



UFAM



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**Deteccção da hepatite B oculta nas regionais de saúde do Baixo Amazonas,
Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo do
Estado do Amazonas**

Mônica Nascimento dos Santos Moresco

Orientadora: Professora Doutora Kátia Luz Torres Silva
Co-orientadora: Professora Doutora Adriana Malheiro

Manaus – Amazonas
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Mônica Nascimento dos Santos Moresco

**Detecção da hepatite B oculta nas regionais de saúde do Baixo Amazonas,
Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo do
Estado do Amazonas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Professora Doutora Kátia Luz Torres Silva
Co-orientadora: Professora Doutora Adriana Malheiro

Manaus – Amazonas
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Mônica Nascimento dos Santos Moresco

**Deteção da hepatite B oculta nas regionais de saúde do Baixo Amazonas, Entorno de Manaus,
Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo do Estado do Amazonas**

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Mestrado em sessão pública realizada em:

30/11/2012

Banca examinadora:

Professora Doutora Kátia Luz Torres Silva
Universidade Federal do Amazonas/UFAM
Presidente

Professor Doutor José Eduardo Levi
Fundação Pró-Sangue/São Paulo
Examinador (1)

Professora Doutora Cristina Melo Rocha
Universidade Federal do Amazonas/UFAM
Examinador (2)

FICHA CATALOGRÁFICA

MORESCO, Mônica Nascimento dos Santos

Detecção da hepatite B oculta nas regionais de saúde do Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo do Estado do Amazonas / Mônica Nascimento dos Santos Moresco - Manaus, AM: UFAM, 2012.

Inclui referencias.

Dissertação (Mestre em Imunologia). Universidade Federal do Amazonas
Orientadora: Professora Doutora Kátia Luz Torres Silva

DNA-VHB, hepatite B oculta, doadores de sangue, Amazônia

Dedicatória

*Aos meus pais Maurílio Tomé dos Santos e
Márcia Nascimento dos Santos.
Ao meu esposo Celso Moresco e aos
meus filhos Gabriel dos Santos
Moresco e Isabelle dos Santos
Moresco.*

*A minha orientadora Dra. Kátia Torres pela dedicação,
orientação e paciência na elaboração deste trabalho.
A coordenadora do projeto MSc. Márcia Poinho pela garra
e coragem que me foi transmitida.
Aos colaboradores do grupo desta pesquisa Helaine
Virgolino, Isabella Passos, Lya Manoela, Kelly Raphaelle,
Cynara Gato, Edson Lira e Felicien Vásquez pela amizade e
comprometimento com o trabalho.
Aos amigos da FHEMOAM que direta e indiretamente
contribuíram na realização deste trabalho.
A FHEMOAM pela parceria na logística deste estudo,
principalmente ao setor de Interiorização.
Aos doadores e as Unidades de Coleta do interior do estado do
Amazonas pela importante e inestimável participação e pela
colaboração com o desenvolvimento da pesquisa.
Aos colaboradores da Fundação Alfredo da Matta pela
parceria na realização dos ensaios moleculares.
Ao Dr. José Eduardo Levi e sua equipe da Fundação pró-
sangue-Hemocentro de São Paulo pelo conhecimento e
treinamento sobre as técnicas de biologia molecular.
Aos meus amigos e professores da Universidade Federal do
Amazonas que sempre me incentivaram e me deram força.
Em especial às minha amigas Maria José, Maria Carolina,
Cecília Camilo e Deiziane Epifânio pela amizade,
companheirismo, e força durante todo o período do
Mestrado.
Aos meus pais pelo apoio e a pela educação que recebi,
formando uma pessoa responsável e sempre otimista.
Ao meu esposo e aos meus filhos pela compreensão,
companheirismo e paciência durante a minha ausência.
E principalmente a Deus, por me dá a vida e saúde para
concluir este trabalho.*

Muito Obrigada!

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AgAu: antígeno Austrália	mL: mililitro
ALT: alanina aminotransferase	mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
anti-HBc: anticorpo contra antígeno do <i>Core</i> do vírus da hepatite B	MS: ministério da saúde
anti-HBe: anticorpo contra o antígeno “e” do vírus da hepatite B	mUI/mL: mili unidade internacional por mililitro
anti-HBs: anticorpo contra antígeno de superfície do vírus da hepatite B	µL: microlitro
APCs: células apresentadoras de antígenos	NAT: tecnologia de detecção de ácidos nucleicos
AST: aspartato aminotransferase	nm: nanômetro
ATs: agências transfusionais	NK: células Natural Killer
BT: bilirrubina total	NKT: células Natural Killer T
CMIA: imunoensaio quimioluminescente por micropartículas	NLRs: receptores Nod-like
DCTA-C: desenvolvimento científico tecnológico amazônico – tipo C	OMS: organização mundial de saúde
DNA: ácido desoxirribonucleico	PAMPs: padrões moleculares associados à patógenos
DNA-VHB: ácido desoxirribonucleico do vírus da hepatite B	PCR: reação em cadeia da polimerase
FA: fosfatase alcalina	pDC: células dendríticas plasmocitóides
GGT: gama glutamil transferase	POP: procedimento operacional padrão
HCC: carcinoma hepatocelular	PRRs: receptores de reconhecimento padrão
HBcAg: antígeno do <i>Core</i> do VHB	rHBcAg: antígeno do <i>Core</i> recombinante
HBeAg: antígeno “e” do VHB	RLHs: receptores Helicases-like
HBsAg: antígeno de superfície do VHB	RLU: unidades relativas de luz
HIV: vírus da imunodeficiência humana	RNA: ácido ribonucleico
IC: intervalo de confiança	rpm: rotação de partículas por minuto
IgG: Imunoglobulina G	SH: hepatite sérica
IgM: Imunoglobulina M	SUS: sistema único de saúde
IL-2: interleucina tipo 2	TLR-1: receptor Toll like tipo 1
IL-6: interleucina tipo 6	TLR-2: receptor Toll like tipo 2
IL-10: interleucina tipo 10	TLR-3: receptor Toll like tipo 3
IL-1β: interleucina 1 beta	TLR-4: receptor Toll like tipo 4
IFN-I interferon do tipo I	TLR-5: receptor Toll like tipo 5
IFN-α: interferon alfa	TLR-7: receptor Toll like tipo 7
IFN-β: interferon beta	TLR-9: receptor Toll like tipo 9
IFN-λ: interferon lambda	TLR-10: receptor Toll like tipo 10
ISO: organização internacional para padronização	TLRs: receptors Toll-like
IOB: infecção oculta pelo vírus B	TMA: amplificação mediada por transcrição
KC: células de Kupffer	TNF-α: fator de necrose tumoral alfa
mDC: células dendríticas mielóides	UCT's: unidades de coletas transfusionais
	UI/mL: unidade internacional por mililitro
	VHB: vírus da hepatite B
	VHC: vírus da hepatite C

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Estrutura dos vírus da hepatite B.....	18
Figura 2. Constituição do genoma do VHB com suas estruturas gênicas.....	20
Figura 3. Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B no mundo. Adaptado de WHO, 2009.....	21
Figura 4. Curso sorológico da hepatite B na fase aguda e crônica da doença.....	32
Figura 5. Mapa com as sub-regiões das regionais de saúde, destacando o Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, rio Negro e Solimões e Triângulo do Estado do Amazonas.....	40
Figura 6. Esquema das mudanças de critérios e o impacto na frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B nas doações oriundas do interior do estado do Amazonas.....	85
Quadro 1. Interpretação dos resultados sorológicos na infecção por hepatite B.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da população dos dois grupos de estudo e a chance da frequência do DNA-VHB na população de doadores do interior do Estado do Amazonas.....	41
Tabela 2. Tamanho amostral e distribuição nos dois grupos.....	42
Tabela 3. Tamanho amostral e distribuição nos dois grupos para as regionais de saúde do Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo.....	42
Tabela 4. Mix para amplificação do VHB.....	49
Tabela 5. Sequência de Primers/Probe do VHB.....	50
Tabela 6. Frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B.....	86
Tabela 7. Distribuição da amostra entre os grupos de estudo.....	86
Tabela 8. Distribuição das frequências dos perfis dos doadores de sangue de acordo com o gênero, idade e procedência provenientes das regionais de saúde estudadas e divisão dos grupos de estudo no período de junho de 2011 a junho de 2012.....	87
Tabela 9. Distribuição das frequências dos fatores de risco para hepatite B nos doadores de sangue provenientes das regionais de saúde estudadas e divisão dos grupos de estudo no período de junho de 2011 a junho de 2012.....	88
Tabela 10. Prevalência do DNA-VHB nos candidatos à doação de sangue e distribuição quanto à procedência e grupos de estudo no período de junho de 2011 a junho de 2012.....	89
Tabela 11. Associação entre a ausência do marcador anti-HBs com a presença do DNA-VHB nos candidatos à doação de sangue das regionais de saúde estudadas com anti-HBc+ e HBsAg- no período de junho de 2011 a junho de 2012.....	90
Tabela 12. Distribuição das frequências dos dados demográficos, clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos candidatos à doação de sangue do interior do estado do Amazonas, com amostras anti-HBc total positivas, HBsAg negativas e DNA-VHB reativos. No período de junho de 2011 a junho de 2012.....	91

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
2.1 Histórico.....	15
2.2 Biologia dos vírus da hepatite B.....	17
2.3 Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite B.....	20
2.4 Transmissão.....	22
2.5 Infecção Oculta pelo VHB.....	23
2.6 Risco de Transmissão Transfusional.....	25
2.7 Quadro Clínico.....	27
2.8 Resposta Imune.....	28
2.9 Tratamento.....	30
2.10 Diagnóstico Laboratorial.....	31
2.11 Prevenção.....	33
3. JUSTIFICATIVA	35
4. OBJETIVOS	37
4.1 Geral.....	37
4.2 Específicos.....	37
5. METODOLOGIA	38
5.1 Desenho do Estudo.....	38
5.2 População de Estudo.....	38
5.3 Problema.....	38
5.4 Hipóteses.....	39
5.5 Grupos de Estudo.....	39
5.6 Área de Estudo.....	39
5.7 Cálculo Amostral.....	41
5.8 Critérios de Elegibilidade.....	43
5.9 Procedimentos.....	43
5.91 Princípios dos testes utilizados.....	45
5.10 Análises Estatísticas.....	50
5.11 Aspectos Éticos.....	50
6. RESULTADOS	51
7. DISCUSSÃO	92
8. CONCLUSÕES	98
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	112
APÊNDICE B. Questionário Epidemiológico	113
APÊNDICE C. Planilha de Controle de Casos	115
APÊNDICE D. Fluxograma Metodológico	116
ANEXOS	117

RESUMO

A epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) demonstra uma distribuição diversificada no mundo, afetando cerca de 2 bilhões de pessoas com alta frequência de infecção crônica. A segurança transfusional depende da avaliação clínico-epidemiológica apropriada de candidatos à doação de sangue e do uso de testes de seleção adequados para excluir e evitar a transmissão de agentes infecciosos tais como o VHB. A ocorrência de infecção oculta pelo VHB em doadores de sangue assintomáticos abriu uma nova lacuna a ser preenchida principalmente em hemocentros de regiões de alta prevalência como na Amazônia brasileira, que são desafiados a buscar estratégias de garantia de estoques considerando o alto impacto do descarte de hemocomponentes anti-HBc reativos. Este estudo buscou analisar nas doações de sangue do interior do estado do Amazonas a presença da infecção oculta pelo vírus da hepatite B em amostras anti-HBc total positivas com ou sem o marcador anti-HBs. A população de estudo foi composta por candidatos à doação de sangue que se apresentaram nas Unidades de Coletas Transfusionais (UCT's) nas regionais de saúde do Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo, no período de junho/2011 a junho/2012. Foram analisados dois grupos de doadores negativos para HBsAg: os que apresentaram reatividade para anti-HBc com e sem a presença do anti-HBs. Foram utilizados métodos sorológicos qualitativos e quantitativos dos marcadores para a infecção e moleculares para detecção e quantificação da carga viral do DNA-VHB. A prevalência do anti-HBc total reativo no interior do estado do Amazonas entre os doadores de sangue foi de 24,4%. Foram analisadas 179 amostras anti-HBc reativas e HBsAg negativas, destas, 04 foram positivas para o DNA-VHB, caracterizando infecção oculta pelo vírus B com uma prevalência de 2,2%. Das 179 amostras, 03 apresentaram anti-HBs ≥ 100 mUI/mL, indicando que o marcador protetor mesmo em altos títulos não evidencia a ausência do vírus. Não houve correlação entre os títulos do anti-HBs e anti-HBc com a carga viral encontrada. A maior frequência dos doadores foi do sexo masculino com 90% em ambos os grupos de estudo e não houve relato de exposição aos fatores clássicos de risco para a infecção entre os doadores com DNA-VHB. A evidência da presença de IOB entre os doadores de sangue do interior do Estado do Amazonas abre espaço para discussão das melhores estratégias a serem utilizadas na triagem de doadores de sangue em regiões de alta prevalência e de perfil de transmissão peculiar como o caso da Amazônia. Atualmente, tanto os testes de

triagem sorológica, quanto o teste NAT precisam ser redesenhados no intuito de aprimorar as estratégias de controle da transmissão transfusional buscando um algoritmo balanceado entre a rejeição de doadores potenciais, descarte de unidades, razões econômicas e segurança desejada.

Palavras-chave: DNA-VHB, hepatite B oculta, doadores de sangue, Amazônia

SUMMARY

The epidemiology of hepatitis B virus infection (HBV) demonstrates a diversified distribution in the world affecting an estimated 2 billion people with high frequency of chronic infection. The safety of blood transfusion depends on the clinical and epidemiological appropriate candidates for blood donation and the use of appropriate screening tests to exclude and prevent transmission of infectious agents such as HBV. The occurrence of occult HBV infection in asymptomatic blood donors opened a new gap to be filled mainly to blood centers in areas of high prevalence as in the Brazilian Amazon, which are challenged to look for assurance strategies for stocks considering the high impact of the disposal of blood products reactive anti-HBc. This study investigated the blood donations in the country town of the Amazonas State the presence of occult hepatitis B virus infection in samples positive anti-HBc with or without anti-HBs. The study population was composed of candidates for blood donation that appeared in Units Collections Transfusion (UCT's) in regional health Lower Amazon, Around of Manaus, Middle Amazon, Rio Negro and Solimoes and Triangle, from June/2011 to June/2012. We analyzed two groups of donors negative for HBsAg: those that were reactive for anti-HBc with and without the presence of anti-HBs. We used qualitative and quantitative methods of serological markers for infection and molecular detection and quantification of the viral load of HBV DNA. The prevalence of anti-HBc reactive in the Amazonas State among blood donors was 24.4%. We analyzed 179 samples reactive anti-HBc and HBsAg negative, of these, 04 were positive for HBV DNA, featuring occult hepatitis B virus infection with a prevalence of 2.2%. Of these 179 samples, 03 had anti-HBs ≥ 100 mIU/mL, indicating that the marker protector even in high titers does not show the absence of the virus. There was no correlation between the titers of anti-HBs and anti-HBc with viral load found. The higher frequency of donors were male with 90% in both

study groups and there was no report of exposure to the classical risk factors for infection among donors with HBV DNA. The evidence of the presence of OBI among blood donors in the Amazonas State opens space for discussion of the best strategies to be used in screening blood donors in areas of high prevalence and transmission profile as the peculiar case of the Amazon. Currently, both serological screening tests, as the test NAT need to be redesigned in order to improve the control strategies transfusion transmission seeking an algorithm balanced between the rejection of potential donors, disposal units, security and economic reasons desired.

Keywords: HBV DNA, occult hepatitis B, blood donors, Amazon

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) afeta cerca de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo e mais de 350 milhões destes apresentam infecção crônica em diferentes estágios da doença (WHO, 2010; Huang & Cheung, 2011). A infecção constitui um importante problema de saúde pública no Brasil especialmente na região Amazônica. No estado do Amazonas a prevalência na população geral para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) pode variar de 2% a 9% e a prevalência de anticorpos contra os antígenos do Core do vírus (anti-HBc) pode variar de 5 a 76% (Braga, *et al.*, 2005; El KHoury *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2012).

Conforme a normatização da hemoterapia no Brasil é preconizado que se deve descartar as unidades de hemocomponentes que apresentem reatividade aos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc. Em regiões endêmicas há um alto nível de rejeição de bolsas de sangue devido à presença destes marcadores sorológicos com grande comprometimento da disponibilidade dos estoques de sangue e hemocomponentes, ocasionando aumento do custo do processo (MS, 2010). A soroprevalência destes marcadores em doadores de sangue no estado do Amazonas apresenta importantes variações entre a capital e os municípios do interior do estado. A prevalência dos marcadores HBsAg e anti-HBc entre doadores de Manaus é 0,3% e 3,6% respectivamente. No interior do estado a prevalência é bem mais alta sendo em média para o HBsAg 0,6% e para anti-HBc total uma média de 31,7% (FHMOAM, 2010).

A segurança transfusional depende da seleção clínico-epidemiológica apropriada de doadores de sangue e do uso de testes de seleção adequados para excluir e evitar a transmissão de agentes infecciosos. A hepatite B oculta se caracteriza pela presença do DNA-VHB no sangue e/ou fígado de pessoas com HBsAg negativo. A implementação da detecção do DNA-VHB através do teste de detecção de ácidos nucleicos (NAT) tem sido um mecanismo para reduzir significativamente a infecção no período da janela imunológica do HBsAg e revelar a infecção oculta pelo vírus B (IOB). No entanto, existe um risco potencial de desenvolvimento de hepatite B pós-transfusional durante o período da janela imunológica dos marcadores sorológicos utilizados na triagem de doadores.

O anticorpo anti-HBs é dito ser protetor e indicativo de imunização. No entanto, mesmo em altos títulos não é sempre relacionado à ausência do vírus (Arraes *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005; Behzad-Behbahani *et al.*, 2006; Manzini *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2007; Satoh *et al.*,

2008; Wendel *et al.*, 2008; Stefano *et al.*, 2009; Antar *et al.*, 2010; Thedja *et al.*, 2010; Massoomeh Sofian *et al.*, 2010). Em região com endemicidade similar a da região Amazônica foi descrito que o DNA-VHB pode estar presente em amostras de doadores de sangue reativas para o anti-HBc que possuem positividade para o anti-HBs com uma prevalência de 1,5% e em doadores com anti-HBs negativo com uma prevalência de 8% (Bhatti *et al.*, 2007).

O anticorpo contra o antígeno do *Core* do vírus (anti-HBc) é o marcador mais sensível para indicar contato prévio com o vírus. Ele aparece na fase aguda da infecção e usualmente persiste após o “clearance” viral, cura espontânea (Bhatti *et al.*, 2007). A presença do anti-HBc isolado está associado a: (a) estado de portador crônico com antígenos da superfície do vírus (HBsAg) indetectável; (b) infecção remota com perda da mensuração do anti-HBs; (c) transferência passiva do anti-HBc; (d) reação cruzada não específica; e (e) período em que o HBsAg já tenha desaparecido, mas o anti-HBs ainda não possa ser detectado (Almeida-Neto *et al.*, 2008; Wendel *et al.*, 2008).

Considerando o risco da transmissão transfusional, o NAT foi introduzido em países como: Canadá, Japão, EUA e países da Europa. (Yang *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). No Brasil estima-se que 5% a 10% das doações de sangue são testadas pelo NAT em centros privados para o vírus da hepatite C (VHC), vírus da Imunodeficiência adquirida (HIV-1) e VHB (Roth *et al.*, 2012). Desde 2011 os hemocentros do sistema público estão em fase de implantação do NAT para VHC e HIV-1, não contemplando a triagem para VHB (MS, 2009; Roth *et al.*, 2012).

A região Amazônica é caracterizada como uma das regiões do mundo de maior ocorrência da hepatite B e suas consequências. A hemoterapia nesta região enfrenta desafios particulares devido às diversidades epidemiológicas e geográficas. O Amazonas é o estado brasileiro de maior extensão (1,577,820 Km²) com 3.350.773 habitantes e Manaus abriga 77% da população do Estado (IBGE, 2010). É constituído por sete sub-regiões de acordo com a calha dos rios e suas características geográficas, são eles: Alto Solimões, Amazonas, Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo, que compreendem 62 municípios. (SUSAM, 2010). A Fundação de Hematologia e Hemoterapia do estado do Amazonas (FHMOAM) é o serviço público responsável por coordenar toda a hemoterapia do Estado. No estado são coletadas cerca de 49.000 unidades de sangue por ano nas 43 unidades de coletas transfusionais do interior e duas unidades da capital (FHMOAM, 2010). Todas as amostras de

sangue dos doadores do estado são submetidas a exames laboratoriais de triagem em Manaus onde funciona a central sorológica.

De forma a subsidiar maiores discussões sobre a segurança transfusional, este estudo tem como objetivo analisar nas doações de sangue do interior do estado do Amazonas a presença da hepatite B oculta em amostras anti-HBc total positivas com ou sem o marcador anti-HBs e contribuir para a avaliação se uma nova política de segurança transfusional deve ser adotada na triagem sorológica de hemocomponentes em bancos de sangue de áreas endêmicas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

A descoberta do vírus da hepatite B teve um caráter puramente acidental ou *por acaso*. Em 1963, o geneticista americano Baruch Blumberg estudando anticorpos contra lipoproteínas séricas em pacientes que tinham recebido transfusão de sangue, ou seja, com objetivos completamente diferentes dos objetivos iniciais e achados finais da pesquisa, identificou no soro pertencente a um aborígine Australiano, a presença de um antígeno que reagia como o soro de dois doentes hemofílicos politransfundidos (Alter, 2003; Blumberg, 1967). Inicialmente, e em decorrência de suas características, foi proposto pelos autores da descoberta a este antígeno, a denominação de antígeno vermelho (red antigen). Depois foi debatido e proposto dois nomes a este antígeno. O primeiro, antígeno Bethesda, local da descoberta (Alter, 2003), o segundo, antígeno Austrália (AgAu), em razão da nomenclatura vigente na época que determinava o nome das novas imunoglobulinas humanas descobertas ao local de origem da amostra do paciente (Alter, 2003). Somente em 1965, a descoberta do antígeno Austrália foi publicada no Journal of the American Medical Association (JAMA), com o título *A New antigen in Leukemia sera* (Blumberg *et al.*, 1965).

A ligação entre o AgAu e a hepatite só aconteceu quando Barbara Werner, uma investigadora do laboratório de Blumberg, desenvolveu um quadro clínico e bioquímico de hepatite aguda e testada para o AgAu, ela foi positiva. Previamente, a referida investigadora tinha servido de controle negativo para o AgAu (Blumberg, 2003).

Em 1967, Blumberg e cols sugeriram pela primeira vez que a alta frequência do AgAu no soro de pacientes com hepatite aguda poderia estar relacionada com um suposto *vírus* introduzido entre humanos por transfusões de sangue (Blumberg *et al.*, 1967). De acordo com Blumberg, tal publicação foi rejeitada inicialmente e aceita após intensa revisão dos autores (Blumberg, 2003). Os revisores da Revista *Annals of Internal Medicine* informaram ao autor que os resultados encontrados não eram convincentes para suportarem a hipótese de que o AgAu estaria associado a hepatite (Blumberg, 2003).

Independentemente dos achados de Blumberg, em 1965 e 1967, Prince AM, em 1968, isolou outro antígeno no sangue durante o período de incubação de uma hepatite pós-transfusional. O referido antígeno foi denominado de antígeno SH, relativo à Hepatite Sérica (Prince, 1968). Posteriormente, comprovou-se que o antígeno SH descrito por Prince AM era o mesmo antígeno Austrália de Blumberg.

No mesmo ano da descoberta de Prince AM, outro americano, e pertencente a equipe de Blumberg, chamado Bayer M analisou por microscopia eletrônica o soro de um portador crônico do antígeno Austrália e encontrou numerosas partículas, algumas esféricas e outras tubulares. As esféricas mediam cerca de 22nm de diâmetro, enquanto as tubulares cerca de 22nm de largura e 150nm de comprimento (Blumberg, 2003). Tais partículas reagiam com o soro dos pacientes convalescentes de hepatite, sugerindo que o AgAu estaria presente na sua superfície (Blumberg, 2003). Estudos posteriores revelaram que as partículas encontradas por Bayer M eram apenas um produto da síntese em excesso do antígeno de superfície pelos hepatócitos infectados (Blumberg, 2003). Tais partículas seriam na realidade, invólucros virais vazios não infectivos.

Finalmente, em 1970, foi demonstrada por microscopia eletrônica em soros positivos para o antígeno Austrália, uma terceira partícula de forma esférica e medindo cerca de 42nm (Dane *et al.*, 1970). Em 1971, Almeida e cols caracterizaram o que chamaram de partícula de Dane, o pacote viral completo do VHB (Almeida *et al.*, 1971; Reuben, 2002).

A primeira publicação sobre a presença do AgAu no Brasil deu-se em 1970, por Salzano & Blumberg. Estudando amostras de pacientes brasileiros para o referido antígeno, os autores revelaram uma prevalência de 0,5% entre indivíduos sadios, 0% entre portadores de hanseníase, de 4% entre portadores de leucemia, com prevalência total de 0,6% para o AgAu. Grande parte das amostras estudadas pertencia a indivíduos e pacientes nativos de Porto Alegre/RS e Florianópolis/SC (Salzano & Blumberg, 1970). Em 1973, estudos realizados na região

Amazônica brasileira revelaram pela primeira vez a presença do antígeno Austrália entre a população residente na zona rural do estado do Amazonas (Bensabath & Boshell, 1973).

Uma provável suposição para a disseminação da hepatite B na região Amazônica brasileira pode ter sido pelo emprego em massa da vacina contra a febre amarela nas décadas de 40 e 50, utilizando ainda vacinas derivadas de plasma humano e seringas e agulhas não descartáveis, servindo de veículo responsável pela disseminação e propagação da infecção pelo VHB e vírus da hepatite D (VHD) entre a população. Outro provável veículo de transmissão do VHB nesta região, área sabidamente endêmica de infecção pelo VHB e conseqüentemente o VHD, seria o uso de lancetas não descartáveis para fins de punção digital no diagnóstico da malária (Fonseca, 2010).

2.2 Biologia dos vírus da hepatite B

A hepatite B é uma doença infecciosa viral, contagiosa, causada pelo vírus da hepatite B (VHB). O agente etiológico é um vírus DNA, hepatovirus da família *hepadnaviridae*, hepatotrópico e não citopático, podendo apresentar-se como infecção assintomática ou sintomática (MS, 2002; Ferreira, 2004; MS, 2005; Fonseca, 2007).

O VHB é uma partícula esférica de 42nm de diâmetro constituída por um envoltório lipídico externo que contém o antígeno de superfície do VHB (HBsAg), o qual induz a formação de anticorpos específicos, anti-HBs, e uma estrutura interna central densa (*Core*) ou nucleocapsídeo de forma icosaédrica (Almeida *et al*, 1971). Essa estrutura central possui uma proteína (HBcAg) que induz a formação de anticorpos específicos (anti-HBc) pelos indivíduos infectados (Blumberg, 2003). O HBcAg não é secretado, sendo por isso muito difícil sua detecção no sangue circulante, diferente do que ocorre no fígado infectado, onde é abundante. Na zona central da partícula observa-se outro antígeno denominado antígeno “e” (HBeAg), que é secretado e que pode ser detectado no sangue (Magnius & Spmark, 1972; Hatzakis *et al.*, 2006). O antígeno “e” está associado à replicação e infectividade viral e induz a formação de anticorpos específicos (anti-HBe), que pode indicar o fim da fase replicativa na vigência da infecção aguda (Alexander, 1990; MS, 2005; Hatzakis *et al.*, 2006). A estrutura do vírus é destacada na **Figura 1**.

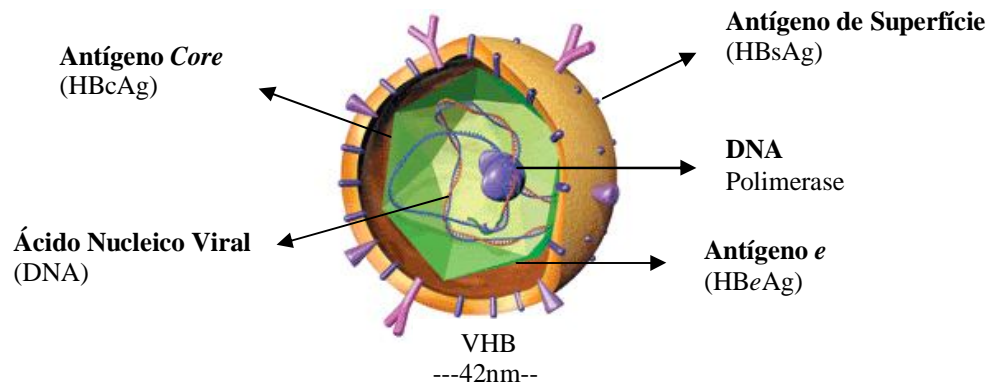


Figura 1. Estrutura dos vírus da hepatite B
 Fonte: Adaptado de Mark Waer, 2010

O genoma do VHB é constituído por um DNA circular de fita parcialmente dupla com aproximadamente 3.200 pb de comprimento e quatro genes descritos pelas letras: S, C, P e X. O gene S codifica o HBsAg, que está dividido em pré-S₁ a proteína grande (L), pré-S₂ proteína intermediária (M) e S que codifica a proteína menor (S). O gene C e a região pré-C (pré-core) codificam o HBcAg e o HBeAg, respectivamente. O gene P codifica a DNA-polimerase que possui atividade de transcriptase reversa e o gene X com função pouco esclarecida codifica proteínas transativadoras responsáveis pela regulação de promotores virais e celulares (Gonçales & Gonçales Jr, 2006; Santos *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011). Na **Figura 2** é possível visualizar a constituição do genoma do VHB.

A heterogeneidade do VHB classifica os vírus em genótipos, subtipos e subtipos sorológicos. Atualmente são descritos oito genótipos do VHB identificados pelas letras A, B, C, D, E, F, G e H. Recentemente dois novos genótipos estão em estudo, I e J, que são considerados provisoriamente em vários trabalhos (Tatematsu *et al.*, 2009; Phung *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). Estes genótipos estão divididos em pelo menos 24 subtipos, exceto para E e G para os quais não são descritos subgrupos. Ainda no âmbito da classificação do VHB e com base na heterogeneidade antigênica do HBsAg, nove subtipos sorológicos são descritos: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adwq*, *adr* e *adrq* (Adrian *et al.*, 2011). Esta diversidade tem grande importância na distribuição geográfica e muito auxilia ao traçar rotas epidemiológicas de disseminação e evolução molecular, também os diferentes genótipos podem interferir no curso

natural da doença, severidade, complicações e sucesso na terapia. (Adrian *et al.*, 2011; Jia-Horng, 2011).

O genótipo A circula principalmente na Europa, América do Norte, África e Índia. Os genótipos B e C são predominantes no Leste e Sudeste da Ásia, e Austrália. O genótipo D é encontrado no Oriente Médio e países mediterrânicos. O genótipo E parece ser predominante na África Ocidental (Kumar *et al.*, 2011). O Genótipo G foi caracterizado em amostras dos EUA, México e França, o genótipo F (específicos dos indígenas na América do Sul) e genótipo do tipo H encontrado exclusivamente na América Central e Sul (Mello *et al.*, 2007; Alvarado-Mora *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2012; Castilho *et al.*, 2012). O genótipo I foi isolado no Vietnã e Laos (Phung *et al.*, 2010; Yu H *et al.*, 2010) e o genótipo J foi identificado no Japão (Tatematsu *et al.*, 2009). No Brasil o genótipo A é o mais prevalente, mas também circulam os genótipos B, C, D e F o que reflete uma etnia diversificada da população, revelando ser um país modelo para estudos de genética de populações e suas relações com os diferentes genótipos do VHB (Santos *et al.*, 2010; Alvarado-Mora *et al.*, 2011).

Existem evidências que a heterogeneidade do VHB pode diferir em suas propriedades patogênicas e a interferência dos genótipos na evolução da hepatite B não apresenta um padrão necessariamente universal. A identificação dos genótipos passa a ser importante, uma vez que estes podem estar relacionados com diferenças na evolução clínica da infecção, na resposta ao tratamento antiviral além de auxiliar no prognóstico diante da doença (Santos *et al.*, 2010; Dény & Zoulim, 2010).

