a -20°C. Foram utilizados controles positivo e negativo oriundos do estoque de amostras do LADTV nas reações.

3.5.2.4 Semi-Nested PCR do B19V-DNA

Com o objetivo de determinar os genótipos das amostras de B19V encontradas, foi realizado *Semi-Nested* PCR utilizando-se oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 476pb da região do genômica que codifica as proteínas do capsídeo viral VP1/VP2 (Tabela 3.2)³¹⁶. Para isso, foi preparado um *mix* de reação utilizando 16µL de água DNase/RNase free (Invitrogen, Califórnia, EUA), 2,5µL de tampão (10X) (Invitrogen, Califórnia, EUA), 0,75µL de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen, Califórnia, EUA), 2µL de dNTP (1,25mM) (Invitrogen, Califórnia, EUA), 0,5µL do *primer* senso (P12 F) (20µM) e 0,5µL do *primer* antisenso (P16 R) (20µM) (Integrated DNA Technologies, Iowa, Estados Unidos da América) e 0,25µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL) (Invitrogen, Califórnia, EUA). Em seguida, foi adicionado ao mix 2,5µL do B19V-DNA extraído, de forma que o volume final da reação foi de 25µL. A termociclagem da PCR ocorreu conforme as seguintes etapas: uma etapa inicial de 5 minutos à 94°C, desnaturação por 45 segundos à 94°C, seguida por 55,8°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com a extensão final ocorrendo a 72°C por 7 minutos.

Como controle positivo, foi utilizado B19V-DNA extraído a partir do sangue de placenta de uma gestante de 40 anos com idade gestacional de 13 semanas e que sofreu aborto (carga viral de 10¹¹cópias/mL), proveniente do estoque de amostras do LADTV. Como controle negativo, foi utilizada água DNase/RNase *free*.

Para o *Semi-Nested* PCR, foi utilizado 17,5µL de água DNase/RNase free (Invitrogen, Califórnia, EUA), 2,5µL de tampão (10X) (Invitrogen, Califórnia, EUA), 0,75µL de MgCl₂ (50Mm) (Invitrogen, Califórnia, EUA), 2µL de dNTP (1,25mM) (Invitrogen, Califórnia, EUA), 0,5µL do *primer* senso (P13 F) a 20µM e 0,5µL do *primer* antisenso (P16 R) a 20µM (Integrated DNA Technologies, Iowa, Estados

Unidos da América) e 0,25µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL) (Invitrogen, Califórnia, EUA). Em seguida, foi adicionado 1µL do produto de PCR1 e submetido ao termociclador. A termociclagem consistiu em 5 minutos à 94°C, seguida pela etapa de 35 ciclos de desnaturação de 45 segundos à 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, finalizando com uma etapa de extensão por 1 minuto à 72°C e extensão final por 7 minutos à 72°C. Após a reação, os produtos foram armazenados a uma temperatura de -20°C.

Tabela 3.2: Oligonucleotídeos utilizados na PCR e na Semi-Nested PCR para NS1 e VP1/VP2, conforme Durigon et al., 1993.

Direção	Iniciador	Localização (nt)	Sequência (5´-3´)	Região-alvo	Amplicon
Senso	P1	1399-1422	AAAAATACACTGTGGTTTTATGGG	NS1	284pb
Antisenso	P6	1682-1659	GAGTACCTGTGGTTATAACCAGCAA		
Senso	P12	4127-4148	CAGCCATACCACCACTGGGACA	VP1/VP2	563pb
Antisenso	P16	4689-4665	AGTACATATGGTAAATGACCTGCTG		
Senso	P13	4214-4237	GACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTG	VP1/VP3	476pb
Antisenso	P16	4689-4665	AGTACATATGGTAAATGACCTGCTG		

3.6 PCR em tempo real e determinação de carga viral

Posterior à etapa de extração de ácidos nucleicos, tanto nas amostras individuais de plasma, quanto nas obtidas sob a forma de *minipools*, foram realizadas PCR em tempo real para detecção e quantificação das cargas virais de HAV e de B19V utilizando-se o sistema Taqman 7500 da Applied Biosystem (Real-time PCR TaqMan - Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

3.6.1 PCR em tempo real e determinação de carga viral de HAV

Para investigar a presença de HAV-RNA, foi realizado *One Step* RT-PCR em tempo real, utilizando-se o kit AgPath One Step Real Time PCR Systems (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA), por meio da metodologia de TaqMan®. A reação amplifica parcialmente a região 5'NC dos genótipos de HAV circulantes no Brasil, IA e IB, e tem sensibilidade de 10 cópias/reação¹⁵⁴ (Tabela 3.3). Como curva-padrão, foi utilizado um oligo-ultrâmero sintético (4nmol) correspondente à região não-codificadora 5' (5' NCR) do HAV (cepa HAF-203), conforme descrito por de Tourinho et al.,2015 (Tabela 3.3)³¹⁷.

Tabela 3.3: Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR em tempo real para detecção e quantificação de HAV-RNA, conforme Tourinho et al., 2015.

Direção	Localização (nt)	Sequência (5'-3')	Tamanho
Senso (5 NCF)	86-109	CTGCAGGTTTCAGGGTTCTTAAATC	23pb
Antisenso (5 NCR)	219-240	GAGAGCCCTGGAAGAAAGAAGA	21pb
Sonda FAM	198-218	5FAM-ACTCATTTCACGCTTTCTG	20pb
Oligo-ultrâmero (Curva-padrão)		5'-TTCGTGAGAGCCCTGGAAGAAAGA AGACGTATCAGAAAGCGTGAAAAATGA GTATGCGTGATTTAAGAACCCTGAACC TGCAGCTGATA-3'	89pb

Para cada reação, foi preparado, em gelo, Mastermix Ag-Path-ID™ One Step RT-PCR (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) contendo 2µL de água DNase/Rnase free, 1µL de 25x RT-PCR Mix de enzimas (1x), 1µL de Detection Enhancer (1x), 1,25µL de oligonucleotídeos senso (5 NCF) a 20µM e 1,25µL de oligonucleotídeos antisenso (5 NCR) a 20µM, 12,5µL de tampão 2x RT-PCR (1x) e 1,0µL de sonda 5'NC (10µM). Em seguida, foram adicionados 5µL de RNA extraído, gerando um volume final de 25µL para cada reação, de forma que cada uma foi aplicada em uma cavidade de uma placa de 96 poços (MicroAmp® Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

As condições consistiram em 40 ciclos compostos pelas seguintes etapas: transcrição reversa por 10 minutos à temperatura de 45°C, seguida de inativação e desnaturação por 10 minutos a 95°C, amplificação a 95°C por 15 segundos e, após, uma etapa final de 45°C por 45 segundos.

3.6.2 PCR em tempo real e determinação de carga viral de B19V

Para investigar a presença de B19V-DNA nas amostras analisadas, foi realizada PCR em tempo real otimizada *in house*, conforme Alves et al. (2019) para a amplificação da região NS1 do B19V (genótipos I e III), com sensibilidade de 13UI/mL²⁹¹. Foi utilizado o kit Taqman Master Mix Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, EUA) com a metodologia de TaqMan®. O conjunto de oligonucleotídeos utilizados, a sonda marcada na região 5' com 6-Carboxifluorescein, e a curva-padrão sintética, estão demonstrados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real para detecção e quantificação de B19V-DNA, conforme Alves et al., 2019.

Direção	Localização (nt)	Sequência (5´-3´)	Tamanho
Senso (E1905)	1905-1923	TGCAGATGCCCTCCACCCA	20pb
Antisenso (E1987)	2007-1987	GCTGCTTTCACTGAGTTCTTC	20pb
Sonda FAM	1925-1951	6FAM- ACCTCAAACCACCCCAATTGTCACAMGBNFQ	26pb
Oligo-ultrâmero (Curva-padrão)	1905-2009	TGCAGATGCCCTCCACCCAGACCTCAAACC ACCCCAATTGTCACCAGTATCAGCAGTGGTG AAAGCTCTGAAGAAGCTCAGTGAAAGCAGCC	104pb

Foi preparada, em gelo, uma mistura contendo os reagentes oriundos do kit utilizado, sendo adicionados 14,5µL de Taqman Mastermix 2x (Thermo Fisher Scientific, EUA), 2µL de água Rnase/Dnase free (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1,25µL do *primer* senso E1905 (20µM) e 1,25µL do *primer* antisenso E1987 (20µM) (Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA) e 1µL de sonda NS1 FAM (10µL) (Thermo Fisher Scientific, EUA). Posteriormente, foram acrescentados 5µL de DNA, totalizando 25µL em cada reação.

A termociclagem seguiu 40 ciclos de incubação, sendo iniciada por uma etapa de 2 minutos à temperatura de 50°C, seguida de um período de 10 minutos à 95°C e, após, 95°C durante 30 segundos, sendo finalizada com uma etapa de 60°C por 1 minuto.

3.7 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR (*amplicons*) foram separados por eletroforese em gel de agarose à concentração de 1,5% contendo tampão Tris/Acetato/Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (TAE) 1x (50x – 242 g de Tris base/57,1 mL de ácido acético glacial/100 mL de EDTA 0,5 M pH: 8,0), agarose (Gibco, EUA) e 0,5% de brometo de etídio a 0,5µg/mL (Invitrogen, EUA). Em seguida, foram aplicados ao gel de agarose 8µL de cada produto da PCR e 2µL de tampão de amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol). Foram utilizados 6µL do padrão de peso molecular 100pb (Norgen Biotek Corporation, Ontario, Canadá). Os produtos amplificados foram visualizados em fotodocumentador Kodak Gel Logic 2200 (Hyland Scientific, Washington, USA).

3.8 Avaliação da presença de inibidores de PCR

A presença de inibidores de qPCR foi avaliada em algumas amostras que foram positivas na PCR convencional e, no entanto, foram negativas na qPCR, por meio da utilização de um controle positivo interno endógeno, que compreende oligonucleotídeos e sonda marcada na extremidade 5' por uma fluorescência VIC™ para um alvo do genoma humano, denominado RNaseP (Applied Biosystems, Califórnia, EUA, Número de catálogo 4316844).

A este controle interno comercial foram adicionados 5µL de B19V-DNA extraído, o que permitiu a amplificação simultânea da sequência-alvo deste controle interno e do genoma do B19V. O preparo da mistura para a reação e as condições da realização da PCR em tempo real foram as mesmas estabelecidas no item 3.5.3.

3.9 Avaliação da infecciosidade das amostras de plasma por meio da detecção de partículas virais

Com o objetivo de avaliar a presença de partículas virais infecciosas nas amostras de plasma que foram positivas para B19V-DNA, foi realizado um método baseado no pré-tratamento da amostra com uma endonuclease, seguido de qPCR, de acordo com o descrito por Alves et al. (2021 *in press*), que permite a diferenciação de B19V-DNA encapsidado de B19V-DNA "Naked". Para isto, foi realizado o pré-tratamento do plasma, antes de uma nova etapa de extração de ácidos nucleicos, com a endonuclease Benzonase®³¹⁸.

A primeira etapa consistiu na adição de 1,5µL de Benzonase™ (Sigma-Aldrich, EUA) a 100µL de plasma, e foi seguida de incubação à temperatura de 37°C pelo período de 1 hora, em agitação mecânica de 120 rotações por minuto (RPM). Após, foram acrescentados 100µL de solução tampão fosfato-salino (PBS) para obtenção de um volume final de 200µL, necessário para iniciar a etapa de extração de ácidos nucleicos, que foi realizada utilizando-se kits comerciais de extração, conforme disposto no item 3.5.1.

3.10 Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética

Para caracterizar os genótipos dos isolados de HAV e de B19V e avaliar os padrões de circulação dos mesmos, os produtos de PCR para ambos os vírus foram

submetidos ao sequenciamento nucleotídico seguido de análise filogenética, baseada na região parcial VP1/2A do HAV e de VP1/VP2 do B19V.

Os isolados de HAV e de B19V foram genotipados por meio de sequenciamento direto do produto de PCR de 247pb e 476pb, respectivamente, após serem purificados da reação de Nested-PCR. A purificação desse material foi realizada com um kit comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hillden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a reação de sequenciamento de DNA, foi feita uma mistura em tubos de poliestireno de 1,5mL livres de nucleases e devidamente identificados, com 4,5µL de água RNase/DNase free, 1µL de oligonucleotídeos específicos para HAV (F8 e F9)³⁵ e para B19V (P13 e P16)³¹⁶ a 3,2pmol e 2µL do respectivo *amplicon* obtido na etapa de Nested-PCR. O sequenciamento foi realizado em ambas as direções, senso e antisenso.

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas na Plataforma de Sequenciamento de DNA do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde/PDTIS (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), onde o sequenciamento foi realizado utilizando o kit BigDye 40 Terminator 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, California, EUA) no termociclador Gen Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, California, EUA) e o sequenciador ABI3730xl-96 capilares (Applied Biosystems, California, EUA).

Os eletroferogramas das sequências nucleotídicas obtidas foram analisados pelo programa BioEdit 7.2.5, a partir da observação de picos únicos das sequências. Posteriormente, as sequências que apresentaram boa qualidade foram comparadas a outras sequências depositadas no Genbank por meio da ferramenta BLAST. Em seguida, estas sequências foram alinhadas e editadas, com a retirada das regiões correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores, pelo método Clustal W do programa BioEdit 7.2.5. As árvores filogenéticas foram reconstruídas pelo método Máxima Verossimilhança com o modelo Tamura-Nei³¹⁹ com *bootstrap* de 1000 repetições, utilizando-se o programa MEGA 6.0^{320,321}.

3.11 Detecção de marcadores sorológicos específicos para HAV e B19V

Do período 2018-2019, as amostras de plasma dos doadores de sangue que foram positivas para HAV-RNA ou para B19V-DNA foram submetidas ao teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-HAV IgM, anti-HAV total, anti-B19V IgM e

anti-B19V IgG, com o objetivo de avaliar a fase da infecção. Para isto, foi utilizado o kit Bioelisa HAV IgM e HAV total – BLOKIT (Biokit, S.A. Barcelona, Espanha), para HAV, e o kit Serion Elisa Parvovirus B19 IgM/IgG (Virion Serion Ltd, Alemanha), para B19V.

Todas as amostras provenientes do período de surto epidêmico de hepatite A foram submetidas ao ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos anti-HAV IgM/total e anti-B19V IgM/IgG. Foram utilizados o kit Bioelisa HAV IgM e HAV total – BLOKIT (Biokit, S.A. Barcelona, Espanha) e o kit Serion Elisa Parvovirus B19 IgM/IgG (Virion Serion Ltd, Alemanha), para HAV e B19V, respectivamente.

3.12 Avaliação do risco de transmissão transfusional e análise estatística

Uma modelagem estatística foi aplicada para estimar o número de bolsas de sangue infectadas com B19V ou HAV liberadas pela Hemorrede do Rio de Janeiro para doação, entre os anos de 2018 e 2019, assim como para estimar o risco de transmissão transfusional destes vírus. Os parâmetros do modelo compreenderam a prevalência de B19V-DNA e HAV-RNA entre os doadores de sangue analisados neste estudo e dados obtidos da literatura, tais como o número de bolsas de sangue liberadas pela Hemorrede nos anos de 2018 e 2019 e a probabilidade do receptor se infectar com B19V ou HAV dado que recebeu uma bolsa de sangue contaminada.

Para estimar o número de bolsas de sangue infectadas com B19 ou HAV liberadas pela Hemorrede do Rio de Janeiro para doação, entre os anos de 2018 e 2019, foram considerados apenas os resultados positivos ou negativos nos testes moleculares, excluindo os casos indeterminados. Desta forma, a prevalência de B19V-DNA e HAV-RNA observados neste estudo foi multiplicada pelo número total de bolsas liberadas (353.302 bolsas), entre os anos de 2018 e 2019 (180.466 e 172.836, respectivamente)³²².

Desta mesma maneira, foi estimada taxa de doações infecciosas multiplicando a taxa de bolsas infectadas pela taxa de bolsas infecciosas. Para o B19V, de acordo com parâmetros baseados na literatura, foram consideradas como infecciosas as bolsas de plasma cujas cargas virais apresentaram valores $\geq 10^4$ UI/mL¹⁹⁵ e que eram negativas para anti-B19 IgG. Para o HAV, não há consenso na literatura, apenas relatos de casos de transmissão a partir de cargas virais $\geq 10^3$ UI/mL. Desta forma foram consideradas infecciosas as bolsas de plasma cujas cargas virais apresentaram valores $\geq 10^3$ UI/mL¹⁹⁵ e que eram negativas para anti-

HAV. Neste modelo de estudo, foi considerada uma transmissibilidade de 100% nas doações que atendiam esses critérios.

