



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL

GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE B E DO
VÍRUS DA HEPATITE DELTA NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL BRASILEIRA

MYUKI ALFAIA ESASHIKA CRISPIM

MANAUS

2007

M.618g Crispim, Myuki Alfaia Esashika

CDU616.9 Genotipagem do vírus da hepatite B e da hepatite Delta na Amazônia Ocidental Brasileira / Myuki Alfaia Esashika Crispim; Orientadora: Dagmar Kiesslich. Manaus, AM: UFAM, 2007.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas.

1. Hepatite B 2. Hepatite D 3. Genótipos 4. Amazônia Ocidental Brasileira I. Kiesslich, Dagmar. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL
CREDENCIADO PELA PORTARIA Nº 2530 - CAPES / MEC, DE 04 DE SETEMBRO DE 2002 E PUBLICADO NO
DIÁRIO OFICIAL EM 06 DE SETEMBRO DE 2002

ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, APRESENTADA PELA FARMACÊUTICA BIOQUÍMICA MYUKI ALFAIA ESASHIKA CRISPIM, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM DIAGNÓSTICO E CONTROLE, REALIZADA NO DIA 20 DE SETEMBRO DE 2007.

Aos vinte dias do mês de setembro do ano de dois mil e sete, às quatorze horas, no Auditório Dr. Zerbini, anexo ao Prédio da Faculdade de Medicina/UFAM, nesta cidade de Manaus/Amazonas, reuniu-se a Banca Examinadora, indicada pela Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia Tropical, para julgamento da Defesa da Dissertação de Mestrado, apresentada pela candidata Myuki Alfaia Esashika Crispim, na Área de Concentração em Diagnóstico e Controle, Linha de Pesquisa –Estratégias para o controle e/ou diagnóstico- intitulada "Genotipagem do Vírus da Hepatite B e Delta na Amazônia Ocidental Brasileira". O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública, compreendendo exposição seguida de arguição dos examinadores. Ao término dos trabalhos, cada examinador em sessão secreta, exarou seu parecer: Orientadora: Prof^a. Doutora Dagmar Kiesslich (Professora da Universidade Federal do Amazonas-UFAM), Aprovada (X) Não Aprovada (), Titulares: Prof^a. Doutora Cristina Maria Borborema dos Santos (Professora da Universidade Federal do Amazonas – UFAM), Aprovada (X) Não Aprovada () e Prof^a. Doutora Gilberto Bensabath (Secretária de Vigilância em Saúde/Instituto Evandro Chagas - IEC/PA) Aprovada (X) Não Aprovada (). Encerrada a sessão, o Professor Dr. Nelson Abrahim Fraiji, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Patologia Tropical, agradeceu a presença de todos. Manaus-Am. 20 de setembro de 2007.

Prof^a. Dr^a. Dagmar Kiesslich
Orientadora

Profa. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Gilberto Bensabath
Membro Titular

Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji
Coordenador

Myuki Alfaia Esashika Crispim
Candidata

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL

MYUKI ALFAIA ESASHIKA CRISPIM

GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE B E DO VÍRUS
DA HEPATITE DELTA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL
BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração “Diagnóstico e Controle”.

Orientadora: **Profa Dra. Dagmar Kiesslich**

MANAUS

2007

MYUKI ALFAIA ESASHIKA CRISPIM

**GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE B E DO VÍRUS
DA HEPATITE DELTA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração “Diagnóstico e Controle”.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. DAGMAR KIESSLICH, Presidente
Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM

Prof. Dra. GILBERTA BENSABATH, Membro
Instituto Evandro Chagas, Belém - PA

Profa. Dra. CRISTINA MARIA BORBOREMA DOS SANTOS, Membro
Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai **Yoshinori Esashika**, in memoriam, por todo amor e incentivo dedicado enquanto aqui esteve.*

*A minha querida mãe **Marina Freire Alfaia**, que pela adversidade da vida, a sua maneira, continua me dando inspiração para minhas vitórias.*

*Ao meu irmão **Sigueru Esashika**, in memoriam que tanto se orgulhava de mim, um exemplo de ser humano.*

*Ao meu marido **Valdemir**, pela força, seu amor e solidariedade em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus filhos **Tiago** e **Marina**, pela compreensão, razão da minha vontade de vencer e alegrias.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a **Dagmar Kiesslich**, que me acolheu para este trabalho, minha gratidão pela exaustiva paciência e por todos os conhecimentos recebidos ao longo de minha formação, um exemplo de profissional e amiga que terei para sempre.

As minhas amigas **Sônia Campello e Victória Sposina**, pelo companheirismo, incentivo, colaboração, e de estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha jornada.

Ao Doutor **Nelson Abrahim Fraiji**, o qual tenho estima e admiração, pela oportunidade proporcionada para a conclusão deste trabalho.

Aos meus irmãos, **Robson, Akie-Anne, Amazônia, Amazonita e Massakó**, pelo carinho e incentivo para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos que torceram pela realização desse grande desafio.

RESUMO

As hepatites B e D são endêmicas na Amazônia Ocidental Brasileira, mas poucos estudos têm buscado investigar a variabilidade genética de ambos os vírus. O vírus da Hepatite B (VHB) tem uma alta variabilidade genética, sendo definidos oito genótipos distintos (A-H). O vírus da hepatite D (VHD), na atual classificação, também é sugerido apresentar oito genótipos (I-VIII). O presente estudo teve o objetivo de descrever os genótipos do vírus B e D na Amazônia Ocidental Brasileira. Selecionamos 190 amostras de portadores crônicos do vírus da hepatite B, sendo que, destas, 50 apresentavam infecção dupla com o VHD. As amostras de soro do VHB foram submetidas a genotipagem por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com iniciadores tipo específicos. Em amostras reativas para o VHD RNA por RT-PCR foi realizada a genotipagem por Análise do Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP). Foi detectado o genótipo A como o mais freqüente em 91 participantes (56,5%), seguido pelo F em 41(25,5%), e o D em 29 (18,0%). Na genotipagem para o VHD encontramos somente o genótipo III. Este estudo mostrou que os genótipos A, D e F do VHB e o genótipo III do VHD, representam os genótipos predominantes na Amazônia Ocidental Brasileira.

Palavras chaves: 1.Vírus Hepatite B 2.Vírus Hepatite D 3. Genótipos 4. Amazônia Ocidental Brasileira

ABSTRACT

Hepatitis B and D are endemic in the Western Brazilian Amazon region , but few studies have been conducted to investigate the genetic variability of both viruses. The hepatitis B virus (HBV) has a high genetic variability, with eight different genotypes defined (A-H). In present classification hepatitis D virus (HDV) is also supposed to present eight different genotypes (I-VIII). The aim of this study was to describe the genotypes of the virus B and D of the Western Brazilian Amazon region. We selected 190 samples of chronic carriers with HBV and 50 of them presented double infection with HDV. The serum samples of HBV were submitted to the genotyping through Polymerase Chain Reaction (PCR), with type-specific “primers”. In the reactive samples for HDV RNA by RT-PCR was used the genotyping by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). The genotype A of HBV was detected as the most frequent, in 91 participants (56,5%), following by genotype F, in 41 (25,5%), and genotype D, in 29 (18,0%). In the HDV genotyping, we found only the genotype III. This study showed that the genotypes A, D and F of VHB and the genotype III of HDV represented the predominant genotypes in the Western Brazilian Amazon.

Key words: 1. Hepatitis B Virus 2. Hepatitis D virus 3. Genotypes 4. Western Brazilian Amazon

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das amostras segundo a sub-região de nascimento dos participantes	44
Tabela 2	Distribuição dos genótipos do VHB, segundo a naturalidade do participante	47
Tabela 3	Distribuição dos genótipos do VHB, de acordo com a reatividade para anti-delta	48
Tabela 4	Distribuição dos genótipos do VHB, segundo as sub-regiões em que foram detectados os indivíduos anti-delta reativos	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Padrões de endemicidade e vias de transmissão do VHB	19
Quadro 2	Distribuição geográfica dos genótipos e subtipos do VHB	26
Quadro 3	Nomenclatura proposta para oito <i>clades</i> do VHD (1-8) do gênero Deltavirus	30
Quadro 4	Seqüência de iniciadores usados para a genotipagem do VHB por <i>nested</i> PCR	38
Quadro 5	Iniciadores do VHD utilizados na reação da PCR.	41
Quadro 6	Polimorfismo dos genótipos baseado na análise por RFLP do produto do VHD-RT-PCR usando enzima restrição <i>Sma I</i> Iniciadores do VHD utilizados na reação da PCR.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos componentes do VHB e seus antígenos associados.	18
Figura 2	Distribuição geográfica mundial da infecção crônica por VHB	20
Figura 3	Representação esquemática do vírus da hepatite D	22
Figura 4	Distribuição geográfica da infecção crônica pelo VHD	23
Figura 5	Distribuição geográfica dos genótipos do VHB no mundo	27
Figura 6	Fluxo de procedimento	34
Figura 7	Estratégia para a genotipagem do VHB por PCR usando os iniciadores tipo-específicos	37
Figura 8	Perfil eletroforético de amostras amplificadas por <i>nested</i> PCR utilizando iniciadores específicos. O produto final amplificado corresponde a 68pb para o genótipo A, 97 pb genótipo F e 119 pb genótipo D	45
Figura 9	Distribuição dos genótipos do VHB procedentes da Amazônia Ocidental Brasileira (n=161)	46
Figura 10	Distribuição dos genótipos do VHB, de acordo com a reatividade anti-delta	48
Figura 11	Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do RNA do VHD por RT-PCR	50
Figura 12	Resultado da genotipagem por enzima de restrição	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT	- Alanina aminotransferase
Anti-HBc IgM	- Anticorpo contra o antígeno central do vírus da hepatite B, classe IgM
anti-HbcAg	- Anticorpo contra o antígeno central do vírus da hepatite B
anti-HBe	- Anticorpo contra o antígeno e do vírus da hepatite B
anti-HBs	- Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
AST	- Aspartato de aminotransferase
C	- <i>Core</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DNA-VHB	- Ácido desoxirribonucleico do vírus da hepatite B
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	- Ensaio imunoenzimático
HbcAg	- Antígeno central do vírus da hepatite B
HbeAg	- Antígeno e do vírus da hepatite B
HbsAg	- Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Kb	- kilo base
KCl	- Cloreto de potássio
Kd	- Kilo daltons
M	- Molar
MG	- Miligrama
mM	- Milimolar
MS	- Ministério da Saúde
μL	- microlitro
NaCl	- Cloreto de sódio
Nm	- Nanômetro
OMS	- Organização Mundial da Saúde
P	- Polimerase
Pb	- Pares de base
Pmol	- Picomol
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
pH	- Potencial hidrogênico
RNA	- Ácido ribonucleico
SDS	- Dodesilsulfato de sódio
<i>Taq</i> DNA Polimerase	- Enzima DNA polimerase
TEB	- Tampão de Tris HCL, EDTA e ácido bórico
TR	- Tampão de resuspensão
Tris	- Tris (hidroximetil) aminometano
U	- Unidade enzimática

UFAM	- Universidade Federal do Amazonas
V	- Volume
VHB	- Vírus de hepatite B
VHD	- Vírus da Hepatite D
X	- Proteína X
10X	- Dez vezes concentrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Vírus da Hepatite B	16
1.1.1	Histórico do VHB	16
1.1.2	Estrutura do VHB	17
1.1.3	Epidemiologia do VHB	18
1.2	Vírus da Hepatite D (Delta) – VHD	21
1.2.1	Histórico do VHD	21
1.2.2	Estrutura do VHD	21
1.2.3	Epidemiologia do VHD	23
1.3	Genótipos do VHB e VHD	24
1.3.1	Distribuição Geográfica dos Genótipos do VHB	25
1.3.2	Distribuição Geográfica dos Genótipos do VHD	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	Geral	32
2.2	Específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1	Modelo de Estudo	33
3.2	População de Estudo	33
3.2.1	Amostras	33
3.2.2	Critérios de Inclusão e Exclusão	33
3.2.2.1	Critérios de Inclusão	33
3.2.2.2	Critérios de Exclusão	34
3.3	Fluxo de Procedimento	34
3.4	Coleta de Amostras	35
3.5	Pesquisa de Marcadores Sorológicos	35
3.6	Procedimentos Moleculares	
3.6.1	VHB	36
3.6.1.1	Extração do DNA do VHB	36
3.6.1.2	Genotipagem do VHB por Iniciadores Tipo-Específico	37
3.6.1.2.1	Preparação dos Iniciadores	38
3.6.1.2.2	Metodologia da <i>nested</i> PCR	38
3.6.1.2.3	Identificação do Produto da PCR	39
3.6.2	VHD	40
3.6.2.1	Extração do RNA do VHD	40
3.6.2.2	Preparação dos Iniciadores	41
3.6.2.3	RT-PCR VHD	41
3.6.2.3.1	Síntese do cDNA	

3.6.2.3.2	Determinação qualitativa do VHD RNA (Amplificação do cDNA)	42
3.6.2.4	Genotipagem do VHD por Análise do Polimorfismo ...	43
3.6.2.4.1	Identificação do produto por RFLP com enzima de restrição	43
4	RESULTADOS	
4.1	Características da População Amostral	44
4.2	Análise dos Genótipos do VHB	45
4.2.1	Distribuição dos Genótipos do VHB (1)	46
4.2.2	Distribuição dos Genótipos do VHB (2)	47
4.3	Análise dos Genótipos do VHD	50
4.3.1	RT-PCR do VHD	50
4.3.2	Genotipagem VHD através de Enzima de Restrição	50
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, houve um enorme avanço nas pesquisas referentes às hepatites virais. Atualmente, reconhecemos diferentes agentes etiológicos, causadores de doenças infecciosas de evolução aguda e crônica, os quais são citados como vírus da hepatite A, vírus da Hepatite B, vírus da hepatite C, vírus da hepatite D (delta), vírus da hepatite E, vírus da hepatite F e vírus da hepatite G .

As infecções pelo vírus das hepatites B (VHB) e D, ou Delta, (VHD) constituem dois graves problemas para a saúde pública em certas regiões do mundo e estima-se que existam aproximadamente 17 milhões de pessoas infectadas pelo VHD, entre os 350 milhões de portadores crônicos do VHB. Os indivíduos com infecção dupla por VHB e VHD têm risco maior de desenvolver doença hepática severa e maior de letalidade, quando comparados aos pacientes com infecção única por VHB (HADLER et al., 1992; FATTOVICH et al., 2000).