Estudos demonstraram que portadores do VHB com genótipos A e B apresentaram melhor resposta ao interferon (INF) quando comparados aos genótipos C e D. A avaliação dos genótipos E, F e H, frente à terapia com INF revelou uma maior sensibilidade a droga que o genótipo G (Dény & Zoulim, 2010; Chin-Lin & Jia-Horng, 2011; Jia-Horng, 2011). A severidade da hepatite B e a ocorrência de carcinoma hepatocelular (HCC) podem estar fortemente ligadas ao genótipo do VHB, levando em consideração a etnia, sexo do paciente e a prevalência do genótipo viral circulante na região. Muitos estudos apontam para o genótipo C como causador de doença mais severa no fígado e ao desenvolvimento de HCC (Guirgis *et al.*, 2010; Jia-Horng, 2011; Zhang & Cao, 2011).

A interferência do genótipo D do VHB sobre uma doença mais grave, na ocorrência de HCC e cirrose hepática, comparado ao genótipo A, também a tendência de desenvolvimento de

HCC em pacientes jovens é assunto na literatura, porém a discussão permanece em aberto. O genótipo F tem sido associado em um volume considerável de publicações com uma hepatite mais severa em pacientes mais jovens e ao desenvolvimento de HCC, além de estar associado a altos índices de mortalidade quando comparado a outros genótipos (Guirgis *et al.*, 2010).

A infecção oculta do VHB e sua relação com os genótipos não tem sido assunto de grande destaque na literatura, um estudo na Itália demonstrou que os genótipos A e D foram mais prevalentes na infecção oculta pelo VHB em pacientes (HBsAg negativos) co-infectados com o HIV e HCV (Raffa *et al.*, 2007). Outro trabalho, também com poucos casos, demonstrou pacientes que apresentaram infecção oculta pelo VHB e estavam infectados com genótipo D (Pinarbasi *et al.*, 2009) e no México outro achado foi genótipo H (García-Montalvo & Ventura-Zapata, 2011).

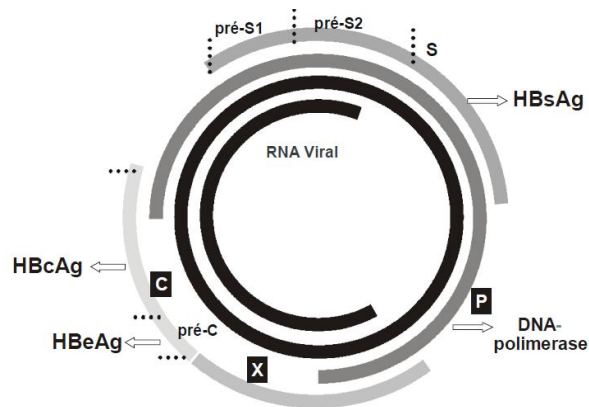


Figura 2. Constituição do genoma do VHB com suas estruturas gênicas
Fonte: Neiva & Fernando, 2006

2.3 Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite B

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a infecção pelo VHB afeta cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo e mais de 350 milhões destes apresentam infecção crônica em diferentes estágios da doença. Sendo assim, a OMS classifica a prevalência da infecção pelo

VHB em alta: quando está superior a 8% da população, intermediária: quando estiver entre 2% e 7% e baixa: quando inferior a 2% (WHO, 2009; Hwang & Cheung, 2011).

A infecção pelo VHB exibe alta prevalência para o HBsAg (8-15%) no Sudoeste Asiático, China, Filipinas, África, Bacia Amazônica, Oriente Médio, onde 75% da população, infecta-se precocemente na infância. Uma prevalência intermediária (2-7%) é observada no leste Europeu, Ásia Central, Japão, Israel e ex-União Soviética onde mais de 50% da população teve uma infecção pelo vírus no passado, enquanto, uma baixa prevalência (< 2%), é encontrada na América do Norte, Europa Ocidental, Austrália e Sul da América Latina (Lavanchy, 2004; Jilin Hou *et al.*, 2005; Hwang & Cheung, 2011), a prevalência da hepatite pelo mundo está representada na **Figura 3**.

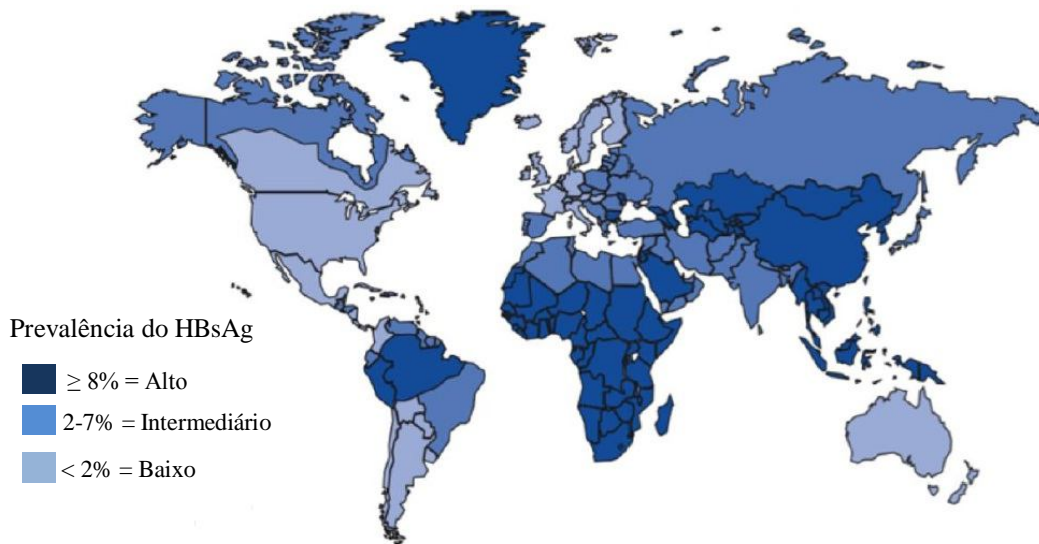


Figura 3. Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B no mundo
Adaptado de WHO, 2010

Um estudo de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites no Brasil, país de prevalência moderada para o VHB, registrou uma prevalência de (0,37%) para o HBsAg, (7,4%) para o anti-HBc e (76,7%) para o anti-HBs. Na região Norte do país considerada de alta prevalência para o VHB foi observado uma prevalência de (0,03%) para o HBsAg, (10,9%) para

o anti-HBc e destes (78,4%) foram reativos para o anti-HBs (Pereira et al., 2010; Ximenes et al., 2012). Um estudo realizado no Oeste da Amazônia brasileira registrou que 79,1% da população apresentaram evidência de sorologia para infecção do VHB e 10,2% apresentaram infecção crônica. A presença do anti-HD foi de 7,3% entre os indivíduos com anti-HBc positivos e 21,7% entre os indivíduos com HBsAg positivos (Castilho et al., 2012). No estado do Amazonas as prevalências na população geral para o HBsAg podem variar de 2% a 9% e para anti-HBc de 5% a 76% (Braga, *et al.*, 2005; Ei KHouri *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2012). A região Amazônica é caracterizada como uma das regiões do mundo de maior ocorrência da hepatite B e suas consequências. As transmissões horizontal e vertical são fortes fatores de risco na propagação e manutenção da doença nesta região (Ei Khouri *et al.*, 2010). Com toda a sua diversidade étnica, econômica e regional, a infecção pelo VHB também tem distribuição muito heterogênea no Brasil, com tendência a aumentar no sentido Sul-Norte (Souto *et al.*, 2004). De modo geral, a Região Sul do Brasil é considerada área de baixa prevalência, enquanto a Amazônia está entre as regiões de maior prevalência do mundo, em especial a Amazônia Ocidental, em uma área correspondente aos Estados do Acre, Rondônia, Roraima e no Amazonas. Entretanto, esse padrão não deve ser generalizado, uma vez que já foram identificadas áreas de prevalência elevada no Espírito Santo, Paraná e Santa Catarina, e de baixa prevalência no estado do Amazonas (Brasil *et al.*, 2003; Voigt *et al.*, 2010; Ei khouri *et al.*, 2010). Os municípios situados nas calhas dos rios Juruá, Purús e Médio Solimões no estado do Amazonas são considerados as áreas de maior endemicidade, com taxas significativamente elevadas (Braga *et al.*, 2005; Bensabath & Leão, 2007; Júnior *et al.*, 2008, Braga *et al.*, 2012). As taxas de infecção passada variam de 21% em Manaus (Ei khouri *et al.*, 2010) e 66% no interior do estado do Amazonas (Paula *et al.*, 2001).

2.4 Transmissão

O VHB está presente no sangue de indivíduos infectados, tanto na fase aguda da doença, como nas formas crônicas e durante o período de recuperação (convalescença). Além disso, o VHB pode ser detectado em outros fluidos corporais em baixos títulos, como na urina, na saliva, fluido nasofaríngeo, sêmem e fluido menstrual. O VHB é aproximadamente 100 vezes mais infectante do que o HIV e 10 vezes mais do que o VHC (Silveira *et al.*, 1999; Ferreira, 2004; Lavanchy, 2004).

A transmissão ocorre principalmente por via parenteral (transfusão de sangue e hemocomponentes), por meio de relações sexuais, transplantes de órgãos ou tecidos, além de vertical ou percutânea como, em intervenções odontológicas e cirúrgicas, hemodiálise, tatuagens, perfurações de orelha, piercings, uso de drogas com compartilhamento de seringas, agulhas ou outros equipamentos, acidentes perfuro cortantes, entre outros (Decker, 1993; CDC, 2003, Silveira *et al.*, 2003; Focaccia, 2007; Deneluz *et al.*, 2010; Hwang & Cheung, 2011).

Depois do contato com o vírus aproximadamente 5% a 10% dos indivíduos adultos infectados cronificam. Caso a infecção ocorra por transmissão vertical, o risco de cronificação nos recém-nascidos de gestantes com evidências de replicação viral (HBeAg reagente e/ou DNA-VHB $>10^4$ cópias) é cerca de 70 a 90%, sugerindo que a imunidade é importante para eliminar a infecção, e entre 10 a 40% nos casos sem evidências de replicação do vírus (Malika *et al.*, 2010). Cerca de 70 a 90% das infecções ocorridas em menores de 5 anos cronificam e 20 a 25% dos casos crônicos com evidências de replicação viral evoluem para doença hepática avançada (cirrose e HCC) e menos de 1% evoluem para uma hepatite fulminante (MS, 2005; Jilin Hou *et al.*, 2005; Candotti & Allain, 2009; Hwang & Cheung, 2011).

2.5 Infecção Oculta pelo VHB

Os indivíduos que entraram em contato com o VHB e não realizam clearance viral podem evoluir para diferentes estados de persistência viral da hepatite B que são classificados em: hepatite B crônica, portador inativo e hepatite B oculta.

A infecção oculta pelo VHB (IOB), silenciosa ou latente é caracterizada pela presença do DNA-VHB no sangue e/ou fígado de indivíduos com sorologia HBsAg negativo, cursando na maioria das vezes com viremia baixa com níveis de DNA-VHB $<10^3$ UI/mL. A IOB é dividida em dois grupos, de acordo com perfil dos anticorpos do VHB, são eles: soropositivos (anti-HBc+ e/ou anti-HBs positivos) e soronegativos (anti-HBc+ e anti-HBs negativos) (Lok ASE, 2004; Raimondo *et al.*, 2007; Purnak & Ozaslan, 2010; Wolf *et al.*, 2011; Rotch *et al.*, 2012).

Os casos de anti-HBc isolado passaram a ser estudados e podem ser consequência de diversos fatores: i) reações sorológicas falso-positivas: são mais frequentes nas regiões com baixa prevalência da infecção pelo VHB e devem ser suspeitadas quando ocorrem em títulos baixos nas

reações imunoenzimáticas, com densidade óptica da amostra próxima ao ponto de corte da reação; ii) período da janela imunológica: observada nas infecções agudas em resolução ou evolução, quando o HBsAg já se negativou e o anti-HBs ainda não é detectado, surgindo algumas semanas depois; iii) expressão de imunidade tardia: quando os níveis do anti-HBs decaem abaixo do limite de detecção dos testes e o anti-HBc permanece positivo, provavelmente em razão da maior imunogenicidade do HBcAg; iv) infecção crônica, onde a positividade do anti-HBc pode ocorrer concomitantemente com uma carga viral baixa do VHB, e o HBsAg não é detectado pelos métodos sorológicos habituais, passando a ser IOB (Allain, 2004; Chemin & Trepó, 2005; Zanetti *et al.*, 2006; Ocana *et al.*, 2011).

A IOB é constantemente observada entre os mais diversos estágios clínicos da infecção e doença ocasionada pelo vírus B, tais como: portadores inativos, hepatite crônica, cirrose hepática, HCC. Em áreas endêmicas de infecção pelo VHB, como a região Amazônica brasileira, um número significativo de pacientes com cirrose hepática apresentam-se negativos para o HBsAg (68,4%) e sorologicamente positivos para o anti-HBc total isolado ou associado ao anti-HBs (Nascimento *et al.*, 2008; Júnior *et al.*, 2008; Ei Khouri *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da biologia molecular, técnicas de detecção de ácidos nucleicos (NAT) e um melhor conhecimento da variabilidade genética do vírus da hepatite B, conduziram a uma revisão nos padrões laboratoriais e clínicos principalmente na interpretação dos perfis sorológicos desta doença. Anteriormente o HBsAg era considerado um marcador sorológico essencial para o diagnóstico da hepatite B e o anti-HBc IgG ou total evidenciavam uma infecção prévia e/ou remissão da doença. Porém, há duas décadas alguns fatores chamaram atenção, principalmente em bancos de sangue onde pacientes que receberam transfusão sanguínea positivas para o anti-HBc, sendo negativo para o HBsAg e anti-HBs, resultaram em infecção pelo VHB. O risco transfusional parece ter relação com as taxas de endemicidade do VHB das regiões expostas (Candotti & Allain, 2009). Um inquérito internacional realizado em 2002 envolvendo 11 países levantou a estimativa do risco da transmissão do VHB por milhão de doações, verificou-se que nos países de baixa endemicidade o risco variou entre 0.69-8.69. Em áreas de moderada a alta endemicidade houve uma variação de 7.5-15.8 e 30.6-200, respectivamente (Candotti & Allain, 2009; Niederhauser, 2011).

A IOB sendo uma realidade e motivo de grande preocupação, especialmente em bancos de sangue pelo elevado risco de transmissão, apesar dos cuidados oferecidos pela triagem

sorológica, vários estudiosos procuram explicar qual ou quais são os mecanismos moleculares ou imunológicos que poderiam desencadear a infecção oculta pelo VHB. Porém, diversas hipóteses são propostas e as mais aceitas seriam: mutações na região S, no *core* e X dos genes do VHB; integração do DNA-VHB no genoma do hospedeiro; formação de imunocomplexos circulantes contendo o VHB; alteração da resposta imune do hospedeiro ao VHB; superinfecção e interferência por outros vírus (Allain, 2004; Lok ASE, 2004; Raimondo *et al.*, 2007; Allain & Candotti, 2011; Samal *et al.*, 2012).

O impacto clínico da IOB pode ser observado nas seguintes circunstâncias: reativação do VHB entre pacientes usando drogas imunossupressoras, levando inclusive a uma hepatite fulminante; reativação na hepatite B crônica; desenvolvimento de HCC; maior gravidade da doença hepática crônica ocasionada pelo VHC em co-infecção com o VHB. Além disso, fatores geográficos, epidemiológicos e étnicos podem também contribuir para a prevalência da IOB (Lok ASE, 2004; Raimondo *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010; Galy *et al.*, 2011; Manzano-Alonso & Castellano-Tortajada, 2011). A presença isolada do anti-HBc total em pacientes infectados pelo HIV é bastante significativa e pode variar de 10% a 45% (Puoti *et al.*, 2006; Koziel & Peters, 2007). A positividade para o DNA-VHB nesse grupo é frequente, caracterizando assim uma provável IOB (Puoti *et al.*, 2006).

2.6 Risco de Transmissão Transfusional

Houve um grande aumento da propagação da hepatite B entre os hemofílicos a partir de 1962, quando foi desenvolvido o primeiro concentrado de fator anti-hemofílico (fator VIII) para o tratamento da hemofilia A (Gaze *et al.*, 2006). Com a descoberta do VHB e o desenvolvimento de testes sorológicos para triagem em bancos de sangue, foram conseguidos grandes avanços no controle da transmissão transfusional a partir de 1971, e com a evolução dos testes e descobertas de novos antígenos, tornando-se mais rigorosa em 1987. Além disso, o maior rigor da triagem clínica e a introdução dos processos industriais de inativação viral e da disponibilidade de uma vacina segura e eficaz contra a hepatite B em meados da década de 1980, representaram avanços importantes na prevenção e redução das hepatites virais, dentro e fora dos bancos de sangue (Gaze *et al.*, 2006; Laperche & Pillonel, 2007).

Os testes para a detecção do HBsAg continuam sendo a primeira escolha para interromper a transmissão transfusional do vírus B e são aplicados na triagem sorológica em todos os países. Como existem casos de portadores do VHB com HBsAg negativo, devido aos baixos títulos ou devido à presença de mutantes de escape do VHB, a pesquisa do anti-HBc se mantém na triagem sorológica de doadores de sangue. Isso representa um aumento importante no total de bolsas descartadas por apresentarem reatividade para este parâmetro (Candotti & Allain, 2009; Launay *et al.*, 2011). No entanto, a transmissão do VHB por transfusão de sangue ainda é possível de ocorrer, principalmente quando os doadores de sangue apresentam-se assintomáticos e com HBsAg negativo durante o período da janela imunológica (Allain, 2004; Jilin Hou *et al.*, 2005).

Vários estudos evidenciaram infecção pós-transfusão de hemocomponentes e transplantes de órgãos a partir de doadores anti-HBc total isolado (Mosley *et al.*, 1995; Uemoto *et al.*, 1998; Allain, 2004; Chemin & Trepó, 2005; Panigrahi *et al.*, 2010), com taxas de infectividade alcançando 17% (Mosley *et al.*, 1995). Diante deste risco, o teste de detecção de ácidos nucleicos (NAT) foi introduzido em países como: Alemanha, Canadá, Japão, EUA, países da Europa etc. (Yang *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). O rastreamento do DNA-VHB tem sido um potencial mecanismo para reduzir significativamente a infecção no período da janela imunológica e revelar a IOB (Allain, 2004; Wendel, 2007; Wendel *et al.*, 2008; Hollinger, 2008; Candotti & Allain, 2009; Hollinger & Dodd, 2009). Para um diagnóstico preciso da IOB, é necessário o uso de técnicas da *PCR ultra-sensível* com limites de detecção menores que 10^5 cópias/mL do DNA-VHB. (Launay *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012).

Em muitos países, a triagem de doadores de sangue contra doenças transmissíveis é realizada utilizando-se critérios epidemiológicos e sorológicos. No Brasil estima-se que 5% a 10% das doações de sangue são testadas pela tecnologia para VHC, HIV-1 e VHB em bancos de sangue privados (Roth *et al.*, 2012). Desde 2011 os hemocentros do sistema público estão em fase de implantação do NAT para VHC e HIV-1 sendo que a triagem molecular para o VHB não está prevista para o primeiro momento. No Brasil foram descritos dois pacientes imunodeficientes que receberam transfusão a partir de um único doador soronegativo para marcadores da infecção pelo VHB que apresentaram DNA-VHB reativos (Wendel *et al.*, 2008).

Conforme a normatização da hemoterapia no Brasil é preconizado que se deve descartar as unidades de hemocomponentes que apresentem reatividade aos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc. Em regiões endêmicas há um alto nível de rejeição de bolsas de sangue devido à presença

destes marcadores sorológicos, conseqüentemente levando a um comprometimento da disponibilidade dos estoques de sangue e hemocomponentes, ocasionando aumento no custo do processo (MS, 2010). A soroprevalência dos marcadores para hepatite B em doadores de sangue no estado do Amazonas apresenta importantes variações entre a capital e os municípios do interior do Estado. A prevalência dos marcadores HBsAg e anti-HBc entre doadores de Manaus é 0,3% e 3,6% respectivamente. No interior do estado a prevalência é bem mais alta sendo em média 0,6% para o HBsAg e 31,7% para anti-HBc (FHMOAM, 2010). A região Amazônica é caracterizada como uma das regiões do mundo de maior ocorrência da hepatite B e suas conseqüências. A transmissão horizontal e vertical são fortes fatores de risco para a propagação da doença nesta região (Ei Khouri *et al.*, 2010). Faz-se de grande necessidade o conhecimento da prevalência da IOB na região Amazônica, para melhor compreender o seu papel patogênico e suas repercussões clínicas.

2.7 Quadro Clínico

Após entrar em contato com o VHB o indivíduo pode desenvolver um quadro de hepatite aguda, podendo apresentar formas clínicas assintomática e sintomática. No primeiro caso, as manifestações clínicas estão ausentes ou são bastantes leves e atípicas, simulando um quadro febril. No segundo caso, a apresentação é típica, com os sinais e sintomas característicos da hepatite como febre, icterícia e colúria (Ferreira, 2004; MS, 2008).

A hepatite aguda tem aspectos clínicos e virológicos limitados aos primeiros seis meses da infecção. Consiste de três fases: Prodrômica ou pré-ictérica: com aparecimento de febre, astenia, dores musculares ou articulares e sintomas digestivos, tais como: anorexia, náuseas e vômitos, perversão do paladar, às vezes cefaléia. A evolução é de mais ou menos quatro semanas. Eventualmente essa fase pode não acontecer, surgindo a icterícia como o primeiro sinal. Ictérica: abrandamento dos sintomas digestivos e do surgimento da icterícia que pode ser de intensidade variável, sendo, às vezes, precedida de colúria. A hipocolia pode surgir por prazos curtos, sete a dez dias, e às vezes se acompanha de prurido. Convalescença: desaparece a icterícia e retorna a sensação de bem-estar. A recuperação completa ocorre após algumas semanas, mas a astenia pode persistir por vários meses (MS, 2008).

A hepatite crônica consiste da persistência do VHB após os seis meses do início da infecção. Os indivíduos com infecção crônica funcionam como reservatórios do VHB, tendo importância epidemiológica por serem os principais responsáveis pela perpetuação da transmissão (Jilin Hou *et al.*, 2005; Hwang & Cheung, 2011). Os sintomas, quando presentes, são inespecíficos, predominando fadiga, mal-estar geral e sintomas digestivos. Somente 20 a 40% dos casos têm história prévia de hepatite aguda sintomática. Em uma parcela dos casos crônicos, após anos de evolução, pode aparecer cirrose, com surgimento de icterícia, edema, ascite, varizes de esôfago e alterações hematológicas. A hepatite B crônica pode também evoluir para hepatocarcinoma sem passar pelo estágio de cirrose (Lavanchy, 2004; MS, 2005, Jilin Hou *et al.*, 2005).

2.8 Resposta Imune

O VHB causa doença hepática de graus de severidade que podem variar entre os indivíduos. Isto é possível devido a fatores do hospedeiro, como a resposta imune inata, a resposta humoral e a celular, como também a fatores virais, como diferentes genótipos, mutações do VHB e a carga viral (Bertoletti & Gerhring, 2006).

O fígado é composto por células parenquimatosas, hepatócitos (aproximadamente 80% das células do fígado), e células não-parenquimatosas, em ordem decrescente, células endoteliais sinusoidais, os linfócitos intra-hepático incluindo: Natural Killer (NK), células Natural Killer T (NKT), células de Kupffer (KC), as células biliares, células estreladas hepáticas e células dendríticas (Gao *et al.*, 2008).

Na infecção pelo VHB, a resposta inata é induzida após a primeira semana de infecção e é mediada pelas próprias células infectadas que reconhecem a presença do vírus e respondem com a produção de Interferon tipo I (IFN-I). Esses vírus são apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs), normalmente são as células dendríticas da imunidade inata, mas sem descartar uma possível participação de outras células como: KC, NK, NKT, as quais produzem citocinas e quimiocinas com propriedades antivirais (IFN- α , IFN- β , IFN- λ , TNF- α) ou que são destinadas a atrair e estimular células do sistema imune adaptativo (IL-2, IL-6, IL-10). As células não-profissionais como células endoteliais sinusoidais, células estreladas hepáticas e hepatócitos também podem ter funções imunomoduladoras secretando citocinas ou quimiocinas em resposta

à infecção (Crispe, 2009). Em geral, as células infectadas podem detectar a presença de componentes virais ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que podem ser: Toll-like (TLRs), Helicases RIG-like (RLHs) ou receptores Nod-like (NLRs) (Akira *et al.*, 2006; Kawai & Akira, 2006), os quais produzem o antiviral Interferon do tipo I (IFN-I: IFN- α e IFN- β), assim como outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6) (Randall & Goodbourn, 2008; Martinon *et al.*, 2009).

O reconhecimento dos antígenos são feitos pelos TLRs na superfície celular ou nas membranas dos lisossomas / endossomas, enquanto patógenos que invadem o citosol, são detectados por PRRs citoplasmático como RLHs ou NLRs (Akira *et al.*, 2006; Kawai & Akira, 2006). Vários TLRs são expressos em células parenquimatosas e não parenquimatosas do fígado (Zarembek & Godowski, 2002). Os hepatócitos expressam mRNA para todos os TLRs (Liu *et al.*, 2002; Nishimura & Naito, 2005), enquanto KCs e células estreladas hepáticas expressam TLR4 e TLR2 (Paik *et al.*, 2003; Ojaniemi *et al.*, 2006). No caso dos linfócitos T e células NK expressam TLR1, 2, 4, 5 e 9, enquanto que as células B expressam altos níveis de TLR1, 6, 7, 9 e 10 (Hornung *et al.*, 2002).

As células dendríticas podem ser mielóides (mDC) ou plasmacitóides (pDC), ambas reconhecem e apresentam os antígenos às células T, que tem como função a eliminação dos antígenos. As células dendríticas são distintas em sua expressão de TLRs e perfis de produção de citocinas (Hornung *et al.*, 2002). As pDC expressam TLR7 e 9 e produzem grandes quantidades de IFN- α , enquanto mDCs expressam TLR2, 3, 4, assim como 9 e produzem citocinas pró-inflamatórias e IFN- β (Hornung *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2003). Embora praticamente todos os tipos de células do fígado expressam TLRs, o padrão de expressão de NLRs em hepatócitos não é conhecido (Vogel *et al.*, 2003).

O efeito direto do antiviral IFN-I é exercido por uma variedade de efetores expressos de genes cuja transcrição é diretamente estimulada por IFNs (IFN-genes estimulados) (Randall & Goodbourn, 2008; Martinon *et al.*, 2009). O efeito indireto do antiviral IFNs-I é devido ao seu efeito estimulante sobre as células do sistema imune inato e adaptativo (Crispe, 2009). VHB pode estabelecer-se evadindo-se de forma eficiente do sistema imune inato. No entanto, permanece incerto se VHB provoca uma resposta inata em hepatócitos infectados, enquanto escapa das células profissionais da imunidade inata (Malika *et al.*, 2010).

A resposta humoral contra o VHB aparece por volta da décima semana após a infecção e é fundamental para eliminação do VHB na fase aguda. Ela está associada a diferentes fases e evolução da infecção. Os anticorpos contra o HBeAg nas fases iniciais da infecção indicam doença auto-limitada, associada a lesão hepática leve, normalização da atividade das aminotransferases e diminuição da carga viral do VHB. Anticorpos contra as glicoproteínas da região S são neutralizados com aparecimento dos anticorpos específicos anti-HBs produzidos por linfócitos B e estes estão associados à proteção contra novas infecções pelo VHB (Rehermann, 2003).

2.9 Tratamento

Nenhuma forma de tratamento específico encontra-se indicado nas formas agudas sintomáticas da hepatite B. Sabe-se que aproximadamente 95% dos pacientes evoluem para a cura espontânea da infecção com aparecimento dos anticorpos anti-HBs, indicativos da resolução do processo (MS, 2009).

O tratamento na fase aguda da doença consiste em acompanhamento ambulatorial e repouso relativo, já na fase crônica o tratamento medicamentoso está indicado para algumas fases da doença crônica e, devido à sua complexidade, deve ser realizado em ambulatório especializado (Ferreira, 2000; Lavanchy, 2004; MS, 2009). O principal objetivo do tratamento é reduzir o risco de progressão da doença hepática e de seus desfechos primários, especificamente cirrose, HCC e consequentemente, o óbito.

As opções farmacológicas disponíveis e recomendadas pelo protocolo do Ministério da Saúde/2009 para o tratamento da hepatite viral B crônica são: Interferon-alfa, Lamivudina, Peguilado Interferon-alfa 2a e 2b, Adefovir Dipivoxil, Entecavir, Telbivudina e Tenofovir (Lavanchy, 2004; Giovana *et al.*, 2008; MS, 2009).

Pacientes com IOB apresentando níveis de DNA-VHB $>10^4$ cópias/mL recomenda-se monitoramento a cada seis meses e tratamento com medicamentos se necessário. Entretanto, alguns pacientes HBeAg positivos e muitos HBeAg negativos apresentam níveis flutuantes de DNA-VHB que estão abaixo de 10^4 cópias/mL. Até hoje, não se conhece, realmente, qual é o valor de corte do DNA-VHB que está diretamente associado com doença hepática progressiva.

Desta forma, o significado clínico do nível de DNA-VHB no sangue deve ser analisado junto com os dados clínicos presentes em cada paciente (Gonçales & Gonçales JR, 2006; MS, 2009).

2.10 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da infecção é realizado através de testes sorológicos, bioquímicos e moleculares. A análise sorológica pode detectar antígenos virais ou anticorpos contra peptídeos virais. As técnicas mais utilizadas são por enzimaímmunoensaio e quimioluminescência (Ferreira, 2000; Bushra *et al.*, 2011).

Os testes bioquímicos permitem avaliar o tipo e o grau de comprometimento hepático e servem como indicadores tanto na evolução natural da infecção para a cura bioquímica ou para a cronicidade, como para monitorar a eficácia terapêutica dos medicamentos. Os mais utilizados são para determinação dos níveis séricos de atividade da: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina (FA) e Gama Glutamil Transferase (GGT) e também para verificar a concentração das bilirrubinas: Bilirrubina total (BT), Bilirrubina indireta (livre), Bilirrubina direta-conjugada (MS, 2005; Bushra *et al.*, 2011).

Os testes de biologia molecular são utilizados para detectar a presença de ácido nucleico do vírus (DNA para o vírus da hepatite B). Os testes podem ser qualitativos (indicam a presença ou ausência do vírus), quantitativos (indicam a carga viral presente na amostra) ou de genotipagem (indicam o genótipo do vírus). Para realização dos testes de biologia molecular são usadas várias técnicas, tais como: Polimerase Chain Reaction ou PCR, hibridização, branched-DNA ou b-DNA PCR em tempo real, Transcription-Mediated Amplification ou TMA. A definição da técnica a ser utilizada depende da informação clínica que se quer obter. São métodos com grande utilização na confirmação diagnóstica da infecção viral e no seguimento de pacientes com formas crônicas, bem como na avaliação terapêutica daqueles pacientes submetidos a tratamento. A técnica da PCR vem ganhando notoriedade devido o seu alto grau de sensibilidade, pois é possível diagnosticar o DNA-VHB no período da janela imunológica, onde os títulos de HBsAg ainda estão baixos e são indetectáveis através dos testes sorológicos convencionais (Ferreira, 2000; Arraes *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2007; Júnior *et al.*, 2008; Wendel *et al.*, 2008; Bushra *et al.*, 2011).

Após a infecção pelo VHB o primeiro marcador sorológico a ser detectado no sangue, ainda na fase prodrômica é o HBsAg, após um período de incubação de quatro a 12 semanas, seguido pelos anticorpos anti-HBc IgG e IgM, HBeAg aparece concomitante com o HBsAg, desaparecendo precocemente em média de 15 dias. Durante o aparecimento do HBsAg observa-se ao mesmo tempo uma alta viremia do VHB (níveis séricos variando de 10^9 a 10^{10} virions por mililitro). No momento inicial da infecção aguda pelo VHB, 75% a 100% dos hepatócitos podem estar infectados (Lee, 1997; Malika *et al.*, 2010).