A fim de avaliar se a incidência de hepatite A foi significativamente maior entre os doadores de sangue “envolvidos no surto” que em doadores do Rio de Janeiro, as incidências das infecções entre os doadores de sangue do período entre 2018 e 2019 foram comparadas com as incidências entre os doadores do período de surto epidêmico de hepatite A. As análises e intervalos de confiança foram calculados utilizando o teste binomial exato com 95% de confiança. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software R, versão 4.0.4, no programa estatístico RStudio (versão 1.4.1106, Boston, Massachusetts, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Detecção de HAV-RNA e B19V-DNA

4.1.1 Em doadores do Rio de Janeiro

Do total de 184 *minipools* de plasma analisados, em nenhum (0%) foi detectada presença de HAV-RNA, por meio de PCR em tempo real. Já para B19V-DNA, três *minipools* (1,6%) apresentaram resultados positivos, sendo encontradas cargas virais de $6,60 \times 10^4$ UI/mL a $2,01 \times 10^6$

Os três *minipools* considerados positivos para presença de B19V-DNA foram abertos e cada uma das seis amostras presentes nos mesmos foram submetidas individualmente a uma nova PCR em tempo real. Foi detectada apenas uma amostra B19V-DNA positiva em cada um dos *minipools*, com cargas virais de $2,60 \times 10^3$ a $3,07 \times 10^7$ UI/mL (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Cargas virais dos *minipools* positivos para B19V-DNA e de suas respectivas amostras individuais, por meio de PCR em tempo real

Número do <i>minipool</i>	Carga viral (UI/mL)	Número da amostra individual	Carga Viral (UI/mL)
DS190 - 24	$2,01 \times 10^6$	DS190-239	ND
		DS190-240	ND
		DS190-241	$3,02 \times 10^7$
		DS190-242	ND
		DS190-243	ND
		DS190-244	ND
DS190 - 41	$5,04 \times 10^4$	DS190-341	ND
		DS190-342	ND
		DS190-343	ND
		DS190-344	ND
		DS190-345	ND
		DS190-346	$2,60 \times 10^3$
DS195 - 21	$6,60 \times 10^4$	DS195-197	ND
		DS195-198	ND
		DS195-199	ND
		DS195-200	$3,07 \times 10^7$
		DS195-201	ND
		DS195-202	ND

ND = Não detectado

Entre as 100 amostras obtidas diretamente de bolsas individuais de plasma congelado, submetidas à PCR convencional, o HAV-RNA foi detectado em duas (2%) amostras, enquanto o B19V-DNA foi encontrado em apenas uma (1%) amostra de plasma. As cargas virais presentes na amostra positiva para B19V-DNA e em uma amostra positiva para HAV-RNA não puderam ser quantificadas em virtude da presença de inibidores de PCR em tempo real, cuja presença foi avaliada por meio do controle endógeno RNaseP, sendo observados resultados negativos neste teste. A amostra restante HAV-RNA positiva apresentou carga viral de $1,58 \times 10^5$ UI/mL.

Ao todo, nos doadores do Rio de Janeiro, foram detectadas duas (n=2) amostras positivas para HAV-RNA e quatro (n=4) para B19V-DNA, o que corresponde a incidência de 0,17% (2/1.204) e 0,33% (4/1.204), respectivamente. Portanto, a taxa de incidência de hepatite A em doadores de sangue foi de 1,66 a cada 1.000 doadores e de B19V foi de 3,32 a cada 1.000 doadores.

4.1.2 Em doadores do Vidigal e Rocinha

Para avaliar o impacto de surtos epidêmicos na incidência da infecção pelo HAV em doadores de sangue e na transmissão transfusional, foram analisadas 42 amostras de plasma de doadores de sangue provenientes de bairros do Rio de Janeiro (Vidigal e Rocinha) onde foram relatados surtos de hepatite A.

Dentre o total de 42 amostras, 29 (69,05%) foram coletadas no ano de 2017 e 13 (30,95%) no ano de 2018. Quanto às características destes doadores, 55% (n=23) eram do sexo masculino e a faixa etária dos 20 aos 30 anos de idade foi mais frequente (47,6%). A distribuição dos doadores de acordo com sexo e faixa etária pode ser observada na Figura 4.1.

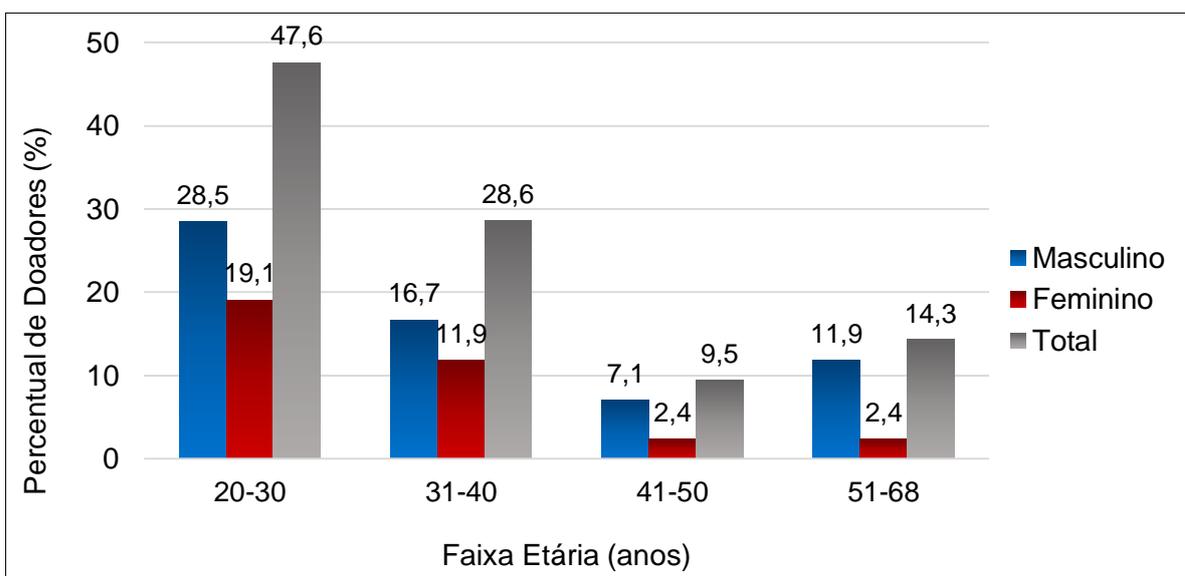


Figura 4.1: Caracterização da população de doadores de sangue oriundos dos bairros Vidigal e Rocinha, de acordo com sexo e faixa etária (n=42).

Entre as 42 amostras de plasma testadas, quatro (9,52%) foram consideradas HAV-RNA positivas por meio de PCR convencional. No que se refere ao ano de doação destas amostras, três (75%) amostras foram coletadas em 2017 e uma (25%) em 2018. Em relação ao sexo e à idade dos doadores, três (75%) amostras de plasma foram obtidas de doadores do sexo masculino, com idades entre 32 e 59 anos, e uma (25%) amostra foi obtida a partir de doador do sexo feminino, com idade de 24 anos (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Detecção de HAV-RNA de acordo ano de doação, sexo e idade dos doadores de sangue dos bairros Vidigal e Rocinha.

Amostra	Ano de doação	Doador de sangue	
		Sexo	Idade (anos)
DSV05	2017	M	32
DSV12	2017	F	24
DSV22	2018	M	59
DSV32	2017	M	43

M = Masculino; F = Feminino

Quanto à detecção de B19V-DNA, do total de 42 amostras de plasma coletadas durante o período de surto de hepatite A e testadas em PCR convencional, apenas uma (2,4%) foi positiva. Esta amostra foi coletada no ano de 2017, a partir de um doador de sangue do sexo masculino, com idade de 61 anos.

4.2 Detecção de partículas virais infecciosas por meio do pré-tratamento com Benzonase®

Em duas das amostras oriundas do Rio de Janeiro, provenientes dos *minipools* de plasma positivos para B19V-DNA (DS190-241 e DS190-346), em que não houve inibição da PCR em tempo real, foi realizado o pré-tratamento com endonuclease.

Após o tratamento com a endonuclease, em uma das amostras positivas para B19V-DNA (DS190-241), ocorreu redução da carga viral detectada, o que sugere que parte do DNA viral presente nesta amostra estava encapsidado em partículas virais. Para a segunda amostra (DS190-341), a carga viral tornou-se indetectável, indicando a presença de “DNA *naked*” e, portanto, ausência de partículas virais (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Cargas virais após o pré-tratamento com Benzonase® em três amostras positivas para B19V-DNA provenientes de *minipools* de plasma.

Amostra	Carga viral B19V (UI/mL)	
	Sem pré-tratamento	Com pré-tratamento
DS190-241	3,02x10 ⁷	2,7x10 ⁷
DS190-346	2,60x10 ³	ND
DS195-200	3,07x10 ⁷	NTV

ND = Não detectado; NTV = Não testado por volume de amostra insuficiente

4.3 Sequenciamento e análise filogenética das amostras positivas para HAV-RNA e B19V-DNA

As sequências nucleotídicas dos produtos de *Nested*-PCR de 247pb da região VP1/2A e de 476pb da região VP1/VP2, do HAV e do B19V, respectivamente, foram determinadas nas amostras consideradas positivas para HAV-RNA ou B19V-DNA.

Para confirmar se estas sequências encontradas eram de fato dos vírus testados e verificar a similaridade de tais sequências com sequências do HAV e do B19V depositadas no Genbank, utilizou-se a ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), conforme demonstrado nos itens 4.3.1 e 4.3.2 a seguir.

4.3.1 Sequenciamento e análise filogenética do HAV

Para caracterizar os genótipos do HAV, foram utilizadas sequências protótipos para os subgenótipos IA (HAS-15) e IB (HAF-203 e HM-175), e IIA (SLF88) e IIB (CF-53), depositadas no Genbank (Anexo 2).

A análise filogenética realizada revelou que as amostras de HAV obtidas de doadores do Rio de Janeiro (n=2) foram classificadas como subgenótipos IB. Por outro lado, as quatro amostras provenientes de doadores dos bairros de Vidigal e Rocinha foram classificadas como subgenótipos IA (n=2) e IB (n=2) (Figura 4.2).

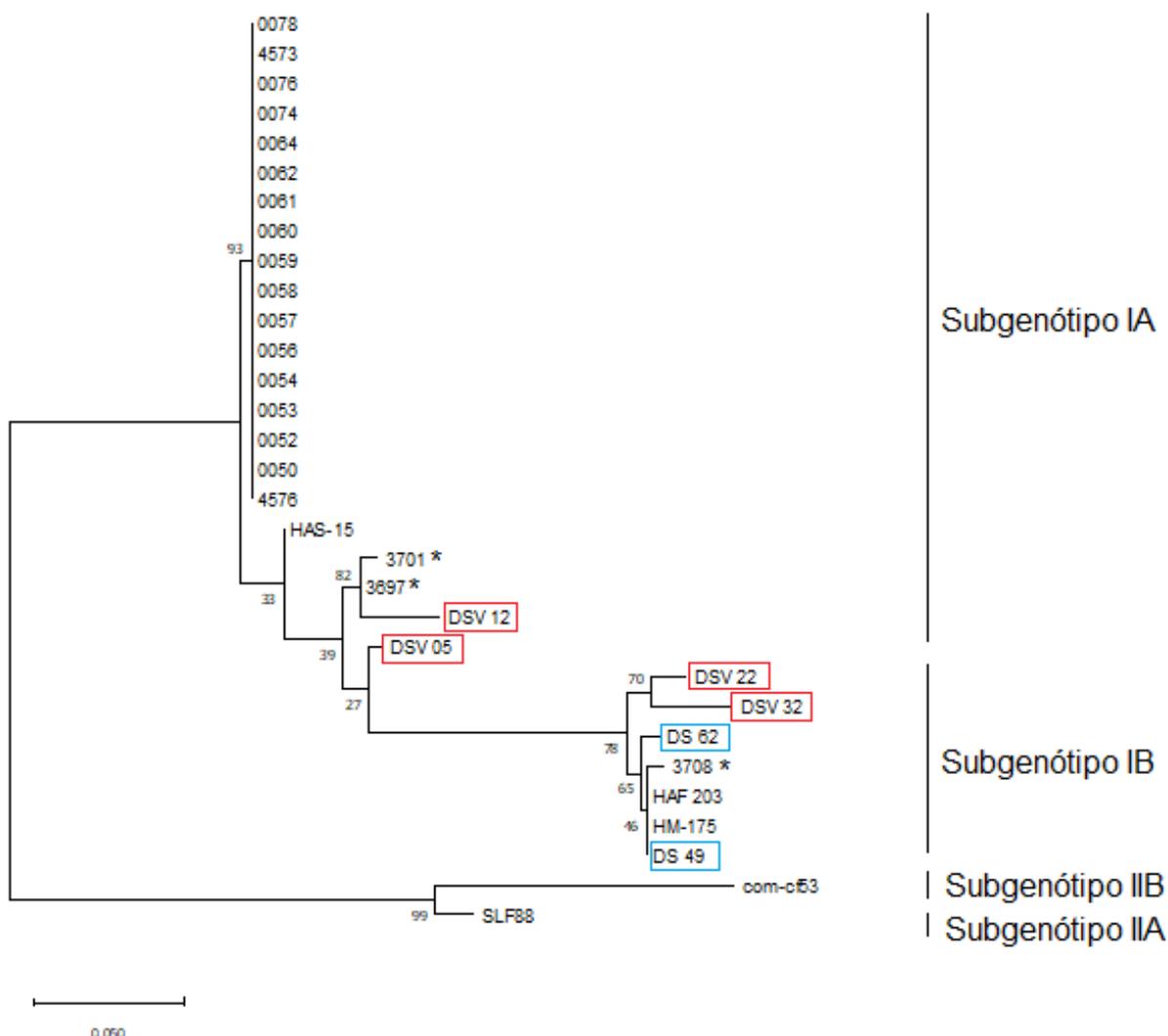


Figura 4.2: Árvore filogenética construída pelo método Máxima Verossimilhança utilizando o modelo Tamura-Nei com *bootstrap* de 1000 repetições, baseada nas sequências de 247pb da região VP1/2A do HAV com duas amostras detectadas em doadores do Rio de Janeiro, destacadas em azul, e quatro amostras detectadas em doadores do Vidigal/Rocinha, destacadas em vermelho. (*) Sequências 3697, 3701 e 3708 isoladas de amostras de água coletadas no bairro do Vidigal durante surto epidêmico (2017-2018). Sequências 4573, 4576 e 0050 a 0078 isoladas de soro de indivíduos envolvidos em surto de hepatite A no bairro do Vidigal (2017-2018). Sequência HAS-15: protótipo de HAV do subgenótipo IA. Sequências HAF-203 e HM-175: protótipos do HAV de subgenótipo IB. Sequência CF-53: protótipo do subgenótipo IIB. Sequência SLF88: protótipo do subgenótipo IIA.

4.3.2 Sequenciamento e análise filogenética do B19V

A classificação das amostras de B19V encontradas foi baseada nas sequências protótipos para os genótipos conhecidos do vírus (1a, 1b, 2, 3a e 3b), também depositadas no Genbank (Anexo 3).

Para três amostras de B19V detectadas a partir de doadores do Rio de Janeiro, a análise filogenética mostrou que todas pertencem ao subgenótipo 1a (Figura 4.3), comumente encontrado no Brasil. Para a quarta amostra oriunda de doadores do Rio de Janeiro e a única proveniente de doadores do Vidigal/Rocinha não foi possível obter sequências nucleotídicas com qualidade satisfatória para determinar o genótipo do B19V.

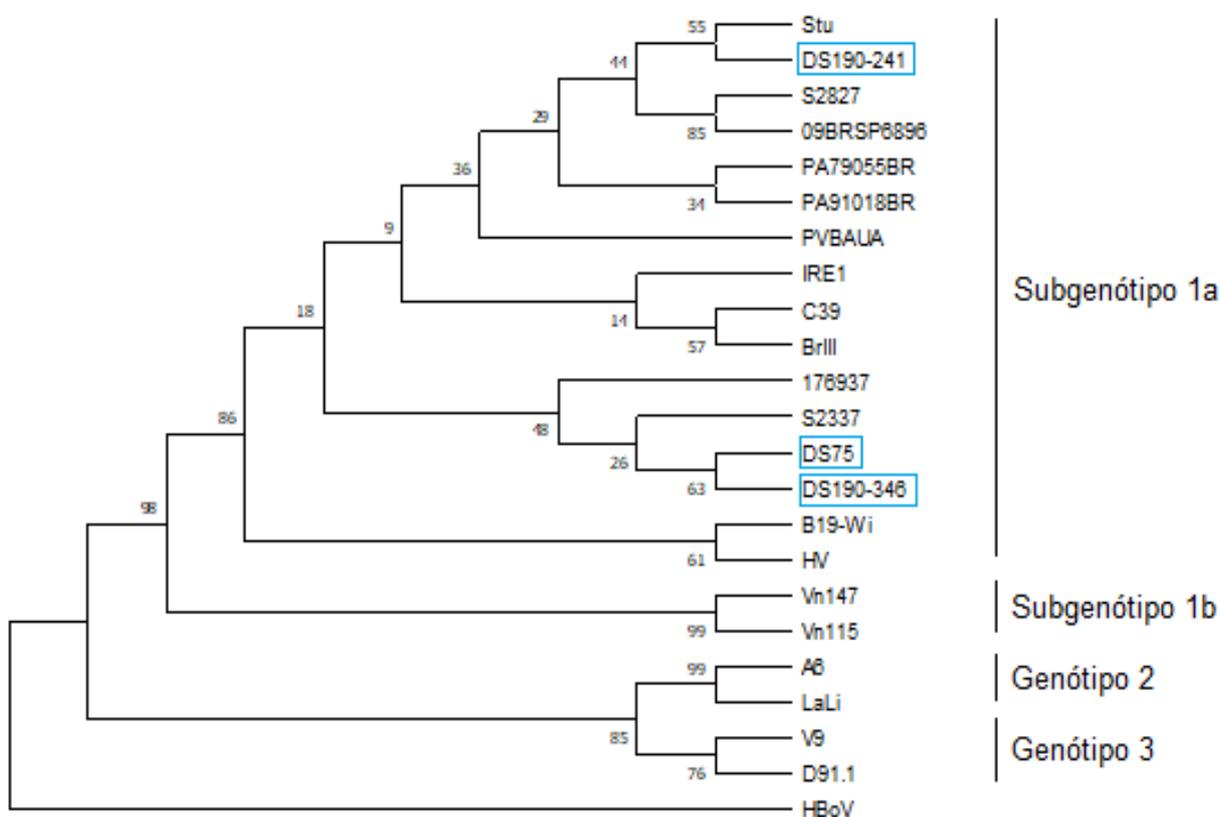


Figura 4.3: Árvore filogenética construída pelo método Máxima Verossimilhança utilizando o modelo Tamura-Nei com *bootstrap* de 1000 repetições, baseada nas sequências de 476pb da região VP1/VP2 do B19V com três amostras detectadas em doadores do Rio de Janeiro, destacadas em azul. Sequências Stu, S2827, 09BRSP6896, PA79055BR, PA91018BR, PVBAUA, IRE1, C39, BrIII, 176937, S2337, B19-Wi, HV: protótipos de B19V do subgenótipo 1a. Sequências Vn147 e Vn115: protótipos de B19V do subgenótipo 1b. Sequências A6 e LaLi: protótipos de B19V do genótipo 2. Sequências V9 e D91.1: protótipos de B19V do genótipo 3.