O vírus da Hepatite Delta é um vírus defectivo que necessita do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) para sua síntese e replicação (RIZZETTO et al., 1980). O estado de portador crônico, definido do ponto de vista sorológico como persistência do antígeno de superfície do VHB (HBsAg) por mais de seis meses, constitui provavelmente, o principal fator epidemiológico para a disseminação do VHD em áreas de alta endemicidade, como na Amazônia Brasileira. (BENSABATH et al., 1987; FONSECA et al., 1987; FONSECA et al., 1994).

Em certas áreas da América do Sul, tais como a Venezuela, Peru, Colômbia, Bolívia e Brasil, a infecção pelo VHD tem sido associada a surtos de hepatites fulminantes, com altas taxas de morbidade e mortalidade (HADLER et al., 1984; LJUNGGREN, 1985; BUITRAGO et al., 1986; BENSABATH et al., 1987).

Na Amazônia brasileira, estudos pioneiros sobre a frequência do Antígeno Austrália foram realizados por Bensabath e Boshel (1973) que caracterizaram a alta endemicidade da infecção pelo VHB na região. Posteriormente, inquéritos soro-epidemiológicos confirmaram a elevada prevalência do VHB na Amazônia Ocidental, sendo ainda agravada pela co-infecção ou superinfecção pelo VHD (GAYOTTO et al., 1984; GARBES-NETO et al., 1995; KIESSLICH, 1996).

Apesar de muitos estudos mostrarem esta região como de alta prevalência, até o momento existem poucos registros dos genótipos circulantes de ambos os vírus, considerando as diversas áreas geográficas da bacia amazônica, bem como a crescente importância do papel dos genótipos na história natural de ambas infecções.

1.1 Vírus da Hepatite B

1.1.1 Histórico do VHB

Na década de sessenta, a descoberta do vírus da hepatite B impulsionou as pesquisas das hepatites virais. Em 1965, Baruch Blumberg e colaboradores, um geneticista que trabalhava no National Institute of Health (NIH), na Filadélfia, descobriu no soro de um aborígene Australiano um antígeno que reagia com o soro de dois doentes hemofílicos politransfundidos, ao qual foi atribuído o nome de antígeno Austrália.

A associação desse antígeno com a hepatite B foi feita em 1968, por Alfred Prince, do New York Blood Center (PRINCE, 1968), ao demonstrar que o mesmo antígeno estava relacionado com a hepatite pós-transfusional, recebendo o nome de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). Ainda em 1968, Okochi e Murakami, no Japão, também observaram a associação do antígeno Austrália com o desenvolvimento de hepatites pós-transfusionais, em receptores de unidades transfusionais positivas para este antígeno.

A partícula viral íntegra do VHB foi visualizada pela primeira vez por Dane et al., em 1970, sendo então denominada “partícula de Dane”. No ano seguinte, Almeida et al. (1971), após aplicação de detergente, verificaram que a partícula de Dane era constituída por um invólucro externo e um núcleo, sendo que o invólucro externo correspondia ao antígeno Austrália, que passou a designar-se antígeno de superfície do vírus B (HBsAg).

Em 1972, Magnius e Espmark, utilizando testes de imunodifusão, descobriram um novo antígeno, o antígeno “e” do vírus da hepatite B (HBeAg), como marcador de replicação viral.

Em 1988 foi identificada a seqüência completa de nucleotídeos do genoma do VHB, o qual foi clonado a partir do soro de um chimpanzé infectado (VAUDIN et al., 1988).

A vacinação contra a hepatite B, como atividade de rotina de saúde pública no Brasil, teve início em 1989, no Município de Lábrea, e, em seguida nos municípios dos rios Purus, Juruá e Médio Solimões (JUAREZ, 1991).

1.1.2 Estrutura do VHB

O vírus da hepatite B é um vírus DNA, de 42nm, classificado na família Hepadnaviridae, gênero Orthohepadnavirus. Três tipos de partículas relacionadas ao vírus podem estar presentes no sangue de indivíduos infectados. Duas delas não são infecciosas, sendo, no entanto, imunogênicas. A terceira, denominada partícula de Dane, constitui o vírion completo do VHB (DANE et al., 1970). Esta, contém um núcleo composto pelo antígeno do core (HBcAg) e o antígeno ‘e’ (HBeAg), uma molécula individual de DNA, parcialmente dupla, e uma DNA-polimerase (HOOFNAGLE et al., 1981). O núcleo é envolvido por um envelope contendo os principais determinantes antigênicos de superfície (LEE, 1997).

O genoma do vírus consiste em cerca de 3200 pares de base, contendo quatro estruturas de leitura sobrepostas, correspondentes aos genes C, S, P e X, responsáveis pela expressão das proteínas do nucleocapsídeo e do antígeno “e”, proteínas do envelope viral; polimerase e fatores de transcrição, respectivamente. (LEE, 1997) (Figura 1). Um esquema do genoma do vírus da hepatite B pode ser visto na figura abaixo.

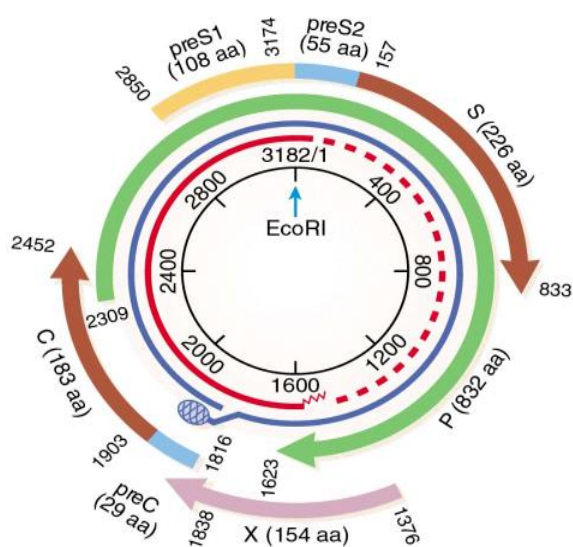


Figura 1 - Representação esquemática dos componentes do VHB e seus antígenos associados (Adaptado de WEI et al., 1994).

1.1.3 Epidemiologia do VHB

Os achados epidemiológicos e modos de transmissão do VHB variam muito de acordo com a endemicidade da infecção nas diferentes regiões do mundo, como pode ser observado na figura 2.

A endemicidade do VHB pode ser classificada em três diferentes padrões, determinados a partir da prevalência do HBsAg e anti-HBc e o modo de transmissão predominante (DAMME; VELLING, 1998).

Endemicidade	Portadores %	Soroprevalência Geral %	Vias de Transmissão
Alta	8-20	70-90	Perinatal Horizontal
Intermediária	2-7	20-55	Horizontal
Baixa	0-2	<20	Sexual Parenteral

Quadro 1 - Padrões de endemicidade e vias de transmissão do VHB. Adaptado (DAMME; VELLING, 1998).

São consideradas áreas de alta endemicidade o continente africano, o sudeste da Ásia, Ilhas do Pacífico, a China, alguns Estados da Indonésia, parte do Oriente Médio, e alguns países do leste Europeu e o Norte da América do Sul. Nestas áreas, a infecção é adquirida na infância geralmente por transmissão perinatal ou horizontal, levando a um maior número de portadores crônicos (DAMME; VELLING, 1998; MADDREY, 2000).

As áreas de endemicidade intermediária incluem parte do Oriente Médio, América do Sul e Central, Ásia Central e algumas regiões do Sudeste e Leste Europeu. Nestas áreas, o modo de transmissão predominante é horizontal e sexual, atingindo todos os grupos etários. (MADDREY, 2000).

As áreas de baixa endemicidade compreendem a América do Norte, Ocidente Europeu, Austrália e algumas regiões da América do Sul. Nestas, a maioria das infecções ocorrem em adultos jovens e adultos, em geral a transmissão é por via parenteral ou sexual (MADDREY, 2000).

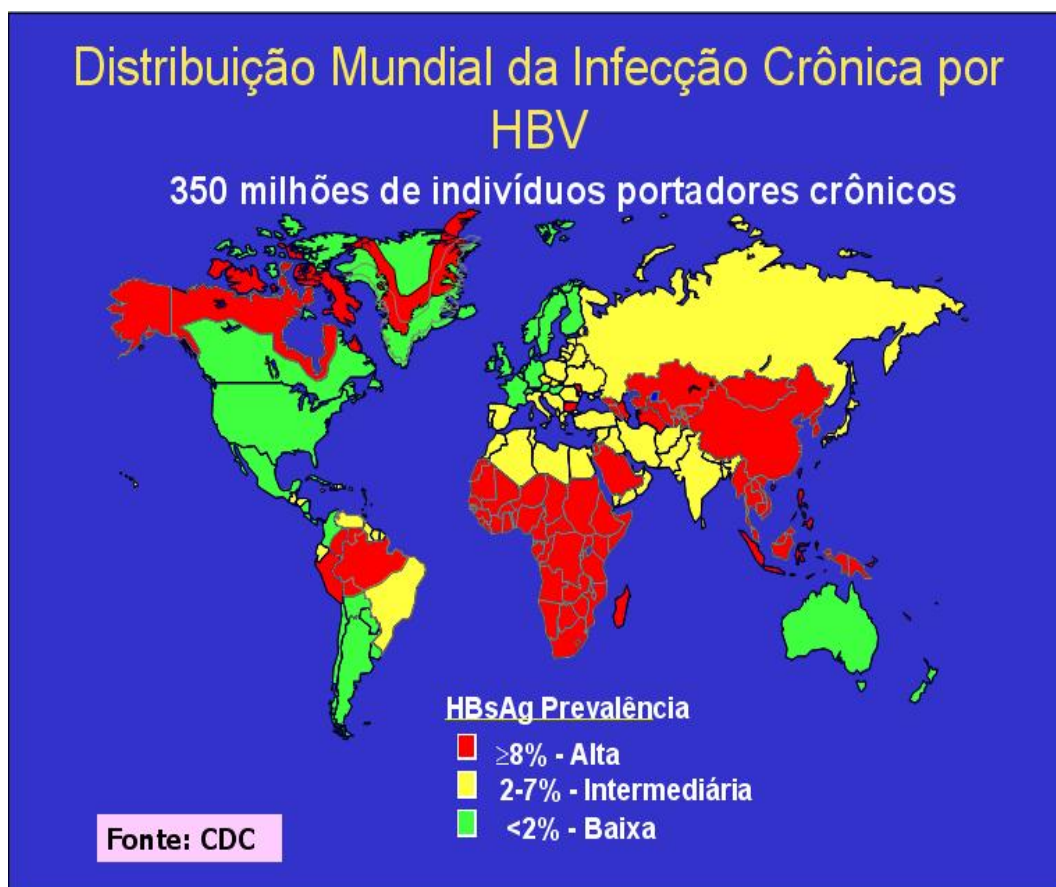


Figura 2 - Distribuição geográfica mundial da infecção crônica por VHB.

Adaptado de CDC, 2007.

No Brasil, a distribuição do VHB é heterogênea. A região Sul é considerada área de menor endemicidade, enquanto que as regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste de endemicidade intermediária, e a região Amazônica, o Estado do Espírito Santo e a região Oeste do Estado de Santa Catarina são considerados de alta endemicidade (SOUTO, 1999; SILVA & PINHO, 2001).

Na Amazônia Brasileira o padrão epidemiológico das infecções pelo VHB não é uniforme em toda a região. As áreas consideradas de alta endemicidade localizam-se principalmente nos vales dos rios Juruá, Purus e Madeira, na Amazônia Ocidental, e no vale do rio Tapajós na Amazônia Oriental (BENSABATH et al., 1987; FONSECA et al., 1988). Estudo realizado entre gestantes residentes na Amazônia Ocidental, confirmou uma alta

prevalência do antígeno de superfície na população de estudo, particularmente na região dos rios Juruá e Purus, identificando elevada viremia entre algumas pacientes, indicando um risco potencial de transmissão vertical. (KIESSLICH, 2003b)

1.2 Vírus da Hepatite D (Delta) - VHD

1.2.1 Histórico do VHD

O vírus da hepatite D foi descoberto em 1977 por Rizzeto et al. (1977), em Turim, Itália, enquanto examinavam biópsias hepáticas de pacientes portadores do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). Este novo antígeno foi denominado de antígeno Delta. No início dos anos 80, pesquisadores reconheceram que a partícula antigênica estava coberta com o antígeno de superfície do VHB. O antígeno então encontrado foi associado nas formas mais graves de hepatite B, aguda ou crônica (RIZZETO et al., 1980).

Em 1986, o genoma viral do VHD foi clonado e seqüenciado, o que permitiu estabelecer características que o destacam como único entre os vírus que infectam animais, porém compartilha semelhanças com os vírus que infectam plantas (DAROS; FLORES, 1995).

1.2.2 Estrutura do VHD

O vírus da hepatite D (VHD) é o único representante da família Deltaviridae, gênero Deltavirus (GERIN, 1994). É um vírus defectivo, que depende da presença do VHB para replicar (NEGRO; RIZZETO, 1995).

O VHD é constituído por uma pequena partícula esférica, com diâmetro de 36 a 43 nm, encapsulada pelo antígeno de superfície do vírus B (HBsAg) (HE et al., 1989). Esta cápsula, além de assegurar a integridade do VHD, também é importante para que o vírus delta possa completar seu ciclo biológico. O nucleocapsídeo é composto pelo antígeno da hepatite Delta (HDAg) e o genoma do VHD. No seu interior encontra-se o nucleocapsídeo de 19 nm de diâmetro.

O antígeno do VHD (HDAg) é composto por duas proteínas: uma curta denominada de S – AgHD e outra longa chamada de L – AgHD (RIZZETTO et al., 1977). Ambas são idênticas, exceto pelo fato que a forma L contém 19 aminoácidos a mais na extremidade do carbono terminal. A proteína curta é requerida para a replicação viral RNA, enquanto a proteína longa inibe a replicação e promove o empacotamento do RNA (KUO et al., 1989).

O genoma viral é formado por um RNA circular de hélice simples de 1,7 Kb, semelhante com os vírus RNA das plantas. (TAYLOR, 1990). A partícula viral constitui-se de 2 componentes: o envelope viral, cuja origem é do VHB, e o RNA genômico ligado ao antígeno delta (Figura 3).