Com a resolução da infecção pelo VHB, os antígenos virais HBsAg e HBeAg desaparecem da circulação e o anti-HBs começa a ser detectado no soro. Após a resolução da infecção, alguns pacientes, mesmo sendo anti-HBs positivo, podem cursar com títulos positivos para o DNA-VHB por um longo período de anos ou por toda a vida (Ferreira, 2000; Chu & Lok, 2002).

A persistência do antígeno viral HBsAg no sangue por mais de seis meses indica infecção crônica pelo VHB. Entre os portadores crônicos do HBsAg a presença do HBeAg indica alta replicação viral, contudo sua ausência não pode ser caracterizada como tal, já que pacientes HBeAg negativo e anti-HBe positivos, com mutação na região pré-core, podem apresentar significativa replicação viral (Hunt *et al.*, 2000; Hatziyannis & Vassilopoulos, 2001; Hatzakis *et al.*, 2006). O curso dos marcadores sorológicos da infecção pelo VHB na fase aguda e crônica é destacado na **Figura 4**.

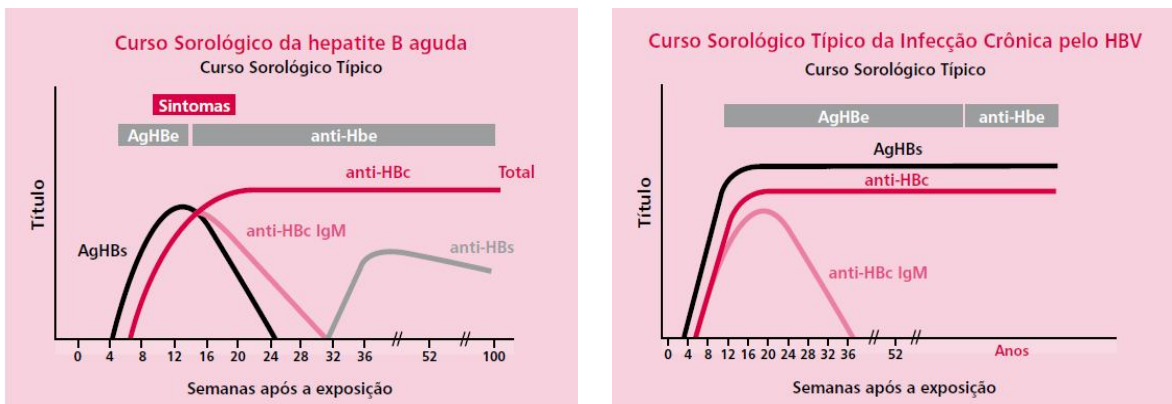


Figura 4. Curso sorológico da hepatite B na fase aguda e crônica da doença
 Fonte: MS, 2008

São descritos diferentes marcadores sorológicos para infecção da hepatite B: HBsAg, HBeAg, anti-HBc IgM, anti-HBc IgG, anti-HBe e anti-HBs que são utilizados no diagnóstico laboratorial, sendo a presença dos mesmos interpretadas de acordo com a característica da evolução da infecção se aguda ou crônica (MS, 2005; Júnior *et al.*, 2008). A infecção oculta pode ser observada nas fases da janela imunológica, expressão de imunidade tardia e infecção crônica (**Quadro 1**).

Quadro 1. Interpretação dos resultados sorológicos na infecção por hepatite B

Interpretação	HBsAg	HBeAg	anti-HBc IgM	anti-HBc IgG*	anti-HBe	anti-HBs
Susceptível	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Incubação	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
VHB aguda (fase inicial)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
VHB aguda (fase tardia)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
VHB crônica (Ag e+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
VHB crônica (Ag e-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
Janela Imunológica	(-)	(-)	(-)	(+)	(+) (-)	(-)**
VHB aguda (baixa antigenemia)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+) (-)	(-)
VHB pregressa imune	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Vacinação prévia	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
VHB pregressa ou reação cruzada	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)

*Devido à indisponibilidade comercial deste marcador, utiliza-se o anti-HBc total como teste de triagem.

**Com o passar do tempo, o anti-HBs pode estar em níveis indetectáveis pelos testes de laboratórios

Fonte: Gonçalves & Cavalheiro, 2006

2.11 Prevenção

A prevenção da infecção pelo VHB pode ser a partir de estratégias de educação para modificação do comportamento prevenindo a transmissão da doença, controle efetivo dos bancos de sangue através da triagem sorológica, imunoprofilaxia passiva e imunização ativa (Jilin Hou *et al.*, 2005; MS, 2009).

A vacina para a hepatite B é altamente efetiva e praticamente isenta de complicações. A vacinação não previne apenas a hepatite B, mas também o câncer. Mais de 80 países já adotaram a vacinação de toda a população como estratégia de combate à doença. A imunidade costuma

durar pelo menos 10 anos, mas pode persistir por toda a vida, podendo ser avaliada por exame de sangue (Moreira *et al.*, 2007; Fagundes *et al.*, 2012).

No Brasil a primeira vacina é administrada ao nascer, a segunda, ao final do primeiro mês de vida, e a terceira, aos seis meses. A vacina também é oferecida para pessoas na faixa etária de 1 a 19 anos, bem como para quem pertence a grupos de risco acrescido, como os imunodeprimidos, os profissionais da área de saúde e os profissionais do sexo, em qualquer faixa etária (MS, 2009). Está disponível gratuitamente na rede pública de saúde. Não são recomendadas "doses de reforço" para a vacina contra a hepatite B, pois mesmo que o nível de anticorpos desapareça com o tempo, há memória imunológica duradoura e rápida na produção de anticorpos quando há contato com o vírus B. Por esse motivo, não se recomenda a realização de sorologia após a vacinação, a não ser em casos especiais (recém nascidos de mãe com hepatite B, imunodeficientes, nefropatas em diálise, parceiros sexuais de portadores e profissionais da saúde com contato com sangue contaminado). Nesses casos, se a sorologia demonstrou ausência de resposta à vacinação (sem títulos protetores de anti-HBs), é possível a realização de uma segunda série, com eficácia de cerca de 50% (Sadeck & Ramos, 2004; Moreira *et al.*, 2007; Fagundes *et al.*, 2012)

A imunização ativa contra o VHB constitui o melhor procedimento para a redução da prevalência e incidência da infecção. Entretanto entre indivíduos portadores crônicos do VHB, residentes em áreas endêmicas de infecção pelo VHD, ou pertencentes a grupos de risco, a profilaxia da superinfecção pelo VHD continua representando um desafio (Lopes, 2006; Moreira *et al.*, 2007; Fagundes *et al.*, 2012).

3. JUSTIFICATIVA

A FHEMOAM é um hemocentro público, responsável pela coordenação da Hemoterapia no estado do Amazonas e está vinculada ao Programa Nacional de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde.

O Ministério da Saúde possui um Plano Nacional de atenção hematológica e medicina transfusional que estabelece ações para garantia da qualidade da hemoterapia no país. Entre outras diretrizes e metas está traçada a implantação de técnicas de detecção de ácidos nucleicos (NAT) na triagem de doadores de sangue em toda a rede nacional para Hepatite C e HIV. Apesar da hepatite B ser uma infecção de alta prevalência e grande impacto de morbidade e mortalidade (principalmente quando pós-transfusional) esta não está sendo contemplada na agenda nacional dentro deste novo plano, deixando uma lacuna a ser preenchida.

Conforme a normatização da hemoterapia no Brasil é preconizado que se deve descartar as unidades de hemocomponentes que apresentem reatividade aos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc. No entanto, a realidade vivida até um passado recente no estado Amazonas diante da alta prevalência da infecção pelo VHB e alta frequência do marcador anti-HBc total reativo nas doações oriundas do interior do estado, além dos desafios geográficos, levou o serviço de hemoterapia locoregional a utilizar por mais de 15 anos de critérios diferenciados de triagem sorológica de doadores. A frequência do HBsAg era 0,6% e do anti-HBc total reativo uma média (31,7%) nas doações do interior, o que causaria forte impacto de descarte de hemocomponentes e de comprometimento da disponibilidade de estoque. Diante disso, com base no papel protetor e imunizante do marcador anti-HBs passou-se a utilizar, hemocomponentes HBsAg negativo, anti-HBc total reativo com marcador anti-HBs reativo $\geq 100\text{mUI/mL}$. O impacto no processo de transmissão da infecção e a análise da frequência de hepatite B oculta nestas doações, no entanto, não havia sido estudada. A hepatite B oculta é definida como a detecção do DNA-VHB no sangue e/ou fígado de pacientes negativos para o HBsAg geralmente assintomáticos, como os doadores de sangue. Esta tem sido implicada como causa de doença hepática crônica. Apesar de sua importância clínica potencial, a prevalência da infecção oculta pelo VHB no estado do Amazonas ainda é desconhecida.

Ações dos grupos de pesquisa da FHEMOAM vem atuando nos últimos anos de forma a subsidiar as tomadas de decisões dentro do serviço assistencial, contribuindo com evidências

científicas para promover melhorias na saúde pública no que diz respeito a hematologia e hemoterapia para o estado do Amazonas.

Este estudo irá contribuir na promoção de informações críticas do impacto do uso da tecnologia de detecção de ácidos nucleicos (NAT) para hepatite B na triagem de doadores de áreas endêmicas, promovendo subsídios para preencher esta lacuna. Além disso, este estudo estará contribuindo para a equidade do serviço de saúde no interior do estado do Amazonas, fortalecendo o SUS nesta região.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Analisar nas doações de sangue do interior do estado do Amazonas a presença da infecção oculta pelo vírus da hepatite B em amostras anti-HBc total positivas com ou sem o marcador anti-HBs.

4.2 Específicos

- Analisar a prevalência do DNA do vírus da hepatite B nas doações de sangue oriundas do interior do estado do Amazonas nas regionais estudadas com anti-HBc total positivo e HBsAg negativo;
- Analisar a associação entre a presença do DNA do vírus da hepatite B com os títulos do anti-HBs nas amostras reativas para este parâmetro;
- Descrever os fatores de risco e dados demográficos relacionados à infecção pelo vírus da hepatite B nas doações de sangue no interior do estado nas regionais de saúde estudadas.

5. METODOLOGIA

5.1 Desenho do Estudo

Tratou-se de um estudo descritivo, observacional, transversal para determinar a associação da presença da infecção oculta pelo vírus da hepatite B, em amostras anti-HBc total positivas e HBsAg negativas, com ou sem o anti-HBs, nas doações de sangue oriundas do interior do estado do Amazonas.

O desenho do estudo foi baseado na iniciativa “STROBE” - “*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*” (Aprimorando a Apresentação de Resultados de Estudos Observacionais em Epidemiologia), de acordo com von Elm *et al.*, 2007 e Malta *et al.*, 2010.

5.2 População de Estudo

A população de estudo foi composta por candidatos a doação de sangue que se apresentaram nas Unidades de Coletas Transfusionais (UCT's) nas regionais de saúde do Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo, totalizando 37 municípios do interior do estado do Amazonas, durante o período de estudo, que foi junho de 2011 a junho de 2012.

5.3 Problema:

Entre as doações de sangue do interior do estado do Amazonas, a presença do marcador anti-HBs está associada com a ocorrência de hepatite B oculta (presença do DNA do vírus da hepatite B em amostras anti-HBc total positivas e HBsAg negativas)?

5.4 Hipóteses:

H₁: A presença do marcador anti-HBs (≥ 100 mUI/mL) está associada com a ocorrência de hepatite B oculta.

H₀: A presença do marcador anti-HBs (≥ 100 mUI/mL) não está associada com a ocorrência de hepatite B oculta.

5.5 Grupos de Estudo

Para efeito de realização de análise do ponto de corte/*cut-off* de positividade do anti-HBs de acordo com a rotina estabelecida pela FHEMOAM, as amostras das doações estudadas foram divididas em dois grupos:

Grupo A: amostras que apresentarem anti-HBs positivo (≥ 100 mUI/mL) sendo anti-HBc positivas e HBsAg negativas.

Grupo B: amostras que apresentarem anti-HBs negativo (≤ 100 mUI/mL) sendo anti-HBc positivas e HBsAg negativas.

5.6 Área de Estudo

O estado do Amazonas é o estado brasileiro de maior extensão (1,577,820 Km²) com 3.350.773 habitantes e Manaus abriga 77% da população do Estado (IBGE, 2010). No momento do deliamento deste estudo, o estado do Amazonas era dividido em sete sub-regiões de acordo com a calha dos rios e suas características geográficas, são eles: Alto Solimões, Amazonas, Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo (Jutaí/Solimões/Juruá), que compreendem 62 municípios (SUSAM, 2010).

Um estudo maior prevê fazer abrangência a todo estado do Amazonas compreendendo todas as doações de sangue oriundas no período de execução do mesmo. No entanto, considerando o desafio geográfico e as diferenças epidemiológicas regionais no protocolo apresentado, foram analisadas as doações de sangue provenientes das seguintes regionais de

saúde: Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo, totalizando 5 sub-regiões (**Figura 5**). As demais áreas geográficas do Amazonas (Alto Solimões e Amazonas) serão estudadas paralelamente em outro protocolo do grupo de pesquisa.

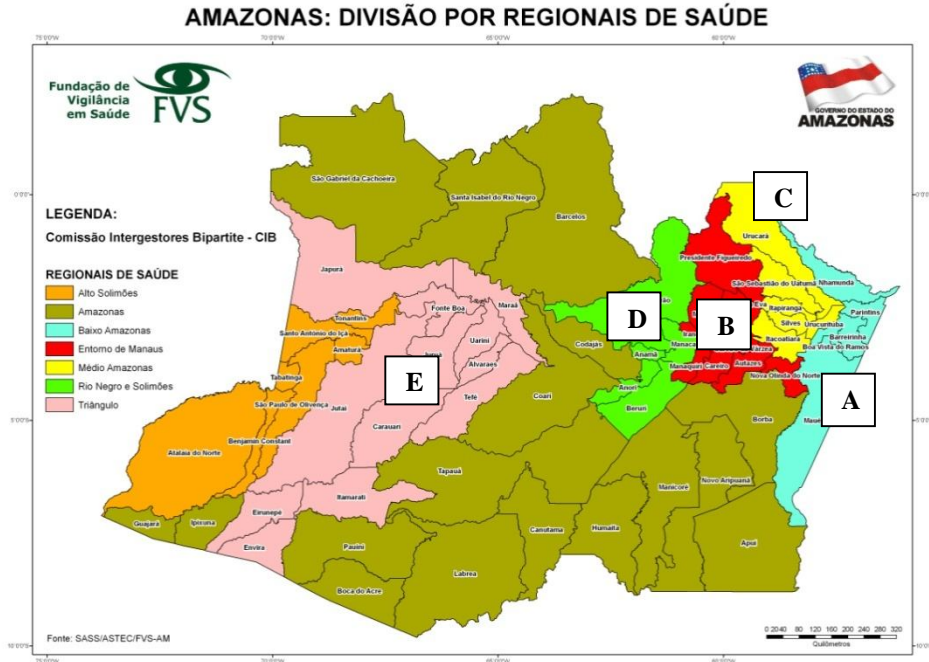


Figura 5. Mapa com as sub-regiões das regionais de saúde destacando o Baixo Amazonas, Médio Amazonas, Entorno de Manaus, Rio Negro e Solimões e Triângulo do Estado do Amazonas

Fonte: SUSAM, 2010

Municípios pertencentes às regionais de saúde deste protocolo:

[A] **Baixo Amazonas:** Nhamundá, Maués, Parintins, Barrerinha e Boa Vista do Ramos.

[B] **Entorno de Manaus:** Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva, Nova Olinda, Careiro da Varzea, Manaquiri, Autazes, Careiro Castanho e Iranduba.

[C] **Médio Amazonas:** Urucurituba, Itapiranga, Silves, Itacoatiara, Uruará e São Sebastião do Uatumã.

[D] **Rio Negro e Solimões:** Manacapuru, Novo Airão, Anori, Beruri e Anamã.

[E] **Triângulo:** Japurá, Marãa, Jutai, Fonte Boa, Alvarães, Tefé, Uarini, Carauari, Itamarati, Uarini, Eirunepé e Envira.

5.7 Cálculo Amostral

Amostragem

Para realizar o cálculo de magnitude do efeito foram considerados três aspectos:

- Em áreas endêmicas a presença do DNA-VHB em unidades de sangue derivadas de amostras anti-HBs positivas (com anti-HBc positivo/HBsAg negativo) ocorre com uma prevalência de 1,5% e em amostras anti-HBs negativas com prevalência de 8% (Bhatti et al, 2007).
- Em áreas não endêmicas a presença do DNA-VHB está presente em unidades de sangue derivadas de amostras anti-HBs positivas (com anti-HBc positivo/HBsAg negativo) ocorre com uma prevalência de 0,8% e em amostras anti-HBs negativas com prevalência de 2,8% (Hollinger, 2008).
- Entre os doadores do interior do estado do Amazonas existe diferença na distribuição dos doadores anti-HBs positivos e negativos (anti-HBc positivos/HBsAg negativos), sendo esta demonstrada na **Tabela 1**.

Tendo como base os aspectos apresentados a fim de atribuir maior rigor no cálculo da amostra, foram consideradas as magnitudes para o efeito nos dois grupos como demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Distribuição da população dos dois grupos de estudo e a chance da frequência do DNA-VHB na população de doadores do interior do estado do Amazonas

	Grupos	Prevalência do DNA-VHB (Magnitude do Efeito)	Distribuição da população no serviço da FHEMOAM
Grupo A	anti-HBs positivo (a-HBc+/HBsAg-)	1,5%	85%
Grupo B	anti-HBs negativo (a-HBc+/HBsAg-)	5%	15%

O cálculo do tamanho amostral considerou ser a média de amostras anti-HBc total positivas com HBsAg negativas oriundas de doações de todo interior do estado do Amazonas por ano de 2.160. Permitindo 80% de poder para detectar 3,5% de diferença entre a prevalência da presença do DNA-VHB entre os grupos, assumindo ser de 1,5% no grupo A, utilizando testes estatísticos bi-direcional com nível de significância de 0,05 e utilizando o teste do qui-quadrado. Foram calculadas 1.411 doações provenientes de doadores que se enquadrarem no grupo A e 235 doações de doadores que se enquadrarem no grupo B (**Tabela 2**).

Foi utilizado 5% de margem no quantitativo do cálculo amostral levando em consideração a possibilidade de dificuldades no processo de recrutamento dos doadores de sangue oriundos do interior do Estado do Amazonas.

Tabela 2. Tamanho amostral e distribuição nos dois grupos

Grupo A (+5%)	Grupo B (+5%)	Total
1.411	235	1.646

Estimativa: 95% de confiança

Nível de significância estatística (α): 0,05

Poder (1- β): 0,80 $\beta=0,2$

A amostra representada na **Tabela 2** corresponde à representação de todo o estado do Amazonas. Especificamente para este protocolo que corresponde às regionais de saúde do Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo, a amostragem está disposta na **Tabela 3** de acordo com a quantidade de doações das áreas estudadas.

Tabela 3. Tamanho amostral e distribuição nos dois grupos para as regionais de saúde do Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo

Grupo A (+5%)	Grupo B (+5%)	Total
838	140	978

5.8 Critérios de Elegibilidade

Doações provenientes de:

- Doadores de sangue das regionais de saúde estudadas neste protocolo com os marcadores: **anti-HBc positivo e HBsAg negativo com ou sem anti-HBs**;
- Ambos os gêneros;
- Com ou sem a presença de marcadores sorológicos para outras patologias.

5.9 Procedimentos

De rotina, as amostras de soro de todos os doadores do interior do estado do Amazonas são encaminhadas para a FHEMOAM para a realização dos testes sorológicos. Para este estudo foi utilizado o método de inclusão consecutiva de doações e busca ativa de doadores que se enquadravam nos critérios de elegibilidade.

O técnico de cada Unidade de Coleta Transfusional apresentou ao doador(a) de sangue a proposta do estudo, seus objetivos, a metodologia a ser utilizada, assim como prestou todos os esclarecimentos acerca da realização do mesmo. Neste momento, convidou o candidato a participar do estudo e apresentou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**APÊNDICE A**) que foi assinado pelo indivíduo, caso desejasse participar do mesmo. Após o consentimento do indivíduo, ainda na sala de entrevista, o colaborador do estudo aplicou um Questionário Epidemiológico dirigido por um roteiro padronizado (**APÊNDICE B**) contendo perguntas que abordem aspectos demográficos, sócio-econômicos e epidemiológicos do indivíduo para detectar possíveis fatores de risco para hepatite B. Caso o candidato à doação não aceitasse participar do estudo, o mesmo continuaria tendo o seu atendimento de rotina do processo de triagem e doação de sangue conforme o processo institucional. Depois de realizada a entrevista, o técnico encaminhou o doador (a) para uma sala específica onde foi coletado uma amostra de 5 mL de sangue venoso em tubo de ensaio sem anticoagulante, devidamente identificado. Após coagulação espontânea, foi centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos; o soro foi conservado a -20°C conforme procedimento rotineiro estabelecido e padronizado pela FHEMOAM. Essas amostras juntamente com TCLE e o Questionário Epidemiológico, foram embaladas e encaminhadas a FHEMOAM conforme a rotina e logística de transporte já existente.

Todos os técnicos das Unidades de Coletas Transfusionais do interior do Estado foram previamente treinados e receberam um Manual de Procedimento Operacional Padrão (POP), contendo todas as orientações para os procedimentos de abordagem ao doador, entrevista, coleta e processamento da amostra e de transporte da mesma. As orientações técnicas também foram repassadas durante as visitas realizadas regularmente pelo Departamento de Unidades Hemoterápicas do hemocentro.

Na FHEMOAM todo o material (TCLE, Questionário Epidemiológico e as amostras) enviado pelas Unidades de Coletas Transfusionais foi conferido. No laboratório de sorologia da FHEMOAM todas as amostras foram submetidas à detecção de marcadores sorológicos do vírus da hepatite B (HBsAg e anti-HBc), utilizando o teste imunoenzimático ELISA, que posteriormente foi substituído pelo imunensaio quimioluminescente por micropartículas (CMIA) – ARCHITECT® - ABBOTT/Alemanha. Os ensaios foram realizados conforme as recomendações do fabricante. Após a realização dos testes de rotina foram preparadas duas alíquotas uma para a realização dos ensaios previstos neste estudo e outra para compor soroteca, com fins de análises e estudos posteriores, conforme previsto na Portaria 092/2005 – GHEMOAM, dos doadores que se enquadrarem nos critérios de elegibilidade. Uma vez que a amostra apresentou sorologia reativa para anti-HBc sem presença do HBsAg, a amostra foi testada para o marcador anti-HBs com metodologia quantitativa através ARCHITECT® - ABBOTT/Alemanha, conforme as recomendações do fabricante, realizado no laboratório Distrital Norte da prefeitura de Manaus, Professor Manoel Bastos Lira (kit doado pela Diagnocel LTDA).

Os resultados e o ponto de corte/*cut-off* dos testes e o título dos anticorpos anti-HBs foram registrados em planilha de controle (**APÊNDICE C**). De todas as amostras foi feita a extração do DNA-VHB através do Kit QIAamp® UltrasensTM Virus (Qiagen/USA), no laboratório de biologia molecular da Fundação Alfredo da Matta (FUAM). A detecção do DNA-VHB e a dosagem da carga viral pela PCR em tempo real, seguindo o protocolo da tecnologia TaqMan, foram executadas no laboratório de biologia molecular da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

O fluxograma metodológico está demonstrado no **APÊNDICE D**.

5.9.1 Princípio dos testes utilizados

Sorológicos

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): o ensaio Murex anti-HBc total é baseado em microcavidades revestidas com antígeno *core* recombinante da hepatite B (HBcAg). As amostras e controles são incubados nas cavidades e qualquer anti-HBc presente na amostra ou controle liga-se ao HBcAg. Qualquer excesso de anticorpo é então removido por lavagem. O Conjugado (anti-HBc monoclonal conjugado com peroxidase de rábano silvestre) é então adicionado às cavidades. Uma segunda incubação é realizada durante a qual o conjugado liga-se a qualquer HBcAg da superfície da cavidade não bloqueado pelo anti-HBc da amostra teste. Após a lavagem para remoção de qualquer conjugado não ligado, uma solução contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio é adicionada às cavidades. As cavidades que não contêm anti-HBc e portanto conjugado ligado, irão desenvolver uma coloração azul/verde que se converte em laranja quando a reação da enzima é bloqueada com ácido sulfúrico. A intensidade da coloração pode ser determinada espectrofotometricamente. A intensidade da coloração é maior na ausência de anti-HBc e diminui com o aumento das concentrações de anti-HBc na amostra (Procedimento realizado conforme o fabricante).

HBsAg: o ensaio ARCHITECT® - ABBOTT/Alemanha HBsAg é um imunoenensaio de duas etapas para detecção quantitativa, usando a tecnologia do imunoenensaio quimioluminescente por micropartículas (CMIA), para determinar a presença de HBsAg em soro ou plasma. Na primeira etapa, amostra e micropartículas paramagnéticas revestidas com anti-HBsAg são combinadas. O HBsAg presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas com anti-HBs. Após lavagem, o conjugado de anti-HBsAg marcado com acridina é adicionado na segunda etapa. Prosseguindo para outro ciclo de lavagem, as soluções pré-trigger (pré-ativadora) e trigger (ativadora) são adicionadas à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades relativas de luz (RLU). A concentração de antígeno de superfície da Hepatite B na amostra é determinada usando-se uma curva de calibração do ARCHITECT® HBsAg previamente gerada. Se a concentração da amostra for maior ou igual a 0,05 UI/mL, a amostra é considerada reativa para HBsAg (Procedimento realizado conforme o fabricante).

anti-HBc total: o ensaio ARCHITECT® - ABBOTT/Alemanha anti-HBc II é um imunoenensaio de duas etapas para a detecção qualitativa do anti-HBc em soro e plasma humano que usa a tecnologia de imunoenensaio quimioluminescente por micropartículas (CMIA), com protocolos de ensaio flexíveis, denominados Chemiflex. Na primeira etapa, amostra, diluente de ensaio, diluente de amostra e micropartículas paramagnéticas revestidas com rHBcAg são combinados. O Anti-HBc presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas com rHBcAg e a mistura de reação é lavada. Na segunda etapa, o conjugado marcado com acridina anti-humana é adicionado. Seguindo outro ciclo de lavagem, as soluções pré-trigger (peróxido de hidrogênio) e trigger (hidróxido de sódio) são adicionadas à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades relativas de luz (RLU). Existe uma relação direta entre a quantidade de anti-HBc na amostra e as RLU detectadas pelo sistema óptico do ARCHITECT®. A presença ou ausência de anti-HBc na amostra é determinada comparando o sinal quimioluminescente na reação com o sinal *cut-off* determinado a partir de uma calibração ativa do ARCHITECT® anti-HBc II. Se o sinal quimioluminescente na amostra for maior ou igual ao sinal *cut-off*, a amostra é considerada reativa para anti-HBc (Procedimento realizado conforme o fabricante).

anti-HBs: o ensaio ARCHITECT® - ABBOTT/Alemanha anti-HBs é um imunoenensaio de duas etapas para a determinação quantitativa do anti-HBs em soro e plasma humano que usa a tecnologia de imunoenensaio quimioluminescente por micropartículas (CMIA). Na primeira etapa, a amostra e micropartículas paramagnéticas revestidas com HBsAg recombinante são combinadas. O anti-HBs presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas com rHBsAg. Após a lavagem, o conjugado marcado com acridina anti-humana é adicionado na segunda etapa. Seguindo outro ciclo de lavagem, as soluções pré-trigger e trigger são adicionadas à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades relativas de luz (RLU). A concentração de anti-HBs na amostra é determinada usando uma curva de calibração ARCHITECT® anti-HBs previamente gerada (Procedimento realizado conforme o fabricante).

Moleculares

Extração do DNA-VHB

A extração do DNA-VHB foi realizada através do Kit comercial QIAamp® Ultrasens™ Virus (Qiagen/USA), no laboratório de biologia molecular da Fundação Alfredo da Matta (FUAM). Essa tecnologia permite detectar o RNA e DNA viral a partir de 1 mL de soro ou plasma de amostras altamente concentradas filtradas por membrana de sílica-gel eluindo o DNA-VHB. Os reagentes necessários e que compõem o kit são: Buffer AC, RNA Carrier, Buffer AR, Proteinase K, Buffer AB, Buffer Aw1 e AW2 e o AVE. Buffer AC (isopropanol) é um reagente que promove a precipitação dos complexos com ácidos nucleicos, e estes complexos podem ser sedimentados por centrifugação baixa para formar um precipitado. Este precipitado pode ser ressuspenso em um volume pequeno de Buffer antes da purificação do ácido nucléico usando o procedimento QIAamp, permitindo de forma eficiente e sensível o isolamento do ácido nucleico viral. Buffer AC e o RNA Carrier são adicionados no soro ou plasma de uma amostra. Depois de um curto período de incubação, a amostra é centrifugada em baixa velocidade para sedimentar os complexos de ácidos nucleicos. O sobrenadante é descartado, e o precipitado é ressuspenso em Buffer AR (cloridrato de guanidina) e proteinase K, incubado por 10 min à 40°C. As condições vinculativas são ajustadas pela adição do Buffer AB (etanol e Nonidet) e do lisado aplicado a uma coluna de spin QIAamp. Durante uma breve centrifugação, o RNA e DNA se ligam seletivamente à membrana QIAamp deixando passar os contaminantes. Os contaminantes restantes e inibidores de enzima são eficientemente removidos por centrifugação em duas etapas de lavagem, e os ácidos nucleicos virais puros são eluídos em solução salina diluída por AVE, seguindo as recomendações do fabricante.

PCR em tempo real para β -actina

Para a verificação da viabilidade do DNA extraído, no laboratório de biologia molecular da Fundação Alfredo da Matta (FUAM) foi realizado a PCR em tempo real para β -actina humana através do sistema de detecção SYBR® Green (GoTaq qPCR Master Mix, Promega Corporation, Madison, USA). O SYBR® Green se liga entre a fita dupla de DNA e com

a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador que emite uma fluorescência verde. O SYBR® Green não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena. Entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA. No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR® Green. As moléculas não-ligadas do SYBR® Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo sendo este subtraído durante a análise do programa. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do SYBR® Green podem ligar-se na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do SYBR® Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do SYBR® Green são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (Novais & Pires-Alves, 2004). As PCRs foram realizadas no termociclador STEP ONE PULS (Applied Biosystems, Warrington, UK) seguindo os parâmetros de ciclagem: 10 minutos à 95°C para ativação da Taq polimerase, seguido por 40 ciclos de desnaturação à 59°C por 15seg, anelamento e extensão à 60°C por 60seg. Sequências de primers para β -actina: senso (5' TGACAAAACCTAACTTGCGC 3') e anti-senso (5' ATAAAGCCATGCCAATCTCA 3').

PCR em tempo real para DNA-VHB

No laboratório de biologia molecular da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo/SP, foi realizada a amplificação do DNA-VHB através da tecnologia de PCR em tempo real utilizando o protocolo padronizado pela Fundação. Este protocolo tem como fundamento o uso do sistema TaqMan® Univerval Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, USA) que é uma sonda com fragmentos de DNA marcado para hibridizar outra molécula de DNA, utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. O DNA alvo é detectado e quantificado por comparação a uma curva padrão de DNA-VHB (Novais & Pires-Alves, 2005).

Para a detecção quantitativa do DNA-VHB foi amplificado parte da região S do genoma do vírus, resultando no produto amplificado de 98pb (GenBank: AF129506.1), sendo que esta região contempla os genótipos A,B,C,D,E, F, G e H (**Tabela 5**).

Para a reação de PCR quantitativa foi utilizada a técnica TaqMan® Univerval Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, USA), conforme **Tabelas 4 e 5**. As PCRs foram realizadas no termociclador STEP ONE PULS (Applied Biosystems, Warrington, UK) seguindo os parâmetros de ciclagem: um ciclo inicial de 95°C por 10min, seguindo de 3 ciclos de 95°C por 15seg, depois 60°C por 1min, seguido de 45 ciclos de 94°C por 15seg , 60° C por 1min e coletar a fluorescência na extensão de 60°C.