4.4 Detecção de anticorpos específicos para HAV e B19V

4.4.1 Em doadores do Rio de Janeiro

As amostras consideradas positivas para HAV-RNA ou para B19V-DNA foram submetidas ao ELISA para detecção de anticorpos IgM e totais, para HAV, e de anticorpos IgM e IgG, para B19V.

Com relação ao HAV, as duas (100%) amostras HAV-RNA positivas apresentaram resultados negativos tanto para anticorpos anti-HAV IgM, quanto para anticorpos totais, sugerindo que estes doadores de sangue estavam em um período de janela imunológica, o qual antecede a produção de anticorpos anti-HAV (Tabela 4.4).

Entre as quatro amostras em que o B19V-DNA foi detectado, os resultados observados foram distintos: duas amostras (50,0%) foram consideradas anti-B19V IgM positiva e IgG negativa; uma amostra (25,0%) apresentou resultado negativo para anticorpos IgM e positivo para anticorpos IgG; e uma amostra (25,0%) foi considerada negativa tanto para presença de IgM quanto para de IgG. Tais resultados foram analisados em conjunto com o pré-tratamento com endonuclease, quando possível (Tabela 4.5).

4.4.2 Em doadores do Vidigal e Rocinha

Todas as 42 (100%) amostras de plasma oriundas do período de surto de hepatite A foram anti-HAV IgM negativas, 27 (64,3%) amostras foram anti-HAV total positivas e uma (2,4%) obteve resultado indeterminado para anti-HAV total. Entre os quatro (n = 4) doadores HAV-RNA positivos, todos foram negativos tanto para anti-HAV IgM, quanto para anticorpos anti-HAV totais, indicando um período de janela imunológica.

Em relação aos marcadores sorológicos para B19V, todas as amostras de plasma foram consideradas negativas para a presença de anticorpos anti-B19V IgM, e 29 (69,0%) apresentaram resultados positivos para anti-B19V IgG. A única amostra positiva para B19V-DNA apresentou resultado negativo para IgM e positivo para IgG, indicando a possível ocorrência de uma infecção persistente pelo B19V neste indivíduo.

A detecção dos marcadores sorológicos das amostras HAV-RNA e B19V-DNA positivas encontradas estão demonstrados nas tabelas 4.4 e 4.5 a seguir.

Tabela 4.4: Perfil de marcadores sorológicos e moleculares das amostras positivas para HAV-RNA, provenientes de doadores do Rio de Janeiro e do Vidigal/Rocinha.

Amostra	Procedência da amostra	Ano de doação	PCR	Carga viral (UI/mL)		RNAseP [#]	Sorologia		Genótipo
			Convencional VP1/2A	Sem pré-tratamento*	Com pré-tratamento*		IgM	IgG	
Doadores do Rio de Janeiro									
DS49	Bolsa de plasma individual	2019	Positivo	NDI	NDI	ND	-	-	IB
DS62	Bolsa de plasma individual	2019	Positivo	1,58x10 ⁵	NTV	NTV	-	-	IA
Doadores do Vidigal/Rocinha									
DSV05	Bolsa de plasma individual	2017	Positivo	NDI	NDI	ND	-	-	IB
DSV12	Bolsa de plasma individual	2017	Positivo	NDI	NDI	ND	-	-	IB
DSV22	Bolsa de plasma individual	2018	Positivo	NDI	NDI	ND	-	-	IA
DSV32	Bolsa de plasma individual	2017	Positivo	NDI	NDI	ND	-	-	IA

NDI = Não detectado por presença de inibidores; ND = Não detectado; NTV = Não testado por volume de amostra insuficiente

*sem pré-tratamento com Benzonase e após tratamento com Benzonase, para avaliar a presença de vírions

RNAseP: Controle utilizado para avaliar a presença de inibidores de qPCR

Tabela 4.5: Perfil de marcadores sorológicos e moleculares das amostras positivas para B19V-DNA, provenientes de doadores do Rio de Janeiro e do Vidigal/Rocinha.

Amostra	Procedência da amostra	Ano de doação	PCR Convencional		Carga viral (UI/mL)		RNAseP [#]	Sorologia		Genótipo
			NS1	VP1/VP2	Sem pré-tratamento*	Com pré-tratamento*		IgM	IgG	
Doadores do Rio de Janeiro										
DS190-241	<i>Minipool</i> de plasma	2019	NT	+	3,02x10 ⁷	2,70x10 ⁷	NA	+	-	1A
DS190-346	<i>Minipool</i> de plasma	2019	NT	+	2,60x10 ³	ND	NA	-	+	1A
DS195-200	<i>Minipool</i> de plasma	2019	NT	+	3,07x10 ⁷	NTV	NTV	-	-	ND**
DS75	Bolsa de plasma individual	2019	+	+	2,84X10 ⁵	NTV	NA	+	-	1A
Doadores do Vidigal/Rocinha										
DSV27	Bolsa de plasma individual	2018	+	+	NDI	NDI	ND	-	+	ND**

NT = Não testado; NA = Não aplicável; ND = Não detectado; NTV = Não testado por volume de amostra insuficiente; NDI = Não detectado por presença de inibidores

*sem pré-tratamento com Benzonase e após tratamento com Benzonase, para avaliar a presença de vírions

RNAseP: Controle utilizado para avaliar a presença de inibidores de qPCR

**ND: Genótipos não determinados devido a qualidade insatisfatória dos eletroferograma

4.5 Avaliação do risco de transmissão transfusional

4.5.1 Número estimado de bolsas contaminadas com HAV e B19V nos doadores do Rio de Janeiro

A partir das amostras dos doadores do Rio de Janeiro, ao se estratificar por ano de coleta, o número esperado de bolsas contaminadas com HAV ou B19V foi calculado pelo produto entre a taxa de amostras positivas e o número de bolsas de plasma que foi liberada para doações em cada ano, pela Hemorrede do estado: 180.466 para 2018, 172.836 para 2019 e 353.302 no total. As amostras de plasma cujos resultados moleculares foram considerados indeterminados foram excluídas desta análise.

De julho a dezembro de 2018, foram obtidas 41 bolsas de plasma, das quais todas foram consideradas para o cálculo do B19V e 39 para o cálculo do HAV. Tanto para HAV-RNA, quanto para B19V-DNA, nenhuma amostra apresentou resultado positivo nos testes moleculares, de forma que o número esperado de bolsas contaminadas foi zero para ambos os vírus, neste período de tempo.

No ano de 2019, um total de 1.163 amostras de plasma foi obtido, do qual 1.128 e 1.159 foram consideradas para a análise estatística do HAV e do B19V, respectivamente. Para HAV-RNA, 0,18% (2/1.128) das amostras foi considerado positivo em PCR. A partir do produto entre esta prevalência de HAV-RNA (0,18%) e as 172.836 bolsas de plasma liberadas para doação, o número esperado de bolsas infectadas com HAV, em 2019, foi de 306. Já para B19V-DNA, foi encontrado uma prevalência de 0,34% (4/1.159), o que corresponde ao número esperado de 594 bolsas de plasma contaminadas.

No geral (período 2018-2019) foram encontradas prevalências de 0,17% e 0,33% para HAV-RNA e B19V-DNA, respectivamente, entre os doadores. Considerando que o número total de bolsas de sangue liberadas foi de 353.302 nestes dois anos, os números esperados totais de bolsas contaminadas com HAV e B19V foram de 605 e 1.174, respectivamente. Estes dados estão demonstrados na tabela 4.6.

Tabela 4.6: Número estimado de bolsas de plasma contaminadas com HAV e B19V em doadores do Rio de Janeiro, de acordo com ano de coleta.

Ano	Bolsas de Plasma	
	N	% (IC95%)
2018		
HAV		
Total considerado*	39	-
PCR-Positivo	0	0,00 (0,00-9,03)
PCR-Negativo	39	100,00 (90,97-100,00)
Número esperado de bolsas contaminadas	0 (0-16.287)	0,00 (0,00-9,03)
B19V		
Total considerado*	41	-
PCR-Positivo	0	0,0 (0,0-8,6)
PCR- Negativo	41	100,0 (91,4-100,0)
Número esperado de bolsas contaminadas	0 (0-15.528)	0,0 (0,0-8,6)
2019		
HAV		
Total considerado*	1.128	-
PCR-Positivo	2	0,18 (0,02-0,64)
PCR-Negativo	1.126	99,82 (99,36-99,98)
Número esperado de bolsas contaminadas	306 (37-1.104)	0,18 (0,02-0,64)
B19V		
Total considerado*	1.163	-
PCR-Positivo	4	0,34 (0,09-0,88)
PCR-Negativo	1.159	99,66 (99,12-99,91)
Número esperado de bolsas contaminadas	594 (162-1.518)	0,34 (0,09-0,88)
Geral (2018 e 2019)		
HAV		
Total considerado*	1.167	-
PCR-Positivo	2	0,17 (0,02-0,62)
PCR-Negativo	1.165	99,83 (99,38-99,98)
Número esperado de bolsas contaminadas	605 (73-2.182)	0,17 (0,02-0,62)
B19V		
Total considerado*	1.204	-
PCR-Positivo	4	0,33 (0,09-0,85)
PCR-Negativo	1200	99,67 (99,15-99,91)
Número esperado de bolsas contaminadas	1.174 (320-2.998)	0,33 (0,09-0,85)

*Bolsas de plasma apenas com resultados positivos ou negativos

4.5.2 Número esperado de bolsas potencialmente infecciosas para HAV e B19V no Rio de Janeiro

Em relação ao B19V, foram identificadas três bolsas de sangue com carga viral acima de 10^4 UI/mL e negativas para anti-B19V IgG, indicando uma taxa de doação infecciosa de 3 em 1.204 (0,25%, IC 95% 0,05-0,73). Para o HAV, foram detectadas duas bolsas de sangue com carga viral acima de 10^3 UI/mL e negativas para anti-HAV, indicando uma taxa de doação infecciosa de 2 em 1.204 (0,17%, IC 95% 0,02-0,62).

Considerando que o número total de bolsas de sangue liberadas para doação no Rio de Janeiro, no período de 2018-2019 foi de 353.302 e que as prevalências de HAV-RNA e B19V-DNA foram 0,17% e 0,25%, respectivamente, foram estimadas que 605 bolsas de plasma eram potencialmente transmissíveis para HAV e 880 bolsas eram potencialmente transmissíveis para B19V. Ao estratificar esta análise por ano, em 2018, não foram encontradas amostras HAV-RNA ou B19V-DNA positivas. Já em 2019, o número estimado de bolsas de sangue no Rio de Janeiro com potencial transmissivo foi de 306 (0,18%) para HAV e de 446 (0,65%) para B19V (Tabela 4.7).

Tabela 4.7: Número estimado de bolsas de sangue com potencial transmissivo de HAV e B19V em doadores do Rio de Janeiro, de acordo com ano de coleta.

Ano	Bolsas de Plasma	
	N	% (IC95%)
2018		
HAV		
Total considerado*	39	-
Com potencial transmissivo	0	0,00 (0,00-9,03)
Sem potencial transmissivo	39	100,00 (90,97-100,00)
Número esperado com potencial transmissivo	0 (0-16.287)	0,00 (0,00-9,03)
B19V		
Total considerado*	41	-
Com potencial transmissivo	0	0,0 (0,0-8,6)
Sem potencial transmissivo	41	100,0 (91,4-100,0)
Número esperado com potencial transmissivo	0 (0-15.528)	0,0 (0,0-8,6)
2019		
HAV		
Total considerado*	1.128	-
Com potencial transmissivo	2	0,18 (0,02-0,64)
Sem potencial transmissivo	1.126	99,82 (99,36-99,98)
Número esperado com potencial transmissivo	306 (37-1.104)	0,18 (0,02-0,64)
B19V		
Total considerado*	1.163	-
Com potencial transmissivo	3	0,26 (0,05-0,75)
Sem potencial transmissivo	1.160	99,74 (99,25-99,95)
Número esperado com potencial transmissivo	446 (92-1.300)	0,26 (0,05-0,75)
Geral (2018 e 2019)		
HAV		
Total considerado*	1.167	-
Com potencial transmissivo	2	0,17 (0,02-0,62)
Sem potencial transmissivo	1.165	99,83 (99,38-99,98)
Número esperado com potencial transmissivo	605 (73-2.182)	0,17 (0,02-0,62)
B19V		
Total considerado*	1.204	-
Com potencial transmissivo	3	0,25 (0,05-0,73)
Sem potencial transmissivo	1.201	99,75 (99,27-99,95)
Número esperado com potencial transmissivo	880 (182-2.567)	0,25 (0,05-0,73)

*Bolsas de plasma apenas com resultados positivos ou negativos

4.6 Avaliação do impacto de surto epidêmico de hepatite A na incidência dessa infecção em doadores de sangue

De um modo geral, a incidência de hepatite A nos doadores do Vidigal/Rocinha (9,52%, IC 95% 2,66-22,62) foi significativamente maior ($p < 0,001$) que a dos doadores do Rio de Janeiro (0,17%, IC 95% 0,02-0,62).

A análise estratificada mostrou que no ano de 2018, tanto o HAV, quanto o B19V, também mostraram incidências significativamente maiores ($p < 0,001$) entre os doadores destes bairros (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Comparação entre as prevalências de HAV-RNA e B19V-DNA de doadores de sangue do Rio de Janeiro e dos bairros Vidigal e Rocinha.

Ano	Bolsas de Plasma				p-valor
	Doadores do Rio de Janeiro		Doadores do Vidigal e Rocinha		
	N	% (IC95%)	N	% (IC95%)	
2018					
HAV					<0,001
Total considerado	39	-	13	-	
PCR-Positivo	0	0,00 (0,00-9,03)	1	7,69 (0,19-36,03)	
PCR-Negativo	39	100,00 (90,97-100,00)	12	92,31 (63,97-99,81)	
B19V					<0,001
Total considerado	41	-	13	-	
PCR-Positivo	0	0,0 (0,0-8,6)	1	7,69 (0,19-36,03)	
PCR- Negativo	41	100,0 (91,4-100,0)	12	92,31 (63,97-99,81)	
Geral					
HAV					<0,001
Total considerado	1.167	-	42	-	
PCR-Positivo	2	0,17 (0,02-0,62)	4	9,52 (2,66-22,62)	
PCR-Negativo	1.165	99,83 (99,38-99,98)	38	90,48 (77,38-97,34)	
B19V					0,1304
Total considerado	1.204	-	42	-	
PCR-Positivo	4	0,33 (0,09-0,85)	1	2,38 (0,06-12,57)	
PCR-Negativo	1.200	99,67 (99,15-99,91)	41	97,62 (87,43-99,94)	

5. DISCUSSÃO

A análise molecular de *pools* de plasma destinados à produção de hemoderivados por meio de testes moleculares vem sendo comumente utilizada por diversos autores de diferentes países na tentativa de avaliar não só a presença de determinados vírus, como HAV e B19V, mas também de analisar a segurança do material destinado à transfusão. No presente estudo, duas amostras provenientes de doadores do Rio de Janeiro, obtidas a partir de bolsas de sangue individuais, foram positivas para HAV-RNA, o que revelou uma prevalência de HAV-RNA de 0,17% (2/1.204) entre os doadores. Para B19V, foi detectada prevalência de B19V-DNA de 1,6% (3/184) *minipools* de plasma positivos, com cargas virais variando de 10^4 a 10^6 UI/mL. A análise das amostras individuais dos doadores do Rio de Janeiro (n=100), incluindo as oriundas da abertura de cada um dos *minipools* considerados positivos (n=1.104), revelou uma prevalência de B19V-DNA de 0,33% (4/1.204), com cargas virais de 10^3 e 10^7 UI/mL.

O vírus da hepatite A é um dos agentes causadores de hepatite aguda mais comuns em todo o mundo⁴. Na maior parte dos casos, a infecção causada por ele apresenta-se aguda e autolimitada, principalmente se os indivíduos infectados forem crianças. Embora os casos sejam em sua grande maioria assintomáticos, existem casos sintomáticos que evoluem para hepatite fulminante com possibilidade de insuficiência hepática aguda, podendo ocorrer até mesmo o óbito^{4,159,161}. A principal via de transmissão é fecal-oral, por meio de alimentos e água contaminados^{96,323}. Como a viremia se desenvolve antes do início dos sintomas, a transmissão por transfusão por sangue total, plasma fresco congelado, concentrados de plaquetas e hemácias tem sido descrita esporadicamente desde 1974^{161,324-327}. Os testes de triagem de anticorpos para HAV não são recomendados para triagem sorológica de doadores de sangue em nenhum país, incluindo o Brasil^{328,329}. Em contraste, após uma série de relatos provando a transmissão de HAV pelo fator VIII tratado com solvente e detergente, a indústria de hemoderivados passou a testar as fontes de plasma por HAV NAT^{328,329}. Em alguns países da Europa, a triagem de sangue e hemoderivados para presença de HAV-RNA é atualmente preconizada pela Farmacopeia Europeia, sendo realizada por pelo menos um teste NAT³³⁰.

Apesar dos dados sobre a prevalência do HAV-RNA em doadores de sangue não serem abundantes em todo o mundo, a prevalência observada neste trabalho (0,17%) foi maior que as descritas nos EUA, cujos valores variam de 0% (0/100.360),

em plasma fresco congelado, a 0.005% (6/1.297.945), em bolsas de sangue total³³¹, e na China, que recentemente apresentou 0% (0/5.030 e 0/728) de detecção entre doadores de sangue^{157,332}. Estas diferenças possivelmente podem ocorrer em razão dos distintos tamanhos amostrais, das populações de estudo, dos métodos moleculares utilizados e pelas condições socioeconômicas e geográficas dos locais de estudo³³².