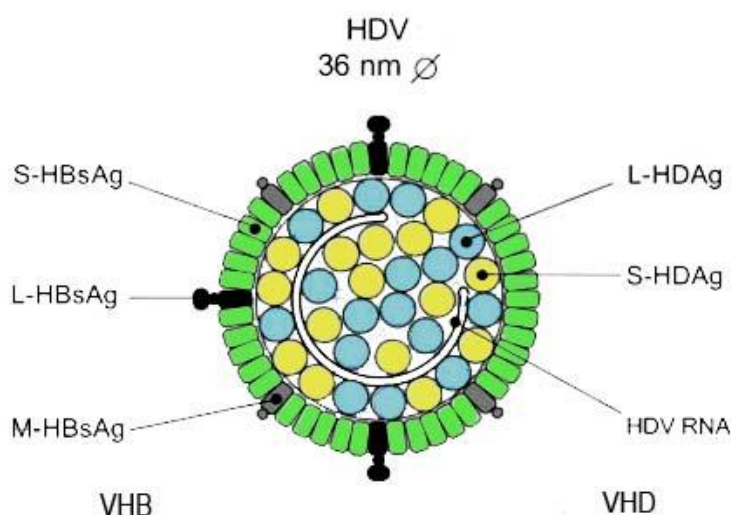


Figura 3 – Representação esquemática do vírus da hepatite D. Adaptado de SUREAU, 2006.

1.2.3 Epidemiologia do VHD

A hepatite por vírus Delta (VHD) não pode se manifestar sem a coexistência de VHB, por isso as características epidemiológicas de ambas encontram-se relacionadas. A distribuição geográfica da Hepatite Delta pode ser observada na figura 4.



Figura 4 – Distribuição geográfica de infecção crônica pelo VHD.

Adaptado de CDC, 2007.

Em geral, o padrão de infecção pelo VHD acompanha a prevalência do VHB, com algumas particularidades. Em países com baixa prevalência de portadores, como os EUA e Austrália, ocorre também baixa prevalência da infecção (CDC, 2007).

Já em países com prevalência moderada ou alta de VHB, como no Sul da Itália, parte da Rússia e Romênia, a prevalência da infecção pelo VHD é alta. Porém, em outras regiões

como o norte da Itália, Espanha, Turquia e Egito que também apresentam moderada prevalência de VHB, o VHD ocorre com frequência moderada (CDC, 2007).

O VHD é mais prevalente nos países mediterrâneos e do Oriente Médio, na África sub-sahariana, e no norte da América do Sul, onde predomina na bacia Amazônica. Estudos realizados na região Amazônica têm relatado um padrão de doença mais grave, acometendo grupos populacionais em surtos epidêmicos, com elevada morbidade e mortalidade, conhecidos como “Hepatite Fulminante de Lábrea”; no Brasil, “Hepatite Fulminante de Santa Marta”, na Colômbia e “Hepatite Fulminante da Tribo Yucpa”, na Venezuela (HADLER et al, 1984; BENSABATH et al., 1987; BUITRAGO et al 1986).

Estudos realizados no Brasil, não têm registrado a presença de infecção no restante do país. (FIGUEIREDO MENDES 1984; STRAUSS et al.,1987; LYRA et al.,1991). No Mato Grosso foram registrados cinco casos sugerindo a contaminação do VHD através da migração interna devido à proximidade com os Estados do Acre e Amazonas (RIBEIRO; SOUTO, 2000).

1.3 Genótipos do VHB e VHD

A variabilidade genética do VHB e VHD têm sido objeto de inúmeros estudos recentes, que têm buscado avaliar seu impacto sobre a evolução clínica, sobre o diagnóstico imunológico e molecular, além da resposta terapêutica.

Em termos de variabilidade genética, além de mutações decorrentes da pressão imune, diferentes genótipos de ambos os vírus têm sido descritos, os quais compreendem formas estáveis, resultantes de alterações ao acaso, selecionadas ao longo da evolução. (WEBER, 2005). Para o VHB, ao todo, oito genótipos são descritos no mundo, identificados pelas letras de A a H, os quais divergem entre si em mais de 8% do genoma completo (OKAMOTO et al.,

1988; NAUMANN et al., 1993; NORDER et al., 1994; STUYVER et al., 2000; ARAUZ-RUIZ et al., 2002). Para o VHD, a classificação atual estima uma variabilidade semelhante a do VHB, ao classificá-lo também em oito *clados*, designadas pelos números de 1 a 8. Para os genomas do VHD conhecidos atualmente, o percentual de divergência na sequência de nucleotídeo varia de 19 a 38% , entre sequências de diferentes genótipos (DENY, 2006).

1.3.1 Distribuição Geográfica dos Genótipos do VHB

Antes do advento das técnicas moleculares, a classificação das variantes antigênicas permitiu a identificação de nove subtipos diferentes: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+* e *adrq-* (COUROUCÉ-PAUTY et al., 1983). Em 1988, Okamoto e colaboradores sequenciaram o genoma completo do VHB e identificaram os genótipos A, B, C e D. Posteriormente, os genótipo F, E, G e H foram descritos sequencialmente. (NAUMAN et al, 1993; NORDER et al., 1994; STUYVER et al., 2000; ARAUZ-RUIZ et al., 2002).

Análise filogenética tem mostrado que o genótipo F pode ser classificado em dois *clados*: uma da América Central e outra da América do Sul (ARAUZ-RUIZ et al., 1977b; 2002). Outra subdivisão do genótipo F tem definido três clusters, designado I, II, III e IV (MBAYED et al., 2001), sendo que o cluster III corresponderia ao genótipo H (ARAUZ-RUIZ et al., 2002).

Stuyver et al. (2000) descreveram o genótipo G em soro de pacientes franceses e americanos com infecção crônica pelo VHB. Observaram, ainda, uma inserção de 36 nucleotídeos (12 aminoácidos) na parte terminal do HBcAg, e a presença de dois códons de terminação na região pré-core (TAA no códon 2 e TAG no códon 28).

Arauz-Ruiz et al. (2002) propuseram um oitavo genótipo VHB, o genótipo H, isolado em cepas virais da Nicarágua, México e Estados Unidos. Estes autores identificaram, através de análise filogenética, um ramo que se distanciava das seqüências do genótipo F, embora apresentasse similaridade com este. Na comparação de 82 seqüências completas, observaram divergências de 6.8 a 17.1 % entre 3 cepas que poderiam representar um novo genótipo.

O Quadro 2 representa os genótipos e os subtipos do VHB, e a figura 5 a distribuição dos genótipos no mundo.

Genótipo	Subtipo	Distribuição Geográfica
A	<i>Adw2, ayw1</i>	Noroeste da Europa, EUA, África Central, Índia
B	<i>Adw2, Ayw1</i>	Indonésia, China, Vietnã
	<i>Ayw1</i>	Vietnã
C	<i>Adw2</i> <i>Adrq+</i> <i>Adqr-, ayr, adr</i>	Leste Asiático Coréia, China, Japão, Taiwan Polinésia, Coréia, China, Japão, Austrália, EUA, Vietnã
D	<i>Ayw2, ayw3</i> <i>Ayw4</i>	Região Mediterrânea Índia, Rússia, EUA
E	<i>Ayw4</i>	África Ocidental
F	<i>Adw4q-</i> <i>Adw2, ayw4</i>	Polinésia, Estados Unidos (raro) América Central e do Sul, Europa
G	<i>Adw2</i>	Europa, EUA
H	<i>Adw4</i>	América Central e do Sul

Quadro 2 - Distribuição geográfica dos genótipos e subtipos do VHB. Adaptado de KAO, 2002; WEBER, 2005.



Figura 5 – Distribuição geográfica dos genótipos do VHB no mundo.
Adaptado de TENGAN e ARAÚJO, 2006.

O genótipo A, embora pandêmico, é encontrado principalmente no Noroeste da Europa, América do Norte, África e Índia e os genótipos B e C ocorrem em as populações do Sudeste da Ásia e Extremo Oriente. (OKAMOTO et al., 1988; NORDER et al., 1993).

O genótipo D, também é pandêmico, porém ocorre com maior frequência no Sudeste Europeu, África do Norte, na Índia, e no Oeste e Sul da África (BOWYER et al., 1997; NORDER et al., 1993). O genótipo E é característico de populações do Oeste e Sul da África e o genótipo F, é característico de populações nativas da América Central e do Sul, sendo o mais divergente do ponto de vista filogenético (BOWYER et al., 1997; NORDER et al., 1994; ARAUZ-RUIZ et al., 1997b; NORDER et al., 1993; BLITZ et al., 1998; MBAYED et al., 1998). Este genótipo seria originário do Novo Mundo, enquanto que a presença de genótipos

A e D na América do Sul estaria relacionada à imigração proveniente do Nordeste e Sudeste da Europa.

De ocorrência mais rara, o genótipo G foi descrito na França e Estados Unidos, enquanto o genótipo H, o último a ser identificado, é também característico de ameríndios, supondo-se que tenha se diferenciado do genótipo F, a partir dos primeiros genomas ancestrais comuns estabelecidos. (STUYVER et al., 2000).

A prevalência dos genótipos de VHB no Brasil ainda não está bem estabelecida devido a escassez de estudos em algumas regiões do país. A distribuição das diversas regiões do Brasil, mostra a predominância dos genótipos A, D e F (CARRILHO, 2001; CONDE, 2001; TELES et al., 2002; SITNIK, 2002).

Os avanços na área da biologia molecular têm permitido comparações filogenéticas entre as seqüências genômicas do VHB, habilitando hipóteses de rota de transmissão do VHB com a migração de portadores sãos. O genótipo do VHB encontrado em um indivíduo é mais relacionado ao seu país de origem, ou ao local de residência na infância, do que à sua residência atual. (GASPAR e YOSHIDA, 1987).

A distribuição geográfica do VHB no Brasil, segundo os subtipos foi descrita por Gaspar e Yoshida (1987). Segundo os autores, na região Norte, há predominância do subtipo *adw4* (provável genótipo F), na região Nordeste prevalece o subtipo *adw2* (provável genótipo A), na região Sudeste, colonizada por portugueses e imigrantes da Itália, Espanha, Líbano e Japão, entre outros, ocorre maior incidência do subtipo *adw2* (provável genótipo A), seguido do *ayw3* (provável genótipo D). Na região Centro-Oeste, 84% dos subtipos de VHB são *adw2* (genótipo A), e no Sul, a maior incidência de determinante y (*ayw2* e *ayw3*) decorre da ascendência européia da população, principalmente italianos e alemães (GASPAR e YOSHIDA, 1987; NAUMANN et al., 1993).

Atualmente, diversos são os métodos para determinar os genótipos dos vírus das hepatites B . O padrão ouro para genotipagem é a análise por sequenciamento do genoma completo, ou partes deste, porém os procedimentos são complexos e extensamente laboriosos, o que inviabiliza a aplicação em larga escala, em amostras clínicas (OKAMOTO et al., 1988). Outras metodologias têm sido empregadas como alternativa para redução de custo e do tempo para obtenção do resultado, tais como iniciadores específicos, ensaios sorológicos, RFLP, e técnicas de hibridização. Uma limitação importante destas metodologias citadas é a baixa acurácia para detectar populações mistas. Evidências crescentes têm indicado que recombinações entre genótipos são possíveis e que infecções com múltiplos genótipos, ou repetidas infecções com o mesmo genótipo também podem ocorrer (BOLLYKY et al., 1996, OWIREDU et al., 2001; SUGAUCHI et al., 2002).

Finalmente, o mais recente método de genotipagem tem sido baseado na PCR em Tempo Real. Trata-se de uma reação de PCR cuja detecção dos produtos de amplificação é simultânea à amplificação. Apresenta como vantagens a alta sensibilidade, alta capacidade de amplificar grande número de amostras simultaneamente, baixo risco de contaminação, alta precisão e reprodutibilidade (WEIZEL, 2006).

1.3.2 Distribuição geográfica dos Genótipos do VHD

Três genótipos têm sido bem identificados: I, II e III. Recentemente 04 novos genótipos têm sido classificados por Radjef et al., 2004 (genótipo IV), distribuído em Taiwan e ilhas de Okinawa, e genótipos V – VII, encontrados no oeste e África .

No Quadro 3 representa a classificação atual dos genótipos do VHD.

Clade	Genótipo	Referência prototipo isolado	Número Acesso	Tamanho (nt)	Referência
VHD-1	<i>I</i>	Italy-A20	X04451	1679	Wang et al., 1986
VHD-2	<i>IIa</i>	Japan-S	X60193	1683	Imazeki et al., 1991
VHD-3	<i>III</i>	Peru-I	L22063	1676	Casey et al., 1993
VHD-4	<i>IIb</i>	TW-2b	AF018077	1676	Wu et al., 1998
VHD-5		dFr-910	AJ584848	1697	Radjef et al., 2004
VHD-6		dFr-48	AJ584847	1687	Radjef et al., 2004
VHD-7		dFr-45	AJ584844	1672	Radjef et al., 2004
VHD-8		dFr-644	AJ584849	1680	Radjef et al., 2004

Quadro 3 - Nomenclatura proposta para oito clados do VHD (1-8) do gênero Deltavirus (Adaptado DENY, 2006).

O genótipo I é o de mais ampla distribuição geográfica, prevalece nos Estados Unidos da América do Norte (CASEY et al., 1993), na Europa, principalmente Itália, França, Grécia, Oriente médio, oeste da Ásia e Sul do Pacífico (NIRO, 1997).

O genótipo II tem sido encontrado somente no leste da Ásia, especialmente em Taiwan e Japão (LEE, 1996) e o seu padrão clínico da doença foi associado a um curso mais moderado ao do genótipo I (SAKUGAWA et al., 1999).

O genótipo III foi encontrado somente na América do Sul (CASEY et al., 1993; 1996), na Colômbia (BUITRAGO et al., 1986) e na Venezuela (HADLER, 1983). No Brasil, estado do Amazonas (KIESSLICH et al., 2003a) caracterizou o genótipo III em amostras de gestantes procedentes dos rios Juruá, Purus e região do Médio Amazonas. Este genótipo parece ser relacionado com formas de hepatite fulminante, em particular aquelas que se verificam nas regiões do norte da América do Sul. Estudos de Nakano e colaboradores (2001) detectaram que o VHD genótipo III associado com o genótipo F do VHB circula entre índios Yucpas na Venezuela e está associado em surtos de hepatite fulminante.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar os genótipos do vírus da hepatite B (VHB) e Hepatite D (VHD) em indivíduos procedentes da Amazônia Ocidental Brasileira.