Para estabelecer o limite de detecção utilizando o ensaio PCR em tempo real, foram realizadas oito diluições sucessivas, em razão de 10, de produto de PCR para a região S do genoma do vírus, previamente quantificada para obtenção da curva padrão, cedidas gentilmente pelo professor Doutor José Eduardo Levi da Fundação Pró-Sangue/São Paulo. O limite de detecção superior foi de $1,5 \times 10^6$ UI/mL e o limite inferior foi de $0,15 \times 10^{-2}$ UI/mL, descritas por Garson *et al.*, 2005. Todas as amostras amplificadas foram testadas em duplicatas para a confirmação.

Tabela 4. Mix para amplificação do VHB

Reagente	Volume	Final
TaqMan® Universal 2x	15 µL	1x
Primer/Probe Mix	8,2 µL	0,4uM/0,2uM
DNA	6,8 µL	
Volume Final	30 µL	

Tabela 5. Sequência de Primers/Probe do VHB

	Região	Primers	Coordenadas
VHB_Foward:	S	5' – GTGTCTGCGGCGTTTTATCAT – 3'	225-245
VHB_Reverse:	GenBank:	5' – GGACAAACGGGCAACATACCT – 3'	303-323
VHB_Probe:	AF129506	5' FAM - ATCCTGCTGCTATGCCTC - NFQ 3'	256-273
Produto amplificado 98pb			

5.10 Análises Estatísticas

Os dados foram registrados em um banco de dados (Excel 2007) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o programa R-2012. Foram realizadas técnicas de estatística descritiva com intervalo de confiança (IC 95%) e testes de significância empregados para validar as proporções encontradas. Teste χ^2 (variáveis categóricas), Teste t de Student (variáveis contínuas). A presença de exposição a fatores de risco foi dicotomizada em sim e não, para analisar os fatores relacionados à infecção verificada pela ocorrência do marcador avaliado, medindo-se a associação através do Teste de *Fisher* (Vienna, 2012).

5.11 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM em outubro de 2009 sob o n° CAAE 0014.0.112.000-09, sendo o mesmo aprovado.

Os casos detectados com a presença de DNA-VHB nas amostras de doadores de sangue serão notificados para a Diretoria Técnica da Fundação HEMOAM e também ao Comitê de Hemovigilância da Instituição para as devidas providências. Os Indivíduos serão notificados e orientados.

6. RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados de três maneiras:

1. Manuscrito do artigo de revisão: **“Hepatite B oculta: implicações no presente e futuro da triagem de doadores de sangue na região Amazônica brasileira”**. Que foi submetido na revista “Transfusion Medicine”.
2. Manuscrito do artigo original: **“Occult hepatitis B virus infection in anti-HBc positive with and without anti-HBs blood donors from Amazon/Brazil”**. Que será submetido na revista “Transfusion”.
3. Resultados complementares: Apresentação dos resultados deste estudo na íntegra.

Artigo de Revisão / Review Article**Hepatite B oculta: implicações no presente e futuro da triagem de doadores de sangue na região Amazônica brasileira**

Mônica Nascimento dos Santos Moresco¹, Helaine de Araújo Virgolino¹, Márcia Poinho Encarnação de Moraes², Isabella da Motta-Passos¹, Adriana Malheiro^{1,2}, José Eduardo Levi³, Norma de Paula Cavalheiro⁴, Kátia Luz Torres^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas/UFAM.

²Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas/FHEMOAM. ³Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. ⁴Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP

Correspond author: Kátia Luz Torres – email: katialuztorres@hotmail.com

Resumo

A epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) demonstra sua distribuição em várias regiões do mundo afetando cerca de 2 bilhões de pessoas com alta frequência de infecção crônica. Entre as regiões de maior prevalência encontra-se a Amazônia brasileira, constituindo uma questão central para a segurança do estoque sanguíneo na região. A segurança transfusional depende da avaliação clínico-epidemiológica apropriada de candidatos à doação de sangue e do uso de testes de seleção adequados para excluir e evitar a transmissão de agentes infecciosos tais como o VHB. A ocorrência de infecção oculta pelo vírus da hepatite B (IOB), definida como a ausência do antígeno de superfície (HBsAg) na presença do DNA viral no sangue e/ou no fígado, em doadores de sangue assintomáticos abriu uma nova lacuna a ser preenchida principalmente em bancos de sangue de regiões de alta prevalência como na Amazônia brasileira que são desafiados a buscar estratégias de garantia de estoques considerando o alto impacto do descarte de hemocomponentes anti-HBc reativos. A implementação dos testes de DNA-VHB através das técnicas de detecção de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) tem sido um mecanismo importante para reduzir significativamente a transmissão da infecção no período da janela imunológica e revelar IOB, diminuindo o risco de uma hepatite B pós-transfusional. De forma a subsidiar maiores discussões sobre a segurança transfusional. Este artigo tem como objetivo reunir abordagens sobre as implicações da IOB nas estratégias de triagem sorológicas de doadores de sangue, principalmente em países onde os testes NAT para VHB não são realizados

e em regiões de alta prevalência para hepatite B como a Amazônia brasileira. Em áreas de alta prevalência da infecção pelo VHB, observou-se através da detecção por NAT que 3% - 30% dos indivíduos com infecção prévia pelo VHB são HBsAg negativos e 3% - 15% dos indivíduos com anti-HBs e anti-HBc positivos mantinham o DNA-VHB circulante. Fica nítido o significativo papel da IOB enquanto potencial fonte de transmissão da infecção, e constitui-se hoje a maior fonte de risco de infecção pós-transfusional pelo VHB.

Palavras-chave: DNA-VHB, Amazônia brasileira, hepatite B oculta, doadores de sangue

Summary

The epidemiology of hepatitis B virus (HBV) infection shows its distribution in various regions of the world affecting an estimated 2 billion people with high frequency of chronic infection. The Brazilian Amazon belongs to the regions with the highest prevalence, and is a central issue for the safety of blood stock in the region. The safety of blood transfusion depends on the clinical and epidemiological appropriate candidates for blood donation and the use of appropriate screening tests to exclude and prevent transmission of infectious agents such as HBV. The occurrence of occult hepatitis B virus infection (OBI), defined as the absence of surface antigen (HBsAg) in the presence of viral DNA in blood and/or liver, in asymptomatic blood donors opened a new gap to be filled especially in blood banks in regions of high prevalence in the Brazilian Amazon as they are challenged to seek assurance strategies stocks considering the high impact of the disposal of blood products anti-HBc reactive. The implementation of testing of HBV DNA through techniques for detecting nucleic acid amplification (NAT) has been an important mechanism for significantly reducing the transmission of infection in the window period and reveal OBI, diminishing the risk of hepatitis B virus post-transfusion. In order to support further discussions on the safety of blood transfusion, this article aims to bring together approaches on the implications of OBI strategies serological screening of blood donors, particularly in countries where HBV NAT assays are not performed and in regions of high prevalence of hepatitis B as the Brazilian Amazon. In areas of high prevalence of HBV infection was observed by detection by NAT than 3% - 30% of individuals with previous infection with HBV are HBsAg negative and 3% - 15% of subjects with anti-HBs and anti-HBc remained

positive HBV DNA circulating. It is clear the significant role of OBI as a potential source of infection transmission, and is today the biggest source of risk of post-transfusion HBV.

Keywords: HBV-DNA, the Brazilian Amazon, occult hepatitis B, blood donors

Introdução

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) afeta cerca de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo e mais de 350 milhões destes apresentam infecção crônica em diferentes estágios da doença (WHO, 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a prevalência do VHB, medida pela presença do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), em alta quando está superior a 8% na população, intermediária: entre 2% e 7% e baixa se inferior a 2% (WHO, 2009). No Brasil, considerado uma área de moderada endemicidade, o Ministério da Saúde (MS) estima que pelo menos 15% da população já teve contato com o vírus (Braga *et al.*, 2012), ou seja, apresentam anticorpos contra os antígenos do *Core* do vírus (anti-HBc). No contexto brasileiro o Estado do Amazonas não segue o perfil nacional e destaca-se por ser uma área de alta endemicidade apresentando prevalências na população geral de HBsAg que podem variar de 2% a 9% e de anti-HBc de 5 a 76% (Braga *et al.*, 2005; Ei Khouri *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2012).

A hemoterapia de excelência busca garantir estoques de hemocomponentes em quantidade adequada à demanda, buscando alcançar o máximo de qualidade. A segurança transfusional depende da triagem clínico-epidemiológica apropriada de candidatos à doação de sangue e do uso de testes de seleção adequados para excluir e evitar a transmissão de agentes infecciosos. A hepatite B oculta se caracteriza pela presença do DNA do VHB (DNA-VHB) no sangue e/ou no fígado de indivíduos com teste HBsAg negativo. A implementação da detecção do DNA-VHB através das técnicas de biologia molecular tem sido um mecanismo para reduzir significativamente a transmissão da infecção no período da janela imunológica do HBsAg e revelar a infecção oculta pelo vírus B (Niederhauser, 2011). No entanto, existe o risco potencial de aquisição de hepatite B pós-transfusional quando a doação ocorre no período da janela imunológica, na ocorrência de doadores com infecção oculta pelo vírus da hepatite B (IOB) em países que não utilizam anti-HBc na triagem de doadores de sangue ou pelo uso de estratégias de garantia de estoques em região de alta endemicidade da infecção com o aproveitamento de

hemocomponentes anti-HBc total positivos com anti-HBs em altos títulos, uma vez que a presença deste último não é necessariamente indicativo da ausência do vírus (Manzini *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2007; Satoh *et al.*, 2008; Wendel *et al.*, 2008; Antar *et al.*, 2010; Thedja *et al.*, 2010; Sofian *et al.*, 2010; Tani *et al.*, 2012).

A Amazônia brasileira apresenta peculiaridades regionais, pois é caracterizada pela alta prevalência da infecção pelo VHB (alta prevalência da presença do marcador anti-HBc total isolado) e apresenta um desafio geográfico regional de alto impacto na logística do abastecimento e da manutenção dos estoques de hemoderivados,

De forma a subsidiar maiores discussões sobre a segurança transfusional, este artigo tem como objetivo abordar as implicações da infecção oculta pelo vírus da hepatite B nas estratégias de triagem sorológicas de doadores de sangue, principalmente em países onde os testes de detecção de ácidos nucleicos (NAT) para VHB não são realizados.

Biologia e diagnóstico do vírus da hepatite B

O VHB é uma partícula constituída por um envoltório lipídico externo que contém o antígeno de superfície do VHB (HBsAg), o qual induz a formação de anticorpos específicos, anti-HBs, e uma estrutura interna central densa (*Core*) ou nucleocapsídeo de forma icosaédrica (Almeida *et al.*, 1971). Essa estrutura central possui uma proteína (HBcAg) que induz a formação de anticorpos específicos (anti-HBc) pelos indivíduos infectados. O HBcAg não é secretado, sendo por isso muito difícil sua detecção no sangue circulante, diferente do que ocorre no fígado infectado, onde é abundante. Na zona central da partícula observa-se outro antígeno denominado antígeno *e* (HBeAg), que é secretado e que pode ser facilmente detectado no sangue (Hatzakis *et al.*, 2006). O antígeno *e* está associado à replicação e infectividade viral e induz a formação de anticorpos específicos (anti-HBe), que pode indicar o fim da fase replicativa na vigência da infecção aguda (Hatzakis *et al.*, 2006).

O genoma do VHB é constituído por um DNA circular de fita parcialmente dupla com aproximadamente 3.200 pb de comprimento e quatro genes descritos pelas letras: S, C, P e X. O gene S codifica o HBsAg, que está dividido em pré-S₁ a proteína grande (L), pré-S₂ proteína intermediária (M) e S que codifica a proteína menor (S). O gene C e a região pré-C (pré-*core*) codificam o HBcAg e o HBeAg, respectivamente. O gene P codifica a DNA-polimerase que

possui atividade de transcriptase reversa e o gene X com função pouco esclarecida codifica proteínas transativadoras responsáveis pela regulação de promotores virais e celulares (Han *et al.*, 2011)

A heterogeneidade do VHB permite a classificação dos isolados virais em genótipos, subtipos e subtipos sorológicos. Esta diversidade tem grande importância na distribuição geográfica e muito auxilia ao traçar rotas epidemiológicas de disseminação e evolução molecular, também os diferentes genótipos podem interferir no curso natural da doença, severidade, complicações e sucesso na terapia (Cooksley, 2010; Cassidy *et al.*, 2011; Kao, 2011).

Existem evidências que a heterogeneidade do VHB pode diferir em suas propriedades patogênicas e a interferência dos genótipos na evolução da hepatite B não apresenta um padrão necessariamente universal. A identificação dos genótipos passa a ser importante, uma vez que estes podem estar relacionados com diferenças na evolução clínica da infecção, na resposta ao tratamento antiviral além de auxiliar no prognóstico diante da doença (Dény & Zoulim, 2010; Guirgis *et al.*, 2010).

Os ensaios utilizados no diagnóstico laboratorial da hepatite B podem ser divididos em duas categorias, indiretos que agregam os testes sorológicos e diretos que envolvem a detecção e amplificação de cadeias genômicas dos vírus. Além destes, pode ser realizada a pesquisa dos antígenos HBsAg e HBcAg no tecido hepático (marcadores teciduais) pela imunohistoquímica.

Os testes bioquímicos permitem avaliar o tipo e o grau de comprometimento hepático e servem para monitorar a eficácia terapêutica dos medicamentos. (Ijaz *et al.*, 2011).

A análise sorológica pode detectar antígenos e anticorpos contra peptídeos virais. Em indivíduos recentemente infectados, o HBsAg é o marcador sorológico detectável durante as primeiras semanas (3 a 5 semanas) após a exposição e o tempo médio para a evidência deste marcador é de 30 dias. Entre 2 a 6 semanas antes do aparecimento da icterícia, o HBsAg e o HBeAg podem ser detectados no soro do paciente, indicando a presença replicante e infectante do VHB. A presença do HBeAg está associada à positividade do DNA-VHB, este perfil sorológico representa um alto risco de transmissão da infecção. Entretanto o fato de não ser detectado não indica ausência de replicação viral, pois em pacientes que apresentam mutação na região pré-*core* ou do *core* promoter do genoma do VHB o HBeAg não é detectável (Kao, 2011).

A mutação na região pré-*core* do DNA-VHB leva a uma falha na expressão do HBeAg. O HBeAg e o HBcAg são produzidos pelo mesmo gene que apresenta dois códon de iniciação para

a síntese protéica (pré-*core* e C). O códon pré-*core* leva à síntese do HBeAg, e o códon C codifica o HBcAg. A Mutação na região pré-*core* está associada a quadros de hepatites fulminantes e às exacerbações de quadros de hepatites crônicas produzidas pelo VHB, produzindo maiores graus de morbidade e mortalidade que os observados nas infecções pelos VHB selvagens. Uma segunda mutação também conhecida é a mutação dupla básica do *core* promoter, levando a uma queda na regulação da produção do HBeAg (Chen *et al.*, 2012).

No curso da hepatite B crônica o HBeAg poderá permanecer reagente no soro por vários anos ou apresentar soroconversão em um período de tempo plausível de grande variação. A soroconversão do HBeAg é caracterizada pelo surgimento do anti-HBe com o consequente desaparecimento do antígeno *e*, associado à negatificação do DNA-VHB no soro, exceto nos casos de mutação (Ait-Goughoulte *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012).

O HBcAg é um antígeno intracelular, insolúvel, que não pode ser detectado no sangue. O anti-HBc IgM é tido como um marcador de doença aguda ou recidivante e é detectado normalmente quando temos o início dos sintomas clínicos, até 30 dias após o aparecimento do HBsAg. A fração IgM do anti-HBc pode apresentar-se elevada de maneira intermitente, o que pode caracterizar uma recidiva da infecção em pacientes com hepatite B crônica, HBeAg positivos, durante os períodos de reativação da doença. O anti-HBc total é considerado um marcador de infecção pregressa do VHB e geralmente persiste por toda a vida do indivíduo que já foi infectado. O aparecimento do anti-HBe geralmente evidencia soroconversão do HBeAg, pois é considerado indicativo da diminuição de replicação viral, exceto em mutante pré-*core* e *core* promoter (Hatzakis *et al.*, 2006; Kao, 2011).

Nos indivíduos que se recuperam da infecção pelo VHB, o anti-HBs é detectado na circulação sanguínea, habitualmente dentro de 3 a 4 meses, e a concentração do anti-HBs tende a aumentar no sangue. A presença do anti-HBs indica, na maioria das vezes, imunidade à infecção pelo VHB (exceto em mutações da região S). Grande parte dos indivíduos que apresentam cura espontânea da infecção mostram positividade para o anti-HBc e anti-HBs (Chu & Lok, 2002).

A persistência do HBsAg no sangue por mais de 6 meses indica que o paciente evoluiu para uma infecção crônica pelo VHB. Nestes casos o HBsAg e o anti-HBc podem permanecer com testes positivos para estes marcadores por décadas. Em 0,5 a 2% dos pacientes com infecção crônica, o perfil sorológico do HBsAg tornar-se indetectável, ao longo da evolução da doença, e

o anti-HBs permanece positivo na maioria dos casos, podendo cursar com títulos positivos para o DNA-VHB por um longo período de anos ou por toda a vida. (Chen *et al.*, 2012).

Os testes diretos ou de biologia molecular são utilizados para detectar a presença do ácido nucleico do vírus, podendo ser qualitativos (indicam a presença ou ausência do vírus), quantitativos (mensuram a carga viral presente na amostra) ou de genotipagem (revelam o genótipo do vírus). Os testes de detecção de ácidos nucleicos podem indicar a presença do DNA-VHB entre 10 a 20 dias antes do aparecimento do HBsAg (Chen *et al.*, 2012).

As técnicas de biologia molecular vêm ganhando notoriedade devido o alto grau de sensibilidade, sendo possível diagnosticar o DNA-VHB no período da janela imunológica, onde os títulos do HBsAg ainda estão abaixo da sensibilidade dos testes sorológicos e portanto indetectáveis (Arraes *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2007; Júnior *et al.*, 2008; Wendel *et al.*, 2008; Ijaz *et al.*, 2011).

Na prática clínica o uso dos testes diretos e indiretos são ferramentas essenciais no manejo da infecção e somam qualidade ao atendimento do paciente com hepatite B e na triagem de doadores de sangue.

Infecção Oculta pelo vírus da hepatite B

Os indivíduos que entraram em contato com o VHB e não apresentaram cura espontânea da doença podem evoluir para diferentes estados de persistência viral da hepatite B que são classificados em: hepatite B crônica, portador inativo e hepatite B oculta.

A infecção oculta pelo vírus da hepatite B (IOB), silenciosa ou latente é caracterizada pela presença do DNA-VHB no sangue e/ou no fígado de indivíduos com sorologia HBsAg negativo, geralmente com carga viral $< 10^3$ cópias/mL no sangue. A IOB é dividida em dois grupos, de acordo com perfil dos anticorpos do VHB, são eles: soropositivos (anti-HBc e/ou anti-HBs positivos) e soronegativos (anti-HBc e anti-HBs negativos) (Ozaslan & Purnak, 2010; Wolf *et al.*, 2011; Rotch *et al.*, 2012). Em áreas endêmicas de infecção pelo VHB, como a região Amazônica brasileira, um número significativo de pacientes com cirrose hepática apresentam-se negativos para o HBsAg (68,4%) e sorologicamente positivos para o anti-HBc total isolado ou associado ao anti-HBs (Nascimento *et al.*, 2008; Júnior *et al.*, 2008; Ei Khouri *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de técnicas de detecção de ácidos nucleicos (NAT) e um melhor conhecimento da variabilidade genética do vírus da hepatite B, conduziram a uma revisão nos padrões laboratoriais e clínicos principalmente na interpretação dos perfis sorológicos desta doença. Anteriormente o HBsAg era considerado um marcador sorológico essencial para o diagnóstico da hepatite B e o anti-HBc IgG ou total evidenciavam uma infecção prévia e/ou remissão da doença. Porém, alguns fatores chamaram atenção, principalmente em bancos de sangue onde pacientes que receberam transfusão sanguínea positivas para o anti-HBc, sendo negativo para o HBsAg e anti-HBs, resultaram em infecção pelo VHB (Hoofnagle *et al.*, 1978). Ainda hoje, o risco transfusional parece ter relação com as taxas de endemicidade do VHB das regiões estudadas (Candotti & Allain, 2009). Um inquerito internacional envolvendo 11 países levantou a estimativa do risco da transmissão do VHB por milhão de doações, verificou-se que nos países de baixa endemicidade o risco variou entre 0.69-8.69. Em áreas de moderada a alta endemicidade houve uma variação de 7.5-15.8 e 30.6-200, respectivamente (Niederhauser, 2011).

Pelo fato da hepatite B oculta ser uma realidade e motivo de grande preocupação, especialmente em bancos de sangue pelo risco de transmissão, vários estudos procuram explicar quais são os mecanismos moleculares ou imunológicos que poderiam desencadear a infecção oculta pelo VHB. Diversas hipóteses são propostas e as mais aceitas seriam: mutações na região S, no *core* e X dos genes do VHB; integração do DNA-VHB no genoma do hospedeiro; formação de imunocomplexos circulantes contendo o VHB; alteração da resposta imune do hospedeiro ao VHB; superinfecção e interferência por outros vírus (Allain & Candotti, 2012; Samal *et al.*, 2012).

O impacto clínico da IOB pode ser observado nas seguintes circunstâncias: reativação do VHB entre pacientes usando drogas imunossupressoras, levando inclusive a uma hepatite fulminante; reativação na hepatite B crônica; desenvolvimento de carcinoma hepatocelular; maior gravidade da doença hepática crônica ocasionada pelo VHC em co-infecção com o VHB. Além disso, fatores geográficos, epidemiológicos e étnicos podem também contribuir para a prevalência da IOB (Yang *et al.*, 2010; Galy *et al.*, 2011; Manzano-Alonso & Castellano-Tortajada, 2011). A presença isolada do anti-HBc total em pacientes infectados pelo HIV é bastante significativa e pode variar de 10% a 45% (Puoti *et al.*, 2006; Koziel & Peters, 2007). A positividade para o DNA-VHB nesse grupo é frequente, caracterizando assim uma provável IOB (Puoti *et al.*, 2006).

Risco de Transmissão Transfusional

Houve um grande aumento da propagação da hepatite B entre os hemofílicos a partir de 1962, quando foi desenvolvido o primeiro concentrado de fator anti-hemofílico (fator VIII) para o tratamento da hemofilia A (Gaze *et al.*, 2006). Com a descoberta do VHB e o desenvolvimento de testes sorológicos para triagem em bancos de sangue, foram alcançados grandes avanços no controle da transmissão transfusional a partir de 1971, e com a evolução dos testes e descobertas de novos antígenos, tornando-se mais rigorosa em 1987. Além disso, o maior rigor da triagem clínica e a introdução dos processos industriais de inativação viral e da disponibilidade de uma vacina segura e eficaz contra a hepatite B em meados da década de 1980, representaram avanços importantes na prevenção e redução das hepatites virais, dentro e fora dos bancos de sangue (Gaze *et al.*, 2006; Laperche & Pillonel, 2007).

No entanto, a transmissão do VHB por transfusão de sangue ainda é possível de ocorrer, principalmente quando os doadores de sangue apresentam-se assintomáticos e com HBsAg negativo durante o período da janela imunológica, que compreende o tempo entre a aquisição da infecção e a detecção do antígeno viral ou marcador de anticorpos, durante fases iniciais da infecção (Hou *et al.*, 2005). O rastreamento do DNA-VHB tem sido um potencial mecanismo para reduzir significativamente a infecção no período da janela imunológica e revelar a IOB (Wendel, 2007; Wendel *et al.*, 2008; Hollinger, 2008; Candotti & Allain, 2009; Hollinger & Dodd, 2009).

Em muitos países, a triagem de doadores de sangue contra doenças transmissíveis é realizada utilizando-se critérios epidemiológicos e sorológicos. No Japão, país de alta prevalência para a infecção pelo VHB utiliza-se testes sorológicos e de detecção do DNA-VHB, aproveitando-se hemocomponentes que apresentam reatividade ao anti-HBc, mas que sejam anti-HBs reativos com alto títulos e DNA-VHB negativos (Tani *et al.*, 2012). No Brasil, onde a execução de teste NAT para VHB ainda não é obrigatória, conforme a normatização da hemoterapia é preconizado que se deve descartar as unidades de hemocomponentes que apresentem reatividade aos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc. Em regiões endêmicas como no estado do Amazonas/Brasil há um alto nível de rejeição de bolsas de sangue devido à presença destes marcadores sorológicos, sendo em média de 27,9%, consequentemente levando a um comprometimento da disponibilidade dos estoques de sangue e hemocomponentes, ocasionando

aumento no custo do processo (Dados não publicados). A soroprevalência dos marcadores para hepatite B em doadores de sangue no estado do Amazonas apresenta importantes variações entre a capital (Manaus) e os municípios do interior do Estado. A prevalência dos marcadores HBsAg e anti-HBc entre doadores de Manaus é 0,3% e 3,6% respectivamente. No interior do Estado a prevalência é bem mais alta sendo em média 0,6% para o HBsAg e 31,7% para anti-HBc (Dados não publicados). Este perfil sorológico entre os indivíduos do interior é sustentado pela presença marcante da transmissão horizontal e vertical sendo fortes fatores de risco para a propagação da doença nestas regiões (Ei Khouri *et al.*, 2010). Braga *et al.*, (2012) realizaram um estudo de soroprevalência na população geral em uma área rural no município de Lábrea (Amazonas/Brasil), após 19 anos de introdução do Programa Nacional de vacinação contra hepatite B. Metade dos indivíduos investigados apresentou reatividade para o anti-HBc total (52,1%) e 6,2% foram HBsAg positivos.

Considerando o risco da transmissão transfusional, o teste de detecção de ácidos nucleicos (NAT) foi introduzido em vários países da Europa, no Japão, no Canadá, EUA além de outros (Yang *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). No Brasil estima-se que 5% a 10% das doações de sangue são testadas pela tecnologia para VHC, HIV-1 e VHB em bancos de sangue privados (Roth *et al.*, 2012). No Amazonas não há registros do uso da tecnologia como rotina na triagem de doadores. Desde 2011 os hemocentros do sistema público brasileiro estão em fase de implantação do NAT para VHC e HIV-1 sendo que a triagem molecular para o VHB não está prevista para o primeiro momento.

Hepatite B oculta e segurança transfusional

Os casos de “anti-HBc isolado” podem ser consequência de diversos fatores: i) reações sorológicas falso-positivas: são mais frequentes nas regiões com baixa prevalência da infecção pelo VHB e devem ser suspeitadas quando ocorrem em títulos baixos nas reações imunoenzimáticas, com densidade óptica da amostra próxima ao ponto de corte da reação; ii) período da janela imunológica: observada nas infecções agudas em resolução ou evolução, quando o HBsAg já se negativou e o anti-HBs ainda não é detectado, surgindo algumas semanas depois; iii) expressão de imunidade tardia: quando os níveis do anti-HBs decaem abaixo do limite de detecção dos testes e o anti-HBc permanece positivo, provavelmente em razão da maior imunogenicidade do HBcAg; iv) infecção crônica, onde a positividade do anti-HBc pode ocorrer

concomitantemente com uma carga viral baixa do VHB, e o HBsAg não é detectado pelos métodos sorológicos habituais, passando a ser IOB (Zanetti *et al.*, 2006; Ocana *et al.*, 2011).

Os testes para a detecção do HBsAg continuam sendo a primeira escolha para interromper a transmissão transfusional do vírus B e são aplicados na triagem sorológica em todos os países. Como existem casos de portadores do VHB com HBsAg negativo, devido aos baixos títulos ou devido à presença de mutantes de escape do VHB, a pesquisa do anti-HBc se mantém na triagem sorológica de doadores de sangue. Isso representa um aumento importante no total de bolsas descartadas por apresentarem reatividade para este parâmetro (Launay *et al.*, 2011). Por esta razão, vários países optam por não utilizar o anti-HBc na triagem de doadores, como em alguns países mediterrâneos (Portugal, Espanha, Grécia e Itália) e países asiáticos (China, Índia, Taiwan entre outros).

Em diferentes regiões geográficas, várias alternativas têm sido propostas para evitar a escassez de sangue para transfusão em áreas com alta prevalência para anti-HBc, são elas: 1) aproveitar doadores anti-HBc positivos que apresentem: anti-HBc reativo com anti-HBs positivo (> 100 mUI/mL), esse procedimento é controverso pois nem sempre a presença do anti-HBs é indicativo da ausência do DNA-VHB (Silva *et al.*, 2005; Bhatti *et al.*, 2007; Satoh *et al.*, 2008; Antar *et al.*, 2010; Thedja *et al.*, 2010; Sofian *et al.*, 2010; Launay *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2012; Tani *et al.*, 2012); anti-HBc reativo com anti-HBs positivo (< 100 mUI/mL) com DNA-VHB negativo (Tani *et al.*, 2012). 2) vacinar contra o VHB os doadores que apresentem anti-HBc reativo isolado e verificar soroconversão. 3) motivar os doadores saudáveis tornando-os doadores de repetição. 4) importar bolsas de sangue de áreas com baixa prevalência para o anti-HBc.

Muitos estudos evidenciaram infecção pós-transfusão de hemocomponentes e transplantes de órgãos a partir de doadores anti-HBc total isolado (Mosley *et al.*, 1995; Panigrahi *et al.*, 2010), com taxas de infectividade alcançando 17% (Mosley *et al.*, 1995). Observou-se, entretanto, que hemocomponentes contendo ambos anti-HBc total e anti-HBs positivos apresentariam por sua vez baixa infectividade (Mosley *et al.*, 1995). Em certas situações na IOB, tanto os anticorpos anti-HBs quanto anti-HBc podem estar indetectáveis, sendo o DNA-VHB o único marcador passível de detecção (Wendel, 2007; Wendel *et al.*, 2008; Hollinger, 2008; Candotti & Allain, 2009; Hollinger & Dodd, 2009; Sofian *et al.*, 2010; Launay *et al.*, 2011).

Em determinadas áreas de alta prevalência da infecção pelo VHB, como em Taiwan, cerca de 80% dos adultos já tiveram contato com VHB. Kao *et al.*, (2002) mencionam que 3-15% dos

pacientes soropositivos apresentaram reatividade para DNA-VHB e que 3-30% dos pacientes soronegativos revelaram IOB pelo NAT. Nesta mesma região, outro grupo de pesquisa relatou que após uma transfusão de sangue, a partir de doadores soropositivos (anti-HBc e anti-HBs positivos) que somaram 10,5% de doadores positivos por métodos sorológicos foi constatado que 3% dos receptores apresentaram o DNA-VHB circulante (Liu *et al.*, 2006). Em outro trabalho participaram 12.461 doadores de sangue Koreanos e 1.682 (13,5%) das amostras foram reativas para o anti-HBc e destas, 1.523 (90,5%) positivas para o anti-HBs. O DNA-VHB foi detectado em duas amostras deste grupo. A prevalência para IOB foi de 0,016% (Seo *et al.*, 2011).

Na Europa, um estudo italiano demonstrou que de 6.313 amostras examinadas, 288 (4,6%) foram anti-HBc positivos, 242 (84,0%) foram anti-HBs positivos e destes 165 (68,2%) apresentaram a titulação do anti-HBs > 100UI/mL. 14 (4,8%) apresentaram reatividade para o DNA-VHB (Manzini *et al.*, 2007). Em Paris, Launay *et al.*, (2011) realizaram um estudo com 6.431 amostras de pacientes e foram avaliados os marcadores sorológicos para HBsAg, anti-HBc total e anti-HBs. Os resultados mostraram 362 (5,6%) amostras com anti-HBc isolado. O DNA-VHB foi detectado em 10 (2,8%) das 362 amostras e apenas 2 HBsAg positivas. Também foi evidenciada mutação genética na região S em 7 pacientes.

Na Indonésia para um total de 309 amostras HBsAg negativas, o anti-HBc total foi reagente em 134 e o anti-HBs em 68 (50,7%). O anti-HBs foi negativo em 66 (49,3%) das reações. O DNA-VHB foi detectado em 25 (18,7%) das amostras anti-HBc positivas, sendo que 6 (8,8%) pertenciam ao grupo reativo para o anti-HBs. A prevalência para IOB foi de 8,1% e para duas amostras desta população os títulos de anti-HBs foram ≥ 100 mIU/mL (Thedja *et al.*, 2010).