No Brasil, não existem dados sobre a prevalência de HAV-RNA em doadores de sangue. O maior percentual encontrado neste estudo, possivelmente, pode ser justificado pelo período em que as amostras foram obtidas, uma vez que entre 2017 e 2018 foram relatados surtos de hepatite A em bairros do Rio de Janeiro. De modo semelhante, Gallian et al. (2019) apresentou dados similares em um estudo realizado na França, em 2018, no qual foi relatado um aumento da prevalência de HAV-RNA em doadores de sangue, de 0.86/10⁶ para 4,5/10⁶ doadores, após a ocorrência de um surto de hepatite A no país^{333,334}.

Neste estudo, não foi detectada presença de HAV-RNA nos *minipools* de plasma analisados, obtidos a partir de doadores do Rio de Janeiro. A ausência de detecção do genoma viral nestes *minipools* pode ser explicada por uma possível diluição das cargas virais, sobretudo se os valores das mesmas, caso estas estivessem presentes, fossem reduzidos. Isto é, em função da mistura de plasma de diferentes doadores, cargas virais com valores muito reduzidos podem ter sido diluídas abaixo do limite de detecção do teste molecular utilizado²⁹⁴.

O Parvovírus B19 é um vírus muito pequeno e que não possui envelope, o que torna sua remoção do plasma e de hemoderivados, por meio de métodos de filtração e de inativação viral, difícil de ser concluída com sucesso¹⁵⁷. Apesar da maioria dos indivíduos imunocompetentes apresentarem infecção pelo B19V assintomática ou com um curso clínico leve, as manifestações clínicas são comumente graves para indivíduos com determinado grau de imunocomprometimento, como gestantes, pacientes transplantados e em quimioterapia, para os quais produtos derivados do sangue podem ser frequentemente prescritos^{157,195}. Para prevenir a transmissão do B19V por meio de transfusão, a realização de testes moleculares para detecção do genoma viral no plasma doado foi estabelecida por alguns órgãos internacionais, como o FDA e a Farmacopeia Europeia³³⁵. Além disso, alguns países, tais quais Japão e Alemanha, introduziram testes de triagem de rotina baseados em diferentes metodologias, como ensaios de quimioluminescência^{195,336,337}.

Estudos mostram que a prevalência do B19V-DNA em doadores de sangue varia de acordo com a região e com a sazonalidade da infecção. No presente estudo, a prevalência total encontrada (0,33%) foi similar à detectada por estudos anteriores realizados em diferentes regiões do Brasil, cujos dados demonstram variação de 0,26% a 1,9% de detecção entre doadores de sangue^{195,297}. Em São Paulo, também na região Sudeste do país, Slavov et al., 2016, detectaram maior prevalência de B19V-DNA entre doadores (1,0%). Contudo, é importante destacar que o N amostral utilizado foi muito menor que o do presente estudo (100 e 1.204 doadores, respectivamente)²⁹⁶. No cenário internacional, recentemente na Austrália, um estudo detectou percentual semelhante entre doadores de sangue, sendo este de 0,26%²⁹⁵. Contudo, a detecção de B19V-DNA relatada nos EUA e na China variaram entre 0,88% e de 0,06% a 6,8%, respectivamente^{157,298,338,339}.

As cargas virais encontradas nos três *minipools* positivos para B19V-DNA apresentaram valores $\geq 10^4$ UI/mL. Este valor de carga viral é considerado pelo FDA e pela Farmacopeia Europeia como o limite em que *pools* de plasma B19V-DNA positivos são considerados seguros para utilização em fins transfusionais. Este parâmetro indica que tais *minipools* apresentam potencial transmissivo de B19V para os receptores, e sua exclusão das doações de hemoderivados deveria ser realizada³³⁵.

Em algumas amostras positivas para HAV-RNA ou B19V-DNA não foi possível realizar a detecção da carga viral em razão da presença de inibidores de PCR em tempo real. Estudos relatam que os mecanismos inibitórios podem variar, contudo, os inibidores de PCR geralmente exercem seus efeitos por meio da interação direta com o DNA, sendo capazes de degradar ou capturar o mesmo, com DNA polimerases, inibindo suas atividades enzimáticas, ou até mesmo com o sinal da fluorescência, no caso das reações de PCR em tempo real³⁴⁰⁻³⁴². Considerando que as amostras em que foi observada inibição foram obtidas diretamente a partir de bolsas de plasma congelado, sugere-se que algum componente presente no preparo das mesmas apresentou ação inibitória.

A partir das prevalências de HAV-RNA e B19V-DNA observadas neste trabalho, foi possível estimar o número de bolsas de sangue contaminadas dentro do total de bolsas liberadas pela Hemorrede estadual³²².

Em 2019, do total de 172.836 bolsas de sangue liberadas para doação, estimamos que 306 (0,18%) poderiam estar contaminadas com o vírus da hepatite A. Considerando todo o período do estudo (2018 a 2019), o número estimado foi de

605 bolsas dentro de 353.302 liberadas para doação (0,17%). Este número foi o mesmo para bolsas com potencial transmissivo em razão dos parâmetros de transmissibilidade adotados neste estudo.

Na literatura, não existe um valor consenso descrito a partir do qual hemoderivados podem ser considerados transmissivos para HAV. Relatos de casos indicam que cargas virais relativamente baixas podem ser capazes de infectar receptores, inclusive, gerando quadros graves, dependendo das condições de saúde destes indivíduos¹⁶¹.

Apesar da natureza esporádica da infecção aguda por HAV entre doadores de sangue observados neste estudo e da ausência de portadores crônicos de HAV, parece adequado avaliar a necessidade de triagem dessa infecção em doadores, sobretudo para receptores que fazem parte de grupos de risco para esta infecção, tais como indivíduos transplantados, imunocomprometidos e portadores de doenças hepáticas crônicas³⁴³. Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou um caso em que um receptor, passando por um transplante de medula óssea e portador de hepatite C crônica, evoluiu ao óbito em razão de uma hepatite fulminante 26 dias após a transfusão de concentrado de hemácias obtido a partir de um doador infectado com HAV.¹⁶¹. Na ausência de triagem prospectiva ou inativação viral eficaz, a limitação da transmissão do HAV por transfusão e a sua disseminação secundária dependem do recebimento e processamento de informações de pós-doação. Nem todos os casos de HAV em doadores são sintomáticos, mas a notificação de casos sintomáticos e a interrupção da transmissão poderiam ser melhoradas se descrições mais claras fossem dadas aos doadores em relação aos tipos de informações pós-doação que são relevantes para a segurança dos receptores.

As prevalências de B19V-DNA neste estudo foram de 0,34%, para 2019, e de 0,33% para 2018-2019. Estes percentuais refletem em 594 e 1.174 bolsas de sangue potencialmente contaminadas, respectivamente, para o ano de 2019 e para o período 2018-2019. No entanto, considerando a taxa de doações infecciosas, foram estimadas 446 (0,65%) bolsas de plasma com potencial transmissivo de B19V para o ano de 2019, e 880 para 2018-2019.

Desde a década de 1990, estudos relatam diferentes desfechos observados em receptores cujos hemoderivados transfundidos estavam contaminados com o B19V³⁴⁴. Em 1995, Zanella et al. relatou um caso de crise aplástica e insuficiência cardíaca transitória ocorridas em um receptor de concentrado de hemácias portador

de talassemia³⁴⁴. Ao longo dos anos, casos de crise aplástica transitória e aplasia de células vermelhas têm sido relatados em receptores imunocomprometidos e portadores de doenças crônicas, tais quais pacientes em quimioterapia e em portadores de hepatite C crônica e de leucemias de diferentes tipos^{345,346}. Recentemente, um caso relatado por Nagaharu et al. (2017) mostraram a transmissão transfusional de B19V para um receptor com quadro hemorrágico grave, que passou a apresentar trombocitopenia grave após a transfusão de concentrado de hemácias com carga viral de 10^4 UI/mL²⁹³. Neste estudo, o número estimado de bolsas com potencial transmissivo, somado ao fato de que a partir de uma única bolsa de plasma podem ser produzidos diferentes hemoderivados que podem vir a infectar mais de um receptor, também sugere a adoção de medidas de triagem para o B19V em hemoderivados, principalmente nos períodos de epidemia de eritema infeccioso²⁹³.

A prevalência geral de HAV-RNA em doadores residentes nos bairros Vidigal e Rocinha foi de 9,52%. Quando comparada com a taxa de detecção geral (0,17%) encontrada entre doadores residentes em outras localidades do Rio de Janeiro, esta prevalência foi significativamente maior ($p < 0,001$). No ano de 2018, comum entre os períodos de coleta de amostras de ambas as populações analisadas, o HAV e o B19V tiveram prevalências significativamente ($p < 0,001$) maiores entre os doadores residentes em Vidigal/Rocinha. Como já demonstrado anteriormente na França, no presente estudo, a ocorrência deste surto epidêmico e o consequente aumento no número de indivíduos infectados também impactou na maior frequência de detecção desse vírus entre doadores de sangue³³³. Em relação ao B19V, possivelmente a maior prevalência observada nessa população foi devido ao período do estudo (2017 a 2018), o qual coincidiu com um período epidêmico para B19V, configurada pelo aumento do número de casos de infecções exantemáticas entre crianças e gestantes no município. Contudo, a infecção causada pelo B19V não possui notificação compulsória, o que dificulta confirmar a ocorrência de surto epidêmico.

Entre os indivíduos HAV-RNA positivos, 75% pertenceram ao sexo masculino, com idades entre 30 e 60 anos. Segundo o Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais referente ao ano de 2018, na região sudeste do Brasil 68,2% dos casos de hepatite A ocorreram em indivíduos do sexo masculino, com idades entre 20 a 39 anos³⁴⁷. Outros estudos recentes demonstram dados concordantes com os encontrados neste estudo. Em 2018, Amado et al. demonstraram a ocorrência de um surto de hepatite A no Rio de Janeiro, com maior incidência também em homens, na faixa entre 20 e 29 anos¹²⁰. Este aumento no sexo masculino, sobretudo nesta faixa

etária, também foi relatado em outros países, principalmente entre homens que fazem sexo com homens^{29,112,348}.

A detecção de anticorpos específicos anti-HAV mostrou que 64,3% (n = 27/42) dos doadores do Vidigal e Rocinha eram anti-HAV total positivos. Este resultado é comparável à soroprevalência de hepatite A no Brasil (64%), entretanto, é maior que a soroprevalência da região sudeste, que é de aproximadamente 32%³⁴⁷. Possivelmente, a alta soroprevalência encontrada neste estudo é reflexo da maior exposição destes indivíduos ao vírus em razão da ocorrência do surto epidêmico, uma vez que foi detectado HAV-RNA em amostras de água utilizadas para consumo pela população local¹²⁰.

Entre as amostras HAV-RNA positivas, tanto a partir das duas oriundas de doadores do Rio de Janeiro, quanto das quatro detectadas nos doadores do Vidigal/Rocinha, foram observados resultados negativos tanto para anticorpos IgM, quanto para anticorpos totais. A ausência de detecção de anticorpos anti-HAV entre estes indivíduos sugere que as doações de sangue ocorreram durante o período de janela imunológica, que dura em média 28 dias e antecede os sintomas³⁴⁹. O longo período de incubação do HAV é um fator que pode influenciar no risco de transmissão transfusional, uma vez que é possível que doadores possam apresentar o vírus circulante no sangue no momento da doação e não tenham conhecimento sobre esta condição.

Para o B19V, a sorologia das amostras do Rio de Janeiro positivas nos testes moleculares revelou duas amostras (50%) anti-B19V IgM positivas e IgG negativas, sugerindo o curso de uma infecção aguda nestes doadores, no momento da doação. Em uma dessas amostras, foi possível realizar o pré-tratamento com endonuclease para avaliar o potencial infeccioso de tais amostras. O resultado obtido corroborou com a hipótese de infecção aguda em razão da leve diminuição da carga viral de $3,02 \times 10^7$ UI/mL para $2,70 \times 10^7$ UI/mL, mostrando que este valor se deve pela presença de partículas infecciosas resultantes da replicação viral ativa e indicando o potencial transmissivo de B19V a partir deste doador²⁴³. Baseado nestes dados, os hemoderivados oriundos deste doador deveriam ser descartados.

As amostras positivas de um doador do Rio de Janeiro e de um doador do Vidigal/Rocinha foram negativas para IgM e positivas para IgG anti-B19V, o que sugere a ocorrência de infecção persistente nestes doadores. Estudos anteriores já demonstraram que a persistência da infecção pelo B19V pode ocorrer por meses após a fase aguda em indivíduos imunocomprometidos, imunocompetentes e

também em doadores de sangue saudáveis^{212,218,300}. A partir do pré-tratamento com endonuclease em uma destas amostras, foi possível observar a redução da carga viral da ordem de 10^3 UI/mL para carga não detectável. Este resultado indica que o DNA detectado na metodologia molecular foi obtido a partir de “DNA *naked*”, indicando a ausência de partículas virais infecciosas, sugerindo uma infecção persistente e descartando o potencial transmissivo desta amostra. Em 2017, Reber et al. demonstraram a utilidade deste ensaio recentemente descrito por Molenaar-de Backer et al. (2016) para a correta interpretação de achados laboratoriais, incluindo para casos de infecção persistente pelo B19V^{243,292}.

Ainda para este vírus, em uma amostra foi encontrado resultado negativo para presença de anti-B19V IgM e IgG. Esta ausência de anticorpos específicos, apesar de uma carga viral detectável, pode ocorrer devido à formação de complexos imunes, compostos pela associação vírus-anticorpo, ou até mesmo pela quantidade de anticorpos produzida, que pode estar abaixo do limiar de detecção dos imunoenaios^{239,294}. Além disso, ainda existe a possibilidade da ocorrência de um período de janela imunológica neste doador.

A análise filogenética das sequências de HAV encontradas neste estudo revelou uma maior frequência de detecção do subgenótipo IB. Este subgenótipo predomina no Oriente Médio, entretanto, já foi associado a surtos de hepatite A na América do Sul^{4,38,39}, incluindo no Brasil, onde casos isolados causados por este subgenótipo e a co-circulação com o subgenótipo IA também já foram relatados^{34,56,57,350}.

O subgenótipo IA foi encontrado em duas das quatro amostras positivas nos doadores do Vidigal/Rocinha. Este subgenótipo foi, recentemente, associado a surtos de hepatite A ocorridos em diversos países da Europa e das Américas do Norte e do Sul^{28,29}. Em 2019, um estudo realizado no Brasil por Mello et al., demonstrou a circulação de cepas de HAV do subgenótipo IA envolvidas em surtos ocorridos na Europa entre HSH, revelando a ocorrência de sua circulação no Rio de Janeiro, que podem ou não estar restrita a este grupo de indivíduos⁵³. Em um estudo epidemiológico conduzido durante o surto de hepatite A ocorrido nestes bairros, o subgenótipo IA foi encontrado em amostras de água usadas para consumo da população¹²⁰. Neste presente estudo observou-se, uma provável relação entre as sequências do HAV isoladas a partir do plasma destes doadores de sangue e da água local, sugerindo uma provável infecção por meio de água contaminada com o vírus, além do contato pessoa-pessoa.

Todas as amostras B19V-DNA sequenciadas (n=3) foram classificadas como subgenótipo 1a. Este resultado já era esperado, uma vez que este subgenótipo é o que apresenta maior prevalência em todo o mundo, sendo inclusive já detectado no Brasil entre doadores de sangue. Estudos anteriores realizados no país, nos anos de 2012 e de 2017, detectaram apenas este mesmo subgenótipo em todos os doadores de sangue positivos para B19V-DNA, mostrando resultados concordantes com os observados neste trabalho e reafirmando a circulação do subgenótipo 1a no Brasil^{195,261}.

Este estudo apresenta algumas limitações. Em virtude da pandemia de SARS-CoV-2 e da consequente implantação de medidas restritivas, foi necessário adotar uma rotina de trabalho reduzida, o que culminou na diminuição do tempo para a realização de algumas etapas deste trabalho. Além disso, não foi possível realizar a quantificação de cargas virais, bem como o pré-tratamento com endonuclease, em algumas amostras em razão do volume insuficiente ou da presença de inibidores de PCR em tempo real nas mesmas, o que levou à realização de diferentes fluxogramas de trabalho. Outra limitação deste estudo compreende a carência do rastreamento de possíveis desfechos nos receptores dos hemoderivados com potencial transmissivo detectados, cuja dinâmica de obtenção de informações foi dificultada pela ocorrência da atual pandemia, de forma que não houve tempo hábil para execução desta tarefa.

No Brasil, conforme discutido, a triagem do HAV e do B19V não é realizada nos serviços de hemoterapia. Além disso, existe uma carência de dados acerca da incidência de ambas as infecções entre a população de doadores de sangue. Desse modo, este estudo teve como objetivo preencher lacunas no cenário epidemiológico atual da hepatite A e do Parvovírus B19 quanto à incidência dessas infecções entre doadores de sangue, e avaliar, assim, o risco de transmissão transfusional de ambos.