2.2 Específicos

- 2.2.1 Identificar os genótipos do vírus B (VHB), em amostras de soro de indivíduos HBsAg reativos;
- 2.2.2 Descrever a frequência dos genótipos do VHB segundo a naturalidade do portador crônico;
- 2.2.3 Identificar os genótipos do vírus delta (VHD), em amostras de soro de indivíduos VHD RNA positivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo de Estudo

Estudo descritivo sobre a frequência dos genótipos do vírus da hepatite B (VHB) e do vírus da hepatite D (VHD), entre indivíduos procedentes da Amazônia Ocidental Brasileira.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas – FHEMOAM, cujo número de processo foi 06/2002.

3.2 População de Estudo

A população de estudo foi constituída por amostras de soro de indivíduos cronicamente infectados pelo vírus da Hepatite B.

3.2.1 Amostras

Foram selecionadas 190 amostras de soro reativas para HbsAg há mais de seis meses. Destas, 130 eram de doadores de sangue do interior e da capital do Amazonas, e 60 amostras eram de pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais da Universidade Federal do Amazonas. A seleção foi realizada no período de dezembro 2003 a novembro de 2006.

3.2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

3.2.2.1 Critérios de Inclusão

- Ser reativo para o marcador HBsAg, há mais de 6 meses ;
- Ser procedente da Amazônia Ocidental Brasileira;
- Ter idade superior a 18 anos e inferior a 60 anos.

3.2.2.2 Critérios de Exclusão

- Ser reativo para os vírus da Hepatite C (anti-VHC), vírus da Imunodeficiência Humana adquirida (anti-HIV) e vírus linfotrópico das células T humanas (anti-HTLV)

3.3 Fluxo de Procedimento

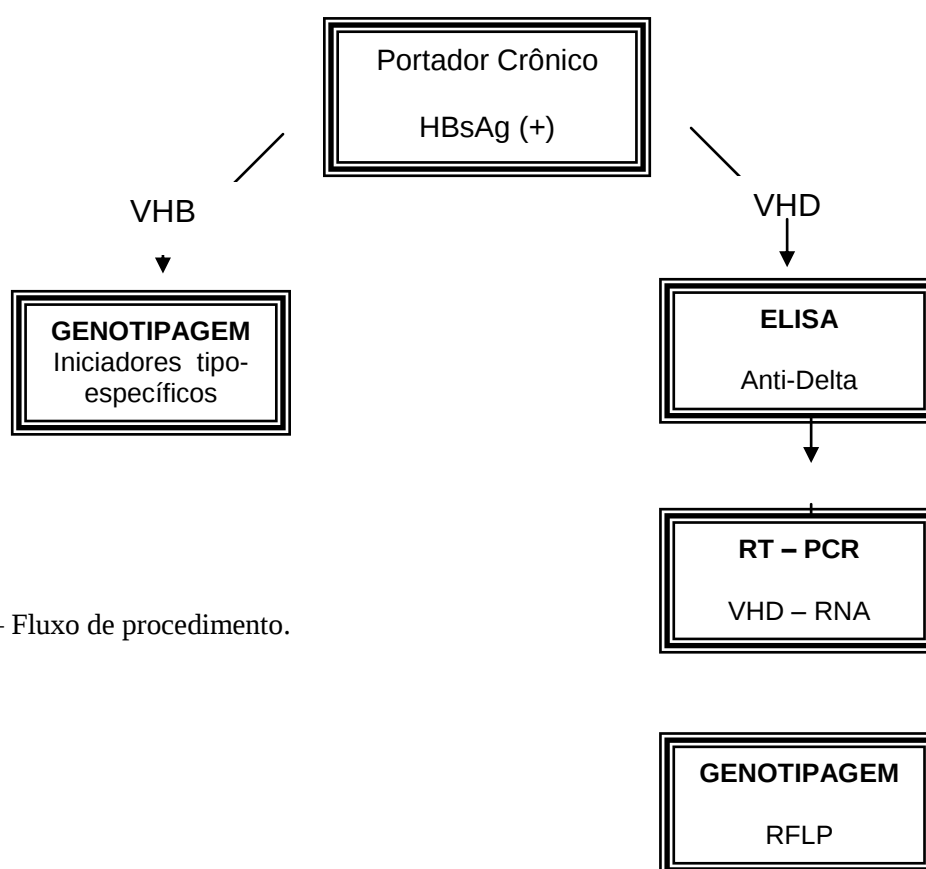


Figura 6 – Fluxo de procedimento.

3.4 Coleta e Armazenamento das amostras

Foram coletados cerca de 10 mL de sangue total de cada participante, em tubo sem anticoagulante. Após centrifugação a 3.500 rpm, durante 10 minutos, alíquotas de soro, com aproximadamente 1 mL, foram estocadas a -20°C para os testes sorológicos, e a -70°C destinadas aos testes moleculares.

3.5 Pesquisa de Marcadores Sorológicos

Foram empregados testes imunoenzimáticos comerciais do tipo ELISA, para a detecção de HBsAg (MUREX/Abbot, EUA), anti-HBc (Biomerieux, França), anti-VHC, anti-HIV e anti-HTLV I/II (MUREX/Abbott, EUA), sendo estes realizados na rotina de triagem sorológica de doadores, no Laboratório de Sorologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas - FHMOAM.

Amostras de pacientes provenientes do Ambulatório Araújo Lima, foram testadas no Laboratório de Pesquisa da Fundação HEMOAM, com os mesmos conjuntos diagnósticos empregados nas amostras de doadores.

Além dos marcadores descritos acima, foram pesquisados anticorpos dirigidos contra o antígeno delta (DIASORIN, Itália), em todos os participantes, sendo estes também realizados no Laboratório de Pesquisa do Hemocentro do Amazonas.

Para a detecção de anticorpos contra o antígeno do vírus da hepatite delta utilizou-se um ensaio imunoenzimático baseado no princípio do tipo competitivo simultâneo. Os poços das microplacas estavam revestidos com antígeno delta recombinante, constituindo os antígenos em fase sólida. A amostra a ser testada foi adicionada a cada cavidade, juntamente com os anticorpos anti-VHD marcados com a enzima peroxidase. Os anticorpos anti-VHD da amostra e os anticorpos anti-VHD marcados com a enzima peroxidase competiram pelo

antígeno em fase sólida. Se a amostra continha anti-VHD, a reação era incolor. A intensidade da coloração medida por um espectrofotômetro, indicava, de maneira inversamente proporcional, a presença dos anticorpos anti-VHD da amostra. As leituras do valor de absorbância para amostras foram comparadas com um valor limite determinado com base na absorbância média do calibrador, conforme a bula do fabricante (DIASORIN, Itália).

3.6 Procedimentos Moleculares

3.6.1 VHB

3.6.1.1 Extração do DNA do VHB

Foi utilizado o protocolo de extração do kit comercial QIAamp DNA (QIAGEN, Alemanha), conforme instrução do fabricante.

Adicionou-se 20 µL de proteinase K em 200 µL de soro e 200 µL de tampão de lise. Incubou-se a 56°C por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 200 µL de etanol 96%. Esta solução foi transferida para tubo contendo a coluna de purificação, a qual centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. Descartado o material que passou, a coluna foi lavada com tampão 500 µL de tampão AW1 e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Descartado o líquido resultante, foi realizada nova lavagem com 500 µL de tampão AW2, e centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos. Para eluir o DNA, foi adicionado 50 µL de tampão AE e o produto obtido foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.6.1.2 Genotipagem do VHB por Iniciadores Tipo-Específico

Amostras identificadas como HBsAg positivas foram submetidas ao sistema de genotipagem utilizando-se nested PCR com iniciadores tipo-específico que determinam os genótipos A, B, C, D e F do vírus da hepatite B, de acordo com a metodologia descrita por Naito et al., 2001 (Figura 7). A primeira PCR amplifica a região da superfície do VHB, pré-S1 e S e geram produtos de 1.063 pb. A segunda PCR consiste em duas misturas específicas para os genótipos. A Mistura A é específica para os genótipos A, B e C e a mistura B é específica para os genótipos D, E e F.

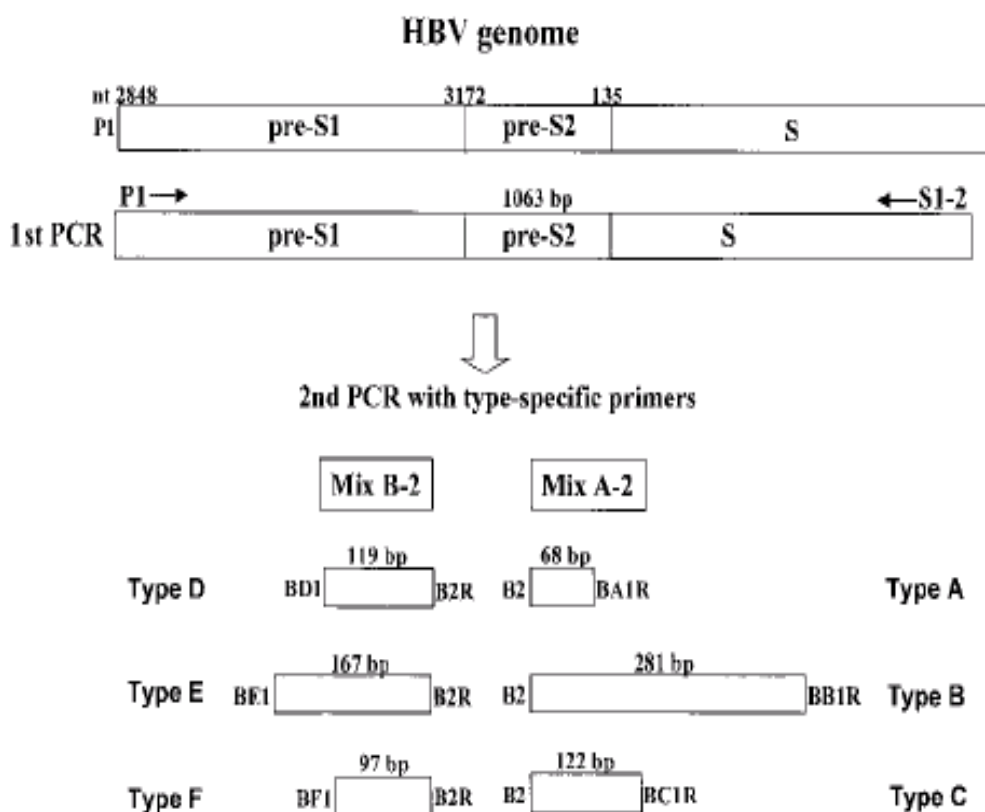


Figura 7 – Estratégia para a genotipagem do VHB por PCR usando os iniciadores tipo-específicos. (Adaptado de NAITO et al., 2001)

3.6.1.2.1 Preparação dos Iniciadores

Os iniciadores utilizados nas reações para a amplificação do genoma do HBV foram: P1, S1-2, B2, BA1R, BB1R, BC1R, BD1, BE1, BF1, B2R (NAITO et al., 2001) sintetizados pela empresa Life Technologies (Quadro 4).

Iniciadores	Sequência ^a (posição, polaridade e especificidade)
Primeira PCR	
P1	5'-TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-39 (nt 2823–2845, sense universal,)
S1-2.....	5'-CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-39 (nt 685–704, antisense, universal,)
Segunda PCR	
Mix A	
B2.....	5'-GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-39 (nt 67–86, tipos A to E sense, específico,)
BA1R	5'-CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-39 (nt 113–134, tipo A antisense, específico,)
BB1R.....	5'-CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-39 (nt 324–345, tipo B , antisense, específico)
BC1R.....	5'-GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-39 (nt 165–186, tipo C antisense, específico)
Mix B	
BD1	5'-GCC AAC AAG GTA GGA GCT-39 (nt 2979–2996, tipo D sense, específico,)
BE1.....	5'-CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-39 (nt 2955–2978, tipo E sense, específico)
BF1	5'-GYT ACG GTC CAG GGT TAC CA-39 (nt 3032–3051, tipo F sense, específico)
B2R.....	5'-GGA GGC GGA TYT GCT GGC AA-39 (nt 3078–3097, tipos D to F ,antisense, específico)

Legenda: ^a “M” representa um nucleotídeo que poderia ser tanto uma A ou uma C; o “Y” representa um nucleotídeo que poderia ser tanto uma C ou uma T.

^b A sequência para o “primer” P1 foi determinada por LINDH et al. (1998).

Quadro 4 – Sequência de iniciadores usados para a genotipagem do VHB por *nested* PCR. Adaptado de NAITO et al. (2001)

3.6.1.2.2 Metodologia da *nested* PCR

a) Primeira PCR: Cada microtubo continha a mistura de 50 µL da reação constituída por 37,8 µL de água ultrapura, 5 µL de tampão 10X (Promega Gold Star) contendo 500mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 160µg/mL BSA, 2mM cada dNTP (pH 8.2-8.4); 1 µL de cada um dos iniciadores contendo 50 pMol cada: P1 e S1-2 e 0,2 µL de *Taq* Platinum DNA polimerase (Life Technologies), acrescentaram-se 5 µL de amostra extraída. As amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, que consistiu de 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para desnaturação; 40 ciclos de 94°C por 20 segundos (desnaturação), 58°C por 20 segundos (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão), 1 ciclo de 72°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

A cada protocolo da reação foi acrescentada uma amostra de água como controle negativo e uma amostra como controle positivo.

b) Segunda PCR: A cada 49 μL da mistura da segunda Mix/PCR, constituída por 39,8 μL de água Milli Q, 5 μL de tampão 10X (Promega Gold Star), 1 μL de cada um dos “iniciadores” contendo 50 pMol cada: B2, BA1R, BB1R, BC1R, para o Mix A, e os “oligonucleotídeos” BD1, BE1, BF1, B2R para o Mix B; e 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies), foi adicionado 1 μL do produto da primeira reação de PCR. As amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, que consistiu de 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para desnaturação; 20 ciclos de 94°C por 20 segundos (desnaturação), 58°C por 20 segundos (anelamento), 72°C por 30 segundos (extensão), mais 20 ciclos de 94°C por 20 segundos (desnaturação), 60°C por 20 segundos (anelamento), 72°C por 30 segundos (extensão), 1 ciclo de 72°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

A cada protocolo da reação foi acrescentada uma amostra de água como controle negativo e uma amostra como controle positivo.