No sudeste da Índia, de 729 amostras testadas, foram positivas 220 (30,1%) para o anti-HBc e 40 (18,2%) para o anti-HBs e destas 12 (30%) apresentaram reatividade para o DNA-VHB (Panigrahi *et al.*, 2010). A frequência da IOB variou consideravelmente entre os países devido à heterogeneidade da prevalência do VHB nas diferentes populações.

No Brasil podemos citar alguns trabalhos que mencionam a IOB, dentre eles um estudo no banco de sangue de Recife (região Nordeste do país) onde de 1000 amostras testadas 120 (12%) mostraram positividade para o anti-HBc, 13 (10%) foram positivos para o DNA-VHB, 10 (76,9%) eram HBsAg positivos, 3 (23,1%) eram HBsAg negativos e 2 (15,4%) foram anti-HBs positivos (Arraes *et al.*, 2003). Outra referência em Porto Alegre na região Sul, onde Silva *et al.*, (2005) detectaram positividade de 3,3% DNA-VHB entre anti-HBc positivos. Em contraste, Wolf

et al., (2011), avaliaram amostras na mesma região, não encontraram positividade para o DNA-VHB entre as amostras de doadores de sangue com anti-HCV nos hemocentros no Sul do Brasil.

No Estado do Amazonas não há dados publicados sobre IOB em doadores de sangue. Nosso grupo de pesquisa avaliou 3.600 doações oriundas do interior do estado e observou 887 (24,6%) das amostras apresentaram algum marcador sorológico para hepatite B. Foram estudadas 179 doações e foram observados 4 casos de presença do DNA-VHB o que representa uma prevalência de 2,2% de IOB na região (Dados não publicados).

A IOB parece ser associada em uma pequena proporção dos casos a isolados virais mutados e indetectáveis através dos métodos convencionais para a determinação sorológica do HBsAg. Mais frequentemente o estado oculto da infecção parece estar relacionado com uma acentuada redução da replicação viral e expressão do gene, responsável pela negatividade para HBsAg e acrescido o fato dos níveis de DNA-VHB estarem muito baixos ou indetectáveis no sangue, mas presente no fígado (Capezzuto *et al.*, 2010).

São descritos casos de transmissão transfusional do VHB em situações de ausência de marcadores sorológicos para a infecção. No Brasil foram descritos dois pacientes imunodeficientes com câncer que receberam transfusão a partir de um único doador com sorologia anti-HBc e HBsAg negativos. Um paciente desenvolveu hepatite B aguda após 13 meses da transfusão e o outro paciente morreu após 6 meses sem apresentar qualquer marcador para infecção do VHB (Wendel *et al.*, 2008). Na Itália, dois doadores com história prévia de 50 doações apresentavam sorologia negativa para os marcadores de hepatite B, e em 2005 foi detectado DNA-VHB reativo apresentando mutações genéticas no tipo D (Capezzuto *et al.*, 2010). O teste de biologia molecular para a detecção do DNA-VHB permitiu a identificação de dois casos de IOB pelo VHB. Outro relato de caso envolvendo um paciente com a doença de Crohn, severamente imunossuprimido - no momento da transfusão, desenvolveu infecção aguda pelo VHB após 20 semanas, a partir de cinco doadores diferentes com HBsAg e DNA-VHB negativos, a especulação mais relevante para esse caso é a reativação da IOB soronegativa (Leung *et al.*, 2010; Ozaslan & Purnak, 2010). Similarmente na Slovenia, quatro meses após uma transfusão de sangue, duas pacientes desenvolveram hepatite B aguda. A primeira com 59 anos durante uma cirurgia de revascularização arterial, e a segunda de 71 anos após receber concentrado de glóbulos vermelhos (Levicnik-Stežinar *et al.*, 2008).

Um inquérito internacional incluindo 37 países, inclusive a cidade de São Paulo no Brasil, reportou os resultados do NAT na triagem de 300 milhões de doadores de sangue para HIV e VHC e mais de 100 milhões para o VHB, num período de 10 anos (1998-2008). O DNA-VHB foi pesquisado em 20.9 milhões de doações. 9.02 milhões de doações apresentaram dados completos para NAT. Destes, 3.081 (341.70/milhão) foram positivos pelo NAT, incluindo sorologia reativa e não reativa para o vírus B. A taxa para os doadores de primeira vez (2151.4/milhão) foi 42,6 vezes maior que os doadores de repetição (50.5/milhão). Doze dos 37 países que utilizam anti-HBc na triagem e como teste confirmatório, relataram um total de 75 doações positivas pelo NAT no período da janela imunológica (6.8/milhão) e 250 doações foram reativas para o DNA-VHB revelando ocorrência de IOB (22.8/milhão) (Roth *et al.*, 2012).

Conclusão

A infecção oculta pelo vírus B continua sendo motivo de preocupação na segurança transfusional, sendo hoje o maior risco de infecção pós-transfusional pelo VHB em países onde o NAT para VHB na triagem de doadores de sangue não foi implantado. Na Amazônia brasileira a possibilidade da ocorrência de IOB entre os doadores de sangue assintomáticos abre uma nova janela para a análise da história natural da infecção, das dinâmicas de replicação viral e da interação do sistema imune com o hospedeiro na região. Desta forma será possível enriquecer a compreensão das interações com a genética e a imunidade do hospedeiro Amazônico. Abre também espaço para discussão das melhores estratégias a serem utilizadas no presente e no futuro na triagem de doadores de sangue em regiões de alta prevalência e de perfil de transmissão peculiar como o caso da Amazônia. Atualmente, tanto os testes de triagem sorológica, quanto o teste NAT precisam ser redesenhados no intuito de aprimorar as estratégias de controle da transmissão transfusional buscando um algoritmo balanceado entre a rejeição de doadores potenciais, descarte de unidades, razões econômicas e segurança desejada.

Refrências

Ait-Goughoulte M., Lucifora, J., Zoulim, F. & Durantel, D. (2010) Innate antiviral immune response to hepatitis B virus. *Viruses*, 2, 1394-1410.

Allain, J.P. & Candotti, D. (2012) Hepatitis B in transfusion medicine: still a problem? *Biologicals*, 40, 180-186.

- Almeida, J.D., Rubenstein, D. & Stott, E.J. (1971) New antigen-antibody system in Australia-antigen positive hepatitis. *Lancet*, 2, 1224-1227.
- Antar, W., El-Shokry, M.H., Adb El Hamid, W.A. & Helmy, M.F. (2010) Significance of detecting anti-HBc among Egyptian male blood donors negative for HBsAg. *Transfusion Medicine*, 20, 409-413.
- Arraes, L.C., Ximenes, R., Andrieu, J.M., Lu, W., Barreto, S., Pereira, LM. & Castelo A. (2003) The biological meaning of anti-HBc positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 45, 137-140.
- Bhatti, F.A., Ullah, Z., Salamat, N., Ayub, M. & Ghani, E. (2007) Anti-Hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. *Transfusion*, 47, 74-79.
- Braga, W.S.M., Castilho, M.C., Borges, F.G., Martinho, A.C.S., Rodrigues, I.S., Azevedo, E.P., Sczufca, M. & Menezes, P.R. (2012) Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45, 13-17.
- Braga, W.S.M., Silva, E.B., Souza, R.A.B. & Tosta, C.E. (2005) Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e pelo plasmódio em Lábrea, Amazonas: estimativa da ocorrência de prováveis coinfeções. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, 218-223.
- Candotti, D. & Allain, J.P. (2009) Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 51, 798-809.
- Capezzuto, C., Franchi, E., Urbani, S., Romano, L. & Franchini, M. (2010) Occult hepatitis B in blood donors: a description of two cases. *Blood Transfusion*, 8, 297-303.
- Cassidy, A., Mossman, S., Olivieri, A., De Ridder, M. & Leroux-Roels, G. (2011) Hepatitis B vaccine effectiveness in the face of global HBV genotype diversity. *Expert Review Vaccines*, 10, 1709-1715.
- Chen Y.C., Jeng, W.J., Chu, C.M. & Liaw, Y.F. (2012) Decreasing levels of HBsAg predict HBsAg seroclearance in patients with inactive chronic hepatitis B virus infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10, 297-302.
- Chu, C.J. & Lok, A.S. (2002) Clinical utility in quantifying serum HBV-DNA levels using PCR assays. *Journal of Hepatology*, 36, 549-551.
- Cooksley, W.G.E. (2010) Do you need to determine viral genotype in treating chronic hepatitis B?. *Journal of Viral Hepatitis*, 17, 601-610.
- Dény, P. & Zoulim, F. (2010) Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathologie-Biologie*, 58, 245-253.

- Ei Khouri, M., Cordeiro, Q., Luz, D.A.B.P., Duarte, L.S., Gama, M.E.A. & Corbett, C.E.P. (2010) Endemic hepatitis B and C virus infection in a Brazilian eastern Amazon region. *Arquivos de Gastroenterologia*, 47, 35-41.
- Galy, O., Chemin, I., Le Roux, E., Villar, S., Le Calvez-Kelm, F., Lereau, M., Gouas, D., Vieco, B., Suarez, I., Navas, MC., Chevallier, M., Norder, H., Srivatanakul, P., Karalak, A., Sangrajang, S., Trépo, C. & Hainaut P. (2011) Mutations in TP53 and CTNNB1 in relation to hepatitis B and C infections in hepatocellular carcinomas from Thailand. *Hepatitis Research and Treatment*, 2011, ID 697162.
- Gaze, R., Carvalho, D.M. & Tura, L.F.R. (2006) Informação de profissionais de saúde sobre transmissão transfusional de hepatites virais. *Revista de Saúde Pública*, 40, 859-864.
- Guirgis, B.S.S., Abbas, R.O. & Azzazy, H.M.E. (2010) Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, e941–e953.
- Han, Q., Zhang, C., Zhang, J. & Tian, Z. (2011) Involvement of Activation of PKR in HBx-siRNA-Mediated Innate Immune effects on HBV inhibition. *PLoS ONE*, 6, e27931.
- Hatzakis, A., Magiorkinis, E. & Haida C. (2006) HBV virological assessment. *Journal of Hepatology*, 44, S71-S76.
- Hollinger, F.B. & Dodd, R. (2009) Hepatitis B virus traceback and lookback: factors to consider. *Transfusion*, 49, 176-184.
- Hollinger, F.B. (2008) Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. *Transfusion*, 48, 1001–1026.
- Hoofnagle, J.H., Seeff, L.B., Bales, Z.B. & Zimmerman, H.J. (1978) Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *The New England Journal of Medicine*, 298, 1379-1383.
- Hou, J., Liu, Z. & Gu, F. (2005) Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *International Journal of Medical Sciences*, 2, 50-57.
- Ijaz, B., Ahmad, W., Javed, F.T., Gull, S. & Hassan S. (2011) Revised cutoff values of ALT and HBV DNA level can better differentiate HBeAg (-) chronic inactive HBV patients from active carriers. *Virology Journal*, 8, 86.
- Júnior, G.M.B., Braga, W.S.M., Oliveira, C.M.C., Castilho, M.C. & Araújo, J.R. (2008) Hepatite B crônica oculta: prevalência e aspectos em população de elevada endemicidade de infecção pelo vírus da hepatite B na Amazônia Ocidental Brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41, 596-601.
- Kao, J.H., Chen, P.J., Lai, M.Y. & Chen, D.S. (2002) Occult Hepatitis B Virus Infection and Clinical Outcomes of Patients with Chronic Hepatitis C. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4068–4071.

- Kao, J.H. (2011) Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 26, 255-261.
- Koziel, M.J. & Peters, M.G. (2007) Viral hepatitis in HIV infection. *The New England Journal of Medicine*, 356, 1445-1454.
- Laperche, S. & Pillonel, J. (2007) Influence of epidemiological factors on blood transfusion. *ISBT Science Series*, 2, 78-84.
- Launay, O., Masurel, J., Servant-Delmas, A., Basse-Guérineau, A.L., Méritet, J.F., Laperche, S., Sogni, P. & Rosenberg, A.R. (2011) High levels of serum hepatitis B virus DNA in patients with anti-HBc alone: role of HBsAg mutants. *Journal of Viral Hepatitis*, 18, 721-729.
- Leung, V.K., Lee, C.K., Chau, T.N., Cheung, W.I., Lo, F.H., Lai, K.B. & Lin CK. (2010) A probable case of transfusion-transmitted hepatitis B virus infection in an immunosuppressed recipient caused by an occult HBV-infection donor with negative ID-NAT. *Transfusion Medicine*, 20, 276-277.
- Levicnik-Stežinar, S., Rahne-Potokar, U., Candotti, D., Lelie, N. & Allain, J.P. (2008) Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *Journal of Hepatology*, 48, 1022–1025.
- Liu, C.J., Lo, S.C., Kao, J.H., Tseng, P.T., Lai, M.Y., Ni, Y.H., Yeh, S.H., Chen, P.J. & Chen, D.S. (2006) Transmission of occult hepatitis B virus by transfusion to adult and pediatric recipients in Taiwan. *Journal of Hepatology*, 44, 39-46.
- Manzano-Alonso, M.L & Castellano-Tortajada, G. (2011) Reactivation of hepatitis B virus infection after cytotoxic chemotherapy or immunosuppressive therapy. *World Journal Gastroenterology*, 17- 1531-1537.
- Manzini, P., Girotto, M., Borsotti, R., Giachino, O., Guaschino, R., Lanteri, M., Testa, D., Ghiazza, P., Vacchini, M., Danielle, F., Pizzi, A., Valpreda, C., Castagno, F., Curti, F., Magistroni, P., Abate, M.L., Smedile, A. & Rizzetto, M. (2007) Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Hematologica*, 92, 1664-1670.
- Mello, F.C., Souto, F.J., Nabuco, L.C., Villela-Nogueira, C.A., Coelho, H.S., Franz, H.C., Saraiva, J.C., Virgolino, H.A., Motta-Castro, A.R., Melo, M.M., Martins, R.M. & Gomes, S.A. (2007) Hepatitis b virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiology*, 7, 1471-2180.
- Mosley, J.W., Stevens, C.E., Aach, R.D., Hollinger, F.B., Mimms, L.T., Solomon, L.R., Barbosa, L.H. & Nemo, G.J. (1995) Donor screening for antibodies to hepatitis B core antigen and hepatitis H virus infection in transfusion recipients. *Transfusion*, 35, 5-12.
- Nascimento, M.C., Mayaud, P., Sabino, E.C., Torres, K.L. & Franceschi, S. (2008) Prevalence of hepatitis B and C serological markers among first-time blood donors in Brazil: A Multi-Center Serosurvey. *Journal of Medical Virology*, 80, 53–57.

Niederhauser, C. (2011) Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. *Journal of Blood Medicine*, 2, 91-102.

O'Brien, S.F., Fearon, M.A., Yi, Q., Fan, W., Scalia, V., Muntz, I.R. & Vamvakas, E.C. (2007) Hepatitis B virus DNA-positive, hepatitis B surface antigen-negative blood donations intercepted by anti-hepatitis B core antigen testing: the Canadian blood service experience. *Transfusion*, 47, 1809-1815.

Ocana, S., Casas, M.L., Buhigas, I. & Lledo, J.L. (2011) Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, 17, 1553-1557.

Ozaslan, E. & Purnak, T. (2010) Is it a case transfusion-transmitted acute HBV or reactivation of occult hepatitis B virus infection? *Transfusion Medicine*, 20, 275.

Panigrahi, R., Biswas, A., Datta, S., Banerjee, A., Chandra, P.K., Mahapatra, P.K., Patnaik, B., Chakrabarti, S. & Chakravarty R. (2010) Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for Transfusion. *Virology Journal*, 7, 204.

Puoti, M., Torti, C., Bruno, R., Filice, G. & Carosi G. (2006) Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. *Journal of Hepatology*, 44, S65-S70.

Roth, W.K., Busch, M.P., Schuller, A., Ismay, S., Cheng, A., Seed, C.R., Jungbauer, C., Minsk, P.M., Sondag-Thull, D., Wendel, S., Levi, J.E., Fearon, M., Delage, G., Xie, Y., Jukic, I., Turek, P., Ullum, H., Tefanova, V., Tilk, M., Reimal, R., Castren, J., Naukkarinen, M., Assal, A., Jork, C., Hourfar, M.K., Michel, P., Offergeld, R., Pichl, L., Schmidt, M., Schottstedt, V., Seifried, E., Wagner, F., Weber-Schehl, M., Politis, C., Lin, C.K., Tsoi, W.C., O'Riordan, J., Gottreich, A., Shinar, E., Yahalom, V., Velati, C., Satake, M., Sanad, N., Sisene, I., Bon, A.H., Koppelman, M., Flanagan, P., Flesland, O., Brojer, E., Lęowska, M., Nascimento, F., Zhiburt, E., Chua, S.S., Teo, D., Stezinar, S.L., Vermeulen, M., Reddy, R., Park, Q., Castro, E., Eiras, A., Gonzales, Fraile, I., Torres, P., Ekermo, B., Niederhauser, C., Chen, H., Oota, S., Brant, L.J., Eglin, R., Jarvis, L., Mohabir, L., Brodsky, J., Foster, G., Jennings, C., Notari, E., Stramer, S., Kessler, D., Hillyer, C., Kame, H., Katz, L., Taylor, C., Panzer, S. & Reesink HW. (2012) International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sanguinis*, 102, 82-90.

Samal, J., Kandpal, M. & Vivekanandan, P. (2012) Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 142-163.

Satoh, K.A., Iwata-Takakura, A., Yoshikawa, Y., Gotanda, T., Tanaka, T., Yamaguchi, H. & Mizoguchi, H. (2008) A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection. *Vox Sanguinis*, 95, 174-180.

Seo, D.H., Whang, D.H., Song, E.Y., Kim, H.S. & Park, Q. (2011) Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen and occult hepatitis B virus infections in Korean blood donors. *Transfusion*, 51, 1840-1846.

Silva, C.M.D., Costi, C., Costa, C., Michelon, C., Oravec, R., Ramos, A.B., Niel, C. & Rossetti, M.L. (2005) Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. *Journal of infection*, 51, 24-29.

Sofian, M., Aghakhani, A., Izadi, N., Banifazl, M., Kalantar, E., Eslamifar, A. & Ramezani, A. (2010) Lack of occult hepatitis B virus infection among blood donors with isolated hepatitis B core antibody living in an HBV low prevalence region of Iran. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, 308–310.

Tani, Y., Aso, H., Matsukura, H., Tadokoro, K., Tamori, A., Nishiguchi, S., Yoshizawa, H. & Shibata, H. (2012) Significant background rates of HNV and HCV infections in patients and risks of blood transfusion from donors with low anti-HBc titres or high anti-Hbc titres with high anti-Hbs titres in Japan: a prospective, individual NAT study of transfusion-transmitted HBV, HCV and HIV infections. *Vox Sanguinis*, 102, 285-293.

Theджа, M.D., Roni, M., Harahap, AR., Siregar, NC., Ie, SI. & Muljono, DH. (2010) Occult hepatitis B in blood donors in Indonesia: altered antigenicity of the hepatitis B virus surface protein. *Hepatology International*, 4, 608–614.

Wendel, S. (2007) Rational testing for transmissible diseases. *ISBT Science Series*, 2, 19-24.

Wendel, S., Levi, J.E., Biagini, D.C. & Allain, J.P. (2008) A probable case of hepatitis B virus transfusion transmission realed after a 13-month-long window period. *Transfusion*, 48, 1602-1608.

Wolf, F.H., Fuchs, S.C. & Brandão, A.B.M. (2011) Absence of occult hepatitis B among donors in southern Brazil. *Brazilian Journal of Infection Disease*, 15, 159-162.

WHO, World Health Organization (2009). Hepatitis B vaccines. *Weekly Epidemiology Record*. 40, 405-420.

Yang, M.H, Li, L., Hung, Y.S., Hung, C.S., Allain, J.P., Lin, K.S. & Tsai, L.S.J. (2010) The efficacy of individual-donation and minipool testing to detect low-level hepatitis B virus DNA in Taiwan. *Transfusion*, 50, 65-74.

Zanetti, A.R., Romanò, L., Zappá, A. & Velati, C. (2006) Changing patterns of hepatitis B infection in Italyand NAT testing for improving the safety of blood supply. *Journal of Clinical Virology*, 36, S51-S55.

Occult hepatitis B virus infection in anti-HBc positive with and without anti-HBs blood donors from Amazon/Brazil

Mônica Nascimento dos Santos Moresco¹, Helaine de Araújo Virgolino¹, Márcia Poinho Encarnação de Moraes², Isabella da Motta-Passos¹, Lya Manoel³, Kelly Raphaele³, Adriana Malheiro^{1,2}, José Eduardo Levi⁴, Norma de Paula Cavalheiro⁵, Kátia Luz Torres Silva^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas/UFAM.

²Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas/FHEMOAM. ³Estudantes do Programa de Apoio à Iniciação Científica do Amazonas, FHEMOAM/FAPEAM. ⁴Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. ⁵Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP.

Correspond author: Kátia Luz Torres – email: katialuztorres@hotmail.com

Resumo

A ocorrência de infecção oculta pelo VHB em doadores de sangue assintomáticos abriu uma nova lacuna a ser preenchida principalmente em hemocentros de regiões de alta prevalência como na Amazônia brasileira, que são desafiados a buscar estratégias de garantia de estoques considerando o alto impacto do descarte de hemocomponentes anti-HBc reativos. Este estudo buscou analisar nas doações de sangue do interior do estado do Amazonas a presença da infecção oculta pelo vírus da hepatite B em amostras anti-HBc total positivas com ou sem o marcador anti-HBs. A população de estudo foi composta por candidatos à doação de sangue do interior do estado do Amazonas, no período de junho/2011 a junho/2012. Das 179 amostras anti-HBc total positivas e HBsAg negativas que foram submetidas a PCR em tempo real, 04 foram positivas para o DNA-VHB, caracterizando infecção oculta pelo vírus B com uma prevalência de 2,2%. Destas, 03 apresentaram anti-HBs ≥ 100 mUI/mL, indicando presença do vírus mesmo em altas titulações, mostrando que a possibilidade de uma transmissão transfusional através de doadores assintomáticos não deve ser descartada, principalmente em áreas de alta endemicidade para o VHB como a da região Amazônica. Este estudo contribuiu na promoção de informações críticas para os gestores da saúde sobre o impacto do uso da tecnologia de detecção de ácidos nucleicos

(NAT) para hepatite B na triagem de doadores de áreas endêmicas, promovendo subsídios para preencher esta lacuna.

Palavras-chave: DNA-VHB, Amazônia brasileira, hepatite B oculta, doadores de sangue

Summary

The occurrence of occult HBV infection in asymptomatic blood donors opened a new gap to be filled mainly to blood centers in areas of high prevalence as in the Brazilian Amazon, who are challenged to seek assurance strategies stocks considering the high impact of the disposal of blood products reactive anti-HBc. This study investigates the blood donations in the state of Amazon the presence of occult hepatitis B virus infection in samples positive anti-HBc with or without anti-HBs marker. The study population was composed of candidates for blood donation in the state of Amazon, from June/2011 to June/2012. Samples from 179 anti-HBc positive and HBsAg negative were subjected to real-time PCR, 04 were positive for HBV DNA, featuring occult B virus infection with a prevalence of 2.2%. Of these, 03 had anti-HBs \geq 100 mIU / mL, indicating the presence of the virus even at high titers, showing that the possibility of transmission through transfusion of asymptomatic donors should not be ruled out, especially in areas of high endemicity for HBV as the Amazon region. This study contributed in promoting critical information for health managers on the impact of technology use nucleic acid amplification test (NAT) for hepatitis B screening of donors from endemic areas, providing subsidies to fill this gap.

Keywords: HBV DNA, the Brazilian Amazon, occult hepatitis B, blood donors

Introdução

O risco de transmissão transfusional da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) continua sendo motivo de preocupação nos serviços de hemoterapia principalmente de países e regiões onde há alta prevalência da infecção. No Brasil, a infecção constitui um importante problema de saúde pública especialmente na região Amazônica. No estado do Amazonas as prevalências na

população geral para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) podem variar de 2% a 9% e anticorpos contra os antígenos do *Core* do vírus (anti-HBc) de 5% a 76% respectivamente (Braga, *et al.*, 2005; Ei KHouri *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2012).

Em muitos países, a triagem de doadores de sangue contra hepatite B é realizada utilizando-se critérios epidemiológicos e sorológicos e não utilizam testes NAT na rotina. No Brasil, conforme a normatização da hemoterapia é preconizado que se deve descartar as unidades de hemocomponentes que apresentem reatividade aos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc e apesar de estar passando pelo processo de implantação dos testes NAT na triagem não prevê no primeiro momento a pesquisa do DNA-VHB (apenas para VHC e HIV). A soroprevalência dos marcadores para hepatite B em doadores de sangue no estado do Amazonas/Brasil apresenta importantes variações entre a capital (Manaus) e os municípios do interior do estado. A prevalência dos marcadores HBsAg e anti-HBc entre doadores de Manaus é 0,3% e 3,6% respectivamente. No interior do estado a prevalência é bem mais alta sendo em média 0,6% para o HBsAg e 31,7% para anti-HBc (Dados não publicados). A transmissão vertical é forte fator de risco para a propagação e manutenção do padrão de transmissão da doença em idade jovem nesta região (Ei Khoury *et al.*, 2010).

Em áreas onde o VHB apresenta alta endemicidade a estratégia de triagem usando anti-HBc pode não ser a mais adequada devido ao alto índice de inaptidão ou rejeição de unidades, ocasionando aumento no custo do processo. Nestas áreas são discutidos dois algoritmos de triagem: testagem do anti-HBc, combinada com a dosagem do anti-HBs ou implementação de teste com alta sensibilidade de detecção do DNA-VHB (Niederhauser, 2011).

A existência de risco residual de transmissão do VHB é prevista em áreas endêmicas e está principalmente relacionado a doações HBsAg negativas que foram coletadas no período de pré-soroconversão ou durante estágios avançados da infecção (Allain, 2004; Hou *et al.*, 2005; Candotti & Allain, 2009). O rastreamento do DNA-VHB tem sido um potencial mecanismo para reduzir significativamente a infecção no período da janela imunológica e revelar a infecção oculta pelo vírus B – IOB (Allain, 2004; Wendel, 2007; Wendel *et al.*, 2008; Hollinger, 2008; Candotti & Allain, 2009; Hollinger & Dodd, 2009). A IOB é caracterizada pela presença do DNA-VHB no sangue e/ou fígado de pessoas com sorologia HBsAg negativo, geralmente com carga viral $< 10^3$ cópias/mL (Braga *et al.*, 2012).

De forma a subsidiar maiores discussões sobre a segurança transfusional, este estudo tem como objetivo analisar nas doações de sangue do interior do estado do Amazonas (área de alta prevalência do marcador anti-HBc) a presença da hepatite B oculta em amostras anti-HBc total positivas com ou sem o marcador anti-HBs

Material e Métodos

Este trabalho foi conduzido como um estudo transversal nas Unidades de Coleta e Transfusão de 37 municípios do interior do estado do Amazonas (regionais de saúde do Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo) no período de Junho de 2011 a junho de 2012. Neste período foram registradas 3.600 doações do interior do estado do Amazonas, destas, 887 (24,6%) apresentaram algum marcador sorológico para hepatite B (Dados não publicados). Foram incluídas neste estudo 179 amostras, destas 128 são correspondentes ao grupo A (anti-HBc total positivo/anti-HBs positivo ≥ 100 mUI/mL) e 51 do grupo B (anti-HBc total positivo/anti-HBs negativo ≤ 100 mUI/mL). As doações foram incluídas de acordo com os seguintes critérios de elegibilidade: doadores de sangue do interior do estado do Amazonas e das regionais de saúde com os marcadores: anti-HBc total positivo e HBsAg negativo com ou sem anti-HBs. O protocolo de estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM.

Os testes sorológicos para HBsAg e anti-HBc total foram realizados através do ARCHITECT® (ABBOTT/Alemanha) conforme as recomendações do fabricante. Uma vez que a amostra foi sorologia reativa para anti-HBc total sem presença do HBsAg, a mesma foi testada para o marcador anti-HBs pelo ARCHITECT® (ABBOTT/Alemanha).

O DNA-VHB foi extraído de 1 mL de soro usando o Kit QIAamp® Ultrasens™ Virus (Qiagen/USA). A PCR em tempo real para β -actina humana foi feita pelo SYBR® Green (GoTaq qPCR Master Mix, Promega Corporation, Madison, USA), realizada no termociclador STEP ONE PLUS (Applied Biosystems, Warrington, UK). As condições básicas da reação foram: 10 minutos à 95°C para ativação da Taq polimerase, seguido por 40 ciclos de desnaturação à 59°C por 15seg, anelamento e extensão à 60°C por 60seg. Sequências de primers para β -actina: senso (5' TGACAAAACCTAACTTGCGC 3') e anti-senso (5' ATAAAGCCATGCCAATCTCA 3').

A região S do genoma VHB foi amplificada pela PCR em tempo real seguindo o protocolo da tecnologia TaqMan®. Foram utilizados os primers VHB_Foward: (5'-GTGTCTGCGGCGTTTTATCAT-3'); VHB_Reverse: (5'-GGACAAACGGGCAACATACCT-3'); VHB_Probe: (5'FAM- ATCCTGCTGCTATGCCTC - NFQ 3'), resultando no produto de 98pb (GenBank: AF129506.1). As PCRs foram realizadas no termociclador STEP ONE PLUS (Applied Biosystems, Warrington, UK), utilizando um ciclo inicial de 95°C por 10min, seguido de 3 ciclos de 95°C por 15seg, depois 60°C por 1min, seguido de 45 ciclos de 94°C por 15seg, 60° C por 1min e coletar a fluorescência na extensão de 60°C. Todas as amostras que amplificaram foram testadas em duplicatas para confirmação. Foram realizadas técnicas de estatística descritiva.

Resultados

No período de estudo a FHEMOAM recebeu 3.600 amostras para doações de sangue do interior do estado do Amazonas, destas 887 (24,6%) apresentaram algum marcador sorológico para hepatite B. Foram estudadas 179 amostras anti-HBc total positivas e HBsAg negativas, com ou sem anti-HBs provenientes das regionais de saúde para este protocolo. Destas, 128 (72%) correspondem ao grupo A e 51 (28%) do grupo B.

Observou-se a presença de DNA-VHB em 04 amostras, sendo 03 correspondentes ao grupo A (anti-HBs ≥ 100 mUI/mL) e 1 ao grupo B (≤ 100 mUI/mL). Desta forma a prevalência da hepatite B oculta encontrada entre as doações de sangue do interior do estado do Amazonas foi de 2,2%. A análise do perfil dos casos de hepatite B oculta encontrados estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Distribuição das frequências dos dados demográficos, clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos candidatos à doação de sangue do interior do estado do Amazonas, com amostras anti-HBc total positivas, HBsAg negativas e DNA-VHB reativos. No período de junho de 2011 a junho de 2012.

Variáveis	DOADORES DNA-VHB+			
	Grupo A (anti-HBc+/anti-HBs+) (n=128)		Grupo B (anti-HBc+/anti-HBs-) (n=51)	
	1	2	3	4
Município	Manacapuru	Fonte Boa	Tefé	Fonte Boa
Sexo	M*	M	M	M
Idade	41	33	51	36
Primeira doação	Não	Não	Não	Não
Estado civil	Casado	Casado	Casado	Mora com alguém
Trabalha na área de saúde	Não	Não	Não	Não
Recebeu transfusão sanguínea	Não	Não	Não	Não
Teve hepatite	Não	Não	Não	Não
Mora com alguém teve hepatite	Não	Não	Não	Não
Parceiro teve hepatite	Não	Não	Não	Não
Mãe teve hepatite	Não	Não	Não Sabe	Não
Usa medicamentos injetáveis sem prescrição médica	Não	Não	Não	Não Sabe
Fez cirurgia	Não	Não	Não	Não
Vacinado	Não	Não	Sim	Sim
Tem tatuagem ou piercing	Não	Não	Não	Não
Compartilha Material perfuro cortante	Não	Não	Não	Não
Fez acupuntura	Não	Não	Não	Não
Nos últimos 12 meses quantos parceiros sexuais	2	1	1	0
Faz uso de bebidas alcoólicas	Não	Sim	Sim	Sim
Quantas doses de bebida anti-HBc total reativo (S/CO)	-	>3	>3	>3
anti-HBs mUI/mL	0,059**	8,87***	5,480***	10,99***
Carga viral: cópias/mL	>1000	608,79	281,53	0,05
	4,5	3,5	29,0	3,6

*M, masculino; **ELISA; ***Quimioluminescencia

Discussão

Além de uma triagem clínica de qualidade, o algoritmo de testes mais utilizado para tentar impedir a transmissão transfusional do vírus B tem sido a detecção do HBsAg e anti-HBc total, seguido da detecção do DNA-VHB pelos testes NAT (Candotti & Allain, 2009; Allain & candotti, 2011; Niederhauser, 2011). No Brasil o teste NAT para VHB não está implantado sendo utilizado apenas em alguns bancos de sangue privados (Wendel *et al.*, 2008). No estado do

Amazonas, por se tratar de uma região de alta prevalência para infecção pelo VHB, o algoritmo brasileiro traz inquietações no sentido da necessidade de repensar o impacto do mesmo na qualidade do produto e na manutenção do estoque de sangue em áreas aonde o descarte de unidades por anti-HBc reativo chega a 64%.