Os dados deste trabalho demonstram que o HAV e o B19V estão presentes na população de doadores de sangue do Rio de Janeiro e que a implantação de métodos de triagem para estes vírus pode ser considerada para a melhoria da segurança de sangue e hemoderivados destinados à doação. Além disso, estes dados destacam a importância do estudo de modelagem dos riscos de transmissão residual dessas infecções por meio da transfusão sanguínea

6. CONCLUSÕES

- HAV e B19V foram detectados entre os doadores deste estudo e suas incidências permitem preencher as lacunas no cenário epidemiológico de ambos, entre a população de doadores de sangue do Rio de Janeiro;
- Os subgenótipos IA e IB do HAV e o subgenótipo 1a do B19V circulam no Rio de Janeiro;
- A detecção de HAV em doadores de sangue oriundos de bairros onde ocorreram surtos de hepatite A foi significativamente maior que em doadores do Rio de Janeiro em geral, sugerindo que tais surtos contribuíram para este aumento de detecção;
- Com as prevalências de HAV-RNA e B19V-DNA encontradas entre os doadores, foi possível estimar o número de bolsas de plasma com potencial transmissivo de ambos os vírus nos bancos de sangue do Rio de Janeiro, para os anos de 2018 e 2019;
- Os dados encontrados sugerem que o risco de transmissão transfusional de HAV e B19V nos bancos do Rio de Janeiro é baixo, contudo, surtos epidêmicos podem impactar na transmissão transfusional destes vírus.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ICTV. Genus: Hepatovirus. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/709/genus-hepatovirus (2019).
2. Melnick, J. L. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine* **10**, 24–26 (1992).
3. Totsuka, A. & Moritsugu, Y. Hepatitis A virus proteins. *Intervirolgy* **42**, 63–68 (1999).
4. Vaughan, G. *et al.* Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **21**, 227–243 (2014).
5. Bae, S. C., Park, S. Y., Kim, A. N., Oh, M. H. & Ha, S. Do. Survival of hepatitis A virus on various food-contact surfaces during 28 days of storage at room temperature. *Food Res. Int.* **64**, 849–854 (2014).
6. McKnight, K. L. & Lemon, S. M. Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2018) doi:10.1101/cshperspect.a033480.
7. Wang, X. *et al.* Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature* **517**, 85–88 (2015).
8. Lemon, S. M., Ott, J. J., Van Damme, P. & Shouval, D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J. Hepatol.* **68**, 167–184 (2018).
9. Feng, Z. *et al.* A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *HHS Public Access* **496**, 367–371 (2013).
10. Najarian, R. *et al.* Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 2627–2631 (1985).
11. McKnight, K. L. & Lemon, S. M. Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, 1–18 (2018).
12. Anderson, D. A. & Ross, B. C. Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles. *J. Virol.* **64**, 5284–5289 (1990).
13. Martin, A., Bénichou, D., Chao, S.-F., Cohen, L. M. & Lemon, S. M. Maturation of the Hepatitis A Virus Capsid Protein VP1 Is Not Dependent on Processing by the 3CproProteinase. *J. Virol.* **73**, 6220–6227 (1999).
14. Graff, J. *et al.* Hepatitis A Virus Capsid Protein VP1 Has a Heterogeneous C Terminus. *J. Virol.* **73**, 6015–6023 (1999).

15. Jecht, M., Probst, C. & Gauss-Müller, V. Membrane permeability induced by hepatitis A virus proteins 2B and 2BC and proteolytic processing of HAV 2BC. *Virology* **252**, 218–227 (1998).
16. Teterina, N. L., Bienz, K., Egger, D., Gorbalenya, A. E. & Ehrenfeld, E. Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology* **237**, 66–77 (1997).
17. G, P., Beneduce, F., Gauss-MulleR, V. & Morace, G. Recombinant expression of hepatitis A virus protein 3A: Interaction with membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **211**, 627–638 (1995).
18. Chernaia, M. M., Malcolm, B. A., Allaire, M. & James, M. N. G. Hepatitis A Virus 3C Proteinase: Some Properties, Crystallization and Preliminary Crustallographic Characterizatiion. *J Mol Biol* **234**, 890–893 (1993).
19. Allaire, M., Malcolm, M. C. B. & James, M. Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymotrypsin-like serine proteinases. *Nature* **369**, 72–76 (1994).
20. Robertson, B. H. *et al.* Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.* **3**, 1365–1377 (1992).
21. Lemon, S. M. & Binn, L. N. Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross-neutralization. *Infect. Immun.* **42**, 418–420 (1983).
22. Brown, E. A., Jansen, R. W. & Lemon, S. M. Characterization of a simian hepatitis A virus (HAV): antigenic and genetic comparison with human HAV. *J. Virol.* **63**, 4932–4937 (1989).
23. Costa-Mattioli, M. *et al.* Genetic variability of hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.* **84**, 3191–3201 (2003).
24. Tsarev, S. A., Emerson, S. U., Balayan, M. S., Ticehurst, J. & Purcell, R. H. Simian hepatitis A virus (HAV) strain AGM-27: Comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *J. Gen. Virol.* **72**, 1677–1683 (1991).
25. Forbi, J. C., Esona, M. D. & Agwale, S. M. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from Nigeria. *Intervirology* **56**, 22–26 (2012).
26. Sulbaran, Y. *et al.* Hepatitis A Virus Genetic Diversity in Venezuela: Exclusive Circulation of Subgenotype IA and Evidence of Quasispecies Distribution in the Isolates. *J. Med. Virol.* **82**, 1829–1834 (2010).
27. Nainan, O. V., Xia, G., Vaughan, G. & Margolis, H. S. Diagnosis of hepatitis A

- virus infection: A molecular approach. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 63–79 (2006).
28. World Health Organization. Hepatitis A. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a> (2019).
 29. Rivas, V. *et al.* Hepatitis a outbreak since november 2016 affecting men who have sex with men (MSM) in Chile connected to the current outbreak in MSM in Europe, situation up to October 2017. *Eurosurveillance* **23**, 1–5 (2018).
 30. Chen, G. J., Lin, K. Y., Hung, C. C. & Chang, S. C. Hepatitis A outbreak among men who have sex with men in a country of low endemicity of hepatitis A infection. *J. Infect. Dis.* **215**, 1339–1340 (2017).
 31. Nejati, A., Makvandi, M., Samarbafzadeh, A., Neisi, N. & Moradzadegan, H. Molecular Epidemiology of Hepatitis A Virus in Patients in the Ahwaz Region of Iran. *J. Med. Virol.* **84**, 582–586 (2012).
 32. Normann, A. *et al.* Acute Hepatitis A Virus infection in Turkey. *J. Med. Virol.* **80**, 785–790 (2008).
 33. Taylor, M. B. Molecular epidemiology of South African strains of hepatitis a virus: 1982-1996. *J. Med. Virol.* **51**, 273–279 (1997).
 34. De Paula, V. S., Lu, L., Niel, C., Gaspar, A. M. C. & Robertson, B. H. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J. Med. Virol.* **73**, 378–383 (2004).
 35. De Paula, V. S., Baptista, M. L., Lampe, E., Niel, C. & Gaspar, A. M. C. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Virol.* **66**, 22–27 (2002).
 36. Amado, L. A., Villar, L. M., Paula, V. S. de, Pinto, M. A. & Gaspar, M. C. Exposure to Multiple Subgenotypes of Hepatitis A Virus During an Outbreak Using Matched Serum and Saliva Specimens. *J. Med. Virol.* **83**, 768–775 (2011).
 37. Villar, L. M., Lampe, E., Meyer, A. & Gaspar, A. M. C. Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: Implications for the vaccination of school children. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **37**, 1779–1787 (2004).
 38. Bosh, A. *et al.* Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Sci. Technol.* **43**, 61–65 (2001).
 39. Sánchez, G., Pintó, R. M., Vanaclocha, H. & Bosch, A. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4148–4155 (2002).
 40. Forbi, J. C., Agwale, S. M., Ndip, L. M. & Esona, M. D. Genetic Analysis of

- Hepatitis A Virus Variants Circulating Among Children Presenting With Acute Diarrhea in Cameroon. *J. Med. Virol.* **84**, 728–732 (2012).
41. Desbois, D. *et al.* Epidemiology and genetic characterization of hepatitis A virus genotype IIA. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3306–3315 (2010).
 42. Yilmaz, H. *et al.* Genotypes of hepatitis a virus in Turkey: first report and clinical profile of children infected with sub-genotypes IA and IIIA. *BMC Infect. Dis.* **17**, 561 (2017).
 43. Cristina, J. & Costa-Mattioli, M. Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus. *Virus Res.* **127**, 151–157 (2007).
 44. D'Andrea, L. *et al.* Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 6842–6854 (2015).
 45. Lee, H. *et al.* Genetic analysis of hepatitis A virus strains that induced epidemics in Korea during 2007-2009. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1252–1257 (2012).
 46. Barde, P. V., Shukla, M. K., Pathak, R., Kori, B. K. & Bharti, P. K. Circulation of hepatitis A genotype IIIA virus in paediatric patients in central India. *Indian J. Med. Res.* **139**, 940–944 (2014).
 47. Mukomolov, S. *et al.* Increased Circulation of Hepatitis A Virus Genotype IIIA Over the Last Decade in St Petersburg, Russia. *J. Med. Virol.* **84**, 1528–1534 (2012).
 48. Arankalle, V. A. *et al.* Molecular characterization of hepatitis A virus from a large outbreak from Kerala, India. *Indian J Med Res* **123**, 760–9 (2006).
 49. Chobe, L. P. & Arankalle, V. A. Investigation of a hepatitis A outbreak from Shimla Himachal Pradesh. *Indian J Med Res* **130**, 179–184 (2009).
 50. Endo, K. *et al.* Full-length sequences of subgenotype IIIA and IIIB hepatitis A virus isolates: Characterization of genotype III HAV genomes. *Virus Res.* **126**, 116–127 (2007).
 51. Mitsui, T. *et al.* 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**, 1015–1024 (2006).
 52. Nainan, O. V., Margolis, H. S., Robertson, B. H., Balayan, M. & Brinton, M. A. Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* **72**, 1685–1689 (1991).
 53. Mello, V. M. *et al.* Hepatitis a strain linked to the European outbreaks during gay events between 2016 and 2017, identified in a Brazilian Homosexual Couple in 2017. *Viruses* **11**, (2019).

54. Amado, L. *et al.* A large hepatitis a outbreak in Rio de Janeiro reinforces the need for vaccination of risk groups. *J. Viral Hepat.* **25**, 174–174 (2018).
55. Villar, L. M. *et al.* Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 168–173 (2007).
56. Fiaccadori, F. S., Soares, C. M. D. A., Borges, A. M. T. & Cardoso, D. D. D. D. P. Prevalence of hepatitis A virus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, by molecular and serological procedures, 1995-2002. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 423–426 (2006).
57. Costa-Mattioli, M. *et al.* Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *J. Gen. Virol.* **82**, 2647–2652 (2001).
58. Dos Santos, D. R. L., Villar, L. M., De Paula, V. S., De Lima, G. S. & Gaspar, A. M. C. Hepatitis A virus subgenotypes dissemination during a community outbreak in a surrounding region of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **103**, 254–258 (2008).
59. Asher, L. V. S. *et al.* Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Med. Virol.* **47**, 260–268 (1995).
60. Moller-Tank, S., Kondratowicz, A. S., Davey, R. A., Rennert, P. D. & Maury, W. Role of the Phosphatidylserine Receptor TIM-1 in Enveloped-Virus Entry. *J. Virol.* **87**, 8327–8341 (2013).
61. Das, A. *et al.* TIM1 (HAVCR1) is not essential for cellular entry of either quasi-enveloped or naked hepatitis a virions. *MBio* **8**, 1–14 (2017).
62. Bishop, N. E. & Anderson, D. A. Uncoating Kinetics of Hepatitis A Virus Virions and Provirions. *J. Virol.* **74**, 3423–3426 (2000).
63. Strauss, M., Levy, H. C., Bostina, M., Filman, D. J. & Hogle, J. M. RNA Transfer from Poliovirus 135S Particles across Membranes Is Mediated by Long Umbilical Connectors. *J. Virol.* **87**, 3903–3914 (2013).
64. Panjwani, A. *et al.* Capsid Protein VP4 of Human Rhinovirus Induces Membrane Permeability by the Formation of a Size-Selective Multimeric Pore. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
65. Brown, K. E. *et al.* Congenital anaemia after transplacental. *La* **343**, 895–96 (1994).
66. Stapleton, J., Raina, V. & Winokur, P. Antigenic and immunogenic properties of recombinant hepatitis A virus 14S and 70S subviral particles. *J. Virol.* **67**, 1080–1085 (1993).

67. Probst, C., Jecht, M. & Gauss-mu, V. Intrinsic Signals for the Assembly of Hepatitis A Virus Particles. **274**, 4527–4531 (1999).
68. Feng, Z., Hirai-yuki, A., Mcknight, K. L. & Lemon, S. M. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annu. Rev. of Virology* **1**, 539–60 (2014).
69. Hirai-yuki, A. *et al.* MAVS-dependent host species range and pathogenicity of human hepatitis A virus. **8325**, 1–9 (2016).
70. Hirai-yuki, A., Hensley, L., Whitmire, J. K. & Lemon, M. Biliary Secretion of Quasi-Enveloped Human Hepatitis A Virus. **7**, 1–11 (2016).
71. Shin, E. C. & Jeong, S. H. Natural history, clinical manifestations, and pathogenesis of hepatitis A. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, 1–13 (2018).
72. Cuthbert, J. A. Hepatitis A: Old and new. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 38–58 (2001).
73. Lemon, S. M. *et al.* In vivo Replication and Reversion to Wild Type of a Neutralization-Resistant Antigenic Variant of Hepatitis A. *J. Infect. Dis.* **16**, 7–13 (1990).
74. Lanford, R. E. *et al.* Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11223–11228 (2011).
75. Amado-Leon, L. A. *et al.* Longitudinal Study of Hepatitis A Infection by Saliva Sampling: The Kinetics of HAV Markers in Saliva Revealed the Application of Saliva Tests for Hepatitis A Study. *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
76. Costa-Mattioli, M. *et al.* Quantification and duration of viraemia during hepatitis a infection as determined by real-time RT-PCR. *J. Viral Hepat.* **9**, 101–106 (2002).
77. Tjon, G. M. S. *et al.* High and Persistent Excretion of Hepatitis A Virus in Immunocompetent Patients. *J. Med. Virol.* **78**, 1398–1405 (2006).
78. Joshi, M. S., Bhalla, S., Kalrao, V. R., Dhongade, R. K. & Chitambar, S. D. Exploring the concurrent presence of hepatitis A virus genome in serum, stool, saliva, and urine samples of hepatitis A patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **78**, 379–382 (2014).
79. Saraceni, C. P. Vigilância das Hepatites Virais: A Experiência de Vargem Grande Paulista, 1997-1999. (Universidade de São Paulo, 2001).
80. Normann, A., Jung, C., Vallbracht, A. & Flehmig, B. Time Course of Hepatitis A Viremia and Viral Load in the Blood of Human Hepatitis A Patients. *J. Med.*

- Viol.* **72**, 10–16 (2004).
81. Ping, L.-H., Lemon, S. M., Hill, C. & Carolina, N. Antigenic structure of human hepatitis A virus against murine monoclonal antibodies. *J. Virol.* **66**, 2208–2216 (1992).
 82. Shin, E. C., Sung, P. S. & Park, S. H. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 509–523 (2016).
 83. Maier, K. *et al.* Human gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes sensitized during hepatitis A virus infection. *J. Virol.* **62**, 3756–3763 (1988).
 84. Vallbracht, A. *et al.* Liver-Derived Cytotoxic T Cells in Hepatitis a Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **160**, 209–217 (1989).
 85. Kim, H. Y. *et al.* A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 1111–1118 (2011).
 86. Armstrong, G. L. & Bell, B. P. Hepatitis A virus infections in the United States: Model-based estimates and implications for childhood immunization. *Pediatrics* **109**, 839–845 (2002).
 87. Lemon, S. M. Type A viral hepatitis: new developments in an old disease. *N. Engl. J. Med.* **313**, 1059–1067 (1985).
 88. Chen, C. M., Chen, S. C. C., Yang, H. Y., Yang, S. T. & Wang, C. M. Hospitalization and mortality due to hepatitis A in Taiwan: a 15-year nationwide cohort study. *J. Viral Hepat.* **23**, 940–945 (2016).
 89. Murphy, T. V. *et al.* Progress Toward Eliminating Hepatitis A Disease in the United States. *MMWR Suppl.* **65**, 29–41 (2016).
 90. Krishna, Y. R. *et al.* Clinical features and predictors of outcome in acute hepatitis A and hepatitis E virus hepatitis on cirrhosis. *Liver Int.* **29**, 392–398 (2009).
 91. Lin, L., Verslype, C., Van Pelt, J. F., Van Ranst, M. & Fevery, J. Viral interaction and clinical implications of coinfection of hepatitis C virus with other hepatitis viruses. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 1311–1319 (2006).
 92. Ee, L. C. *et al.* Acute liver failure in children: A regional experience. *J. Paediatr. Child Health* **39**, 107–110 (2003).
 93. Turk, T. *et al.* Progressive liver failure post acute hepatitis A, over a three-month period, resulting in hepatorenal syndrome and death: Table 1. *Gastroenterol. Rep.* gow009 (2016) doi:10.1093/gastro/gow009.
 94. Jeong, S. H. & Lee, H. S. Hepatitis a: Clinical manifestations and management.

- Intervirology* **53**, 15–19 (2010).
95. Elinav, E. *et al.* Acute Hepatitis A Infection in Pregnancy Is Associated With High Rates of Gestational Complications and Preterm Labor. *Gastroenterology* **130**, 1129–1134 (2006).
 96. Pereira, F. E. L. & Gonçalves, C. S. Hepatite A. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* vol. 36 387–400 (2003).
 97. Franco, E., Meleleo, C., Serino, L., Sorbara, D. & Zaratti, L. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol* **4**, 68–73 (2012).
 98. Organização Mundial de Saúde. WHO position paper on hepatitis a vaccines – June 2012. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **87**, 261–276 (2012).
 99. Jefferies, M., Rauff, B., Rashid, H., Lam, T. & Rafiq, S. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. *World J Clin Cases* **6**, 589–600 (2018).
 100. Franco, E., Meleleo, C., Serino, L., Sorbara, D. & Zaratti, L. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. *World J. Hepatol.* **4**, 68–73 (2012).
 101. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do H. e das H. V. *Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais.* (2005).
 102. Jacobsen, K. H. Globalization and the Changing Epidemiology of Hepatitis A Virus. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2018) doi:10.1101/cshperspect.a031716.
 103. Hutin Y, Low-Beer D, Bergeri I, Hess S, Garcia-Calleja JM, Hayashi C, Mozalevskis A, Rinder Stengaard A, Sabin K, Harmanci H, B. M. Viral Hepatitis Strategic Information to Achieve Elimination by 2030: Key Elements for HIV Program Managers. *JMIR Public Heal. Surveill* **3**, (2017).
 104. El Khoury, A. C., Wallace, C., Klimack, W. K. & Razavi, H. Economic burden of hepatitis C-Associated diseases: Europe, Asia Pacific, and the Americas. *J. Med. Econ.* **15**, 887–896 (2012).
 105. Tanaka, J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* **18**, 1–4 (2000).
 106. Jacobsen, K. H. & Wiersma, S. T. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* **28**, 6653–6657 (2010).