3.6.1.2.3 Identificação do Produto da PCR

Após a amplificação, a identificação do produto obtido pela *nested* PCR, foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2,5%. Para isto, foram aplicados 6 μL do produto final misturado com 2 μL de tampão de amostra (glicerol 40% e azul de bromofenol 0.1%) em gel de agarose 3% preparado em tampão Tris-Borato EDTA (TBE 0.5X) com 0.005% de brometo de etídio. O controle positivo e os negativos, além de um marcador de peso molecular de 50pb (Life Technologies), foram também aplicados ao gel.

O Mix A permitiu a detecção específica dos produtos de PCR para os genótipos A, B, C; e o Mix B permitiu a detecção dos genótipos D, E e F. Os produtos de PCR genótipo específico foram reconhecidos claramente pelos diferentes tamanhos na eletroforese. Assim, os tamanhos para os respectivos genótipos foram:

- Genótipo A 68 pb
- Genótipo B 281 pb
- Genótipo C 122 pb
- Genótipo D 119 pb
- Genótipo E 167 pb
- Genótipo F 97 pb

3.6.2 VHD

3.6.2.1 Extração do RNA do VHD

Foi utilizado o protocolo de extração do kit comercial QIAamp RNA (QIAGEN, Alemanha), conforme a instrução do fabricante.

Adicionou-se 560 µL de buffer AVL preparado contendo o carrier RNA em 140 µL de soro. Incubou-se a temperatura ambiente (15 a 25°C) por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 560 µL de etanol (96-100%). Em seguida 630 µL desta solução foi transferida para tubo contendo a coluna de purificação, e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Descartado o material que passou, trocou-se a coluna para um tubo limpo e transferido mais 630 µL para a coluna de purificação, e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Descartado o material que passou, a coluna foi lavada com tampão 500 µL de tampão AW1 e centrifugado a 8.00 rpm por 1 minuto. Descartado o líquido resultante, foi realizada nova lavagem com 500 µL de tampão AW2 e centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos. Para eluir o RNA, foi

realizado uma dupla eluição, usou-se 2 vezes 40 *ul de Buffer AVE* e armazenado a -70°C até o momento de usar.

3.6.2.2 Preparação dos Iniciadores

Os iniciadores usados para a síntese do cDNA foram randômicos, comercialmente disponíveis (Invitrogen Life Technologies). Para a PCR utilizou-se os iniciadores 5414 e 5415 (Quadro 05) conforme protocolo da literatura (Casey, 1996)

Os iniciadores foram diluídos com água ultrapura na concentração de 50 pMoles (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Nome	Seqüência	Posição Genoma	Pares Base
5414	5'- GAG ATG CCA TGC CGA CCC GAA GAG - 3'	883-906	405
5415	5 - GAA GGA AGG CCC TCG AGA ACA AGA - 3'	1288-1265	

Quadro 5 – Iniciadores do VHD utilizados na reação da PCR.

3.6.2.3 RT-PCR VHD

Em todas as amostras de soro positivas para o marcador anti-delta foi realizada a detecção do VHD RNA através da técnica de semi-*nested* RT-PCR, de acordo com a metodologia descrita por Casey et al. (1996).

3.6.2.3.1 Síntese do cDNA

O extrato RNA foi transferido para um tubo de 0,5 mL e submetido a desnaturação por 3 minutos. Cerca de 1 µg de RNA foi adicionado a 10 µL de reação de transcrição reversa contendo 4,5 µg/µL de iniciador randômico (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,1mM de DTT (Invitrogen Life Technologies, USA), 200 mM de cada desoxinucleotideo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen Life Technologies, USA), 10 unidades de inibidor

ribonuclease (RNaseOUT™ Invitrogen Life Technologies, USA), 200 unidades de Transcriptase reversa. Esta solução contendo o material a ser transcrito foi submetido a repetidos ciclos de variação de temperatura, em um termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient), que consistiu de 1 ciclo de 37°C por 15 minutos; 1 ciclo de 42°C por 15 minutos; 1 ciclo de 95°C por 5 minutos e 1 ciclo de 72°C por 7 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

Nesta etapa, o RNA viral presente na alíquota através da ação da transcriptase reversa foi totalmente transcrito em DNA complementar (cDNA). O cDNA sintetizado foi então adicionado diretamente à reação de amplificação ou armazenado a -20° C.

3.6.2.3.2 Determinação qualitativa do VHD RNA (Amplificação do cDNA)

Um total de 10 µL de cDNA foi amplificado em 40 µL a mistura da reação, contendo 20 mM de Tris-HC(pH 8.0), 50 mM de KCl, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada desoxinucleotideo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25 pmoles de oligonucleotídeos 5414 e 5415, 5 unidades de *Taq* Polimerase (Invitrogen Life Thecnologies). Esta solução contendo o material a ser amplificado foi submetido a repetidos ciclos de variação de temperatura, em um termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient), que consistiu de 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para desnaturação; 35 ciclos de 94°C por 1 minutos (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão), 1 ciclo de 72°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado. O produto final obtido deveria produzir um fragmento de aproximadamente 405 pares de base.

Para cada reação da PCR foram incluído um controle positivo e um controle negativo (água).

3.6.2.4 Genotipagem do VHD por Análise do Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) com por Enzima de Restrição *Sma I*

As amostras positivas para o HDV RNA foram submetidas a genotipagem através da metodologia RFLP. O produto amplificado obtido foi digerido com a enzima de restrição, *Sma I* (Invitrogen Life Thecnologies) a partir da seguinte reação : 5 µL do produto da PCR foram incubados por 2 horas a 37°C, com 5U da enzima de restrição.

Esta técnica permite a detecção específica dos produtos da PCR para os genótipos I, II e III (CASEY et al.,1996). Os sítios de restrição da enzima *SmaI* encontram-se abaixo:

5'- CCC GGG-3'

3'- GGG CCC – 5'

Esta metodologia já foi validada em estudo anterior, comparando-a com o sequenciamento direto dos produtos da PCR (CRISPIM et al., 2005).

3.6.2.4.1 Identificação do produto por RFLP com enzima de restrição

Após a incubação com a enzima *Sma I*, a identificação do produto da digestão foi detectado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Para isto, foram aplicados no gel 10 µL do produto digerido, ao qual foi adicionado 2 µL do tampão de amostra (glicerol 40% e azul de bromofenol 0,1%). Na corrida utilizou-se o tampão tris-borato EDTA (TBE 1X) . Controle positivo e o controle negativo, além de um marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), foram também aplicados no gel. Após a corrida, o gel foi visualizado e analisado em sistema de fotodocumentação, com transiluminador UV (Vilber Lourmar). O produto da digestão foi analisado de acordo com o quadro abaixo :

Genótipos	Análise do produto digerido
I	227 pb + 178 pb
II	405 pb (não digere)
II	298 pb + 107 pb

Quadro 6 – Polimorfismo dos genótipos baseado na análise por RFLP do produto do VHD-RT-PCR usando enzima restrição *Sma I*

4. RESULTADOS

4.1 Características da População Amostral

A população de estudo foi constituída por 54 indivíduos do sexo feminino (28,4%) e 136 do sexo masculino (71,6%), cuja média de idade foi 38,0 anos (DP=9,5) e 37,0 anos (DP=10,6), respectivamente.

Na tabela 8 encontra-se a distribuição do número de amostras de doadores de sangue e pacientes, segundo a sub-região de nascimento, de acordo com o Anuário Estatístico do Amazonas (2001).

Tabela 1

Distribuição das amostras segundo a sub-região de nascimento dos participantes

Sub-regiões Amazonas e outros Estados	Doador Nº	Paciente Nº	Nº	%
1. Alto Solimões	05	01	06	3,2
2. Jutai/Solimões/Juruá	04	04	08	4,2
3. Purus	11	13	24	12,6
4. Juruá	10	16	26	13,7
5. Madeira	03		03	1,6
6. Alto Rio Negro	01	01	02	1,1
7. Rio Negro/Solimões	58	14	72	37,9
8. Médio Amazonas	06	01	07	3,6
9. Baixo Amazonas	01	-	01	0,5
10. Outras UF Norte	18	09	27	14,2
11. Demais regiões (*)	13	01	14	7,4
Total	130	60	190	100,0

(*) Indivíduos procedentes da Amazônia Ocidental Brasileira

O maior percentual de amostras foi proveniente da sub-região Rio Negro/Solimões 72/190 (37,9%), a qual inclui os municípios de Manaus, Anamã, Anourí, Autazes, Careiro, Coari, Codajás, Manacapuru e Manaquiri, onde se concentra a maioria da população do Estado do Amazonas.

4.2 Análise dos Genótipos do VHB

Entre as 190 amostras de soro submetidas para genotipagem do VHB, somente 161 (84,7%) puderam ser genotipadas pela metodologia com iniciadores tipo-específicos, sendo que 29 (15,3%) não amplificaram na PCR.

Na Figura 8 encontra-se o perfil eletroforético obtido após amplificação dos produtos da *nested* PCR, com iniciadores específicos, correspondentes aos três genótipos encontrados no presente estudo. O Mix A permitiu a detecção específica dos produtos da PCR para o genótipo A, correspondente a 68pb; e o Mix B permitiu a detecção dos genótipos D e F, correspondente a 119pb para o genótipo D e 97pb para o genótipo F.

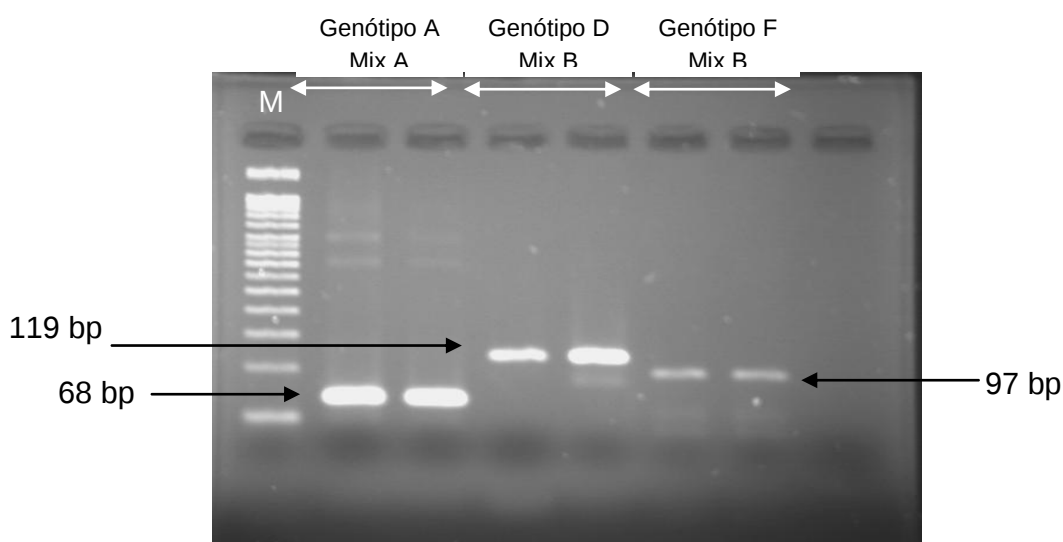


Figura 8 – Perfil eletroforético de amostras amplificadas por *nested* PCR utilizando iniciadores específicos. O produto final amplificado corresponde a 68pb para o genótipo A, 97 pb genótipo F e 119 pb genótipo D. M-marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).

Os resultados dos genótipos do VHB das 161 amostras mostraram a presença dos genótipos A, D e F, sendo que o genótipo mais freqüente foi o A, encontrado em 56,5% (n=91) das amostras. O segundo genótipo mais freqüente foi o F 25,5% (n=41), seguido do genótipo D 18,0% (n=29). A distribuição dos genótipos encontrados entre as 161 amostras está representada na Figura 9.

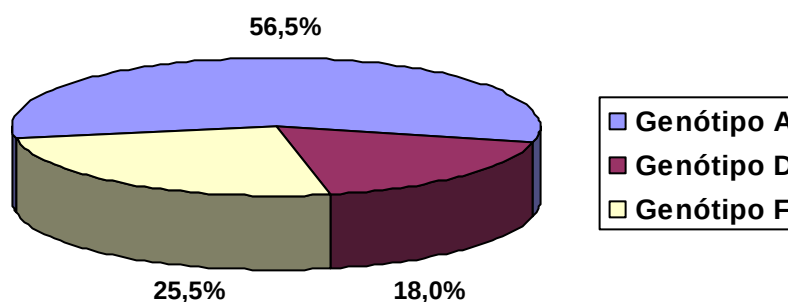


Figura 9 – Distribuição dos genótipos do VHB procedentes da Amazônia Ocidental Brasileira (n=161).

4.2.1 Distribuição dos Genótipos do VHB de acordo com a Naturalidade do Participante

Em nosso estudo, foram incluídos indivíduos procedentes de diferentes áreas da Amazônia Ocidental brasileira. Para a apresentação dos resultados, optou-se por analisar os genótipos segundo a sub-região de nascimento do participante.

A Tabela 2 apresenta a distribuição dos genótipos, segundo a naturalidade do participante, onde se observa que o genótipo A é predominante em todas as microrregiões, o genótipo D é encontrado com maior freqüência entre os indivíduos cuja naturalidade é de outras regiões do país, enquanto o genótipo F encontra-se distribuído em todas as sub-regiões de modo uniforme.

Tabela 2

Distribuição dos genótipos do VHB, segundo a naturalidade do participante.