Estudos demonstram que a presença do marcador anti-HBs em altos títulos (acima de 100 mUI/mL) é indicativo de imunidade adquirida conferindo a possibilidade do uso dos hemocomponentes em terapia transfusional (Sato *et al.*, 2008; Kupski, 2008). Esse procedimento é controverso, pois nem sempre a presença do anti-HBs é indicativo da ausência do DNA-VHB (Silva *et al.*, 2005; Thedja *et al.*, 2010; Launay *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2012; Tani *et al.*, 2012). Em região com endemicidade similar a da região Amazônica foi descrito que o DNA do vírus da hepatite B pode estar presente em amostras de doadores de sangue com anti-HBc reativo que possuem positividade para o anti-HBs com uma prevalência de 1,5% e em doadores com anti-HBs negativo com uma prevalência de 5% (Bhatti *et al.*, 2007).

Alguns estudos buscam explicar a relação entre os títulos do anti-HBs com os níveis de DNA-VHB. Em humanos a transmissão do VHB tem sido relatada a partir de doadores no período da janela de pré-soroconversão com carga viral do DNA-VHB inferior a 20 UI/mL (Satake *et al.*, 2007). No entanto, alguns casos de doadores no período da janela imunológica com IOB não são infecciosos mesmo com a carga viral variando entre < 20 e 500 UI/mL (Candotti & Allain, 2009). Uma pesquisa analisando a amostra de um doador com 50 doações na Itália, não imunizado contra o VHB, sem história de fatores de risco para infecção, com HBsAg negativo, anti-HBc reativo e anti-HBs positivo (31.0 U/L) foi positivo para o DNA-VHB com carga viral de 60 UI/mL (Capezzuto *et al.*, 2010). A real taxa de infectividade da IOB ainda é desconhecida, por isso todas as doações contendo DNA-VHB são consideradas infecciosas. Dados recentes sugerem que a capacidade de neutralização do anti-HBs pode ser ineficiente quando expostos a altas cargas virais do VHB (Satake *et al.*, 2007). A relação entre a infecção do VHB com a carga viral pode estar relacionada a diversos fatores, como: fatores imunes no doador; fase da infecção, o volume de hemocomponentes e hemoderivados transfundido para o receptor, e a presença de anticorpos neutralizantes contra o VHB (Satake *et al.*, 2007). Em nosso estudo não encontramos relação entre os títulos de anti-HBs com a carga viral do VHB.

Apesar do cenário epidemiológico local, não havia relatos de casos de hepatite B oculta em doadores de sangue no estado do Amazonas. Neste estudo são apresentados 4 casos de

presença de DNA-VHB entre os 179 doadores de sangue oriundos do interior do estado do Amazonas que não apresentaram reatividade para o marcador HBsAg mas que apresentaram reatividade para o marcador anti-HBc. Entre estes, 03 doadores apresentaram anti-HBs positivos com títulos acima de 100 mUI/mL. Este dado representa a ocorrência de 2,2% de hepatite B oculta entre doadores de sangue no interior do estado do Amazonas.

A prevalência de IOB encontrada neste estudo está abaixo do que é observada em outras regiões onde a hepatite B é endêmica. Em Ganjam/Índia a prevalência descrita de IOB é de 30% (Panigrahi *et al.*, 2012) e na Indonésia é de 8,1% (Thedja *et al.*, 2010). O índice encontrado no estado do Amazonas se assemelha com índices encontrados em regiões de média prevalência como no Sul do Brasil onde a frequência da IOB é de 3,3% (Silva *et al.*, 2005). No Nordeste do Brasil foi achado 2,7% de IOB (Arraes *et al.*, 2003) entre doadores de sangue. E se aproxima de índices de países de baixa prevalência como na Itália onde foi descrito ser de 4,8% (Manzini *et al.*, 2007).

De qualquer forma a ocorrência de casos de IOB entre doadores de sangue evidencia a possibilidade do risco de transmissão transfusional do VHB, quando os doadores de sangue apresentam-se assintomáticos e com HBsAg negativo durante o período da janela imunológica. A infectividade de hemoderivados de casos de IOB é muito discutida. Estudos tem relatado a detecção do DNA-VHB no sangue de doadores HBsAg negativos com anti-HBc total reativos como responsáveis pela transmissão da hepatite B por transfusão de sangue. Um estudo no Japão analisou 685.844 doações de repetição, destas 265 eram sorologia e mini pool NAT (MP-NAT) positivas para VHB. Das 265/13 eram NAT individual positivos (ID-NAT). Apenas 1 receptor foi identificado como caso de transmissão da hepatite B por transfusão de sangue, mostrando uma frequência de aproximadamente 1/53.000 doações neste país. O Ministério da Saúde/Japão recomenda fazer o ID-NAT nos receptores de hemoderivados após 3 meses da transfusão, porém neste estudo foi observado um período de janela imunológica por mais de 161 dias. O aparecimento tardio do VHB pode ser explicado por dois factores: (i) quantidade muito baixa de cópias do VHB no sangue transfundido e (ii) condição imunossupressora do receptor. Por conseguinte, é necessário estabelecer um sistema mais cauteloso de acompanhamento pós-transfusão de sangue (Bouike, *et al.*, 2010).

No Brasil foram descritos dois pacientes imunodeficientes com câncer que receberam transfusão a partir de um único doador com sorologia anti-HBc e HBsAg negativos. Um paciente

desenvolveu hepatite B aguda após 13 meses da transfusão e o outro paciente morreu após 6 meses sem apresentar qualquer marcador para infecção do VHB (Wendel *et al.*, 2008). Outro relato de caso envolvendo um paciente com a doença de Crohn, severamente imunossuprimido - no momento da transfusão, desenvolveu infecção aguda pelo VHB após 20 semanas, a partir de cinco doadores diferentes com HBsAg e DNA-VHB negativos, a especulação mais relevante para esse caso é a reativação da IOB soronegativa (Leung, 2010; Ozaslan & Purnak, 2010). Similarmente na Slovenia, quatro meses após uma transfusão de sangue, duas pacientes desenvolveram hepatite B aguda. A primeira com 59 anos durante uma cirurgia de revascularização arterial, e a segunda de 71 anos após receber concentrado de glóbulos vermelhos (Levicnik-Stežinar *et al.*, 2008).

Observou-se neste estudo que entre os doadores que foram positivos para o DNA-VHB, dois eram imunizados contra o vírus da hepatite B e não houve relato de exposição aos fatores clássicos de risco para a infecção. Sabe-se que a vacina contra a hepatite B é eficaz, faz parte do Programa Nacional de Imunização do país e deve ser seguido rigorosamente. De acordo com o Ministerio da Saúde três doses de vacina contra hepatite B induzem títulos protetores de anticorpos (anti-HBs ≥ 10 UI/mL) em mais de 90% dos adultos e jovens saudáveis, e em mais de 95% dos lactentes, crianças e adolescentes. A eficácia da vacina diminui com a idade e é menor em maiores de 40 anos. Outros fatores, tais como tabagismo, obesidade e fatores genéticos ligados a determinados haplotipos de HLA estão associados à resposta inadequada à vacinação contra infecção pelo vírus B (Gerlich *et al.*, 2010).

Estima-se que 5% a 10% de adultos saudáveis e imunocompetentes, que recebem a vacina contra VHB, não produzem uma resposta imunológica satisfatória (Gerlich *et al.*, 2010). No entanto, sabe-se que os fenótipos humano de antígenos leucocitários específicos são considerados os mais importantes marcadores genéticos para os não respondedores (Leonardi *et al.*, 2009). A diminuição dos níveis de anti-HBs após a vacinação são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de infecções e cronicidade da hepatite B, especialmente em adolescentes que estão constantemente expostos ao VHB (Fagundes *et al.*, 2012).

No município de Lábrea/Amazonas após de 19 anos de vacinação, foi encontrado uma prevalência do anti-HBc de 19,8% em crianças com idade entre 5 e 9 anos, e 38,9% entre os adolescentes com faixa etária entre 10 e 14 anos. Esses dados demonstram a forte circulação do

VHB nesta região evidenciando uma transmissão de forma vertical, horizontal e sexual (Braga *et al.*, 2012).

A realização de estudos retrospectivos de investigação de transmissão transfusional de hepatite B são extremamente interessantes em regiões como no estado do Amazonas. No entanto, estudos como esse apresentam dificuldades para serem realizados pela ausência da informação do perfil sorológico pré-transfusional (Bouike *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011).

A implementação da detecção do DNA-VHB através das técnicas de detecção de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) tem sido um potencial mecanismo para reduzir significativamente a transmissão da infecção no período da janela imunológica e revelar IOB, diminuindo o risco de uma hepatite B pós-transfusional (Roth *et al.*, 2012).

Conclusão

A infecção oculta pelo vírus B continua sendo motivo de preocupação na segurança transfusional, sendo hoje o maior risco de infecção pós-transfusional pelo VHB em países onde o NAT para VHB na triagem de doadores de sangue não foi implantado. Na Amazônia brasileira a ocorrência de IOB entre os doadores de sangue assintomáticos abre uma nova janela para a análise da história natural da infecção, das dinâmicas de replicação viral e da interação do sistema imune com o hospedeiro na região. Abre também espaço para discussão das melhores estratégias a serem utilizadas no presente e no futuro na triagem de doadores de sangue em regiões de alta prevalência e de perfil de transmissão peculiar como o caso da Amazônia. Atualmente, tanto os testes de triagem sorológica, quanto o teste NAT precisam ser redesenhados no intuito de aprimorar as estratégias de controle da transmissão transfusional buscando um algoritmo balanceado entre a rejeição de doadores potenciais, descarte de unidades, razões econômicas e segurança desejada.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Fundação Alfredo da Matta (FUAM), Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo/SP, Laboratório Distrital Norte Professor Manoel Bastos

Lira da prefeitura de Manaus/AM, Diagnocel LTDA (doação do kit comercial), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sanguinis* 2004; 86:83–91.

Allain JP & Candotti D. Hepatitis B in transfusion medicine: still a problem? *J. Biologicals*. 2011; 1-7.

Arraes LC, Ximenes R, Andrieu JM, Lu W, Barreto S, Pereira LM, Castelo A. The biological meaning of anti-HBc positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 2003; 45:137-140.

Bhatti FA, Ullah Z, Salamat N, Ayub M, Ghani E. Anti-Hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. *Transfusion* 2007; 47:74-79.

Bouike Y, Imoto S, Mabuchi O, Kokubunji A, Kai S, Okada M, Taniguchi R, Momose S, Uchida S, Nishio H. Infectivity of HBV DNA positive donations identified in look-back studies in Hyogo-Prefecture, Japan. *Transfusion Medicine* 2010 doi: 10.1111/j.1365-3148.2010.01057.x

Braga WSM, Castilho MC, Borges FG, Martinho ACS, Rodrigues IS, Azevedo EP, Scazufca M, Menezes PR. Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2012; 45:13-17.

Braga WSM, Silva EB, Souza RAB, Tosta CE. Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e pelo plasmódio em Lábrea, Amazonas: estimativa da ocorrência de prováveis coinfeções. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2005; 38:218-223.

Candotti D & Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2009; 51:798–809.

Capezzuto C, Franchi E, Urbani S, Romano L, Franchini M. Occult hepatitis B in blood donors: a description of two cases. *Blood Transfusion* 2010; 8:297-303.

Ei Khouri M, Cordeiro Q, Luz DABP, Duarte LS, Gama MEA, Corbett CEP. Endemic hepatitis B and C virus infection in a Brazilian eastern Amazon region. *Arquivos de Gastroenterologia* 2010; 47:35-41.

Fagundes GD, Tabalipa FO, Silva J. Antibody levels in children after 10 years of vaccination against hepatitis B: a Brazilian community-based study. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45 (2):260-262.

Gerlich WC, Bremer C, Saniewski M, Schuttler CG, Wend UC, Willems WR, Glebe D. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. *Dig Dis* 2010; 28:116-125.

Hollinger FB & Dodd R. Hepatitis B virus traceback and lookback: factors to consider. *Transfusion* 2009; 49:176-184.

Hollinger FB. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. *Transfusion* 2008; 48:1001–1026.

Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005; 2(1):50-57.

Launay O, Masurel J, Servant-Delmas A, Basse-Guérineau AL, Méritet JF, Laperche S, Sogni P, Rosenberg AR. High levels of serum hepatitis B virus DNA in patients with anti-HBc alone: role of HBsAg mutants. *Journal of Viral Hepatitis* 2011; 18:721-729.

Leung VK, Lee CK, Chau TN, Cheung WI, Lo FH, Lai KB, Lin CK. A probable case of transfusion-transmitted hepatitis B virus infection in an immunosuppressed recipient caused by an occult HBV-infection donor with negative ID-NAT. *Transfusion Medicine* 2010; 20:276-277.

Levicnik-Stezinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, Lelie N, Allain JP. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *Journal of Hepatology* 2008; 48:1022–1025.

Manzini P, Giroto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, Testa D, Ghiazza P, Vacchini M, Danielle F, Pizzi A, Valpreda C, Castagno F, Curti F, Magistroni P, Abate ML, Smedile A, Rizzetto M. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Hematologica* 2007; 92:1664-1670.

Niederhauser, C. Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. *Journal of Blood Medicine*. 2011; 2:91-102.

Ozaslan E & Purnak T. Is it a case transfusion-transmitted acute HBV or reactivation of occult hepatitis B virus infection? *Transfusion Medicine* 2010; 20:275.

Panigrahi R, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Mahapatra PK, Patnaik B, Chakrabarti S, Chakravarty R. Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for Transfusion. *Virology Journal* 2010; 7:204.

Ramos VF & Ferraz FN. Perfil epidemiológico dos doadores de sangue do hemonúcleo de Campo do Mourão-PR no ano de 2008. *Rev Saúde e Biol* 2010; 5(2):14-21.

Roth WK, Busch MP, Schuller A, Ismay S, Cheng A, Seed CR, Jungbauer C, Minsk PM, Sondag-Thull D, Wendel S, Levi JE, Fearon M, Delage G, Xie Y, Jukic I, Turek P, Ullum H, Tefanova V, Tilk M, Reimal R, Castren J, Naukkarinen M, Assal A, Jork C, Hourfar MK, Michel P, Offergeld R, Pichl L, Schmidt M, Schottstedt V, Seifried E, Wagner F, Weber-Schehl M,

Politis C, Lin CK, Tsoi WC, O'Riordan J, Gottreich A, Shinar E, Yahalom V, Velati C, Satake M, Sanad N, Sisene I, Bon AH, Koppelman M, Flanagan P, Flesland O, Brojer E, Lętowska M, Nascimento F, Zhiburt E, Chua SS, Teo D, Stezinar SL, Vermeulen M, Reddy R, Park Q, Castro E, Eiras A, Gonzales Fraile I, Torres P, Ekermo B, Niederhauser C, Chen H, Oota S, Brant LJ, Eglin R, Jarvis L, Mohabir L, Brodsky J, Foster G, Jennings C, Notari E, Stramer S, Kessler D, Hillyer C, Kamel H, Katz L, Taylor C, Panzer S, Reesink HW. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sanguinis* 2012; 102:82–90.

Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, Tadokoro K. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion* 2007; 47:1197-1205.

Satoh KA, Iwata-Takakura A, Yoshikawa Y, Gotanda T, Tanaka T, Yamaguchi H, Mizoguchi H. A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection. *Vox Sanguinis* 2008; 95:174–180.

Silva CMD, Costi C, Costa C, Michelon C, Oravec R, Ramos AB, Niel C, Rossetti ML. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. *Journal of infection* 2005; 51:24-29.

Su TH, Chen PJ, Chen TC, Cheng HR, Li L, Lin KS, Kao JH, Chen DS, Liu CJ. The clinical significance of occult hepatitis B transfusion in Taiwan – a look-back study. *Transfusion Medicine* 2011; 21:33-41.

Tani Y, Aso H, Matsukura H, Tadokoro K, Tamori A, Nishiguchi S, Yoshizawa H, Shibata H. Significant background rates of HNV and HCV infections in patients and risks of blood transfusion from donors with low anti-HBc titres or high anti-Hbc titres with high anti-Hbs titres in Japan: a prospective, individual NAT study of transfusion-transmitted HBV, HCV and HIV infections. *Vox Sanguinis* 2012; 102:285-293.

Thedja MD, Roni M, Harahap AR, Siregar NC, Ie SI, Muljono DH. Occult hepatitis B in blood donors in Indonesia: altered antigenicity of the hepatitis B virus surface protein. *Hepatology International* 2010; 4:608–614.

Wendel S, Levi JE, Biagini DC, Allain JP. A probable case of hepatitis B virus transfusion transmission realed after a 13-month-long window period. *Transfusion* 2008; 48:1602-1608.

Wendel S. Rational testing for transmissible diseases. *ISBT Science Series* 2007; 2:19-24.

Resultados Complementares

Durante o período de estudo (junho de 2011 a junho de 2012) as estratégias de coleta de sangue e abastecimento de hemocomponentes no interior do estado do Amazonas sofreram mudanças importantes em função do risco de transmissão considerando a alta soroprevalência do marcador anti-HBc total nas doações oriundas do interior do estado. Além disso, em função da logística de transporte de amostras do interior para a central sorológica em Manaus, a estruturação da logística foi revista de forma a permitir o processo de implantação da tecnologia do NAT orientada pelo Ministério da Saúde na região.

Os critérios de triagem anteriormente utilizados, que indicava o aproveitamento de hemocomponentes HBsAg negativos, anti-HBc total reativo e anti-HBs reativo em altos títulos, foi substituído pelo critério de descarte de unidades HBsAg reativo e/ou anti-HBc reativo. Desta forma, a média de doações oriundas do interior do estado caiu de cerca de 6.600 para cerca de 3.600/ano (FHMOAM, 2012), representando uma queda de aproximadamente 50%.

Os antigos doadores de repetição do interior que apresentavam o marcador anti-HBc total reativo passaram a ser considerados inaptos e não mais foram realizados os testes para o marcador anti-HBs. As mudanças de critérios e o impacto na frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B nas doações do interior do estado do Amazonas estão demonstradas na **Figura 6**.

Diante destas mudanças o Hemocentro do Amazonas, para buscar a garantia de disponibilidade de hemocomponentes no interior do estado, passou a encaminhar unidades de hemocomponentes da capital (Manaus) para as agências transfusionais do interior. As unidades hemoterápicas passaram a funcionar como Agências Trasmfusionais (ATs) e não mais como Unidades de Coleta e Transfusão (UCTs).

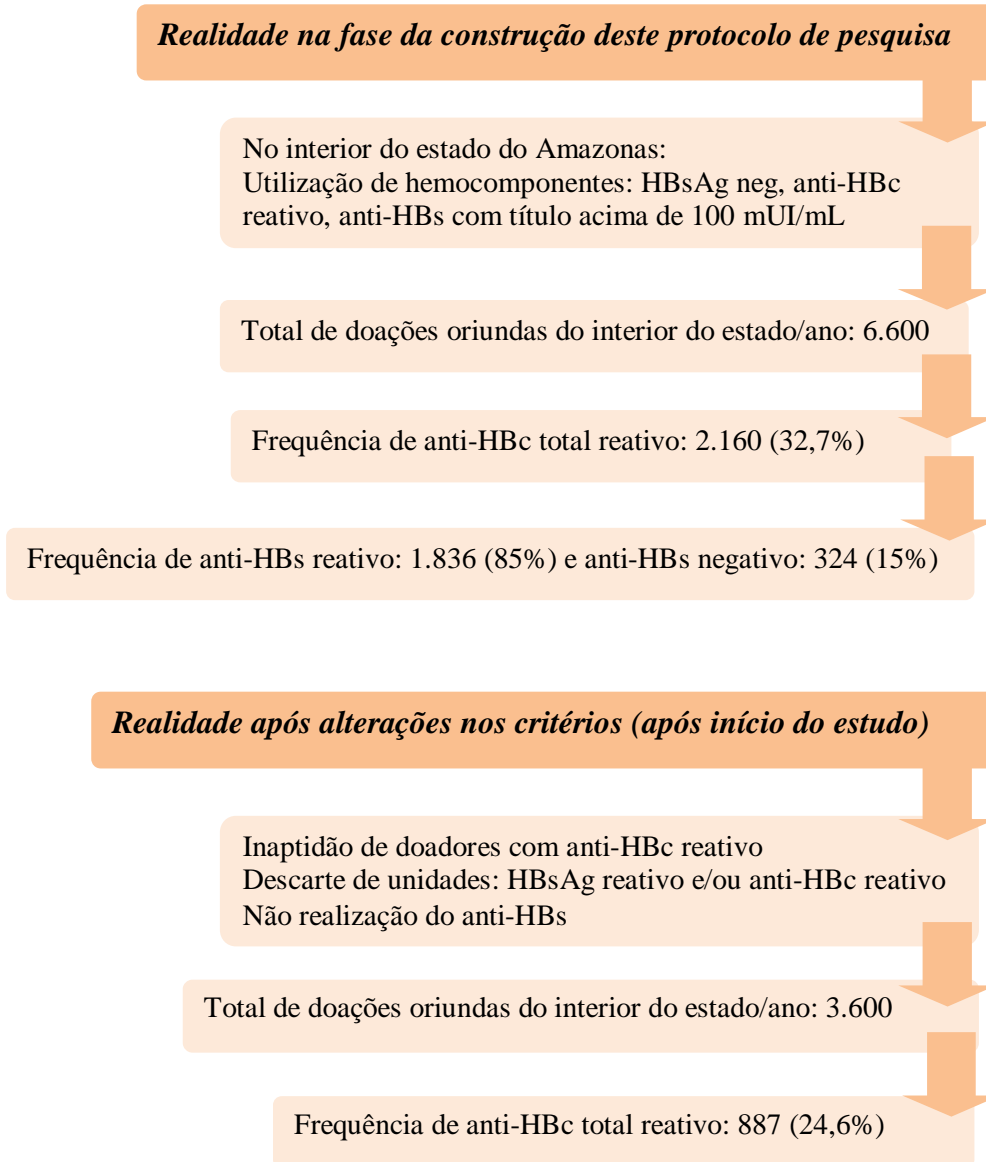


Figura 6. Esquema das mudanças de critérios e o impacto na frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B nas doações do interior do estado do Amazonas

No período do estudo o total de doações recebidas pela Fundação HEMOAM de todo o interior do estado do Amazonas foi de 3.600. Destas, 887 (24,6%) apresentaram algum marcador sorológico para hepatite B, provocando o descarte dos hemocomponentes. A distribuição dos marcadores está demonstrada na **Tabela 6**.

Tabela 6. Frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B

Marcadores sorológicos para hepatite B	(n=887) <i>fi</i> %
HBsAg	6 (0,7%)
Anti-HBc reativo	851(95,9%)
anti-HBc com HBsAg reativo	30 (3,4%)
Total	887 (100%)

O total de 431 doações foram provenientes das regionais de saúde inseridas neste estudo. Deste universo, de acordo com os critérios de elegibilidade foram incluídas 179 (41,5%) amostras anti-HBc total positivas e HBsAg negativas, com ou sem anti-HBs. Destas, 128 (72%) correspondem ao grupo A e 51 (28%) do grupo B (**Tabela 7**).

Tabela 7. Distribuição da amostra entre os grupos de estudo

Grupos	Distribuição da amostra do estudo (n=179) <i>fi</i> %
Grupo A anti-HBs positivo (a-HBc+/HBsAg-)	128 (72%)
Grupo B anti-HBs negativo (a-HBc+/HBsAg-)	51 (28%)

Fatores de risco e dados demográficos

Em ambos os grupos a população masculina foi predominante, com 118 (92,2%) e 46 (90,2%), nos grupos A e B respectivamente. Quanto à idade, a média foi 43 anos no grupo A e 42 anos no grupo B. Em relação à procedência das amostras, notou-se que a maior parte das doações foi proveniente da regional de saúde Triângulo (**Tabela 8**).

Tabela 8. Distribuição das frequências dos perfis dos doadores de sangue de acordo com o gênero, idade e procedência provenientes das regionais de saúde estudadas e divisão dos grupos de estudo no período de junho de 2011 a junho de 2012.

Variáveis	GRUPOS		P*
	A	B	
	(anti-HBc+/anti-HBs+) (n=128) fi %	(anti-HBc+/anti-HBs-) (n=51) fi %	
Gênero			0.766
Masculino	118(92,2)	46(90,2)	
Feminino	10(7,8)	5(9,8)	
Idade			0.575**
Média (SD)= 0.56	43.7(9.5)	42.7(11.3)	
Procedência (Regionais de Saúde)			
Baixo Amazonas	10(7,8)	7(13,7)	
Entorno de Manaus	5(3,9)	4(7,8)	
Médio Amazonas	8(6,2)	3(5,9)	
Rio Negro e Solimões	13(10,2)	13(25,5)	
Triângulo	92(71,9)	24(47,1)	0.015

*Teste de Fisher ** Teste t de Student (Vienna, 2012)

Os doadores foram investigados em relação à presença de fatores de risco relacionados à infecção pelo VHB como: ser primodoador, trabalhar na área de saúde, apresentar relato de transfusão sanguínea, relato de hepatite na família, antecedentes de cirurgias, condição de imunização, presença de tatuagem e/ou piercing, hábito de compartilhar material perfuro cortante de uso pessoal e uso de bebidas alcoólicas. Não houve diferença estatística significativa dos fatores de risco para hepatite B entre os grupos estudados (**Tabela 9**).

Tabela 9. Distribuição das frequências dos fatores de risco para hepatite B nos doadores de sangue provenientes das regionais de saúde estudadas e divisão dos grupos de estudo no período de junho de 2011 a junho de 2012.

Variáveis	GRUPOS				P*
	A (anti-HBc+/anti-HBs+) (n=128)		B (anti-HBc+/anti-HBs-) (n=51)		
	<i>fi</i>	%	<i>fi</i>	%	
Primeira doação					0.795**
Não	86	(84,3)	29	(80,6)	
Sim	16	(15,7)	07	(19,4)	
Trabalha na área de saúde					0.854**
Não	79	(82,3)	29	(82,9)	
Sim	17	(17,7)	6	(17,1)	
Recebeu transfusão sanguínea					0.455
Não	101	(99)	35	(97,2)	
Não sabe	-		1	(8)	
Sim	1	(1)	-		
Teve hepatite					0.206
Não	98	(96,1)	32	(88,9)	
Sim	4	(3,9)	4	(11,1)	
Sua mãe já teve hepatite					0.355
Não	90	(88,2)	31	(86,1)	
Não sabe	12	(11,8)	4	(11,1)	
Sim	-		1	(2,8)	
Já fez alguma cirurgia na vida					1
Não	91	(89,2)	32	(88,9)	
Sim	11	(10,8)	1	(11,1)	
Imunizado contra VHB					0.753**
Não	26	(25,5)	7	(19,4)	
Não sabe	12	(11,8)	5	(13,9)	
Sim	64	(62,7)	24	(66,7)	
Tem tatuagem ou piercing					0.651
Não	98	(96,1)	34	(94,4)	
Sim	4	(3,9)	2	(5,6)	
Tem o hábito de compartilhar material pérfuro cortante de uso pessoal					1
Não	99	(97,1)	35	(97,2)	
Sim	3	(2,9)	1	(2,8)	
Faz uso de bebidas alcoólicas					0.302**
Não	56	(54,9)	24	(66,7)	
Sim	46	(45,1)	12	(33,3)	

*Teste de Fisher ** Teste Qui-quadrado (Vienna, 2012)

Prevalência do DNA-VHB

Entre as doações estudadas observou-se a presença do DNA-VHB em 04 amostras (4/179 – 2,2%), sendo 03 provenientes da regional Triângulo e 01 da regional Rio Negro e Solimões. A distribuição das doações positivas para DNA-VHB entre os grupos de estudo e da procedência está apresentada na **Tabela 10**.

Tabela 10. Prevalência do DNA-VHB nos candidatos à doação de sangue e distribuição quanto à procedência e grupos de estudo no período de junho de 2011 a junho de 2012.

Regionais de Saúde	DNA-VHB+		
	<i>fi</i> %		
	GRUPOS		
	HBsAg- anti-HBc total+	A (anti-HBc+/anti-HBs+) (n=128)	B (anti-HBc+/anti-HBs-) (n=51)
	<i>fi</i> %	<i>fi</i> %	<i>fi</i> %
Baixo Amazonas	17 (9,63)		
Entorno de Manaus	09 (5,22)		
Médio Amazonas	11 (6,13)		
Rio Negro e Solimões	26 (14,65)	1 (3,8)	
Triângulo	116 (64,8)	2 (1,7)	1 (0,8)
Total	179 (100)	3 (2,3)	1 (1,9)

Associação do DNA-VHB com os títulos do anti-HBs

Quanto à associação da presença do DNA-VHB com os títulos do anti-HBs nas amostras reativas para este parâmetro, das 179 amostras que foram submetidas a PCR, 03 amostras apresentaram titulação do anti-HBs ≥ 100 mUI/mL e 1 apresentou titulação ≤ 100 mUI/mL. Os títulos estão demonstrados na **Tabela 11**. A ausência do marcador anti-HBs (≥ 100 mUI/mL) não está associada com a ocorrência da hepatite B oculta nas amostras anti-HBc total positivas e HBsAg negativas (**Tabela 11**).

Tabela 11. Associação entre a ausência do marcador anti-HBs com presença do DNA-VHB nos candidatos à doação de sangue das regionais de saúde estudadas com anti-HBc+ e HBsAg- no período de junho de 2011 a junho de 2012.

	PCR		Total	OR (IC 95%)	P*
	Positivo <i>fi</i> %	Negativo <i>fi</i> %			
anti-HBs mUI/mL				1,2 (0,094-64,221)	1
Grupo A \geq 100	3(2,3)	125(97,7)	128(100)		
Grupo B \leq 100	1(2)	50(100)	51(100)		

*Teste de *Fisher* (Vienna, 2012)

Descrição dos casos positivos para a presença do DNA-VHB

Todos os doadores eram do gênero masculino, a idade variou entre 33-51 anos, todos eram doadores de repetição, todos referiam ter relação conjugal estável, nenhum trabalha na área da saúde, não houve relato de transfusão de sangue, nem relato de hepatite B na família, nem relato de parceiros sexuais com hepatite B, assim como relato do uso de medicamentos injetáveis sem solicitação médica, nenhum antecedente de cirurgia. Dois doadores eram vacinados contra hepatite B. Nenhum dos doadores apresentou tatuagem e/ou piercing e não relataram hábito de compartilhar material perfuro cortante de uso pessoal, nem tratamento por acupuntura, assim como não descreveram promiscuidade sexual. Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas não houve relato de uso abusivo. Verificou-se uma variação nos títulos sorológicos para o marcador anti-HBs entre 281,53 - >1000 mUI/mL e a carga viral com uma variação de 3,5 - 29 cópias/mL (**Tabela 12**).

Tabela 12. Distribuição das frequências dos dados demográficos, clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos candidatos à doação de sangue do interior do estado do Amazonas, com amostras anti-HBc total positivas, HBsAg negativas e DNA-VHB reativos. No período de junho de 2011 a junho de 2012.