107. Bruni, R. *et al.* Hepatitis a virus genotypes and strains from an endemic area of Europe, Bulgaria 2012-2014. *BMC Infect. Dis.* **17**, 1–8 (2017).
108. Bradley-Stewart, A., Smith-Palmer, A., Hawkins, G. & Gunson, R. Hepatitis A—2017 an unusual year in Scotland. *J. Clin. Virol.* **115**, 1–4 (2019).
109. Lanini, S., Ustianowski, A., Pisapia, R., Zumla, A. & Ippolito, G. Viral Hepatitis: Etiology, Epidemiology, Transmission, Diagnostics, Treatment, and Prevention. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **33**, 1045–1062 (2019).
110. Ndumbi, P. *et al.* Hepatitis a outbreak disproportionately affecting men who have sex with men (MSM) in the european union and european economic area, june 2016 to may 2017. *Eurosurveillance* **23**, 1–12 (2018).
111. Corey, L. & Holmes, K. K. Sexual transmission of hepatitis A in homosexual men - incidence and mechanism. *N. Engl. J. Med.* **302**, 435–38 (1980).
112. CDC, C. C. for D. Hepatitis A Among Homosexual Men - United States, Canada, and Australia. *Leads From Morb. Mortal. Wkly. Rep. Hepat.* **41**, 155–161 (1992).
113. Mariojoules, J. *et al.* Hepatitis A outbreak affecting men who have sex with men (MSM) in central Argentina, occurred in July 2017–April 2018, later than the European outbreak. *J. Clin. Virol.* **117**, 49–53 (2019).
114. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Prevenção e Controle das IST do HIV/Aids e das Hepatites Virais. *Boletim Epidemiológico Hepatites Virais 2020.* (2020).
115. De Oliveira, T. M., Vieira, N. S. G., Sepp, T. D. S. & Souto, F. J. D. Recent trends in hepatitis A incidence in Brazil. *J. Med. Virol.* **92**, 1343–1349 (2020).
116. Vitral, C. L. *et al.* 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 (2012).
117. SES, D. de D. de T. H. e A. Informe Técnico Atualização Surto De Hepatite a – 2017. *Centro de Vigilância Epidemiológica* (2017).
118. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do H. e das H. V. *Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais.* (2018).
119. Mello, V. M. *et al.* Hepatitis a strain linked to the European outbreaks during gay events between 2016 and 2017, identified in a Brazilian Homosexual

- Couple in 2017. *Viruses* **11**, (2019).
120. Amado, L. A. *et al.* A large hepatitis a outbreak in Rio de Janeiro reinforces the need for vaccination of risk groups. *J. Viral Hepat.* **25**, 174–174 (2018).
 121. Seeberg, S., Brandberg, A., Hermodsson, S., Larsson, P. & Lundgren, S. Hospital Outbreak of Hepatitis A Secondary to Blood Exchange in a Baby. *J. Infect. Dis.* **23**, 1155–1156 (1980).
 122. Nigro, G. & Grosso, B. Del. Transfusion acquired hepatitis A in a patient with B thalassaemia major Accepted. *J. Infect.* **20**, 175–6 (1989).
 123. Soucie, J. M., Robertson, B. H., Bell, B. P., McCaustland, K. A. & Evatt, B. L. Hepatitis A virus infections associated with clotting factor concentrate in the United States. *Transfusion* **38**, 573–579 (1998).
 124. Brundage, S. C. & Fitzpatrick, A. N. Hepatitis A. *Am. Fam. Physician* **73**, 2162–2168 (2006).
 125. Shouval, D. The immunological basis for immunization series. in *In. Immunization vaccines and biologicals* (ed. Organization, W. H.) (2010).
 126. Liu, J. P., Nikolova, D. & Fei, Y. Immunoglobulins for preventing hepatitis A. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2009) doi:10.1002/14651858.CD004181.pub2.
 127. Gluud, L. L. & Gluud, C. Meta-analyses on Viral Hepatitis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **23**, 315–330 (2009).
 128. Cui, F. *et al.* Development, production, and postmarketing surveillance of hepatitis a vaccines in China. *J. Epidemiol.* **24**, 169–177 (2014).
 129. Rao, S., Mao, J. S., Motlekar, S., Fangcheng, Z. & Kadhe, G. A review of immunogenicity and tolerability of live attenuated Hepatitis A vaccine in children. *Hum. Vaccines Immunother.* **12**, 3160–3165 (2016).
 130. Dagan, R. *et al.* Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *J. Am. Med. Assoc.* **294**, 202–210 (2005).
 131. Stuurman, A. L., Marano, C., Bunge, E. M., De Moerlooze, L. & Shouval, D. Impact of universal mass vaccination with monovalent inactivated hepatitis A vaccines - A systematic review. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 724–736 (2017).
 132. Sartori, A. M. C. *et al.* Cost-effectiveness analysis of universal childhood hepatitis A vaccination in Brazil: Regional analyses according to the endemic context. *Vaccine* **30**, 7489–7497 (2012).
 133. de Brito, W. I. & Souto, F. J. D. Vacinação universal contra hepatite A no Brasil:

- análise da cobertura vacinal e da incidência cinco anos após a implantação do programa. *Rev. Bras. Epidemiol.* **23**, 1–13 (2020).
134. Souto, F. J. D., de Brito, W. I. & Fontes, C. J. F. Impact of the single-dose universal mass vaccination strategy against hepatitis A in Brazil. *Vaccine* **37**, 771–775 (2019).
 135. Brasil. Informe técnico da introdução da vacina adsorvida hepatite A (inativada). *Ministério da Saúde* 203 (2014).
 136. Brasil. Nota informativa sobre mudanças no calendário nacional de vacinação para o ano de 2017. *Ministério da Saúde* 10 (2016).
 137. de Paula, V. S. Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virol* 461–472 (2012).
 138. Tong, M. J., El-Farra, N. S. & Grew, M. I. Clinical manifestations of hepatitis a: Recent experience in a community teaching hospital. *J. Infect. Dis.* **171**, (1995).
 139. Jung, Y. M. *et al.* Atypical Manifestations of Hepatitis A Infection: A Prospective, Multicenter Study in Korea. *J. Med. Virol.* **82**, 1318–1326 (2010).
 140. Park, S. J. *et al.* Computed tomography findings for predicting severe acute hepatitis with prolonged cholestasis. *World J. Gastroenterol.* **19**, 2543–2549 (2013).
 141. Suk, K. T. *et al.* Gallbladder wall thickening in patients with acute hepatitis. *J. Clin. Ultrasound* **37**, 144–148 (2009).
 142. Lee, H. K. *et al.* Window period of anti-hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies in diagnosing acute hepatitis A. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **25**, 665–668 (2013).
 143. Wiedmann, M., Boehm, S., Schumacher, W., Swysen, C. & Zauke, M. Evaluation of three commercial assays for the detection of hepatitis A virus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 129–130 (2003).
 144. Prasadthratsint, K. & Stapleton, J. T. Laboratory Diagnosis and Monitoring of Viral Hepatitis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **48**, 259–279 (2019).
 145. De Paula, V. S. Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virol.* **7**, 461–472 (2012).
 146. Lee, H. J. *et al.* Evaluation of an immunochromatographic assay for the detection of anti-hepatitis A virus IgM. *Virol. J.* **7**, 1–5 (2010).
 147. Sarthi, M. *et al.* Prevalence of hepatitis A virus as cause of acute viral hepatitis in central Karnataka, India. *Int. J. Contemp. Pediatr.* **4**, 87–89 (2017).
 148. De Paula, V. S. *et al.* Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the

- window period of infection. *J. Clin. Virol.* **29**, 254–259 (2004).
149. Fujiwara, 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* **51**, 82–88 (2002).
 150. Pina, S. *et al.* Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* **82**, 2955–2963 (2001).
 151. Robertson, B. H. *et al.* Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.* **73**, 1365–1377 (1992).
 152. de Paula, V. S., Villar, L. M. & Coimbra Gaspar, A. M. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. *Braz. J. Infect. Dis.* **7**, 135–141 (2003).
 153. Donia, D., Petrinca, A. R. & Divizia, M. A strategy to increase the specificity of Syber Green I qRT-PCR in hepatitis A detection. *New Microbiol.* **33**, 215–222 (2010).
 154. de Paula, V. S. *et al.* Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Research* vol. 41 1169–1176 (2007).
 155. Weimer, T., Streichert, S., Watson, C. & Gröner, A. Hepatitis A virus prevalence in plasma donations. *J. Med. Virol.* **67**, 469–471 (2002).
 156. Gadgil, P. S., Fadnis, R. S., Joshi, M. S., Rao, P. S. & Chitambar, S. D. Seroepidemiology of hepatitis A in voluntary blood donors from Pune, western India (2002 and 2004–2005). *Epidemiol. Infect.* **136**, 406–409 (2008).
 157. Han, T. *et al.* The prevalence of hepatitis A virus and parvovirus B19 in source-plasma donors and whole blood donors in China. *Transfus. Med.* (2015) doi:10.1111/tme.12259.
 158. Gallian, P. *et al.* Hepatitis A: an epidemiological survey in blood donors, France 2015 to 2017. *Eurosurveillance* **23**, 1–5 (2018).
 159. Kim, M. J. *et al.* Identification of transfusion-transmitted hepatitis A through postdonation information in Korea: results of an HAV lookback (2007–2012). *Vox Sang.* **113**, 547–554 (2018).
 160. Hettmann, A. *et al.* Phylogenetic analysis of a transfusion-transmitted hepatitis A outbreak. *Virus Genes* **53**, 15–20 (2016).
 161. Da Silva, S. G. C. *et al.* A Rare Case of Transfusion Transmission of Hepatitis

- A Virus to Two Patients with Haematological Disease. *Transfus. Med. Hemotherapy* **43**, 137–141 (2016).
162. ICTV. Genus: Erythroparvovirus. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1044/genus-erythroparvovirus (2019).
163. Cotmore, S. F. *et al.* The family Parvoviridae. *Arch Virol* **159**, 1239–1247 (2015).
164. Kerr, J. R. The Parvoviridae; an emerging virus family. *Infect. Dis. Rev.* 99–109. (2000).
165. Qiu, J., Söderlund-Venermo, M. & Young, N. S. Human Parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 43–113 (2017).
166. Berns, K. I. Parvoviridae: The viruses and their replication. in *Fundamental Virology* (eds. Fields, D. M. & Knipe, P. M.) 1017–1048 (Raven, 1996).
167. Broliden, K., Tolfvenstam, T. & Norbeck, O. Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J. Intern. Med.* **260**, 285–304 (2006).
168. Schwarz, T. F., Nerlich, A. & Roggendorf, M. Parvovirus B19 infection in pregnancy. *Behring Inst. Mitt* **1990**, 69–73 (1990).
169. Cossart, Y. E., Field, A. M., Cant, B. & Widdows, D. Parvovirus-like Antigen. *Lancet* 72–73 (1975).
170. Blut, A., Bewertung, U. & Krankheitserreger, B. Parvovirus B19 – Revised *. *Transfus Med Hemother* 2010;37339–350 **37**, 339–350 (2010).
171. Luo, Y. & Qiu, J. Human parvovirus B19: A mechanistic overview of infection and DNA replication. *Future Virol.* **10**, 155–167 (2015).
172. Heegaard, E. D. & Brown, K. E. Human Parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 485–505 (2002).
173. Amand, J. S. & Astell, C. R. Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology* **192**, 121–131 (1993).
174. Luo, W. & Astell, C. R. A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology* **195**, 448455 (1993).
175. Ozawa, K. *et al.* Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J. Virol.* **61**, 2395–2406 (1987).
176. Servant-Delmas, A. & Morinet, F. Update of the human parvovirus B19 biology. *Transfus. Clin. Biol.* **23**, 5–12 (2016).
177. Zádori, Z. *et al.* A Viral Phospholipase A2 Is Required for Parvovirus Infectivity.

- Dev. Cell* **1**, 291–302 (2001).
178. Kajigaya, S. *et al.* Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions (fifth disease/transient aplastic crisis/vaccine/enzyme immunoassay). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4646–4650 (1991).
 179. Zhi, N. *et al.* Molecular and Functional Analyses of a Human Parvovirus B19 Infectious Clone Demonstrates Essential Roles for NS1, VP1, and the 11-Kilodalton Protein in Virus Replication and Infectivity. *J. Virol.* **80**, 5941–5950 (2006).
 180. Jain, A. & Kant, R. Genotypes of erythrovirus B19, their geographical distribution & circulation in cases with various clinical manifestations. *Indian J Med Res* **147**, 239–247 (2018).
 181. Servant, A., Lallemand, F., Maur, G. D. Saint, Franc, J. & Garbarg-chenon, A. Genetic Diversity within Human Erythroviruses: Identification of Three Genotypes. *J. Virol.* **76**, 9124–9134 (2002).
 182. Hübschen, J. M. *et al.* Phylogenetic analysis of human parvovirus B19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3735–3738 (2009).
 183. Costa, A. C. *et al.* Investigation of human parvovirus B19 occurrence and genetic variability in different leukaemia entities. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, E31–E43 (2012).
 184. Waldman, M. & Kopp, J. B. Parvovirus-B19-associated complications in renal transplant recipients. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **3**, 540–550 (2007).
 185. Young, N. S. & Brown, K. E. Parvovirus B19. *N. Engl. J. Med.* **6**, 586–97 (2004).
 186. Parsyan, A., Szmaragd, C., Allain, J. P. & Candotti, D. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J. Gen. Virol.* **88**, 428–431 (2007).
 187. Ekman, A. *et al.* Biological and Immunological Relations among Human Parvovirus B19 Genotypes 1 to 3. *J. Virol.* **81**, 6927–6935 (2007).
 188. Cassinotti, P., Burtonboy, G., M., F. & Siegl, G. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J Med Virol.* **53**, 229–232 (1997).
 189. Landry, M. L. Parvovirus B19. *Diagnostic Microbiol. Immunocompromised Host* 505–506 (2016) doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0008-2015.
 190. Norja, P. *et al.* Bioportfolio: Lifelong persistence of variant and prototypic

- erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7450–7453 (2006).
191. Corcoran, C., Hardie, D., Yeats, J. & Smuts, H. Genetic variants of human parvovirus B19 in South Africa: Cocirculation of three genotypes and identification of a novel subtype of genotype 1. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 137–142 (2010).
 192. Sanabani, S., Neto, W. K., Pereira, J. & Sabino, E. C. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 604–606 (2006).
 193. Freitas, R. B. *et al.* Molecular characterization of human erythrovirus B19 strains obtained from patients with several clinical presentations in the Amazon region of Brazil. *J. Clin. Virol.* **43**, 60–65 (2008).
 194. Cubel Garcia, R. de C. N. *et al.* Molecular diversity of human parvovirus B19 during two outbreaks of erythema infectiosum in Brazil. *Brazilian J. Infect. Dis.* **21**, 102–106 (2017).
 195. Slavov, S. N. *et al.* Parvovirus B19 seroprevalence, viral load, and genotype characterization in volunteer blood donors from southern Brazil. *J. Med. Virol.* **91**, 1224–1231 (2019).
 196. Slavov, S. N., Kashima, S., Silva-Pinto, A. C. & Covas, D. T. Genotyping of Human parvovirus B19 among Brazilian patients with hemoglobinopathies. *Can. J. Microbiol.* **58**, 200–205 (2012).
 197. Garcia, S. de O. *et al.* Parvovirus among patients with cytopenia of unknown origin in Brazil: A case-control study. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1578–1580 (2011).
 198. Keller, L. W. *et al.* Phylogenetic analysis of a near-full-length sequence of an erythrovirus genotype 3 strain isolated in Brazil. *Arch Virol* **2400**, 1685–1687 (2009).
 199. Pereira, R. F. A. *et al.* Clinical features and laboratory findings of human parvovirus B19 in human immunodeficiency virus-infected patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **109**, 168–173 (2014).
 200. Brown, K., Anderson, S. & Young, N. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science (80-.)*. **262**, 114–117 (1993).
 201. Weigel-Kelley, K. A., Yoder, M. C. & Srivastava, A. Recombinant Human Parvovirus B19 Vectors: Erythrocyte P Antigen Is Necessary but Not Sufficient for Successful Transduction of Human Hematopoietic Cells. *J. Virol.* **75**, 4110–