Sub-regiões Amazonas e outros Estados	Genótipos VHB						Total
	A		D		F		n
	n	%	n	%	n	%	
1. Alto Solimões	03	75.0	-	-	01	25.0	04
2. Jutai/Solimões/Juruá	03	42.8	02	28.6	02	28.6	07
3. Purus	11	50.0	05	22.7	06	27.3	22
4. Juruá	13	52.0	03	12.0	09	36.0	25
5. Madeira	01	33.3	-	-	02	66.7	03
6. Alto Rio Negro	01	50.0	-	-	01	50.0	02
7. Rio Negro/Solimões	30	55.5	10	18.5	14	25.9	54
8. Médio Amazonas	06	85.7	-	-	01	14.3	07
9. Baixo Amazonas	01	100.0	-	-	-	-	01
10. Outras UF Norte	15	68.2	04	18.2	03	13.6	22
11. Demais regiões(*)	07	50.0	05	41.4	02	14.3	14
TOTAL	91	56.5	29	18.0	41	25.5	161

(*) Indivíduos procedentes da Amazônia Ocidental Brasileira

4.2.2 Distribuição dos Genótipos do VHB de acordo com a Reatividade para Anti-Delta

Testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-delta foram realizados em 190 amostras de soros de indivíduos reativos para o HBsAg, procedentes das diversas áreas da Amazônia Ocidental Brasileira. Entre as amostras estudadas, 50 (26,3%) amostras foram positivas para o anti-delta e as demais 140 (73,7%) foram negativas para este marcador sorológico.

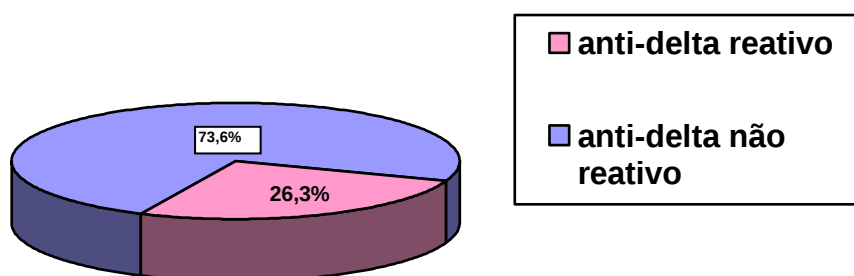


Figura 10 – Distribuição dos genótipos do VHB de acordo com a reatividade anti-delta.

A tabela 3 apresenta os resultados dos genótipos do HBV de acordo com a reatividade para anti-delta. Não houve diferença significativa entre os genótipos do VHB a reatividade para anti-delta, embora tenha ocorrido uma frequência maior do genótipo A entre os pacientes não reativos para anti-delta e de F entre os pacientes anti-delta reativos.

Tabela 3

Distribuição dos genótipos do VHB, de acordo com a reatividade para anti-delta.

Genótipos HBV	Anti-Delta reativo		Anti-Delta Não Reativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
A	18	45,0	73	60,3	91	56,5
D	7	17,5	22	22,0	29	18,0
F	15	37,5	26	18,2	41	25,5
Total	40	100,0	121	100,0	161	100,0

Qui-quadrado=4,28 p=0,11

Entre as 50 amostras anti-delta positivas que foram submetidas para genotipagem do VHB, somente 40 (80%) puderam ser genotipadas pela metodologia com iniciadores tipo-específicos, sendo que 10 (20%) não amplificaram na PCR.

Na Tabela 4 apresenta-se a distribuição dos genótipos do VHB, segundo a naturalidade de acordo com as sub-regiões nas quais foram detectados os indivíduos anti-delta reativos, na qual observa-se que o genótipo A é predominante em todas as microrregiões, seguido do genótipo F e D.

Tabela 4

Distribuição dos genótipos do VHB, segundo as sub-regiões em que foram detectados os indivíduos anti-delta reativos

Sub-regiões Amazonas e outros Estados	Genótipos VHB						Total
	A		D		F		
	n	%	n	%	n	%	
1.Alto Solimões	01	100,0	-	-	-	-	01
2. Jutai/Solimões/Juruá	01	33,3	02	66,7	-	-	03
3. Purus	03	33,3	01	11,1	05	55,6	09
4. Juruá	09	47,4	02	10,5	08	42,1	19
5. Madeira	-	-	-	-	01	100,0	01
6. Alto Rio Negro	01	50.0	-	-	-	-	01
7. Rio Negro/Solimões	-	-	02	66,7	01	33,3	03
10. Outras UF Norte	03	100,0	-	-	-	-	03
TOTAL	18	45,0	07	17,5	15	37,5	40

4.3 Análise dos Genótipos do VHD

4.3.1 RT-PCR do VHD

Das 50 amostras positivas para anti-delta, 34(68%) foram positivas para o VHD RNA, sendo que 16 (32%) amostras não amplificaram na RT-PCR. O tamanho do fragmento amplificado nesta etapa, como esperado, correspondeu a cerca de 405pb, conforme Figura 11.

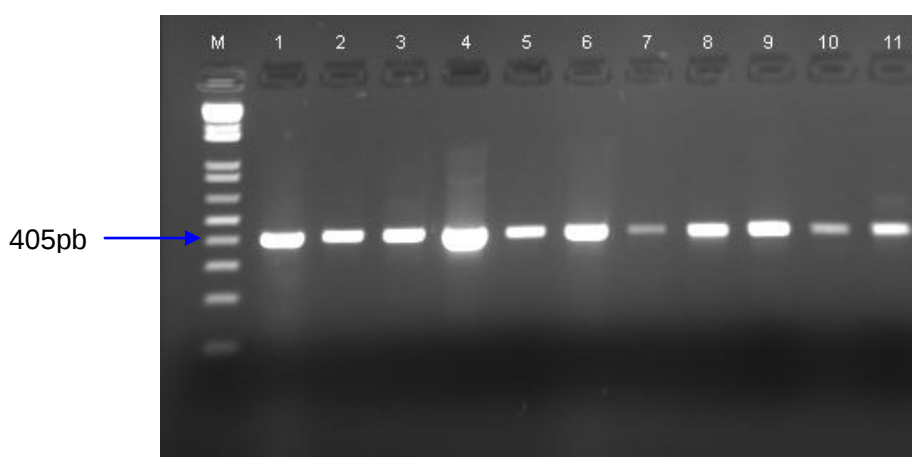


Figura 11 – Perfil Eletroforético dos Produtos de amplificação do RNA do VHD por RT-PCR. 1 – 10 Amostras positivas para o RNA viral a partir dos iniciadores 5414 e 5415; 11 – controle positivo. M – Marcador de peso molecular de 100pb (*Invitrogen Life Technologies*).

4.3.2 Genotipagem VHD através de Enzima de Restrição

Todas as 34 amostras positivas para o VHD RNA foram submetidas a genotipagem com a enzima de restrição *SmaI* (*Invitrogen Life Technology*). O genótipo identificado nas 34 amostras amplificadas foi somente o genótipo III, sendo que não encontramos os genótipos I e II do VHD. O produto da digestão encontrado no genótipo III é caracterizado por dois fragmentos de 107 pb e 298 pb respectivamente, como mostra a figura 12.

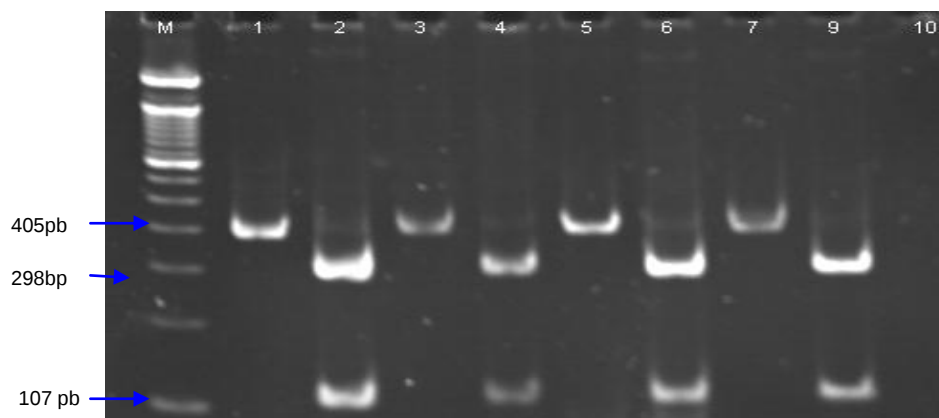


Figura 12 – Resultado da genotipagem por enzima de restrição. M – marcador de peso molecular (Ladder de 100 pb); os números 1, 3, 5 e 7 com 405 pb representam amostras não digeridas; Os números 2, 4 e 6 representam amostras digeridas com a enzima de restrição *SmaI* com 107 pb e 298 pb; e os números 9 e 10 os controles positivo digerido e negativo respectivamente.

5. DISCUSSÃO

As amostras de soro selecionadas para este trabalho, representam um amplo aspecto da população amazonense, visto que o Estado do Amazonas recebe um grande número de migrantes procedentes de várias regiões, particularmente da Amazônia Ocidental, constituída pelos Estados do Acre, Roraima, Rondônia, além do Amazonas. O mesmo acontece com os pacientes do Ambulatório de Hepatites Virais da Universidade Federal do Amazonas, que recebe indivíduos oriundos do interior do Amazonas, e de outros Estados da região Norte, que se deslocam de seu município em busca de diagnóstico. O maior percentual de amostras obtidas foi representado por participantes cujo local de nascimento foi a sub-região Rio Negro/Solimões (37,9%) que inclui Manaus e municípios próximos à Manaus, devido a maior proximidade dos centros de diagnóstico.

Houve predomínio do sexo masculino (71,2%) no universo do estudo, devido aos participantes serem doadores de sangue, em sua maioria, com uma razão entre o sexo masculino e feminino igual a 2,5.

Genótipos do VHB

O método de genotipagem empregado permitiu a detecção dos genótipos do VHB em 161 amostras (84,7%). Apesar de 29 amostras não terem sido amplificadas, possivelmente devido a uma baixa carga viral, podemos considerar também problemas na especificidade dos iniciadores empregados, em decorrência de possível variabilidade genética do VHB, na região geográfica estudada.

Os genótipos B, C e E do VHB não foram encontrados em nossas amostras, uma vez que são genótipos encontrados em populações da África e Sudeste da Ásia, embora, paciente procedente de Angola, e raros casos dos genótipos B e C foram descritos entre imigrantes asiáticos. (STINIK et al; 2002; STINIK et al; 2004).

Os genótipos G e H não foram pesquisados, devido à metodologia utilizada no presente estudo detectar somente os genótipos de A – F. Ressalta-se que o genótipo G foi raramente encontrado entre pacientes dos Estados Unidos e França, tendo sido isolado em três pacientes, no Rio de Janeiro. (STUYVER et al., 2000; BOTTECCHIA et al., 2006).

Neste estudo a genotipagem das amostras do VHB mostrou que 54,6% pertenciam ao genótipo A, o qual foi o mais prevalente, e 25,8% o genótipo F o segundo mais freqüente, e 19,6% genótipo D o qual foi o menos freqüente.

Na Amazônia Ocidental e Oriental estudos têm confirmado um predomínio do genótipo A, seguido pelo F, sendo o D menos freqüente o que confirma os nossos achados. (CONDE et al, 2004; VIANA et al, 2005; OLIVEIRA; 2007). Nas demais regiões brasileiras, os estudos também demonstram o genótipo A como o mais prevalente no país (DE CASTRO, 2001; STINIK et al, 2004; TELES et al, 1999; MORAES, 1996)

A análise da freqüência dos genótipos segundo a naturalidade dos participantes, permitiu observar que o genótipo A foi predominante em todas as sub-regiões estudadas, que o genótipo D é encontrado com maior freqüência entre os indivíduos de outras regiões do país, enquanto que o genótipo F encontra-se distribuído em todas as sub-regiões de modo uniforme.

A maior prevalência de infecção com o genótipo A, o qual é pandêmico, poderia ser explicada pelos intensos movimentos migratórios de europeus e africanos para o Brasil, durante a colonização, uma vez que este genótipo é característico da Europa, América, Índia e África.

O genótipo D, característico de países mediterrâneos, Estados Unidos e Índia foi o menos freqüentemente encontrado na Amazônia Ocidental, sendo, entretanto, o mais prevalente entre indivíduos, cuja naturalidade era de outras regiões geográficas brasileiras, sugerindo uma introdução mais recente na região amazônica.

O genótipo F, o segundo mais freqüentemente encontrado, é o mais distante do ponto filogenético, sendo característico das populações ameríndias, o que pode refletir uma antiga segregação dos genótipos entre o Velho e o Novo Mundo. Sua ocorrência foi bastante semelhante entre as sub-regiões, confirmando a sua circulação entre as populações amazônicas. No estudo de Bertolini et al (2000), o genótipo F foi detectado em 77,3% dos casos em três comunidades indígenas da região amazônica.

A genotipagem das amostras provenientes de cinco países da América Central (Nicarágua, Costa Rica, Guatemala, El Salvador e Honduras) detectou a presença do genótipo F em 79% das amostras, além de 14% do genótipo A, 6% do D e 1% do C, reforçando o F como o genótipo nativo da região (ARAUZ RUIZ et al., 1997a).

Importância clínica dos genótipos de VHB

A associação entre os genótipos do VHB com a história natural da infecção e com a resposta ao tratamento tem sido extensivamente investigada. Na Ásia, onde os genótipos B e C são prevalentes, o genótipo C tem sido associado a um maior risco de cirrose e hepatocarcinoma, em contraste com o genótipo B (KAO, 2002). Achados similares têm sido reportados no Japão, uma vez que, em indivíduos com cirrose foi detectado um maior número de pacientes com genótipo C comparado ao genótipo B (KOBAYASHI et al., 2002). Hepatocarcinoma tem sido mais prevalente em pacientes com genótipo C do que o genótipo B na China e Japão (ORITO et al., 2001; DING et al., 2001).

Em relação a soroconversão do HBeAg para anti-HBe é mais freqüente entre indivíduos infectados com o genótipo B do que o genótipo C (ORITO, 2001; CHU et al, 2002; SUMI et al, 2003; KAO, 2003; YUEN et al, 2004).

Os genótipos do VHB também têm sido relacionados à resposta terapêutica. Pacientes com genótipos C e D têm uma baixa resposta ao interferon alfa quando comparados com genótipos A e B e entre pacientes que usam Lamivudine, a resposta tem sido melhor no

genótipo B do que no genótipo C (KAO et al, 2000; HOU et al , 2001). E ZOLLNER et al (2001) observaram que portadores do VHB subtipo *adw* (indicativo do genótipo A) apresentam 20 vezes mais risco de desenvolverem resistência a lamivudina do que pacientes infectados pelo subtipo *adw* (indicativo do VHB genótipo D da Europa (ZOLLNER et al, 2001).