Variáveis	DOADORES DNA-VHB+			
	Grupo A (anti-HBc+/anti-HBs+) (n=128)			Grupo B (anti-HBc+/anti-HBs-) (n=51)
	1	2	3	4
	Manacapuru	Fonte Boa	Tefé	Fonte Boa
Município	Manacapuru	Fonte Boa	Tefé	Fonte Boa
Gênero	M*	M	M	M
Idade	41	33	51	36
Primeira doação	Não	Não	Não	Não
Estado civil	Casado	Casado	Casado	Mora com alguém
Trabalha na área de saúde	Não	Não	Não	Não
Recebeu transfusão sanguínea	Não	Não	Não	Não
Teve hepatite	Não	Não	Não	Não
Mora com alguém que teve hepatite	Não	Não	Não	Não
Parceiro(a) teve hepatite	Não	Não	Não	Não
Mãe teve hepatite	Não	Não	Não Sabe	Não
Usa medicamentos injetáveis sem prescrição médica	Não	Não	Não	Não Sabe
Fez cirurgia	Não	Não	Não	Não
Vacinado	Não	Não	Sim	Sim
Tem tatuagem ou piercing	Não	Não	Não	Não
Compartilha material perfuro cortante	Não	Não	Não	Não
Fez acupuntura	Não	Não	Não	Não
Nos últimos 12 meses quantos parceiros sexuais	2	1	1	0
Faz uso de bebidas alcoólicas	Não	Sim	Sim	Sim
Quantas doses de bebida	-	>3	>3	>3
anti-HBc total reativo (S/CO)	0,059**	8,87†	5,480†	10,99†
anti-HBs mUI/mL	>1000	608,79	281,53	0,05
DNA-VHB: UI/mL	4,5	3,5	29,0	3,6

*M, masculino; **ELISA; † Quimioluminescência

7. DISCUSSÃO

Além de uma triagem clínica de qualidade, o algoritmo de testes mais utilizado para tentar impedir a transmissão transfusional do vírus B tem sido a detecção do HBsAg e anti-HBc total, seguido da detecção do DNA-VHB pelos testes NAT (Candotti & Allain, 2009; Allain & Candotti, 2011; Niederhauser, 2011). No Brasil o teste NAT para VHB não está implantado sendo utilizado apenas em alguns bancos de sangue privados (Wendel *et al.*, 2008). No estado do Amazonas, por se tratar de uma região de alta prevalência para infecção pelo VHB, o algoritmo brasileiro traz inquietações no sentido da necessidade de repensar o impacto do mesmo na qualidade do produto e na manutenção do estoque de sangue em áreas aonde o descarte de unidades por anti-HBc reativo chega a 64%.

Este estudo mostrou que no interior do estado do Amazonas a prevalência do marcador sorológico anti-HBc total variou entre 5 – 64%, nas regionais estudadas. No município de Fonte Boa na regional de saúde Triângulo a prevalência foi de 35,6%. Esse resultado coincide com outros estudos no interior do estado. Braga *et al.*, (2012) realizaram um estudo de soroprevalência na população de uma área rural no município de Lábrea, Amazonas/Brasil e observaram que a metade dos indivíduos investigados (52,1%) apresentou reatividade para o anti-HBc total.

Este perfil epidemiológico provoca um impacto importante na manutenção do estoque fazendo com que unidades sejam desprezadas e provocando a necessidade de envio de hemocomponentes da capital (Manaus) para os municípios do interior. Esta conduta é dificultada tendo em vista a complexa e custosa logística de transporte no Estado devido principalmente ao desafio geográfico.

O índice de anti-HBc total reativo entre os doadores de sangue no interior do estado do Amazonas é alto quando comparado com outras regiões do país onde a prevalência da hepatite B é considerada moderada. Dados de um estudo multicêntrico em hemocentros mostram uma prevalência de 2,8% em São Paulo, 3,4% em Belo Horizonte e 4,7% em Recife (Almeida-Neto *et al.*, 2012). Estes dados demonstram claramente o quanto são diferentes e peculiares as características epidemiológicas da infecção no estado do Amazonas quando comparado com o restante do país, devendo provocar discussões quanto à qualidade hemoterápica na região considerando as especificidades regionais.

Os resultados aqui apresentados, no entanto, não diferem de outros estudos em países de alta prevalência para hepatite B. Na Índia, entre 729 amostras testadas 220 (30,1%) eram anti-HBc reativos e HBsAg negativos (Panigrahi *et al.*, 2010). Na Indonésia de 309/134 (43,4%) eram anti-HBc reativos e HBsAg negativos (Thedja *et al.*, 2010). As possíveis explicações para este perfil sorológico são: i) reações sorológicas falso-positivas: são mais frequentes nas regiões com baixa prevalência da infecção pelo VHB e devem ser suspeitadas quando ocorrem em títulos baixos nas reações imunoenzimáticas; ii) período da janela imunológica: observada nas infecções agudas em resolução ou evolução, quando o HBsAg já se negativou e o anti-HBs ainda não é detectado; iii) expressão de imunidade tardia: quando os níveis do anti-HBs decaem abaixo do limite de detecção dos testes e o anti-HBc permanece positivo, provavelmente em razão da maior imunogenicidade do HBcAg; iv) infecção crônica, onde a positividade do anti-HBc pode ocorrer concomitantemente com uma baixa carga viral do VHB, e o HBsAg não é detectado pelos métodos sorológicos habituais, passando a ser IOB (Candotti & Allain, 2009; Niederhauser, 2011).

Estudos demonstram que a presença do marcador anti-HBs em altos títulos (acima de 100 mUI/mL) é indicativo de imunidade adquirida conferindo a possibilidade do uso dos hemocomponentes em terapia transfusional (Sato *et al.*, 2008; Kupski *et al.*, 2008). Esse procedimento é controverso, pois nem sempre a presença do anti-HBs é indicativo da ausência do DNA-VHB (Silva *et al.*, 2005; Thedja *et al.*, 2010; Launay *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2012; Tani *et al.*, 2012). Em região com endemicidade similar a da região Amazônica foi descrito que o DNA do vírus da hepatite B pode estar presente em amostras de doadores de sangue com anti-HBc reativo que possuem positividade para o anti-HBs com uma prevalência de 1,5% e em doadores com anti-HBs negativo com uma prevalência de 5% (Bhatti *et al.*, 2007).

Alguns estudos buscam explicar a relação entre os títulos do anti-HBs com os níveis de DNA-VHB. Em humanos a transmissão do VHB tem sido relatada a partir de doadores no período da janela de pré-oroconversão com carga viral do DNA-VHB inferior a 20 UI/mL (Satake *et al.*, 2007). No entanto, alguns casos de doadores no período da janela imunológica com IOB não são infecciosos mesmo com a carga viral variando entre < 20 e 500 UI/mL (Candotti & Allain, 2009). Uma pesquisa analisando a amostra de um doador com 50 doações na Itália, não imunizado contra o VHB, sem história de fatores de risco para infecção, com HBsAg negativo, anti-HBc reativo e anti-HBs positivo (31.0 U/L) foi positivo para o DNA-VHB com carga viral de 60

UI/mL (Capezzuto *et al.*, 2010). A real taxa de infectividade da IOB ainda é desconhecida, por isso todas as doações contendo DNA-VHB são consideradas infecciosas. Dados recentes sugerem que a capacidade de neutralização do anti-HBs pode ser ineficiente quando expostos a altas cargas virais do VHB (Satake *et al.*, 2007). A relação entre a infecção do VHB com a carga viral pode estar relacionada a diversos fatores, como: fatores imunes no doador; fase da infecção, o volume de hemocomponentes e hemoderivados transfundido para o receptor, e a presença de anticorpos neutralizantes contra o VHB (Satake *et al.*, 2007). Em nosso estudo não encontramos relação entre os títulos de anti-HBs com a carga viral do VHB.

Apesar do cenário epidemiológico local, não havia relatos de casos de hepatite B oculta em doadores de sangue no estado do Amazonas. Neste estudo pioneiro são apresentados 4 casos de presença de DNA-VHB entre os 179 doadores de sangue oriundos do interior do estado do Amazonas que não apresentaram reatividade para o marcador HBsAg mas que apresentaram reatividade para o marcador anti-HBc. Entre estes, 03 doadores apresentaram anti-HBs positivos com títulos acima de 100 mUI/mL. Este dado representa a ocorrência de 2,2% de hepatite B oculta entre doadores de sangue no interior do estado do Amazonas.

A prevalência de IOB encontrada neste estudo está abaixo do que é observada em outras regiões onde a hepatite B é endêmica. Em Ganjam/Índia a prevalência descrita de IOB é de 30% (Panigrahi *et al.*, 2012) e na Indonésia é de 8,1% (Thedja *et al.*, 2010). O índice encontrado no estado do Amazonas se assemelha com índices encontrados em regiões de média prevalência como no Sul do Brasil onde a frequência da IOB é de 3,3% (Silva *et al.*, 2005). No Nordeste do Brasil foi achado 2,7% de IOB (Arraes *et al.*, 2003) entre doadores de sangue. E se aproxima de índices de países de baixa prevalência como na Itália onde foi descrito ser de 4,8% (Manzini *et al.*, 2007).

De qualquer forma a ocorrência de casos de IOB entre doadores de sangue evidencia a possibilidade do risco de transmissão transfusional do VHB, quando os doadores de sangue apresentam-se assintomáticos e com HBsAg negativo durante o período da janela imunológica. A infectividade de hemoderivados de casos de IOB é muito discutida. Estudos tem relatado a detecção do DNA-VHB no sangue de doadores HBsAg negativos com anti-HBc total reativos como responsáveis pela transmissão da hepatite B por transfusão de sangue. Um estudo no Japão analisou 685.844 doações de repetição, destas 265 eram sorologia e mini pool NAT (MP-NAT) positivas para VHB. Das 265/13 eram NAT individual positivos (ID-NAT). Apenas 1 receptor foi

identificado como caso de transmissão da hepatite B por transfusão de sangue, mostrando uma frequência de aproximadamente 1/53.000 doações neste país. O Ministério da Saúde/Japão recomenda fazer o ID-NAT nos receptores de hemoderivados após 3 meses da transfusão, porém neste estudo foi observado um período de janela imunológica por mais de 161 dias. O aparecimento tardio do VHB pode ser explicado por dois factores: (i) quantidade muito baixa de cópias do VHB no sangue transfundido e (ii) condição imunossupressora do receptor. Por conseguinte, é necessário estabelecer um sistema mais cauteloso de acompanhamento pós-transfusão de sangue (Bouike, *et al.*, 2010).

No Brasil foram descritos dois pacientes imunodeficientes com câncer que receberam transfusão a partir de um único doador com sorologia anti-HBc e HBsAg negativos. Um paciente desenvolveu hepatite B aguda após 13 meses da transfusão e o outro paciente morreu após 6 meses sem apresentar qualquer marcador para infecção do VHB (Wendel *et al.*, 2008). Outro relato de caso envolvendo um paciente com a doença de Crohn, severamente imunossuprimido - no momento da transfusão, desenvolveu infecção aguda pelo VHB após 20 semanas, a partir de cinco doadores diferentes com HBsAg e DNA-VHB negativos, a especulação mais relevante para esse caso é a reativação da IOB soronegativa (Leung, 2010; Purnak & Ozaslan, 2010). Similarmente na Eslovénia, quatro meses após uma transfusão de sangue, duas pacientes desenvolveram hepatite B aguda. A primeira com 59 anos durante uma cirurgia de revascularização arterial, e a segunda de 71 anos após receber concentrado de glóbulos vermelhos (Levicnik-Stežinar *et al.*, 2008).

Neste estudo foi observada a maior frequência de doadores do sexo masculino (90%) evidenciando a pouca participação do sexo feminino (10%), as quais se deparam com situações em que a mulher não pode doar, como: durante a gravidez, a amamentação, três meses do pós-parto, anemia, o medo e até mesmo a falta de informação. No entanto, não foi observada significância estatística entre os grupos, o que retrata uma característica peculiar do interior do Amazonas. Devido à baixa incidência demográfica dos municípios estudados se faz necessária a busca ativa de doadores de repetição, tornando-os doadores fidelizados. Em Manaus devido às campanhas específicas realizadas pelo hemocentro, esse quadro vem sofrendo alterações positivas e o número de doadores vem aumentando cada vez mais inclusive do sexo feminino. Na capital, 77% dos doadores são masculinos e 23% são do sexo feminino (FHMOAM, 2011). Dados similares aos de Manaus foram encontrados nos hemocentros no Paraná/Brasil com (61%)

masculino e (39%) feminino (Ramos & Ferraz, 2010) e região Norte/Itália (58,3%) masculino e (41,7%) feminino (Manzini *et al.*, 2007).

Observou-se neste estudo que entre os doadores que foram positivos para o DNA-VHB, dois eram imunizados contra o vírus da hepatite B e não houve relato de exposição aos fatores clássicos de risco para a infecção. Sabe-se que a vacina contra a hepatite B é eficaz, faz parte do Programa Nacional de Imunização do país e deve ser seguido rigorosamente. De acordo com o Ministério da Saúde três doses de vacina contra hepatite B induzem títulos protetores de anticorpos (anti-HBs ≥ 10 UI/mL) em mais de 90% dos adultos e jovens saudáveis, e em mais de 95% dos lactentes, crianças e adolescentes. A eficácia da vacina diminui com a idade e é menor em maiores de 40 anos. Outros fatores, tais como tabagismo, obesidade e fatores genéticos ligados a determinados haplotipos de HLA estão associados à resposta inadequada à vacinação contra infecção pelo vírus B (MS, 2009; Gerlich *et al.*, 2010). Um estudo realizado na comunidade de Criciúma/Santa Catarina investigou a titulação do anti-HBs em crianças com idade média de 11,4 anos após 10 anos de vacina. Das 405/222 (54,8%) apresentaram níveis protetores de anti-HBs (anti-HBs ≥ 10 UI/mL). Das 405/18 (4,4%) foram anti-HBc total reativos com uma média de títulos de anti-HBs de 218,4 mUI/mL. Todas as crianças reativas para o anti-HBc foram HBsAg negativas, excluindo uma infecção crônica pelo VHB (Fagundes *et al.*, 2012).

Estima-se que 5% a 10% de adultos saudáveis e imunocompetentes, que recebem a vacina contra VHB, não produzem uma resposta imunológica satisfatória (Gerlich *et al.*, 2010). No entanto, sabe-se que os fenótipos humano de antígenos leucocitários específicos são considerados os mais importantes marcadores genéticos para os não respondedores (Leonardi *et al.*, 2009). A diminuição dos níveis de anti-HBs após a vacinação são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de infecções e cronicidade da hepatite B, especialmente em adolescentes que estão constantemente expostos ao VHB (Fagundes *et al.*, 2012).

No município de Lábrea/Amazonas após de 19 anos de vacinação, foi encontrado uma prevalência do anti-HBc de 19,8% em crianças com idade entre 5 e 9 anos, e 38,9% entre os adolescentes com faixa etária entre 10 e 14 anos. Esses dados demonstram a forte circulação do VHB nesta região evidenciando uma transmissão de forma vertical, horizontal e sexual (Braga *et al.*, 2012).

A realização de estudos retrospectivos de investigação de transmissão transfusional de hepatite B são extremamente interessantes em regiões como no estado do Amazonas. No entanto,

estudos como esse apresentam dificuldades para serem realizados pela ausência da informação do perfil sorológico pré-transfusional. A realidade do processo de transmissão da hepatite B no estado do Amazonas deve ter sofrido influência direta dos critérios utilizados nos últimos anos na triagem de doadores de sangue do interior do estado no qual eram utilizadas unidades HBsAg negativas, anti-HBc reativas e com presença do marcador anti-HBs em títulos maiores do que 100 mUI/mL. Assim sendo o desenvolvimento de estudos de “look back” devem ser desenhados para trazer para discussão o impacto dos critérios de triagem de doadores de sangue em áreas de alta endemicidade para hepatite B (Bouike *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011).

A implementação da detecção do DNA-VHB através das técnicas de detecção de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) tem sido um potencial mecanismo para reduzir significativamente a transmissão da infecção no período da janela imunológica e revelar IOB, diminuindo o risco de uma hepatite B pós-transfusional (Roth *et al.*, 2012).

A infecção oculta pelo vírus B continua sendo motivo de preocupação na segurança transfusional, sendo hoje o maior risco de infecção pós-transfusional pelo VHB em países onde o NAT para VHB na triagem de doadores de sangue não foi implantado (Silva *et al.*, 2005; Wendel *et al.*, 2008; Thedja *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2012). Na Amazônia brasileira a ocorrência de IOB entre os doadores de sangue assintomáticos abre uma nova janela para a análise da história natural da infecção, das dinâmicas de replicação viral e da interação do sistema imune com o hospedeiro na região. Abre também espaço para discussão das melhores estratégias a serem utilizadas no presente e no futuro na triagem de doadores de sangue em regiões de alta prevalência e de perfil de transmissão peculiar como o caso da Amazônia. Atualmente, tanto os testes de triagem sorológica, quanto o teste NAT precisam ser redesenhados no intuito de aprimorar as estratégias de controle da transmissão transfusional buscando um algoritmo balanceado entre a rejeição de doadores potenciais, descarte de unidades, razões econômicas e segurança desejada.

8. CONCLUSÕES

A prevalência de Hepatite B oculta entre os doadores de sangue das regionais de saúde do Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo do Estado do Amazonas foi de 2,2%.

Entre os 4 doadores de sangue com presença do DNA-VHB 3 apresentaram titulação do anti-HBs acima de 100 mUI/mL, não havendo correlação entre a presença do DNA-VHB e a titulação do anti-HBs.

Não houve correlação entre os títulos dos marcadores anti-HBs e anti-HBc com a carga viral encontrada.

A maior frequência dos doadores foi do sexo masculino com 90% em ambos os grupos de estudo. Não houve relato de exposição aos fatores clássicos de risco para a infecção entre os doadores com presença do DNA-VHB.

A descrição da ocorrência de IOB no Estado do Amazonas abre uma nova janela para a análise da história natural da infecção, das dinâmicas de replicação viral e da interação do sistema imune com o hospedeiro na região. Desta forma será possível enriquecer a compreensão das interações com a genética e a imunidade do hospedeiro Amazônico.

A evidência da presença de IOB entre os doadores de sangue do interior do Estado do Amazonas abre também espaço para discussão das melhores estratégias a serem utilizadas no presente e no futuro na triagem de doadores de sangue em regiões de alta prevalência e de perfil de transmissão peculiar como o caso da Amazônia. Atualmente, tanto os testes de triagem sorológica, quanto o teste NAT precisam ser redesenhados no intuito de aprimorar as estratégias de controle da transmissão transfusional buscando um algoritmo balanceado entre a rejeição de doadores potenciais, descarte de unidades, razões econômicas e segurança desejada.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estado do Amazonas uma vez considerado de alto risco para hepatite B apresentando epidemiologia diferenciada do restante Brasil necessita de mais estudos entre a população de doadores de sangue para melhor desvendar o curso da infecção oculta pelo VHB. Este estudo aponta as dificuldades do banco de sangue quanto ao número de descartes de bolsas seguindo a RDC 2010 e aponta também uma fragilidade quando o banco de sangue usava hemocomponentes com sorologia positiva para o anti-HBc e anti-HBs em altos títulos (≥ 100 mUI/mL). Uma das alternativas que poderia ser pensada é a utilização de hemocomponentes anti-HBc positivos com NAT negativo para os doadores do interior do estado do Amazonas, diminuindo o número elevado de descartes devido à positividade do marcador anti-HBc.

REFERÊNCIAS

- Adrian, C.; Sally, M.; Antonio, O.; Marc, de R.; Geert, L-R. Hepatitis B vaccine effectiveness in the face of global HBV genotype diversity. **Expert Rev. Vaccines**. 2011; 10 (12): 1709-1715.
- Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**. 2006; 124: 783-801.
- Alexander, G.J.M. Immunology of hepatitis B virus infection. **Brit. Med. Bull.** 1990; 46: 354-367.
- Allain J.P. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. **Vox Sanguinis**. 2004; 86: 83-91.
- Allain, J.P. & Candotti, D. Hepatitis B in transfusion medicine: still a problem? **J. Biologicals**. 2011: 1-7.
- Almeida, J.D.; Rubenstein, D.; Stott, E.J. New antigen-antibody system in Australia-antigen positive hepatitis. **Lancet**. 1971; 2: 1224-1227.
- Almeida-Neto, C.de; Strauss, E; Sabino, E.C.; Sucupira, M.C.A.; Chamone, D.A.F. Significance of isolated hepatitis B core antibody in blood donors from São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop**. 2008; 43(4): 203-208.
- Almeida-Neto, C.; Sabino, E.C.; Liu, J.; Blayta, P.F.; Medrone-Junior, A.; Salles, N.A.; Leão, S.C.; Writht, D.J.; Basques, F.V.; Ferreira, J.E.; Bush, M.P.; Murphy, E.L. Prevalence of serologic markers for hepatitis B and C viruses in Brazilian blood donors and incidence and residual risk of transfusion transmission of hepatitis C virus. **Transfusion**. 2012. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03840.x.
- Alter, H.J. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. **J. of Hepatology**. 2003; 39: 149-152.
- Alvarado-Mora, M.V.; Botelho, L.; Gomes-Gouvea, M.S.; Souza, V.F.; Nascimento, M.C.; Pannuti, C.S *et al.* Detection of hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil. **Virology Journal**. 2011; 8: 415.
- Antar, W.; M. H. El-Shokry; W. A. Abd E; Hamid; M. F. Helmy. Significance of detecting anti-HBc among Egyptian male blood donors negative for HBsAg. **Transfusion Medicine**. 2010; doi: 10.1111/j.1365-3148.2010.01021.x
- Arraes,L.C.; Ximenes,R.; Andrieu, J.; Wei-Lu, Barreto, S.; Pereira, L.M.M.B.; Castelo, A. The biological meaning of anti-HBc positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. **Rev. Inst. Med. Trop**. 2003; 45(3):137-140.

Behzad-Behbahani, A.; Mafi-Nejad, S.Z.; Tabei, K.B.; Lankarani, A. Torab; Moadddeb, A. Anti-HBc & HBV-DNA detection in blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen in reducing risk of transfusion associated HBV infection. **Indian J Med Res.** 2006; 37-42.

Bensabath, G. & Boshell J. Presence of Australian (Au) antigen in population groups of the interior of the State of Amazonas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** 1973; 15: 284-288.

Bensabath, G. & Leão, R.N.Q. Prevalência na Amazônia Brasileira. *In*: Focaccia R (Ed) Tratado de Hepatites Virais, 2ª. edição, **Atheneu**, São Paulo. 2007, p11-26.

Bertoletti, A.; Gerhring, A. The immune response during hepatitis B virus infection. **J. of General Virology.** 2006; 87: 1439-1449.

Bhatti, F.A.; Ullah, Z.; Salamat, N.; Ayub, M.; Ghani, E. Anti-Hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. **Transfusion.** 2007; 47: 74-79.

Blumberg B.S. Hepatitis B: The hunt for a killer virus. Princeton University Press, **New Jersey.** 2003.

Blumberg B.S.; Alter H.J.; Visnich A. A “new” antigen in leukemia sera. **JAMA.** 1965; 191: 541-546.

Blumberg B.S.; Gerystley B.J.S.; Hungerford D.A.; London W.T.; Sutnick A.I. A serum antigen (Australia antigen) in Down’s syndrome, leukemia and hepatitis. **Ann. Int. Med.** 1967; 66: 924-931.

Bouike, Y.; Imoto, S.; Mabuchi, O.; Kokubunji, S.; Kai, S.; Okada, M.; Taniguchi, R.; Momose, S.; Uchida, S.; Nishio, H. Infectivity of HBV DNA positive donations identified in look-back studies in Hyogo-Prefecture, Japan. **Transfusion Medicine.** 2010. doi 10.1111/j.1365-3148.2010.01057.x

Buschra, L.; Ahmad, W.; Javed, F.T.; Gull, S.; Hassan, S. Revised cutoff values of ALT and HBV DNA level can better differentiate HBeAg (-) chronic inactive HBV patients from active carriers. **Virology Journal.** 2011; 8: 86.

Braga, W.S.M.; Silva, E.B.; Souza, R.A.B.; Tosta, C.E. Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e pelo plasmódio em Lábrea, Amazonas: estimativa da ocorrência de prováveis coinfeções. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2005; 38 (3): 218-223.

Braga, W.S.M; Castilho, M.C; Borges, F.G; Martinho, A.C.S; Rodrigues, I.S; Azevedo, E.P; Scazufca, M. and Menezes, P.R. Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2012; 45 (1): 13-17.

Brasil, L.M.; Fonseca, J.C.F; Souza R.B.; Braga, W.S.M., Toledo, L.M. Prevalência de marcadores para o vírus da hepatite B em contatos domiciliares no Estado do Amazonas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2003; 36 (5): 565-570.

- Candotti, D.; Allain, J.P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. **J. of Hepatology**. 2009; 51: 798–809.
- Capezzuto, C., Franchi, E., Urbani, S., Romano, L. Franchini, M. Occult hepatitis B in blood donors: a description of two cases. **Blood Transfusion**. 2010, 8: 297-303.
- Castilho, M.C.; Oliveira, C.M.C.; Gimaque, J.B.L.; Leão, J.D.T.; Braga, W.S.M. Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus infection in isolated villages in the western Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2012; 87 (4): 767-773.
- CDC. Center Disease Central. Epi Info™ statistical software, version 3.3.2, CDC, Atlanta GA, 2005.
- CDC. Center Disease Central. Recommendations and Reports. Prevention and control of Infections with hepatitis virus in correctional settings. Morbidity and Mortality. **Weekly Report**. 2003.
- Chen Y.C.; Jeng, W.J.; Chu, C.M. and Liaw, Y.F. Decreasing levels of HBsAg predict HBsAg seroclearance in patients with inactive chronic hepatitis B virus infection. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. 2012; 10: 297-302.
- Chemin I. & Trepó C. Clinical impact of occult HBV infections. **J. of Clinical Virology**. 2005, 34 (suppl. I): S15-S21.
- Chin-Lin, L. & Jia-Horng, K. The clinical implications of hepatitis B virus: genotype: recent advances. **J. Gastroenterology and Hepatology**. 2011; 26 (1): 123-130.
- Chu, C.J. & Lok, A.S. Clinical utility in quantifying serum HBV-DNA levels using PCR assays. **J. of Hepatology**. 2002; 36: 549-551.
- Crispe, I.N. The liver as a lymphoid organ. **Annu. Rev. Immunol.** 2009; 27: 147-163.
- Dane, D.S.; Cameron C.H.; Briggs M. Virus-like particules in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. **Lancet**. 1970; 1: 695-698.
- Decker, R.H. Diagnostic. In: **Viral Hepatitis: Scientific Basis and Clinical Management**. 1993; 9: 165-184.
- Deneluz, A.C.; Oliveira, S.; Focaccia, R. Survey of hepatitis B and C infection control: procedures at manicure and pedicure facilities in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** 2010; 14(5): 502-507.
- Dény, P. & Zoulim, F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. **Pathologie Biologie**. 2010; 58 (4): 245-253.
- Dias, A.L.B.; Oliveira, C.M.C.; Castilho, M.C.; Silva, M.S.P.; Braga, W.S.M. Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the Wester Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2012; 45 (1): 9-12.

Ei Khouri, M.; Cordeiro, Q.; Luz, D.A.B.P et al. Endemic hepatitis B and C virus infect in a Brazilian eastern Amazon region. **Arq. Gastroenterol.** 2010; 47 (1): 35-41.

Fagundes, G.D.; Tabalipa, F.O.; Silva, J. Antibody levels in children after 10 years of vaccination against hepatitis B: a Brazilian community-based study. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2012; 45 (2): 260-262.

Ferreira, M.S. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2000; 33 (4): 389-400.

Ferreira, C.T. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Rev. Bras. Epidemiol.** 2004; 7 (4): 473-87.

FHEMOAM – Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Gerencia da Sorologia, 2010/2011.

FHEMOAM – Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Gerencia da Interiorização, 2012.

Focaccia R. Tratado de hepatites virais. 2^a ed. São Paulo: **Atheneu**, 2007. 2v.

Fonseca, J.C.F. História natural da hepatite B crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2007; 40 (6): 672-677.

Fonseca, J.C.F. Histórico das hepatites virais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2010; 43 (3): 322-330.

Gao, B.; Jeong, W.I.; Tian, Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. **Hepatology.** 2008; 47: 729-736.

Galy, O.; Chemin, I.; Roux, E.L.; Villar, S.; Calvez-Kelm, F.L.; Lereau, M. *et al.* Mutations in TP53 and CTNNB1 in relation to hepatitis B and C infections in hepatocellular carcinomas from Thailand. **Hepatitis Research and Treatment.** 2011, ID 697162.

García-Montalvo, B.M & Ventura-Zapata, L.P. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico. **Annals of hhepatology.** 2011; 10 (2): 133-141.

Garson, J.A.; Grant, P.R.; Ayliffe, U.; Ferns, R.B.; Tedder, R.S. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. **Journal of Virological Methods.** 2005; 126: 207–213.

Gaze, R.; Carvalho, D.M.; Tura, L.F.R. Informação de profissionais de saúde sobre transmissão transfusional de hepatites virais. **Rev. Saúde Pública.** 2006; 40 (5): 859-64.

Gerlich, W.H.; Bremer, C.; Saniewski, M.; Schuttler, C.G.; Wend, U.C.; Willems, W.R.; Glebe, D. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. **Immunology and Liver Disease**. 2010; 28: 116-125.

Giovanna, F.; Flavia B.; Fracesco, D. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. **J. of Hepatology**. 2008; 48: 335-352.

Gonçales, N.S.L & Gonçalves Jr, F.L. Perfil Sorológicos anômalos, genótipos e mutantes do VHB. The Brazilian Journal of infectious diseases. I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Diagnóstico e Manuseio da Hepatite B (e Delta). **An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**. 2006; 1-86.

Guirgis, B.S.S.; Abbas, R.O.; Azzazy, H.M.E. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. **International Journal of Infectious Diseases**. 2010; 14: (11) e941–e953.

Han, Q.; Zhang, C.; Zhang, J.; Tian, Z. Involvement of Activation of PKR in HBx-siRNA-Mediated Innate Immune effects on HBV inhibition. **PLoS ONE**. 2011; 6 (12): e27931. doi:10.1371/journal.pone.0027931.

Hatzakis, A.; Magiorkinis, E.; Haida C. HBV virological assessment. **J. of Hepatology**. 2006; 44: 71-76.

Hadziyannis, S.J. & Vassilopoulos, D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. **Hepatology**. 2001; 34: 617-624.

Hollinger, F.B. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. **Transfusion**. 2008; 48: 1001–1026.

Hollinger, F.B. & Dodd, R. Hepatitis B virus traceback and lookback: factors to consider. **Transfusion**. 2009; 49: 176-184.

Hornung, V.; Rothenfusser, S.; Britsch, S.; Krug, A.; Jahrsdorfer, B.; Giese, T.; Endres, S.; Hartmann, G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. **J. Immunol**. 2002; 168: 4531-4537.

Hunt, C.M.; McGill, J.M.; Allen, M.L.; Condey, L.D. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. **Hepatology**. 2000; 31: 1037-1044.

Hwang, E.W. & Cheung, R. Global epidemiology of hepatitis B virus (HBV) Infection. **North American J. of Med. and Science**. 2011; 4 (1): 7-13.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dados do Censo 2010 publicados no Diário Oficial da União. Acesso: 27/08/2012

Disponível em: http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/index.php

Jia-Horng, k.; Pei-Jer,C.; Ming-Yang, L.; Ding-Shinn,C. Occult Hepatitis B Virus Infection and Clinical Outcomes of Patients with Chronic Hepatitis C. **J. Clin. Microbiol.** 2002; 40 (11): 4068–4071.

Jia-Horng, Kao. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. **korean J Intern Med.** 2011; 26: 255-261.

Jilin Hou, Zhihua, L.; Gu, F. Epidmiology and prevention of hepatitis B vírus infection. **Int. J. Med. Sci.** 2005; 2 (1): 50-57.

Júnior, G.M.B.; Braga, W.S.M.; Oliveira, C.M.C. ET AL. Hepatite B crônica oculta: prevalência e aspectos em população de elevada endemicidade de infecção pelo vírus da hepatite B na Amazônia Ocidental Brasileira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2008; 41 (6): 596-601.

Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. **Nat. Immunol.** 2006; 7: 131-137.