- 4116 (2001).
202. Bönsch, C., Zuercher, C., Lieby, P., Kempf, C. & Ros, C. The Globoside Receptor Triggers Structural Changes in the B19 Virus Capsid That Facilitate Virus Internalization. *J. Virol.* **84**, 11737–11746 (2010).
 203. Filippone, C. *et al.* VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. *Virology* **23**, 1–7 (2008).
 204. Ganaie, S. S. & Qiu, J. Recent advances in replication and infection of human parvovirus B19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 1–12 (2018).
 205. Ros, C., Gerber, M. & Kempf, C. Conformational Changes in the VP1-Unique Region of Native Human Parvovirus B19 Lead to Exposure of Internal Sequences That Play a Role in Virus Neutralization and Infectivity. *J. Virol.* **80**, 12017–12024 (2006).
 206. Weigel-Van Aken, K. A. K. Pharmacological activation of guanine nucleotide exchange factors for the small GTPase Rap1 recruits high-affinity β 1 integrins as coreceptors for parvovirus B19: Improved Ex Vivo Gene transfer to human erythroid progenitor cells. *Hum. Gene Ther.* **20**, 1665–1678 (2009).
 207. Cotmore, S. F. & Tattersall, P. Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. *Annu. Rev. Virol.* **1**, 517–537 (2014).
 208. Young, N. Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. *Semin Hematol* **25**, 159–172 (1988).
 209. Young, N. S., Mortimer, P. P., Moore, J. G. & Humphries, R. K. Characterization of a virus that causes transient aplastic crisis. *J. Clin. Invest.* **73**, 224–230 (1984).
 210. Momoeda, M., Wong, S., Kawase, M., Young, N. S. & Kajigaya, S. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J. Virol.* **68**, 8443–8446 (1994).
 211. Anderson, M. J. *et al.* Parvoviral Infection in Humans Experimental. *J. Infect. Dis.* **152**, 257–265 (1985).
 212. Schmidt, I., Blümel, J., Seitz, H., Willkommen, H. & Löwer, J. Parvovirus B19 DNA in plasma pools and plasma derivatives. *Vox Sang.* **81**, 228–235 (2001).
 213. Chisaka, H. *et al.* Clinical manifestations and outcomes of parvovirus B19 infection during pregnancy in Japan. *Tohoku J. Exp. Med.* **209**, 277–283 (2006).
 214. Brown, T., Anand, A., Ritchie, L. D., Clewley, J. P. & Reid, T. M. S. Intrauterine Parvovirus Infection Associated With Hydrops Fetalis. *Lancet* **324**, 1033–1034

- (1984).
215. Choi, S., Chang, S., Won, J. & Lee, J. A Case of Persistent Anemia in a Renal Transplant Recipient : Association with Parvovirus B19 Infection. *Scand J Infect Dis* **34**, 71–75 (2002).
 216. Yoto, Y. *et al.* Incidence of human parvovirus B19 DNA detection in blood donors. *Br. J. Haematol.* **91**, 1017–1018 (1995).
 217. Anderson, L. J. *et al.* Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 522–526 (1986).
 218. Juhl, D., Steppat, D., Görg, S. & Hennig, H. Parvovirus B19 infections and blood counts in blood donors. *Transfus. Med. Hemotherapy* **41**, 52–59 (2014).
 219. Erdman, D. D. *et al.* Human parvovirus B19 specific IgG, IgA, and IgM antibodies and DNA in serum specimens from persons with erythema infectiosum. *J. Med. Virol.* **35**, 110–115 (1991).
 220. Woolf, A. D. *et al.* Clinical Manifestations of Human Parvovirus B19 in Adults. *Arch Intern Med* **149**, 18–21 (1989).
 221. Anderson, M. J., Lewis, E., Kidd, I. M., Hall, S. M. & Cohen, B. J. An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J. Hyg. (Lond)*. **93**, 85–93 (1984).
 222. Landry, M. L. & Parvovirus, B. Parvovirus B19. *Diagnostic Microbiol. Immunocompromised Host* 9–11 (2016) doi:10.1128/9781555819040.
 223. Nocton, J. J., Miller, L. C., Tucker, L. B. & Schaller, J. G. Human parvovirus B19-associated arthritis in children. *J. Pediatr.* **122**, 186–190 (1993).
 224. Hichijo, A. & Morine, M. A Case of Fetal Parvovirus B19 Myocarditis That Caused Terminal Heart Failure. *Case Rep. Obstet. Gynecol.* **2014**, 1–4 (2014).
 225. Cubel-Garcia, R. de C. N. & Amado-Leon, L. A. Human parvovirus B19: A review of clinical and epidemiological aspects in Brazil. *Future Microbiol.* **16**, 37–50 (2021).
 226. Kinney, J. S. *et al.* Risk of adverse outcomes of pregnancy after human parvovirus b19 infection. *J. Infect. Dis.* **157**, 663–667 (1988).
 227. Hall, S. M. *et al.* Prospective study of human parvovirus (B19) infection in pregnancy. *Br. Med. J.* **300**, 1166–1170 (1990).
 228. Enders, G. & Biber, M. Parvovirus B19 infections in pregnancy. *Behring Inst Mitt* **85**, 74–8 (1990).
 229. Essary, L. R., Vnencak-Jones, C. L., Manning, S. S., Olson, S. J. & Johnson,

- J. E. Frequency of parvovirus B19 infection in nonimmune hydrops fetalis and utility of three diagnostic methods. *Hum. Pathol.* **29**, 696–701 (1998).
230. Pattison, J. R. *et al.* Parvovirus Infections and Hypoplastic Crisis in Sickle-Cell Anaemia. *Lancet* **317**, 664–665 (1981).
231. Rao, S. P. Transient Aplastic Crisis in Patients With Sickle Cell Disease. *Am. J. Dis. Child.* **146**, 1328 (1992).
232. Saarinen, U. M. *et al.* Parvovirus Patients B19-Induced With Epidemic Acute Aplasia in Hereditary hemolytic anemia. *Blood* **67**, 1411–1417 (1986).
233. Bell, L. M., Naides, S. J., Stoffman, P., Hodinka, R. L. & Plotkin, S. A. Human Parvo Virus B19 Infection among Hospital Staff Members after Contact with Infected Patients. *N. Engl. J. Med.* **321**, 485–491 (1989).
234. Saunders, P. W. G., Reid, M. M. & Cohen, B. J. Human parvovirus induced cytopenias: a re- port of five cases. *Br J Haematol* **63**, 407–10 (1986).
235. Kurtzman, G. J. *et al.* Chronic Bone Marrow Failure Due to Persistent B19 Parvovirus Infection. *N. Engl. J. Med.* **317**, 287–294 (1987).
236. Beghetti, M., Gervaix, A., Haenggeli, C. A., Berner, M. & Rimensberger, P. C. Myocarditis associated with parvovirus B19 infection in two siblings with merosin-deficient congenital muscular dystrophy [4]. *Eur. J. Pediatr.* **159**, 135–136 (2000).
237. Finkel, T. H. *et al.* Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotising vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent? *Lancet* **343**, 1255–1258 (1994).
238. Arista, S., De Grazia, S., Di Marco, V., Di Stefano, R. & Craxì, A. Parvovirus B19 and ‘cryptogenic’ chronic hepatitis [2]. *J. Hepatol.* **38**, 375–376 (2003).
239. Candotti, D., Etiz, N., Parsyan, A. & Allain, J.-P. Identification and Characterization of Persistent Human Erythrovirus Infection in Blood Donor Samples. *J. Virol.* **78**, 12169–12178 (2004).
240. Adamson-Small, L. A., Ignatovich, I. V., Laemmerhirt, M. G. & Hobbs, J. A. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: Possible role in the inflammatory and disease process. *Virus Res.* **190**, 8–16 (2014).
241. Juhl, D. & Hennig, H. Parvovirus B19: What is the relevance in transfusion medicine? *Front. Med.* **5**, (2018).
242. Brown, K. E., Young, N. S., Alving, B. M. & Barbosa, L. H. Parvovirus B19: Implications for transfusion medicine. *Transfusion* **41**, 130–135 (2001).
243. Molenaar-de Backer, M. W. A. *et al.* Detection of parvovirus B19 DNA in blood:

- Viruses or DNA remnants? *J. Clin. Virol.* **84**, 19–23 (2016).
244. Musiani, M. *et al.* Persistent B19 parvovirus infections in hemophilic HIV-1 infected patients. *J. Med. Virol.* **46**, 103–108 (1995).
245. Mendelson, E., Aboudy, Y., Smetana, Z., Tepperberg, M. & Grossman, Z. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). *Reprod. Toxicol.* **21**, 350–382 (2006).
246. de Freitas, R. B. *et al.* Prevalence of human parvovirus (B19) and rubellavirus infections in urban and remote rural areas in northern Brazil. *J. Med. Virol.* **32**, 203–208 (1990).
247. Cohen, B. J. & Buckley, M. M. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J. Med. Microbiol.* **25**, 151–153 (1988).
248. Abraham, M. *et al.* A pilot study on the seroprevalence of parvovirus B19 infection. *Indian J Med Res* **115**, 139–43 (2002).
249. Nunoue, T., Okochi, K., Mortimer, P. P. & Cohen, B. J. Human parvovirus (B19) and erythema infectiosum. *J. Pediatr.* **107**, 38–40 (1985).
250. Güerri, M. L., Prior, C., Merino, R. & Zapico, R. Seroprevalence of parvovirus B19 in our area and its distribution by ages and sexes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **18**, 243–4 (2000).
251. Abarca, K., Cohen, B. J. & Vial, P. A. Seroprevalence of parvovirus B19 in urban Chilean children and young adults, 1990 and 1996. *Epidemiol. Infect.* **128**, 59–62 (2002).
252. Sodja, I. *et al.* Seroprevalence of IgG antibodies against parvovirus B19 in the population of the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* **44**, 171–4 (1995).
253. Karami, A. *et al.* Prevalence of Parvovirus B19 Infection by Serology and PCR in Pregnant Women Referring to Obstetrics and Gynecology Clinic. *J. Natl. Med. Assoc.* **112**, 91–96 (2020).
254. Staroselsky, A., Klieger-Grossmann, C., Garcia-Bournissen, F. & Koren, G. Exposure to fifth disease in pregnancy. *Can. Fam. Physician* **55**, 1195–1198 (2009).
255. Ziyaeyan, M., Rasouli, M. & Alborzi, A. The seroprevalence of parvovirus B19 infection among to-be-married girls, pregnant women, and their neonates in Shiraz, Iran. *Jpn. J. Infect. Dis.* **58**, 95–97 (2005).

256. Nascimento, J. P., Buckley, M. M., Brown, K. E. & Cohen, B. J. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **32**, 41–5 (1990).
257. Oliveira, S. A. *et al.* Clinical and epidemiological aspects of human parvovirus B19 infection in an urban area in Brazil (Niterói City Area, State of Rio de Janeiro, Brazil). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**, 965–970 (2002).
258. Cohen, B. J., Couroucé, A. M., Schwarz, T. F., Okochi, K. & Kurtzman, G. J. Laboratory infection with parvovirus B19. *J Clin Pathol* **41**, 1027–1028 (1988).
259. Cohen, B. J. & Brown, K. E. Laboratory infection with human parvovirus B19. *J Infect* **24**, 113–114 (1991).
260. Miyamoto, K. *et al.* Outbreak of human parvovirus B19 in hospital workers. *J. Hosp. Infect.* **45**, 238–241 (2000).
261. Slavov, S. N. *et al.* Molecular and Phylogenetic Analyses of Human Parvovirus B19 Isolated From Brazilian Patients With Sickle Cell Disease and β -Thalassemia Major and Healthy Blood Donors. *J. Med. Virol.* **84**, 1652–1665 (2012).
262. Schild, R. L. *et al.* Intrauterine management of fetal parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **13**, 161–166 (1999).
263. Kurtzman, G. *et al.* Pure Red-Cell Aplasia of 10 Years' Duration Due to Persistent Parvovirus B19 Infection and Its Cure with Immunoglobulin Therapy. *N. Engl. J. Med.* **321**, 519–523 (1989).
264. Eid, A. J., Brown, R. A., Patel, R. & Razonable, R. R. Parvovirus B19 Infection after Transplantation : A Review of 98 Cases. *Clinical Infectious Diseases* vol. 43 40–8 (2006).
265. Manaresi, E. & Gallinella, G. Advances in the development of antiviral strategies against parvovirus B19. *Viruses* **11**, (2019).
266. Crabol, Y. *et al.* Intravenous immunoglobulin therapy for pure red cell aplasia related to human parvovirus B19 infection: A retrospective study of 10 patients and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **56**, 968–977 (2013).
267. Bonvicini, F., Bua, G., Manaresi, E. & Gallinella, G. Antiviral effect of cidofovir on parvovirus B19 replication. *Antiviral Res.* **113**, 11–18 (2015).
268. Bonvicini, F., Bua, G., Manaresi, E. & Gallinella, G. Enhanced inhibition of parvovirus B19 replication by cidofovir in extendedly exposed erythroid progenitor cells. *Virus Res.* **220**, 47–51 (2016).
269. Painter, W. *et al.* First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel

- lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2726–2734 (2012).
270. Chemaly, R. F., Hill, J. A., Voigt, S. & Peggs, K. S. In vitro comparison of currently available and investigational antiviral agents against pathogenic human double-stranded DNA viruses: A systematic literature review. *Antiviral Res.* **163**, 50–58 (2019).
271. Bonvicini, F., Bua, G., Conti, I., Manaresi, E. & Gallinella, G. Hydroxyurea inhibits parvovirus B19 replication in erythroid progenitor cells. *Biochem. Pharmacol.* **136**, 32–39 (2017).
272. Lori, F., Foli, A., Kelly, L. M. & Lisziewicz, J. Virostatics: A New Class of Anti-HIV Drugs. 233–241 (2007).
273. Platt, O. S. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Anemia. *The new engl J. of Med.* **358**, 1362–9 (2008).
274. Xu, P. *et al.* Endonuclease activity inhibition of the NS1 protein of parvovirus B19 as a novel target for antiviral drug development. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, 1–19 (2019).
275. Ballou, W. R., Reed, J. L., Noble, W., Young, N. S. & Koenig, S. Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. *J. Infect. Dis.* **187**, 675–678 (2003).
276. Bernstein, D. I. *et al.* Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine* **29**, 7357–7363 (2011).
277. Chandramouli, S. *et al.* Generation of a parvovirus B19 vaccine candidate. *Vaccine* **31**, 3872–3878 (2013).
278. Doyle, S. The Detection of Parvoviruses. in *Methods in Molecular Biology* (eds. Stephenson, J. R. & Warnes, A.) vol. 665 (2011).
279. Patou, G. & Ayliffe, U. Evaluation of commercial enzyme linked immunosorbent assay for detection of B19 parvovirus IGM and IgG. *J. Clin. Pathol.* **44**, 831–834 (1991).
280. Tolfvenstam, T., Rudén, U. & Broliden, K. Evaluation of serological assays for identification of parvovirus B19 immunoglobulin M. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**, 147–150 (1996).
281. Butchko, A. R. & Jordan, J. A. Comparison of three commercially available serologic assays used to detect human parvovirus B19-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera of pregnant women. *J. Clin.*

- Microbiol.* **42**, 3191–3195 (2004).
282. Juhl, D., Görg, S. & Hennig, H. Persistence of Parvovirus B19 (B19V) DNA and humoral immune response in B19V-infected blood donors. *Vox Sang.* **107**, 226–232 (2014).
283. Baylis, S. A., Shah, N. & Minor, P. D. Evaluation of different assays for the detection of parvovirus B19 DNA in human plasma. *J. Virol. Methods* **121**, 7–16 (2004).
284. Aberham, C., Pendl, C., Gross, P., Zerlauth, G. & Gessner, M. A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Methods* **92**, 183–191 (2001).
285. Kovacs, B. W., Carlson, D. E., Shahbahrami, B. & Platt, L. D. Prenatal diagnosis of human parvovirus B19 in nonimmune hydrops fetalis by polymerase chain reaction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**, 461–466 (1992).
286. Sevall, J. S., Ritenhous, J. & Peter, J. B. Laboratory diagnosis of parvovirus B19 infection. *J. Clin. Lab. Anal.* **6**, 171–175 (1992).
287. Carrière, C., Boulanger, P. & Delsert, C. Rapid and sensitive method for the detection of B19 virus DNA using the polymerase chain reaction with nested primers. *J. Virol. Methods* **44**, 221–234 (1993).
288. Cassinotti, P., Weitz, M. & Siegl, G. Human parvovirus B19 infections: Routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay. *J. Med. Virol.* **40**, 228–234 (1993).
289. Musiani, M. *et al.* Nested polymerase chain reaction assay for the detection of B19 parvovirus DNA in human immunodeficiency virus patients. *J. Med. Virol.* **40**, 157–160 (1993).
290. Gallinella, G. *et al.* Relevance of B19 markers in serum samples for a diagnosis of parvovirus B19-correlated diseases. *J. Med. Virol.* **71**, 135–139 (2003).
291. Alves, A. D. R., Garcia, R. de C. N. C., Cruz, O. G., Pinto, M. A. & Leon, L. A. A. Quantitative real-time PCR for differential diagnostics of parvovirus B19 infection in acute liver failure patients. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **1** (2019) doi:10.1080/14737159.2019.1582333.
292. Reber, U., Moser, O., Dilloo, D. & Eis-Hübinger, A. M. On the utility of the benzonase treatment for correct laboratory diagnosis of parvovirus B19 infection. *J. Clin. Virol.* **95**, 10–11 (2017).
293. Nagaharu, K. *et al.* Persistent symptomatic parvovirus B19 infection with severe thrombocytopenia transmitted by red blood cell transfusion containing low