Estudos prévios sobre a história da evolução do VHB têm sugerido que recombinação inter-genótipos e complexos padrões de substituição de nucleotídeos provocados por seleção natural, teriam levado à atual classificação. (FARES e HOLMES, 2002)

A evolução dos genótipos do VHB em primatas e humanos é ainda obscura, havendo duas teorias divergentes para explicá-la. A primeira propõe que isolados de VHB de uma mesma localização geográfica poderiam ter sofrido cruzamento entre as espécies, isto é, entre humanos e primatas, ao passo que a segunda propõe que todos os genótipos do VHB evoluíram de uma cepa ancestral, que se diferenciou quando os humanos migraram da África há , aproximadamente, 100.000 anos. (SIMMONDS, 2001; FARES e HOMES, 2002)

È possível que a infecção tenha emergido entre humanos, a partir do contato com diferentes primatas infectados com genótipos espécie-específicos, semelhantemente, ao que ocorreu com o HIV. A origem a partir de primatas é suportada pela observação de que áreas de alta prevalência de VHB em humanos são aquelas onde o contato e a transmissão cruzada a partir de primatas são mais prováveis, como a América do Sul, África Sub-Sahariana e Sudeste da Ásia. (SIMMONDS, 2001)

Por outro lado, a presença do F em populações nativas da América, é inconsistente com a presença dos genótipos B e C em asiáticos da Mongólia, já que as duas populações são geneticamente aparentadas. (SIMMONDS, 2001)

No estágio atual do conhecimento, as hipóteses existentes não permitem conclusões sobre a origem do VHB.

Genótipos do VHD

Encontramos em nosso estudo somente o genótipo III do VHD, confirmando os achados de estudos anteriores, os quais têm reportado que o genótipo III do VHD é exclusivo da América do Sul, predominando nas populações indígenas da bacia amazônica. Na Amazônia brasileira, Kiesslich et al (2003a) caracterizaram pela primeira vez o genótipo III do VHD, entre pacientes oriundos da Amazônia Ocidental.

Entretanto, estudo em 23 amostras, coletadas em doze municípios do Estado do Acre, mostrou um predomínio do genótipo I em 70% , sendo o genótipo III encontrado em 26%, e somente um paciente apresentou infecção mista do genótipo I e do genótipo III (4%) (MOLINET, 2004). O genótipo I do VHD foi descrito também por Quintero na Venezuela, que identificou um caso isolado entre ameríndios da Venezuela, possivelmente, relacionado a transmissão através de imigrante europeu (QUINTERO et al., 2001).

Estudos realizados no Peru, Colômbia e Venezuela têm encontrado o genótipo III do VHD associado ao genótipo F do VHB, porém, em nosso estudo não observamos associação entre o genótipo III e os genótipos do VHB, uma vez que, em nossa amostra de pacientes com VHD, 45% apresentavam o genótipo A, 17,5% o genótipo D e 37,5% o genótipo F.. (CASEY, 1993; CASEY et al, 1996; NAKANO et al, 2001).

Relevância clínica dos genótipos do VHD

Considerando a variabilidade genética do VHD e os padrões clínicos, atualmente já descritos, é possível sugerir que há uma associação entre os genótipos do VHD e as manifestações clínicas. Estudos realizados têm mostrado que o genótipo I apresenta maior severidade na agressão hepática, quando comparado ao genótipo II. Entretanto, diversos relatos têm indicado o genótipo III como o mais agressivo, uma vez que este, tem sido associado a formas graves de hepatites, inclusive fulminantes. Lesões específicas do fígado,

incluindo células em mórula, foram descritas em pacientes com hepatite grave (CASEY et al., 1993). É considerado que o genótipo III do VHD, em associação com o genótipo F do VHB, conduziria a uma hepatite aguda severa. Por contraste, o genótipo II e IV estariam associados a doença menos severa. (WU et al, 1995). Porém, estudos recentes entre pacientes das ilhas de Miyako e Okinawa sugerem que a variante IIB, que na nova classificação corresponde ao genótipo IV, levaria a uma maior progressão para hepatite crônica e cirrose (WATANABE et al, 2003). Certamente, outros fatores como o tempo, a duração da infecção, a carga viral, o aparecimento de mutações, o genótipo do VHB e a imunidade do paciente podem contribuir para a história natural da infecção. (DIEYE et al. 1999; LE GAL et al, 2005; WU et al., 2005).

A associação de um genótipo, em particular genótipo III, com a forma grave de hepatite que ocorre na região norte da América do Sul, apóia a hipótese que fatores genéticos do VHD possam ser determinantes na patogênese da hepatite Delta. A proteína curta (S-HDag) é necessária para a replicação viral do RNA e a proteína longa (L-HDag), especificamente a região do carbono terminal, inibe a replicação e promove o empacotamento do RNA do vírus. A principal diferença entre os genótipos do VHD reside no carbono terminal da proteína longa do HDag e no grupo amino(N) terminal. É possível que as diferenças nestas regiões entre os diferentes genótipos, determinam variações na capacidade do empacotamento do RNA viral com o HBsAg, graus variáveis de inibição da replicação do RNA do vírus, ou diferentes interações com fatores do hospedeiro, incluindo o sistema imunológico (CASEY et al., 1993).

Outra característica genotípica que poderia estar relacionada com a patogênese, é que a estrutura formada pelo genótipo III, apresenta diferenças em relação ao genótipo I. O genótipo I exibe uma estrutura particular de bases pareadas, esta estrutura é requerida para a máxima edição do RNA. No caso do genótipo III, as bases pareadas são interrompidas por uma série de 5 aminoácidos na região da sequência a ser editada (CASEY e GERIN, 1998).

Esta alteração na estrutura do genótipo III, pode resultar em uma menor formação de ARN, e desta maneira limitar a quantidade de proteína longa. A L-HDAg é postulada para reduzir a replicação genômica e limitar a infecção. A diminuição desta proteína em pacientes portadores do genótipo III, provocaria um aumento da replicação viral, podendo influenciar na patogênese da hepatite fulminante, causada pelo genótipo III do VHD.

Estudos do genótipo I e III, em cultura celular, da replicação de clones dos genótipos I e III demonstrou a forte inibição de replicação do RNA do Genótipo I pelo AgHD do genótipo III, o que poderia ter implicações para esclarecer a biologia molecular e a epidemiologia deste agente, como também para o desenvolvimento de terapias modernas. A forma curta do AgHD do genótipo III tem as características de ligar-se debilmente ao ARN do genótipo I. Uma possibilidade alternativa envolve a interação direta entre a forma curta do HDAg-S dos genótipos I e III de maneira que a atividade da replicação do AgHD do genótipo I seja inibido. Neste caso, a ausência de inibição da replicação do RNA do genótipo III pelo AgHD do Genótipo I poderia ser explicado se o complexo de agHD I – III alterasse a conformação ou a acessibilidade da região amino-terminal do AgHD do genótipo I, que é requerido para a replicação do ARN do genótipo I, mas tem pouco efeito para genótipo III. Embora o mecanismo da inibição do genótipo I pelo genótipo III, sugere a possibilidade do que no ambiente natural, o genótipo III pode ter uma competitividade numa coinfeção com ambos os genótipos. A análise adicional desta atividade inibitória poderia ser usada para desenvolver terapias para inibir a replicação do genótipo I do HDV em pacientes infectados (CASEY e GERIN., 1998).

6. CONCLUSÕES

- Os genótipos A, D e F do VHB são os genótipos prevalentes na Amazônia Ocidental Brasileira;
- O genótipo A foi o mais freqüente, seguido dos genótipos F e o menos freqüente foi o genótipo D;
- O genótipo D foi o genótipo mais prevalente entre indivíduos, cuja naturalidade eram de outras regiões geográficas brasileiras;
- O genótipo III do VHD é o predominante na Amazônia ocidental Brasileira;
- Não há associação entre os genótipos do VHB e a infecção pelo vírus D em pacientes cronicamente infectados;
- A metodologia da PCR com iniciadores tipo-específico utilizada para genotipar o Vírus da Hepatite B e a metodologia da RT-PCR com RFLP utilizada para genotipar o Vírus da Hepatite Delta são ferramentas úteis para o conhecimento dos genótipos de ambos os vírus.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.D.; RUBENSTEIN, D.; STOTT, E.J. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. **Lancet**, v. 2, p. 1225-1227, 1971.

Anuário Estatístico do Amazonas – v. 17. Manaus: **Sead/DEP**; 2001. p.40-41.

ARAUZ-RUIZ, P.; NORDER, H.; VISONA, K. A.; MAGNIUS, L.O. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. **J. Infectious Diseases**, v. 176, p. 851-858, 1997a.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnius LO. Genotype F prevails in VHB infected patients of hispanic origin in Central América and may carry the precore stop mutant. **J. Med. Virol.**; v.51, p. 305-312, 1997b.

ARAUZ-RUIZ, P.; NORDER, H.; ROBERTSON, B.H.; MAGNIUS, L.O. Genotype H: A new amerindian genotype of hepatitis B vírus revealed in Central America. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 2059-2073, 2002.

BENSABATH, G.; BOSHEL, J. Presença do antígeno “Austrália” (Au) em populações do interior do Estado do Amazonas-Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.15, n. 5, p. 284-288, 1973.

BENSABATH, G.; HADLER, S.C.; SOARES, M.C.P.; FIELDS, H.; MAYNARD, J.E. Características serológicas y epidemiológicas de la hepatitis virica aguda em la cuenca Amazonica Del Brasil. **Bol. Of Sanit. Panam.**, v. 103, n. 4, p. 351-362, 1987.

BERTOLINI, D.A; MOREIRA, R.C; SOARES, M. et al. Genotyping of hepatitis B vírus in indigenous populations from Amazon region, Brazil. **Review & Research**. v. 5 (supl 1), p. 101, 2000.

BLITZ, L.; PUJOL, F.H.; SWENSON, P.D.; PORTO, L.; ATENCIO, R.; ARAUJO, M.; COSTA, L.; MONSALVE, D.C.; TORRES, J.R.; FIELDS, H.A.; LAMBERT, S.; VAN GEYT, C.; NORDER, H.; MAGNIUS, L.O.; ECHEVARRIA, J.M.; STUYVER, L. Antigenic diversity of hepatitis B virus strain of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 648-651, 1998.

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

BOLLYKY, P.L.; RAMBAUT, A.; HARVEY, P.H.; HOLMES, E.C. Recombination between sequences of hepatitis B virus from different genotypes. **J. Mol. Evol.**, v. 42, p. 97-102, 1996.

BOTTECCHIA, M; BRANDÃO, C. E.; DO Ó, KR. et al. Detection of hepatitis B virus genotype G in Rio de Janeiro. **OP HBV** 7, p.54, 2006.

BOWYER, S.M.; VAN STADEN, L.; KEW, M.C.; SIM, J.G.M. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 1719-1729, 1997.

BUITRAGO, B.; POPPER, H.; HADLER, S.C.; THUNG, S.N.; GERBER, M.A.; PURCELL, R.H.; MAYNARD, J.E. Specific histologic features of Santa Marta hepatitis: a severe form of hepatitis delta-virus infection in northern South America. **Hepatology**, v. 6., p. 1285-1291, 1986.

CARRILHO, F.J.; MORAES, C.R.; PINHO, J.R.R.; MOREIRA, R.; BERTOLINI, D.; MELLO, I.; LEMOS, M.; GATURA, S.; CARDOSO, R.A.; DA SILVA, L.C.; LAUDANNA, A.A. Infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) em unidades de hemodiálise do estado de Santa Catarina : fatores preditivos de infecção e epidemiologia molecular. **Gastr. End. Dig.**, 20 (Supl.), PO-153, 2001.

CASEY, J.L.; BROWN, T.L.; COLAN, E.J.; WIGNALL, F.S.; GERIN, J.L. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 9016-9020, 1993.

CASEY, J.L. NIRO, G.A.; ENGLE, R.E.; VEGA, A.; GOMEZ, H.; McCARTHY, M.; WATTS, D.M.; HYAMS, K.C; GERIN, J.L. Hepatitis B virus (HBV) / hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon Basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. **J. Infect. Dis.**, v. 174, p. 920-926, 1996.

CASEY, J.L.; GERIN, J.L. Genotype-specific complementation of hepatitis delta virus RNA replication by hepatitis Delta antigen. **Journal of Virology**, v.72, p.2806-2814, 1998.

CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/d/index.htm>. Acesso em: 01/10/2007.

CONDE, S.R.S.S.; MOIA, L.J.P.; BARBOSA, M.S.B.; AMARAL, I.S.A.; MIRANDA, E.C.B.M.; SOARES, M.C.P.; BRITO, E.M.F.; SOUZA, O.S.C.; ARAÚJO, M.T.; DEMACHKI, S.; REBELLO, J.R.P.; MESQUITA, M.G.S.; BERTOLINI, D.A.; ISHAK, R. Prevalência de genótipos e de mutantes pré-core A-1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica, em uma população da Amazônia Oriental. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 37, p. 33-39, 2001.

CONDE, S. et al. Prevalência de genótipos e de mutantes pré-core A-1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica em uma população da Amazônia Oriental. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, p.33-39, 2004.

COUROUCÉ-PAUTY, A.M.; PLANÇON, A.; SOULIER, J.P. Distribution of HBsAg subtypes in the world. **Vox Sang.**, v. 44, p. 197-211, 1983.

CHU C.J., HUSSAIN M., LOK A.S. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HbeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. **Gastroenterology**, v.122, p. 1756-1762, 2002.

CRISPIM, M.A.E.; KIESSLICH, D.; RIBEIRO, F.C.F.; CAMPELLO, S.C. Genotyping comparison by RFLP with the hepatitis delta virus direct sequencing in the amazonian state endemic areas. In.: III Simpósio Internacional de Oncovirologia e XVI Encontro Nacional de Virologia, 2005, Salvador, Brasil. **Resumos**. v. 10, p. 219, 2005.

DAMME, V.P.; VELLING, A. Epidemiology of hepatitis B e C in Europe. **J. Int. Dis. Res.**, v. 44, n. 6, p. 175-181, 1998.

DANE, D.S.; CAMERON, C.H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen associated hepatitis. **Lancet**, v. 1, p. 695-698, 1970.

DAROS, J.; FLORES, R. Characterization of multiple circular RNAs derived from a plant viroid-like RNA by sequence deletions and duplications. **RNA**, v. 1., p.734-744, 1995.