Kumar, K.; Kumar, M.; Rahaman, Sk.H.; Singh, T.B.; Patel, S.K. and Nath, G. Distribution of hepatitis B virus genotypes among healthy boold donors in eastern part of North India. **Asian J. Transfus. Sci.** 2011; 5 (2): 144-149.

Kupski, C., Trasel, F.R., Mazzoleni, F., Winckler, M.A., Bender, A.L., Machado, D.C., Schmitt, V.M. Serologic and molecular profile of anti-HBc-positive blood bank donors in an area of low endemicity for HBV. **Dig Dis Sci.** 2008; 53: 1370-1374.

Laperche, S. & Pillonel, J. Influence os epidemiological factors on blood transfusion. **ISBT Science Series.** 2007; 2: 78-84.

Launay, O.; Masurel, J.; Servant-Delmas, A.; Basse-Guérineau, A.L. Méritet, J.F. Laperche, S. et al. High levels of serum hepatitis B virus DNA in patients with anti-HBc alone: role of HBsAg mutants. **Journal of Viral Hepatitis.** 2011; 18: 721-729.

Lavanchy, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **J. of viral Hepatitis.** 2004; (11): 97-107.

Lee, W.M.; Hepatitis B virus infection. **The New England Journal of Medicine.** 1997; 337: 1773-1745.

Leonardi, S.; Spina, M.; Spicuzza, L.; Rotolo, N.; Rosa, L.M. Hepatitis B vaccination failure in celiac disease: Is there a need to reasses current immunization strategies? **Vaccine.** 2009; 27: 6030-6033.

Leung, V.K.S. A probable case of transfusion-transmitted hepatitis B virus infection in an immunosupressed recipient caused by an occult HBV-infection donor with negative ID-NAT. **Transfusion Medicine.** 2010; 20: 276-277.

- Levicnik-Stezinar, S.; Rahne-Potokar, U.; Candotti, D.; Lelie, N.; Allain, J.P. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. **Journal of Hepatology**. 2008; 48: 1022-1025.
- Liu, C.J.; Gallo, D.J.; Green, A.M.; Williams, D.L.; Gong, X.; Shapiro, R.A.; Gambotto, A.A.; Humphris, E.L.; Vodovotz, Y.; Billiar, T.R. Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. **Infect. Immun**. 2002; 70: 3433-3442.
- Liu C.J., Lo S.C., Kao J.H., *et al.* Transmission of occult hepatitis B virus by transfusion to adult and pediatric recipients in Taiwan. **J. of Hepatology**. 2006, 44:39-46.
- Lok ASE. Occult hepatitis B virus infection: diagnosis, implication and management. **J. Gastroenterology Hepatology**. 2004, 19: S114-S117.
- Lopes, M.H. The Brazilian Journal of infectious diseases. I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Diagnóstico e Manuseio da Hepatite B (e Delta). **An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**. 2006; 1-86.
- Magnius, L.O.& Espmark, A. A new antigen complex occurring with Australia antigen. **Acta Path Microbiol. Scand**. 1972; 80: 335.
- Malika, A.G.; Lucifora, J.; Zoulim, F.; Durantel, D. Innate antiviral immune response to hepatitis B virus. **Viruses**. 2010; 2: 1394-1410.
- Malta, M.; Cardoso, L.O.; Bastos, F.I.; Ferreira, M.M.; Silva, C.M.F.P. Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais. **Rev. Saúde Pública**. 2010; 44 (3): 559-65.
- Manzano-Alonso, M. L. & Castellano-Tortajada, G. Reactivation of hepatitis B virus infection after cytotoxic chemotherapy or immunosuppressive therapy. **World J Gastroenterol**. 2011; 17 (12): 1531-1537.
- Manzini, P.; Gitotto, M.; Borsotti, R.; Giachino, O. et al. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. **Hematology Journal**. 2007; 92 (12): 1664-1670.
- Martinon, F.; Mayor, A.; Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu. Rev. Immunol**. 2009; 27: 229-265.
- Masoomeh Sofian, Arezoo Aghakhani, Nabiallah Izadi, Mohammad Banifazl, Ebrahim Kalantar, Ali Eslamifar & Amitis Ramezani. Lack of occult hepatitis B virus infection among blood donors with isolated hepatitis B core antibody living in an HBV low prevalence region of Iran. **International Journal of Infectious Diseases**. 2010; 14: 308–310.
- Mello, F.C.A.; Souto, F.J.D.; Nabuco, L.C.; Villela-Nogueira, C.A. *et al.* Hepatitis b virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **MMC Microbiology**. 2007; 7:1471-2180.

Ministério da Saúde. Programa Nacional de Hepatites Virais. Avaliação da assistência às hepatites virais no Brasil. (Brasil) Brasília: **Ministério da Saúde**. 2002; 1-61.

Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites virais: o Brasil está atento. (Brasil) Brasília: **Ministério da Saúde**. 2008.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Co-infecções. (Brasil) Brasília: **Ministério da Saúde**. 2009.

Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC nº 57, de 16 de Dezembro de 2010. Determina o regulamento sanitário para serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. (Brasil) Brasília: **ANVISA**. 2010

Moreira, R.C.; Saracehi, C.P.; Oba, I.T.; Spina, A.M.M.; Pinho, J.R.R.; Souza, L.T.M de *et al.* Soroprevalência da hepatite B e avaliação da resposta imunológica à vacinação contra a hepatite B por via intramuscular e intradérmica em profissionais de um laboratório de saúde pública. **J Bras Patol Med Lab**. 2007; 43 (5): 313-318.

Mosley J.W., Stevens C.E., Aach R.D., *et al.* Donor screening for antibodies to hepatitis B core antigen and hepatitis H virus infection in transfusion recipients. **Transfusion**. 1995, 35: 5-12.

Nascimento, M.C.; Mayaud, P.; Sabino, E.C.; Torres, K.L.; and Franceschi, S. Prevalence of hepatitis B and C serological markers among first-time blood donors in Brazil: A Multi-Center Serosurvey. **Journal of Medical Virology**. 2008; 80: 53–57.

Niederhauser, C. Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. **Journal of Blood Medicine**. 2011; 2: 91-102.

Nishimura, M. & Naito, S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. **Drug. Metab. Pharmacokinet**. 2005; 20: 452-477.

Novais, C.M. & Pires-Alves, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 2004, Edição 33.

O'Brien, S.F. Fearon, M.A., Yi, Q., Fan, W., Scalia, V., Muntz, I.R., Vamvakas, E.C. Hepatitis B virus SNA-positive, hepatitis B surface antigen-negative blood donations intercepted by anti-hepatitis B core antigen testing: the Canadian blood service experience. **Transfusion**. 2007; 47:1809-1815.

Ocana, S., Casas, M.L., Buhigas, I., Lledo, J.L. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. *World J. of Gastroenterology*. 2011, 17 (12): 1553-1557.

Ojaniemi, M.; Liljeroos, M.; Harju, K.; Sormunen, R.; Vuolteenaho, R.; Hallman, M. TLR-2 is upregulated and mobilized to the hepatocyte plasma membrane in the space of Disse and to the Kupffer cells TLR-4 dependently during acute endotoxemia in mice. **Immunol. Lett.** 2006; 102: 158-168.

Paik, Y.H.; Schwabe, R.F.; Bataller, R.; Russo, M.P.; Jobin, C.; Brenner, D.A. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. **Hepatology.** 2003; 37: 1043-1055.

Panigrahi, R., Biswas, A., Datta, S., Banerjee, A., Chandra, P.K., Mahapatra, P.K., *et al.* Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for Transfusion. **Virology Journal.** 2010, 7: 204.

Paula, S.S.; Arruda, M.E.; Vitral, C.L.; Gaspar, A.M.C. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the western region of the Brazilian Amazon Basin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2001; 96 (8): 1123-1128.

Pereira LMMB, Ximenes RAA, Moreira RC, Braga MC, Montarroyos UR. Estudo de Prevalência de Base Populacional das Infecções pelos vírus das Hepatites A, B e C nas Capitais do Brasil. **Ministério da Saúde.** 2010 Acesso: 06/11/2012 Disponível em: http://www.aids.gov.br/publicacao/2010/estudo_de_prevalencia_de_base_populacional_das_infecoes_pelos_virus_das_hepatites_b

Phung, T.B.; Alestig, E.; Nguyen, T.L.; Hannoun, C.; Lindh, M. Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam: genotypes B4 and C1 predominate **J. Med. Virol.** 2010; 82: 1327-1333.

Pinarbasi B, Onel D, Cosan F, Akyuz F, Dirlik N, Cakaloglu Y, *et al.* Prevalence and virological features of occult hepatitis B virus infection in female sex workers who work uncontrolled in Turkey. **Liver Int.** 2009; 29: 227–30.

Prince A.M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 1968; 60:814-819.

Puot,i M.; Torti, C.; Bruno, R.; Felice, G.; Carosi, G. Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. **J. of Hepatology.** 2006, 44: S65-S70.

Purnak, T. & Ozaslan, E. Is it a case transfusion-transmitted acute HBV or reactivation of occult hepatitis B virus infection? **Transfusion Medicine.** 2010; 20: 275.

Raffa G, Maimone S, Cargnel A, Santantonio T, Antonucci G, Massari M, *et al.* Analysis of occult hepatitis B virus infection in liver tissue of HIV patients with chronic hepatitis C. **AIDS** 2007; 21: 2171–5.

Ramos, V.F & Ferraz, F.N. Perfil epidemiológico dos doadores de sangue do hemonúcleo de Campo do Mourão-PR no ano de 2008. **Rev. Saúde e Biol.** 2010; 5 (2): 14-21.

Raimondo, G.; Pollicino, T.; Cacciola, I.; Squadrito, G. Occult hepatitis B virus infection. **J. of Hepatology.** 2007, 46: 160-170.

Randall, R.E. & Goodbourn, S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. **J. Gen. Virol.** 2008; 89: 1-47.

Rehermann B. Immune Responses in Hepatitis B Virus Infection. **Semin. Liver Dis.** 2003; 23 (1): 21-37.

Reuben, A. Landmarks in hepatology: the thin red line. **Hepatology** 2002; 36:770-773.

Roth, W.K.; Busch, M.P.; Schuller, A.; Ismay, S.; Cheng, A.; Seed, C.R.; Jungbauer, C.; Minsk, P.M.; Sondag-Thull, D.; Wendel, S.; Levi, J.E. *et al.* International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. **Vox Sanguinis.** 2012; 102: 82–90.

Sadeck, L.S.R. & Ramos, J.L.A. Resposta imune à vacinação contra hepatite B em recém-nascidos pré-termo, iniciada no primeiro dia de vida. **Jornal de Pediatria.** 2004; 80 (2): 113-8.

Salzano, F.M. & Blumberg, B.S. The Australia antigen in Brazilian healthy persons and in leprosy and leukemia patients. **J. Clin. Pathol.** 1970; 23: 39-42.

Samal, J.; Kandpal, M. and Vivekanandan, P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. **Clinical Microbiol. Rev.** 2012; 25 (1): 142-163.

Santos, A.O.; Alvarado-Mora, M.V.; Botelho, L.; Vieira, D.S.; Pinho, J.R.R. *et al.* Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. **Virology Journal.** 2010; 7: 315.

Satoh, K.A.; Iwata-Takakura, A. Yoshikawa, Y. Gotanda, T. Tanaka, T. Yamaguchi & H. Mizoguchi. A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection. **Vox Sanguinis.** 2008; 95: 174–180.

Satake, M.; Taira, R.; Yugi H. *et al.* Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. **Transfusion.** 2007; 47 (7): 1197-1205.

Silva, C.M.D.; Costi, C.; Costa, C.; Michelon, C.; Oravec, R.; Ramos, A.B.; Niel, C.; Rossetti, M.L. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. **Journal of infection.** 2005; 51: 24-29.

Silveira, T.R.; Cunha, J.; Krebs, L.; Ramalho, L. Avaliação do grau de conhecimento e de proteção de ginecologistas e obstetras do Rio Grande do Sul em relação à hepatite B. **Revista AMRIGS.** 2003; 47: 193-201.

Silveira, T.R.; Fonseca, J.C.; Rivera, L. Fay, O.H.; Tapia, R.; Santos, J.I. *et al.* Hepatitis B seroprevalence in Latin America. **Pan. Am. J. Public. Health.** 1999; 6: 378-83.

Souto, F.J.D.; Fontes, C.J.F.; Oliveira, S.S. *et al.* Prevalência da hepatite B em área rural de município hiperendêmico na Amazônia Mato-grossense: situação epidemiológica. **Epidemiologia e Serviços de Saúde.** 2004; 13 (2): 93-102.

Stefano Dettori, Angela Candido, Loreta A. Kondili, Paola Chionne, Stefania Taffon, Domenico Genovese, Paola Iudicone, Michelina Miceli, Maria Rapicetta. Identification of low HBV-DNA levels by nucleic acid amplification test (NAT) in blood donors. **Journal of Infection.** 2009; 59: 128-133.

Su, T.H.; Chen, P.J.; Cheng, H.R.; Li, L.; Lin, K.S.; Kao, J.K.; Chen, D.S.; Liu, C.J. The clinical significance of occult hepatitis B transfusion in Taiwan – a look-back study. **Transfusion Medicine.** 2011; 21: 33-41.

SUSAM - Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas. Mapa das regionais de saúde do Amazonas. 2010. Acesso: 15/03/2010. Disponível em: <http://www.saude.am.gov.br/>

Tani Y.; Aso, H.; Matsukura H.; Tadokoro K.; Tamori A., Nishiguchi S.; Yoshizawa H.; Shibata H. Significant background rates of HNV and HCV infections in patients and risks of blood transfusion from donors with low anti-HBc titres or high anti-Hbc titres with high anti-HBs titres in Japan: a prospective, individual NAT study of transfusion-transmitted HBV, HCV and HIV infectious. **Vox Sanguinis.** 2012; 102 (4): 285-93.

Tatematsu, K.; Tanaka, Y.; Kurbanov, F. *et al.* A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype **J. J. Virology.** 2009; 83: 10538-10547.

Theджа, M.D.; Martono Roni; Alida R.; Harahap; Nurjati C.; Siregar; Susan I.; David H. Muljono. Occult hepatitis B in blood donors in Indonesia: altered antigenicity of the hepatitis B virus surface protein. **Hepatol. Int.** 2010; 4: 608–614.

Uemoto S., Sugiyama K., Marusawa H., *et al.* Transmission of hepatitis B virus from hepatitis B core antibody-positive donors in living related liver transplants. **Transplantation.** 1998, 65: 494-9.

Vogel, S.N.; Fitzgerald, K.A.; Fenton, M.J. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. **Mol. Interv.** 2003; 3: 466-477.

Voigt, A.R.; Strazer-Neto, M.; Spada, C.; Treitinger, A. Seroprevalência of hepatitis B and hepatitis C markers among children and adolescents in the south brazilian region – metropolitan área of Florianópolis, Santa Catarina. **Braz. J. Infect. Dis.** 2010; 14 (1): 60-65.

von Elm, E.; Altman, D.G.; Egger, M.; Pocock, S.J.; Gotsche, P.C.; Vandenbroucke, J.P, *et al.* Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. **BMJ.** 2007; 335 (7624): 806-8.

Vienna, A.C. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical ISBN 3-900051-07-0. Development Core Team 2012.

Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

Ximenes RA de A, Pereira LMB, Martelli CMT, Merchán-Hamann E, Stein AT, Figueiredo GM, Braga MC, Montarroyos UR, Brasil LM, Turchi MD, Fonseca JCF, Lima MLC, de Alencar LCA, Costa M, Coral G, Moreira RC, Cardoso MRA. Methodology of a nationwide cross-sectional survey of prevalence and epidemiological patterns of hepatitis A, B and C infection in Brazil. **Cad. Saúde Pública**. 2010; 26 (9): 1693-1704.

Wendel, S. Rational testing for transmissible diseases. **ISBT Science Series**. 2007; 2: 19-24.

Wendel, S.; Levi, J.E.; Biagini, D.C.; Allain, J.P. A probable case of hepatitis B virus transfusion transmission realed after a 13-month-long window period. **Transfusion**. 2008; 48 (8): 1602-8.

WHO - World Health Organization. Hepatitis B vaccines. **Weekly Epidemiology Record**. 2009; 40: 405-420.

WHO - World Health Organization. Prevalence of hepatitis B virus infection in the world by country. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/en/>.

Wolf, F.H., Fuchs, S.C., Brandão, A.B.M. Absence of occult hepatitis B among donors in southern Brazil. **Braz. J. Infec. Dis**. 2011, 15 (2): 159-162.

Yang, M.H; Li, L.; Hung, Y.S.; Hung, C.S.; Allain, J.P.; Lin, K.S. and Tsai, L.S.J. The efficacy of individual-donation and minipool testing to detect low-level hepatitis B virus DNA in Taiwan. **Transfusion**. 2010; 50: 65-74.

Yu, H. Yuan, Q.; Ge, S.X.; Wang, H.Y.; Zhang, Y.L *et al*. Molecular and phylogenetic analyses suggest and addition hepatitis B virus genotype I. **PLoS ONE**. 2010; 5: e9297.

Zarembek, K.A.; Godowski, P.J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. **J. Immunol**. 2002; 168: 554-561.

Zanetti A.R., Romano L., Zappa A., *et al*. Changing patterns of hepatitis B infection in Italy and NAT testing for improving the safety of blood supply. **J. of Clinical Virology**. 2006, (suppl. I) S51-S55.

Zhang, Qi & Cao, G. Genotypes, mutations and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. **Hepat Mon**. 2011; 11 (2): 86-91.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Detecção do DNA do vírus da Hepatite B nas doações de sangue do interior do Estado do Amazonas e sua relevância nas estratégias de triagem de doadores de sangue em áreas endêmicas.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo tem como objetivo promover informações sobre o impacto do uso de novas tecnologias diagnósticas para a seleção de doadores de sangue do interior do Estado do Amazonas no que diz respeito à hepatite B, visando melhorar a qualidade das transfusões na região Norte.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será aplicado um questionário contendo perguntas sobre possíveis comportamentos de exposição à infecção a hepatite B. Posteriormente será coletada amostra de 5mL de sangue para análise da presença do DNA do vírus. As análises serão realizadas na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus. Se a sua amostra após a análise não estiver dentro dos critérios exigidos por este projeto, este documento torna-se inválido.

RISCOS E DESCONFORTOS: Os riscos são mínimos a participação neste estudo. Haverá um desconforto pela picada da agulha para coleta da amostra e a necessidade de responder a algumas perguntas de história de risco para adquirir a infecção pela hepatite B.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento e na prevenção da hepatite B.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: Os indivíduos participantes deste estudo terão, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito à hepatite B, podendo entrar em contato com as doutoras Kátia Torres e Márcia Poinho (HEMOAM: Tel: (92)3655-0130). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica da unidade de saúde da sua cidade.

VOLUNTARIEDADE: A participação neste estudo é voluntária. Os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no serviço de hemoterapia.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a identidade dos participantes, sendo os participantes identificados apenas através de um número.

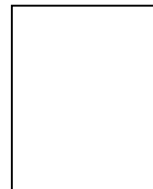
USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue periférico) será utilizado para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores. Os questionários serão arquivados sob a guarda do pesquisador principal deste estudo.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

(Assinatura do doador/ Nome completo em letra de forma)

Número da bolsa (macarrão): _____



(Assinatura do entrevistador)

(Impressão dactiloscópica)

Data: ____/____/____ Nome da Cidade: _____

APÊNDICE B
QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Título do projeto: Detecção do DNA do vírus da Hepatite B nas doações de sangue do interior do Estado do Amazonas e sua relevância nas estratégias de triagem de doadores de sangue em áreas endêmicas.

Código do projeto: _____ (preenchido em Manaus)

1.DADOS PESSOAIS / DEMOGRÁFICOS	
1.1 Nome completo do doador(a):	Tel: () Cel: ()
1.2 Data de nascimento: ___/___/___	Sexo: ()1.Feminino ()2.Masculino
1.3 Data da doação: ___/___/___	
1.4 Número da bolsa (Macarrão/da doação atual):	
1.5 Local da doação/Unidade Hemoterápica (especificar a cidade):	
2.DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	
2.1 É a sua primeira doação? ()Sim ()Não SE NÃO , quando foi a última doação? ___/___ (colocar mês/ano) ()Não lembra	
2.2 Qual é o seu estado civil: ()Casado ()Solteiro ()Viúvo ()Divorciado ()Não casado, mais mora com alguém	
2.3 Qual é a sua profissão? (<i>considerar a função que ele exerce atualmente</i>)	
2.4 O Sr(a) já trabalhou na área da saúde? ()Sim ()Não=Pule para próxima pergunta SE SIM , especifique o local: ()Hospitais ()Clínicas médicas ()Unidades de diálise ()Laboratório ()Consultório dentário ()Outros trabalhos na área da saúde? (Especifique): _____	
2.5 O Sr(a) já recebeu transfusão de sangue? ()Sim ()Não ()Não lembra SE SIM , quando foi? ___/___ (colocar mês/ano)	
2.6 O Sr(a) já teve hepatite? ()Sim ()Não SE SIM , quando foi? ___/___ (colocar mês/ano) E qual foi o tipo de Hepatite ()A ()B ()C () Não Sabe	
2.7 O Sr(a) tem algum familiar com hepatite que mora na mesma casa que você? ()Sim ()Não () Não sabe	
2.8 O Sr(a) tem ou já teve algum parceiro sexual com hepatite? ()Sim ()Não ()Não Sabe ()Se recusa a responder	

2.9 A hepatite pode ser transmitida dos pais para os filhos. A sua mãe tem ou já teve hepatite? ()Sim ()Não ()Não sabe ()Se recusa a responder
2.10 O Sr(a) faz ou fez uso de medicamentos injetáveis sem solicitação médica? ()Sim ()Não ()Não sabe ()Se recusa a responder
2.11 O Sr(a) já fez cirurgia alguma vez na vida? ()Sim ()Não SE SIM , quando foi? ____/____ (colocar mês /ano) E qual foi o tipo de cirurgia? _____
2.12 O Sr(a) já foi vacinado contra a hepatite B? ()Sim ()Não ()Não sabe SE SIM , apresentou a carteira de vacinação? ()Sim ()Não
2.13 O Sr(a) possui tatuagem ou piercing? ()Sim ()Não SE SIM , quando fez a última? ____/____ (colocar mês/ano) ()Não lembra
2.14 O Sr(a) tem o hábito de compartilhar material perfuro cortante de uso pessoal? Ex: lâminas de barbear, alicates de unha, pinças, materiais de rituais... ()Sim ()Não
2.15 O Sr(a) utiliza ou utilizou tratamento por acupuntura nos últimos 12 meses? ()Sim ()Não SE SIM , o Sr(a) usou agulhas descartáveis? ()Sim ()Não ()Não sabe
2.16 Nos últimos 12 meses quantos parceiros sexuais o Sr(a) teve? _____(colocar número de parceiros) ()Se recusa a responder
2.17 “É comum as pessoas ingerirem bebidas alcoólicas”. O Sr(a) costuma fazer uso de bebidas alcoólicas? ()Sim ()Não
2.18 Nas últimas semanas, em quais dias o Sr(a) bebeu? ()Seg ()Ter ()Qua ()Qui ()Sex ()Sáb ()Dom
2.19 Quando o Sr(a) ingere bebidas alcoólicas, em média, quantas doses o Sr(a) costuma beber? ()1dose ()2 doses ()3 doses ou mais

Comentários: _____

Responsável pela entrevista: _____

(colocar o nome completo em letra de forma)

Data: ____/____/____

APÊNDICE C

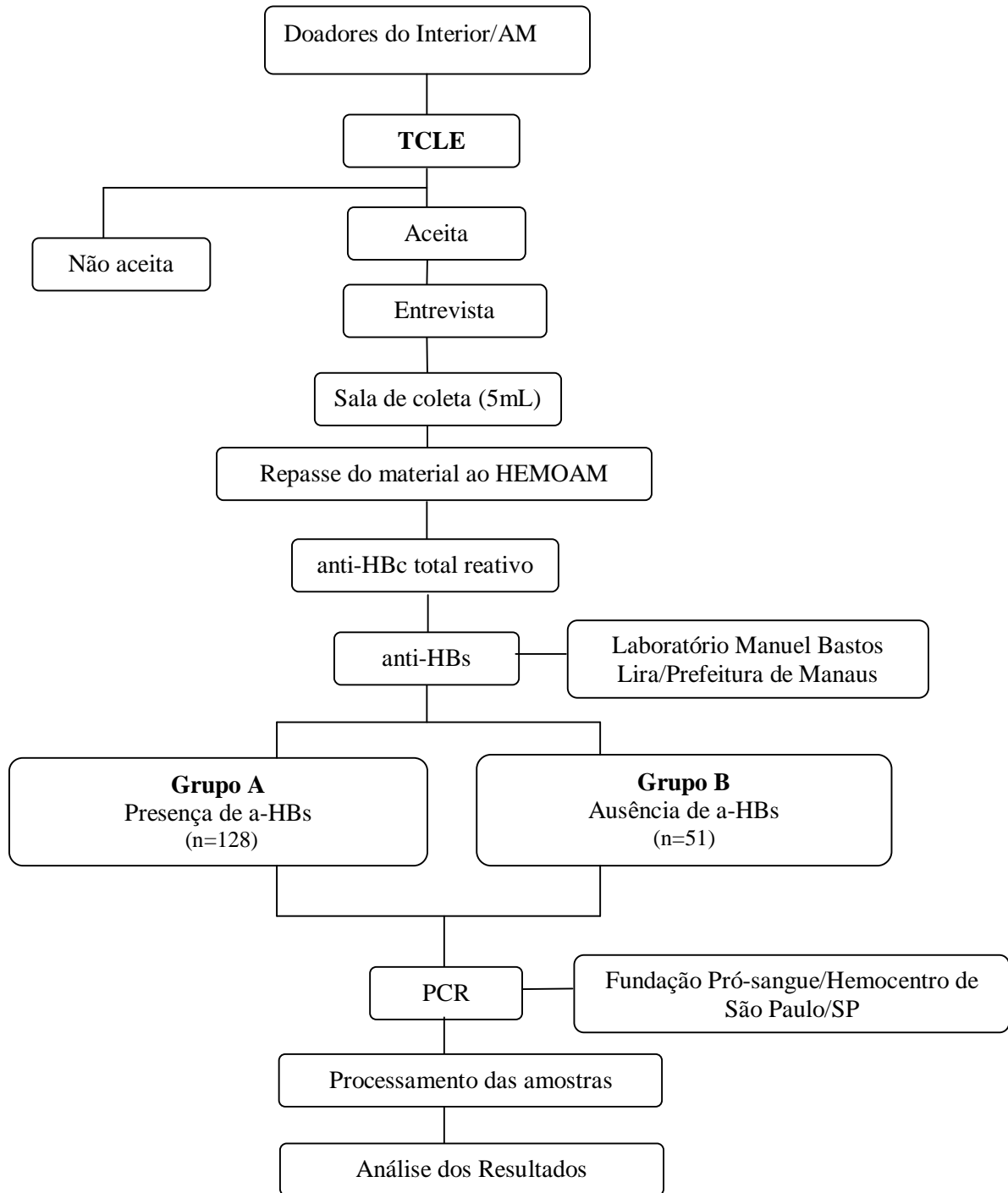
PLANILHA DE CONTROLE DOS CASOS

Detecção do DNA do vírus da Hepatite B nas doações de sangue do interior do Estado do Amazonas e sua relevância nas estratégias de triagem de doadores de sangue em áreas endêmicas

Responsáveis: Márcia Poinho, Mônica Moresco, Helaine Virgolino, Christiane Usui, Kátia Torres

Nº	NOME	DAT. NASC.	Nº BOLSA	LOCALIDADE	TCLE	QUEST.	DAT. ROTINA	M	T	Nº ROTINA	SOROLOGIA	DO	CUTTOF	RESUT.	Obs.
											HBc				
											a-HBs				
											HBc				
											a-HBs				
											HBc				
											a-HBs				
											HBc				
											a-HBs				
											HBc				
											a-HBs				
											HBc				
											a-HBs				
											HBc				
											a-HBs				
											HBc				
											a-HBs				

APÊNDICE D
FLUXOGRAMA METODOLÓGICO





COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
CAAE- 0014.0.112.000-09 - VERSÃO 002/09

I. Identificação

Título: Prevalência do vírus da Hepatite B em doadores de sangue do interior Estado do Amazonas e sua relevância nas estratégias de triagem de doadores de sangue em áreas endêmicas.

Instituição: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM)

Pesquisador responsável: Márcia Poinho Encarnação de Moraes

Data de Reapresentação ao CEP: 17/11/2009

Documentos Encaminhados: Folha de Rosto, Projeto, Currículo do pesquisador principal, Currículos dos técnicos envolvidos no Projeto, TCLE.

II. Objetivos

Geral:

Analisar na população de doadores de sangue do interior do estado do Amazonas, a associação da presença do marcador anti-HBs (em bolsas de sangue anti-HBc reativas e HBsAg negativas) com a presença do DNA do vírus da hepatite B.

Específicos:

- Analisar a prevalência de DNA do vírus da hepatite B em doadores de sangue do interior do estado do Amazonas anti-HBc reativos e HBsAg negativos;
- Analisar a correlação entre a presença do DNA do vírus da hepatite B com os títulos do anti-HBs nas amostras reativas para este parâmetro;
- Verificar os fatores de risco relacionados à infecção pelo vírus da hepatite B na população de doadores de sangue no interior do estado do Amazonas;
- Analisar os critérios de triagem sorológica para hepatite B para doadores de sangue do interior do estado do Amazonas para subsidiar as adoções de novas políticas neste processo em áreas endêmicas.

III. Sumário do projeto

Descrição e caracterização da amostra:

Trata-se de um estudo observacional, transversal para determinar a associação entre a presença do marcador anti-HBs em amostras de doadores de sangue anti-HBc reativo e HBsAg negativos com a presença do DNA do vírus da hepatite B no estado do Amazonas. Serão analisados 1646 doadores de sangue do interior do estado do Amazonas divididos em dois(2) grupos: 1411 doadores do grupo A = anti-HBs reativo



(antiHBc+/HEsAg-) e 235 doadores do grupo B = anti-Hbs negativo (anti-HBc+/HBsAg-) que permitirá 80% de poder para detectar 3,5% de diferença entre a prevalência da presença do DNA do HBV entre os grupos assumindo se de 2% no grupo A, utilizando testes estatísticos bidirecional com nível de significância de 0,05 e utilizando o teste qui-quadrado. O projeto utilizou 5% de margem no quantitativo do cálculo amostral levando em consideração a possibilidade de dificuldades no processo de recrutamento dos doadores de sangue selecionados.

Critérios de Inclusão: Doadores de sangue total dos municípios do interior do estado do Amazonas com seguinte padrão de marcadores para hepatite B: anti-HBc reativo e HBsAg negativo. Ambos os gêneros.


Critérios de Exclusão: Doadores de sangue que apresentem diferentes padrões aos marcadores da hepatite B (HBsAg reativo ou padrão indeterminado para qualquer marcador: HbeAg, anti-Hbc ou anti-HBs).

IV. Comentários do CEP frente a Resolução CNS 196/96 e Complementares

As adequações sugeridas na primeira análise do projeto foram perfeitamente atendidas pelas pesquisadoras. O projeto de pesquisa é de relevância clínica e importância social e científica que conduzirá a tomada de decisões na melhoria da saúde e bem estar da população gerando informações importantes e que trarão subsídios para uma melhor estruturação no campo da hemoterapia.

V. Parecer do CEP: **Projeto Aprovado.** Conforme determinado pela resolução CNS 196/96 os pesquisadores deverão apresentar a este CEP relatórios parcial e/ou final, ficando determinado desde então, o prazo para apresentação de relatório: **24/05/2010**. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O termo de Consentimento deverá ser aplicado em duas vias sendo que uma delas ficará com o sujeito da pesquisa.

Data Parecer: 25/11/2009


JOSIANE DA SILVA NEVES
 Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa
 da Fundação HEMOAM

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 AV. CONSTANTINO NERY, 4397 – CHAPADA – CEP 69050-002 – MANAUS/AMAZONAS
 FONE (92) 3655-0113 FAX (92) 3655-0112
 E-mail: cep_hemoam@hotmail.com