- parvovirus B19 DNA levels. *Transfusion* **57**, 1414–1418 (2017).
294. Francois, K. L., Parboosing, R. & Moodley, P. Parvovirus B19 in South African blood donors. *J. Med. Virol.* **91**, 1217–1223 (2019).
 295. Styles, C. E. *et al.* Modeling the parvovirus B19 blood safety risk in Australia. *Transfusion* **59**, 295–302 (2019).
 296. Slavov, S. N., Otaguiri, K. K. & Covas, D. T. Prevalence and Viral Load of Human Parvovirus B19 (B19V) Among Blood Donors in South-East Brazil. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **32**, 323–325 (2016).
 297. Slavov, S. N. *et al.* Low human parvovirus B19 (B19V) DNA prevalence in blood donors from central-west Brazil. *J. Med. Microbiol.* **68**, 622–626 (2019).
 298. Ke, L. *et al.* The prevalence of human parvovirus B19 DNA and antibodies in blood donors from four Chinese blood centers. *Transfusion* **51**, 1909–1918 (2011).
 299. Zhang, W., Ke, L., Changqing, L., Zhang, Y. & Li, W. Parvovirus B19V DNA contamination in Chinese plasma and plasma derivatives. *J. Transl. Med.* **10**, 1–8 (2012).
 300. Lefrère, J. *et al.* Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood* **106**, 2890–2896 (2005).
 301. Kumar, L. C. S. *et al.* Seroprevalence of human parvovirus B19 in healthy blood donors. *Med. J. Armed Forces India* **69**, 268–272 (2013).
 302. Brodin-Sartorius, A. *et al.* Severe transfusion-transmitted parvovirus B19 infection in a naive immunocompromised patient. *Transpl. Infect. Dis.* **13**, 97–98 (2011).
 303. Tsukada, Y. *et al.* Erythroid crisis caused by parvovirus B19 transmitted via red blood cell transfusion. *Intern. Med.* **50**, 2379–2382 (2011).
 304. Junqueira, P. C., Rosembliit, J. & Hamerschlak, N. História da Hemoterapia no Brasil. *Rev. Bras. Hematol. e Hemoter. e Hemoter.* **27**, 201–207 (2005).
 305. Saraiva, J. C. P. A História da Hemoterapia no Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **27**, 156–158 (2005).
 306. Basílio, F. P. de S. Evolução das Políticas de Hemoterapia no Brasil: O Sistema Público de Hemoterapia do Ceará. (2002).
 307. Brasil, M. da S. Programa Nacional de Sangue e Hemoderivados. in *Sangue e Hemoderivados* 13f (1986).
 308. Brasil. Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993. Aprova Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e

- derivados, e dá outras providências. in *Diário Oficial da União* (ed. Ministério da Saúde) (1993).
309. Silva Júnior, J. B., Costa, C. da S. & Baccara, J. P. de A. Regulação de sangue no Brasil: contextualização para o aperfeiçoamento. *Rev. Panam. Salud Pública* **38**, 333–338 (2015).
310. Brasil. Lei nº 10.205, de 21 de março de 2001. Regulamento o parágrafo 4º do artigo 199 da Constituição Federal, relativo a coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados. in *Diário Oficial da União* (2001).
311. Brasil, M. da S. *Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue*. (2004).
312. Brasil, C. F. (1988). Portaria nº 158, de 4 de fevereiro de 2016. Redefine regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0158_04_02_2016.htm (2016).
313. Corrêa, A. S. de M. *O impacto da implantação do teste NAT-HBV na Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Pará (HEMOPA), na Região Norte do Brasil*. (2019).
314. SES, G. E. do R. de J. HEMORIO - 60 anos. *Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro* http://www.hemorio.rj.gov.br/html/historico_novo/historico_1944.htm.
315. Thompson, S. K. Estimating Proportions, Ratios, and Subpopulation Means. in *Sampling* 57–66 (John Wiley & Sons, Inc., 2012).
316. Durigon, E. L., Erdman, D. D. & Gary, G. W. Virological Methods Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Methods* **44**, 155–165 (1993).
317. Tourinho, R. S. *et al.* Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR. *J. Genet. Genome Res.* **2**, 23–25 (2015).
318. Molenaar-de Backer, M. W. A. *et al.* Detection of parvovirus B19 DNA in blood: Viruses or DNA remnants? *J. Clin. Virol.* **84**, 19–23 (2016).
319. Tamura, K. & Nei, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512–526 (1993).
320. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. MEGA6:

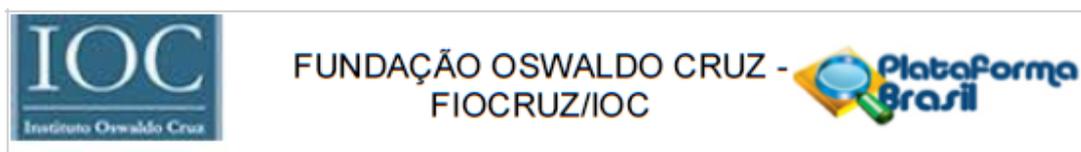
- Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729 (2013).
321. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549 (2018).
322. Sistema de Informação de Produção Hemoterápica - HEMOPROD. Total de Bolsas de Sangue Coletadas pela Hemorrede Pública. *Indicadores 2020* http://www.hemorio.rj.gov.br/Html/Apresentacoes/Indicadores_Hemorio_2020/Dados.htm#1 (2021).
323. World Health Organization WHO. Hepatitis A. *Fact sheet N°328* www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/en/ (2020).
324. Meyers, J., Huff, J., Holmes, K., Thomas, E. & Bryan, J. Parenterally transmitted hepatitis A associated with platelet transfusions: Epidemiologic study of an outbreak in a marrow transplantation center. *Ann Intern Med* **81**, (1974).
325. Skidmore, S. J., Boxall, E. H. & Ala, F. A case report of post-transfusion hepatitis A. *J. Med. Virol.* **10**, 223–223 (1982).
326. Sherertz, R. J., Russell, B. A. & Reuman, P. D. Transmission of Hepatitis A by Transfusion of Blood Products. *Arch. Intern. Med.* **144**, 1579–1580 (1984).
327. Hughes, J. A. *et al.* Case report of a transfusion-associated hepatitis A infection. *Transfusion* **54**, 2202–2206 (2014).
328. ANVISA, A. N. de V. S. Portaria n°. 2.712, de 12 de novembro de 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. in *Diário Oficial da União n°.221, de Dezembro de 2010* (2010).
329. ANVISA, A. N. de V. S. Resolução RDC n°. 51, de 7 de novembro de 2013. Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. in *Diário Oficial da União n°. 221 (2AD)*.
330. Chudy, M., Nübling, C. M., Blümel, J., Daas, A. & Costanzo, A. Establishment of the Ph. Eur. Hepatitis A virus RNA for NAT testing BRP batch 1. *Pharmeur Bio Sci Notes* **2017**, 29–43 (2017).
331. Jones, S. L. & Chapa, J. Prevalence of hepatitis A virus (HAV) and high titer parvovirus B19 in recovered and source plasma donations. *Transfusion* **53**, (2013).
332. Sun, P. *et al.* Prevalence of hepatitis A viral RNA and antibodies among

- Chinese blood donors. *Genet. Mol. Res.* **14**, 16431–16437 (2015).
333. Gallian, P. *et al.* Hepatitis A: an epidemiological survey in blood donor, France 2015 to 2017. *Eurosurveillance* 1–5 (2017).
334. Gallian, P. *et al.* Persisting higher prevalence of hepatitis A virus RNA in blood donors, France, 2018. *Eurosurveillance* **24**, 2018–2019 (2019).
335. FDA. Nucleic Acid Testing (NAT) to Reduce Parvovirus B19 Transmission by the Possible Risk of Human Plasma-Derived Products. *Guidance for Industry* (2009).
336. Schmidt, M. *et al.* Blood donor screening for parvovirus B19 in Germany and Austria. *Transfusion* **47**, 1775–1782 (2007).
337. Sakata, H. *et al.* Impact of chemiluminescent enzyme immunoassay screening for human parvovirus B19 antigen in Japanese blood donors. *Transfusion* **53**, 2556–2566 (2013).
338. Kleinman, S. H. *et al.* Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion* **47**, 1756–1764 (2007).
339. Wang, R., Wu, M.H., Tang, R.C.&Huang, X. N. Analysis of human parvovirus B19 infection in blood donor screened by PCR. *Jiangsu Heal. Care* **4**, 14 (2002).
340. Wilson, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3741–3751 (1997).
341. Demeke, T. & Jenkins, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 1977–1990 (2010).
342. Kontanis, E. J. & Reed, F. A. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *J. Forensic Sci.* **51**, 795–804 (2006).
343. MMWR. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Recomm Rep* **48**, 1–37 (1999).
344. Zanella, A. *et al.* Transfusion-transmitted human parvovirus B 19 infection in a thalassemic patient. *Transfusion* **35**, 769–772 (1995).
345. Jordan, J., Tiangco, B., Kiss, J. & Koch, W. Human Parvovirus B19: Prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. *Vox Sang.* **75**, 97–102 (1998).
346. Satake, M. *et al.* Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood

- component transfusion. *Transfusion* **51**, 1887–1895 (2011).
347. Saúde, M. da. *Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais*. (2019).
348. Chen, G. J., Lin, K. Y., Hung, C. C. & Chang, S. C. Hepatitis A outbreak among men who have sex with men in a country of low endemicity of hepatitis A infection. *J. Infect. Dis.* **215**, 1339–1340 (2017).
349. Matsukura, H., Shibata, S., Tani, Y., Shibata, H. & Furuta, R. A. Persistent infection by human parvovirus B19 in qualified blood donors. *Transfusion* **48**, 1036–1037 (2008).
350. De Paula, V. S., Saback, F. L., Gaspar, A. M. C. & Niel, C. Mixed infection of a child care provider with hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB revealed by heteroduplex mobility assay. *J. Virol. Methods* **107**, 223–228 (2003).

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da infecção pelo Parvovirus humano B19 e hepatites virais A e E em plasma de doadores de sangue

Pesquisador: Luciane Almeida Amado

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17579919.0.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.523.916

Apresentação do Projeto:

As hepatites agudas se caracterizam pelo processo inflamatório hepático e podem originar-se de diversos agentes causais. Entre os vírus classicamente hepatotrópicos, estão os vírus das hepatites com via de transmissão entérica como o vírus da hepatite A (HAV) e vírus da hepatite E (HEV). Estes são associados com mais frequência a casos de hepatite aguda e em menor frequência a falência hepática fulminante. A forma fulminante de hepatite viral também tem sido relacionada à presença do herpes simplex vírus (HSV) e do parvovírus B19. Atualmente, a transmissão de doenças infecciosas através de transfusão está sendo reduzida no Brasil e em outros países, devido a adoção de uma triagem clínica cuidadosa e uma nova geração de testes sorológicos. Mais recentemente, a utilização de testes de ácidos nucleicos (NAT) para a detecção do HIV, HCV e HBV aumentou a segurança das transfusões, reduzindo o período de janela de infecção. No entanto, os vírus da hepatite A (HAV), E (HEV), e Parvovírus B19 não estão incluídos nos testes de triagem de doadores de sangue. A transmissão do HAV e do HEV através do sangue e hemoderivados é rara, mas alguns estudos relatam casos de hepatite pós-transfusional por esses agentes.

O risco de transmissão parenteral ocorre durante o período de viremia e antes do aparecimento de sintomas. Para garantir a segurança da transfusão de sangue, a triagem da infecção pelo PVB19, através da detecção do DNA do PVB19 entre pools de plasma de doadores de sangue é atualmente recomendada em alguns países da América do Norte e na Europa como um processo de controle.

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.523.916

Entretanto, intervenções visando a prevenção da transmissão do PVB19 por transfusão de componentes do sangue ainda não foram implementadas na grande maioria dos países, como o Brasil, principalmente devido aos baixos níveis de DNA do PVB19 entre doadores de sangue e o custo de implementar um método diagnóstico específico para o PVB19 na triagem das doações. Considerando-se o possível risco de transmissão dessas infecções (HAV, HEV e PVB19) por sangue e hemoderivados e a sua resistência à inativação viral por, praticamente, todas as técnicas de inativação de vírus aplicadas nos processos de fabricação de plasma, destacase a importância de avaliar a necessidade de detecção prévia desses vírus nas transfusões de sangue. Desta forma, esse estudo visa avaliar a prevalência da infecção pelo HAV, HEV e PVB19 entre doadores de sangue e o risco de transmissão por transfusão sanguínea, a fim de contribuir para o estabelecimento de medidas de vigilância e intervenção da transmissão de infecção nos sistemas de banco de sangue.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar a prevalência da infecção pelos vírus das hepatites A, E e Parvovírus B19 em amostras de plasma provenientes de bancos de sangue do Brasil e avaliar o risco de transmissão transfusional desses vírus.

Objetivo Secundário:

1. Determinar a prevalência de hepatite A, Hepatite E e de Parvovirus B19 em de doadores de sangue;
2. Detectar e quantificar o HAV, HEV e PVB19 em amostras de sangue, plasma e hemoderivados provenientes de doadores de sangue através de PCR qualitativo e PCR em tempo real;
3. Determinar os genótipos do HAV, HEV e PVB19 isolados nas amostras de doadores de sangue, através de sequenciamento nucleotídico.
4. Construir um painel de amostras-controle provenientes de plasma de doadores de sangue para padronização e validação interna de diferentes plataformas de diagnóstico dessas infecções;
5. Padronizar a detecção de marcadores sorológicos e moleculares das hepatites A e E e PVB19, através de diferentes plataformas de diagnóstico dessas infecções, tais como: testes rápidos, biossensores e PCR.

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** oepfocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.523.916

6. Avaliar o risco de transmissão transfusional do HAV, HEV e B19V em bancos de sangue

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou oxidação no local, que serão controladas por uma coleta de sangue realizada dentro das normas de biossegurança por profissionais experientes na coleta de sangue

Benefícios:

Os benefícios resultantes deste projeto aos participantes serão indiretos em termos de retorno social e acesso a futuros procedimentos laboratoriais de diagnóstico diferencial das hepatites virais A, E e o Parvovírus humano B19, uma vez que este estudo irá fornecer dados sobre a prevalência desse vírus e o risco de transmissão transfusional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está de pleno acordo quanto a resolução 466/2012 no que diz respeito à proteção do participante da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- folha de rosto, assinada pelo V.Diretor, ratificando a responsabilidade pelo orçamento da pesquisa pela Instituição.
- cronograma - com a declaração de só iniciar após a aprovação do CEP
- orçamento - Detalhado com a participação da INOVA.
- projeto detalhado.
- TCLE - com linguagem clara de acordo com a 466/2012
- Declaração de infra-estrutura - o lab de Virologia possui toda a infraestrutura necessária para pesquisa e armazenamento, assinada pelo chefe do laboratório
- documentos Biorrepositório - armazenamento e transpore tudo de acordo com a 441/2011
- CV Lattes de toda a equipe, comprovando a experiência
- Carta de anuência - Hemorio devidamente assinada com a observação de só autorizar o início da pesquisa após a aprovação do CEP.
- Declaração de compromisso - apresentação de relatório parcial e final
- Termo de confidencialidade - assinada por todos os membros da equipe.
- Justificativa - declaração de justificativa pela reapresentação do projeto.

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.523.916

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 252ª reunião (extraordinária), realizada em 13.08.2019, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1398103.pdf	17/07/2019 10:19:29		Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_assinada.pdf	17/07/2019 10:17:44	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	Carta_anuencia_Hemorio.pdf	16/07/2019 14:39:39	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração do Patrocinador	declaracao_compromisso_04jul19.pdf	16/07/2019 14:38:46	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Fiocruz_04jul19.pdf	16/07/2019 14:38:31	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	CEP_carta_justificativa_04jul19.pdf	16/07/2019 14:38:10	Luciane Almeida Amado	Aceito
Parecer Anterior	PARECER_anterior_CEP_1610747.pdf	16/07/2019 14:37:45	Luciane Almeida Amado	Aceito
Orçamento	CEP_declaracao_orcamento_04jul19.pdf	16/07/2019 14:36:39	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CEP_temo_confidencialidade_04jul19.pdf	16/07/2019 14:35:47	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Manuseio Material	CEP_biorrepositorio_04jul19.pdf	16/07/2019 14:34:19	Luciane Almeida Amado	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.523.916

Biológico / Biorepositório / Biobanco	CEP_biorrepositorio_04jul19.pdf	16/07/2019 14:34:19	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CEP_declaracao_infraestrutura_04jul19.pdf	16/07/2019 14:33:50	Luciane Almeida Amado	Aceito
Cronograma	CEP_cronograma_04jul19.pdf	16/07/2019 14:33:35	Luciane Almeida Amado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_04jul19.pdf	16/07/2019 14:33:21	Luciane Almeida Amado	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 21 de Agosto de 2019

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manginhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfocruz@ioc.fiocruz.br

8.2 ANEXO 2 - SEQUÊNCIAS PROTÓTIPOS DE HAV UTILIZADAS PARA A CONSTRUÇÃO DE ÁRVORE FILOGENÉTICA

Número Genbank	Genótipo	Isolado	Origem	Referência
X15464	IA	HAS-15	EUA	Sverdlov et al., 1987
AF26896	IB	HAF-203	RJ/Brasil	Gaspar et al., 1992
M14707	IB	HM-175	Austrália	Cohen et al., 1987
L07729	IIA	SLF88	Serra Leoa	Robertson et al., 1992
L07693	IIB	CF-53	França	Robertson et al., 1992

8.3 ANEXO 3 - SEQUÊNCIAS PROTÓTIPOS DE B19V UTILIZADAS PARA A CONSTRUÇÃO DE ÁRVORE FILOGENÉTICA

Número Genbank	Genótipo	Isolado	Origem	Referência
M24682	1a	B19-Wi	Reino Unido	Blundel et al., 1987
U38546	1a	BrIII	RJ/Brasil	Cruz et al., 1988
U38508	1a	IRE1	Irlanda	Erdman et al., 1996
Z68146	1a	Stu	Alemanha	Hicks et al., 1996
AF162273	1a	HV	Finlândia	Hokynar et al., 2000
DQ293995	1a	C39	Bélgica	Parsyan et al., 2006
EF089179	1a	PA79055BR	PA/Brasil	Freitas et al., 2007
EF089209	1a	PA91018BR	PA/Brasil	Freitas et al., 2007
EU478562	1a	S2337GerB05	Alemanha	Norja et al., 2008
EU478578	1a	S2827GerB04	Alemanha	Norja et al., 2008
JN211168	1a	176937	Holanda	De Backer et al., 2012
KC013321	1a	09BRSP6896	SP/Brasil	Da Costa et al., 2013
DQ357064	1b	Vn147	Vietnã	Toan et al., 2006
DQ357065	1b	Vn115	Vietnã	Toan et al., 2006
AY044266	2	LaLi	Finlândia	Hokynar et al., 2002
AY064475	2	A6	Itália	Nguyen et al., 2002
AJ249437	3a	V9	França	Nguyen et al., 1999
AY083234	3b	D91.1	França	Servant et al., 2002