De CASTRO, L; ARAUJO, N.M; SABINO, R., et al. Nosocomial spread of hepatitis B vírus in two hemodialysis units, investigated by restriction fragment length polymorphism analysis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v. 19, p. 531-537, 2001.

DÉNY, P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 307, p. 151-171, 2006.

DING, X.; MIZOKAMI, M.; YAO, G.; et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. **Intervirology**, v.44, p.43-47, 2001.

DIEYE A; OBAMI-ITOU V.; BARRY M.F.; et al. Association between Class I HLA alleles and HBs antigen carrier status among blood donors in Senegal. **Dakar Med.**, v.44,p.166–170, 1999.

FARES M.A.; HOLMES, E.C. A revised evolutionary history of hepatitis B (HBV). **J Mol Evol.**, v.54, p.807-814, 2002.

FATTOVICH, G.; GIUSTINA, G.; CHRISTENSEN, E.; PANTALENA, M.; ZAGNI, I.; REALDI, G.; SCHALM, S.W.; the European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). Influence of hepatitis delta vírus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. **GUT**, v. 46, n. 3, p. 420-426, 2000.

FIGUEIREDO MENDES, T.; SIMONETTI, J.P.; FONSECA, J.C.F. et al. O impacto de hepatite delta. **Moderna Hepatologia**, v.3, pág. 16-22, 1984.

FONSECA, J.C.F.; CASTEJÓN, M.J.; CESÁRIO, A.L.O.; TAVARES, A.M.; VILHENA, R.V.; SIMONETTI, S.R.R.; SIMONETTI, J.P. Prevalência da infecção pelo vírus das hepatites A, B e Delta entre crianças do Estado do Amazonas, Brasil. In: Congresso de Medicina Tropical, 23, 1987. Curitiba. **Anais**: São Paulo, 1987. p. 42.

FONSECA, J.C.F.; SIMONETTI, S.R.; SCHATZMAYR, H.G.; CASTEJÓN, M.J.; CESÁRIO, A.L.; SIMONETTI, P. Prevalence of infection with hepatitis delta vírus among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 469-471, 1988.

FONSECA, J.C.F.; BRASIL, L.; CASTILHO, M.C.; BRAGA, W.S.M. Hepatitis delta virus (HDV) infection in the brazilian amazon basin and its role in chronic liver disease. **Hepatology**, v. 19, n. 4, p. 64, 1994.

GAYOTTO, L.C.C.; QUARENTEI, A.A; CABRAL, G. L. Soroepidemiologia das hepatites A e B nas regiões dos rios Biá e Alto Juruá, Amazônia Ocidental. **GED**, v. 3, n. 4, p. 106-112, 1984.

GARBES-NETTO P., YOSHIDA C.T., CAMILLO-COURA L. Estudo sorológico da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) na região centro-amazonense (Microrregião de Coari). In: XXXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 1995, São Paulo, Brasil. **Resumos**. 1995. p. 01.

GASPAR, A.M.; YOSHIDA, C.F.T. Geographic distribution of HBsAg subtypes in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 2, p. 253-258, 1987.

GERIN JL. The taxonomy of Hepatitis Delta Vírus. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Nishioka K., Susuki H., Tokio, Springer-Verlag p.63-64. 1994.

HADLER S.C., MONZON, N., RIVERO D., et al. Epidemiology and long-term consequences of hepatitis delta virus infection in the yuca Indians of Venezuela. **Am J Epidemiol.**, v.36, n. 12, p.1507-1516, 1992.

HADLER, S.C.; MONZON, N.; PONZETTO, A.; ANZOLA, E.; RIVERO, D.; MONDOLFI, A.; BRANCHO, A.; FRANCIS, D.P.; GERBER, M.A.; THUNG, S.; GERIN, J.; MAYNARD, J.E.; POPPER, H.; PURCELL, R.H. Delta virus infection and severe hepatitis: an epidemic in the Yuca Indians of Venezuela. **Ann. Of. Intern. Medic.**, v. 100, p. 339-344, 1984.

HE LF et al. The size of the hepatitis delta agent. **J Med Virol.** v.27, p.27-31, 1989.

HOOFNAGLE, J.H.; DUSHEIKO, G.M.; SEEFF, L.B.; JONES, E.A.; WAGGONER, J.G.; BALES, Z.B. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. **Ann. Intern. Med.**, v. 94, p. 744-748, 1981.

HOU, J.; SCHILING, R.; JANSSEN, HLA.; et al. Molecular characteristics of hepatitis B virus genotype A confer a higher response rate interferon treatment. **J Hepatol**, v.34, p.1-15, 2001.

JUAREZ, E.; AMARAL, C.; PINHEIRO Jr, F.; BIELLIK, R. Hepatitis B and Delta vaccination program in the Western Amazon region of Brazil. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 364, p. 343-349, 1991.

KAO, J.H.; CHEN, P.J.; LAY M.Y.; CHEN, D.S. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, v.118, p.554-559, 2000.

KAO, J.H. Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. **J. Gastr. Hepat.**, v. 17, p. 643-650, 2002.

KAO, J.H. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Taiwan. **Intervirol**, v. 46, n. 6, p. 400-4007, 2003.

KIESSLICH, D. **Estudo epidemiológico da infecção pelo vírus da hepatite B, em doadores de sangue de Manaus/AM.** São Paulo: USP, 1996. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 1996.

KIESSLICH, D.; CRISPIM M.A.E. et al. Caracterização do genótipo III do vírus da hepatite Delta na Amazônia Brasileira. In: Caracterização do genótipo III do vírus da hepatite Delta na Amazônia Brasileira. In: XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2003, Belém. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 497-497. 2003a.

KIESSLICH, D.; CRISPIM M.A.E. et al. Prevalência de marcadores sorológicos e moleculares do vírus da hepatite B em gestantes do Estado do Amazonas, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde: Revista do Sistema Único de Saúde**, v. 12, n. 3, p. 155-164, jul/set, 2003b.

KOBAYASHI, M.; ARASE, Y.; IKEDA, K.; et al. Clinical characteristics of patient infected with hepatitis B vírus genotype A, B and C. **J. Gastroenterol**, v.37, p.35-39, 2002.

KUO, M.Y.; CHAO, M.; TAYLOR, J. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. **J. Virol.**, v. 63, p. 1945-1950, 1989.

LEE, W.M. Hepatitis B virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n. 24, p. 1733-1745, 1997.

LE GAL f., GORDIEN, E., ALFOLABI, D. et al. Quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus Real-Time PCR indicates differentes patterns of virological response to interferon therapy in chonically infected patients. **J Clin Microb.**, V.43, n.5, p.2363-2369.

LJUNGGREN, K.E.; PATARROYO, M.E.; ENGLE, R.; PURCELL, R.H.; GERIN, J.L. Viral hepatitis in Colombia: a study of the “hepatitis of the Sierra Nevada de Santa Marta”. **Hepatology**, v. 5, p. 299-304, 1985.

LIRA, L.; PARANA, R.; COTRIM, H., et al. The hepatitis delta vírus infection in Salvador, Bahia (Northeast – Brazil). Its correlation with the population of Africa descent. **Acta Hepatol** v.1, n. 2, p. 36-38, 1991.

MADDREY, W.C. Hepatitis B: Important Public Health Issue. **J. Med. Virol.**, v. 61, p. 362-365, 2000.

MAGNIUS, L.O; ESPMARK, J.A. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. **J. Immunology**, v. 109, p. 1017-1025, 1972.

MBAYED, V.A.; LOPEZ, J.L. ; TELENTA, P.F.S. et al. Distribuition os hepatitis B vírus genotypes in two different pedriatric populations from Argentina. **J Clin Micro**, v. 36, n.3, p.362-365.1998.

MBAYED, V.A.; BARDNILI L.;LOPEZ, J.L. e Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus(HBV) genotype F including Argentine isolates. **Arch Virol**, v. 146, n 9, 2001

MOLINET, F.J.L. **Caracterização Genotípica do Vírus da Hepatite Delta no Estado do Acre, Brasil**. Brasília: UnB, 2004. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF; 2004.

MORAES, M.T.; GOMES, S.A.; NIEL, C. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brasil. **Arch. Virol.**, v. 141, n. 9, p.767-773, 1996.

NAITO, H; HAYASHI, S; ABE, K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. **J. Clin. Microbiol**, v. 39, p. 362-364, 2001.

NAKANO, T. et al. Characterization of hepatitis B virus genotypes among Yucpa Indians in Venezuela. **J Gen Virol.**, v.82, p.359-65, 2001.

NAUMANN, H. et al. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. **J Gen Virol.**, v.74, p.1627-1632, 1993.

NEGRO, F.; RIZZETTO, M. Diagnosis of hepatitis delta virus infection. **J. Hepatol.**, v. 22, p. 136-139, 1995.

NIRO G.A.; SMEDILE A.; ANDRIULLI A.; RIZZETTO M.; GERIN J.L.; CASEY J.L. The predominance of hepatitis delta virus genotype I among chronically infected Italian patients. **Hepatology**. V.25, n.3, p.728-734, 1997.

NORDER, H. ; HAMMAS, B.; LEE, S.D.; BILE, K.; COUROUCÉ, A.M.; MUSHAHWAR, I.K.; MAGNIUS, L.O. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains with diverse geographic origin and natural variation in the primary structure of hepatitis B surface antigen. **J Gen Virol**, v.74, p.1341-1348. 1993.

NORDER, H.; COUROUCÉ, A.M.; MAGNIUS, L.O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**. v. 198, p. 489-503, 1994.

OLIVEIRA, C.M. **Análise molecular e implicações biológicas do vírus da hepatite b, em pacientes naturais do Estado do Amazonas. 2007.** [Tese de Doutorado]. 2007 Universidade Federal do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas.

OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; SAKUGAWA, H.; SASTROSOEWIGNJO, R.I.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y.; MAYUIMI, M. Typing Hepatitis B Virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. **J. Gen. Virol.**, v. 69, p. 2575-2583, 1988.

OKOSHI, K.; MURAKAMI, S. Observations on Australia antigen in Japanese. **Vox Sang.**, v. 15, p. 374-385, 1968.

ORITO, E.; ICHIDA, T.; SAKUGAWA, H.; SATA, M.; HORIIKE, N.; HINO, K.; OKITA, K.; OKANOUE, T.; IINO, S.; TANAKA, E.; SUZUKI, K.; WATANABE, H.; HIGE, S.; MIZOKAMI, M. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic VHB infection in Japan. **Hepatology**, v. 34, p.590-594, 2001.

OWIREDU, W.K.; KRAMVIS, A.; KEW, M.C. Hepatitis B virus DNA in serum of healthy black African adults positive for hepatitis B surface antibody alone: possible association with recombination between genotypes A and D. **J. Med Virol.**, v. 64, p. 441-454, 2001.

PRINCE, A.M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 60, p. 814-821, 1968.

QUINTERO, A.; et al. Hepatitis delta virus genotype I and III circulate associated with hepatitis B virus genotype F in Venezuela. **J. of Medical Virology**, v.64, p.356-359, 2001.

RADJEF, N.; GORDIEN, E.; IVANIUSHINA, V.; GAULT, E.; ANAIS, P.; DRUGAN, T.; TRINCHET, J.C.; ROULOT, D.; TAMBY, M.; MILINKOVITCH, M.C.; DENY, P. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. **J. Virol.**, v. 78, p.2537-2544, 2004.

RIZZETTO, M., et al. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (Delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. **Gut**, v.18, p.997-1003, 1977.

RIZZETTO, M.; CANESE, M.G.; GERIN, J.L.; LONDON, W.T.; SLY, D.L.; PURCELL, R.H. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. **GJ. Infect. Dis.**, v.141, n. 5, p. 590-602, 1980.

RIBEIRO, L.C; SOUTO F.J.D. Hepatite Delta no Estado de Mato Grosso: apresentação de cinco casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, n. 6, p.599-602, 2000.

SAKUGAWA, H., et al. Hepatitis Delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. **J Med virol**, v. 58, p. 366-372, 1999.

SILVA, L.C.; PINHO, J.R.R. Hepatitis Virais – Hepatite B. In: GAYOTTO, L.C.C. et al. Doenças do fígado e vias biliares. São Paulo: Atheneu. V.1, p. 441-467, 2001.

SIMONDS, P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. **J. Gen. Virol.**, v. 82, p. 693-712, 2001.

SITNIK, R.; PINHO, J.R.R.; BERTOLINI, D.A.; BERNARDINI, A.P.; SILVA, L.C.; CARRILHO, F.J. Hepatitis B vírus genotypes and precore and core mutants in brazilian patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 6, p. 2455-2460, 2004.

SITNIK, R., **Padronização de reações de sequenciamento para caracterização do vírus da hepatite B: genótipos, subtipos, mutantes na região pré-core, promotor basal do core, epítipo aos antivirais.** São Paulo. 2002. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo. 2002.

SOUTO, F.J.D. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. **Gastro Endos Digest.**, v.94, p.719-726, 1999.

STRAUSS, E. ; GAYOTTO L.C.C., SILVA L.C., et al. Unexpected low prevalence of delta antibodies in the east Amazon region and Sao Paulo: evidence for regional differences in the epidemiology of delta virus within Brazil. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg.** V.81, p.73-74, 1987.

STUYVER, L. et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 702-707. 2000.

SUMI H., YOKOSUKA O., SEKI N., et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. **Hepatology.**, v..37, p.19-26, 2003.

SUGAUCHI, F. ; ORITO, E. ; ICHIDA, T. et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus core gene. **J. Virol.**, v. 76, p. 5985-5992, 2002.

TAYLOR, J.M. Hepatitis Delta Virus: cis and trans- function required for replication. **Cell**, v. 61, p. 371-373, 1990.

TENGAN, F.M.; ARAÚJO, E.S.A. Epidemiologia da hepatite B e D e seu impacto no sistema de saúde. **BJID**, v. 10, sup. 1, p. 6-10, 2006.

TELES A.S. et al. Hepatitis B virus: Genotypes and subtypes in Brazilian hemodialys patients. **Artif.Organs**; 23: 1074-8. 1999.

TELES A.S. et al. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. **J Med Virol.**, v.68, n.1, p.41-49, 2002.

VAUDIN M., et al. The Complete Nucleotide Sequence of the Genome of a Hepatitis B Virus Isolated from a Naturally Infected Chimpanzee. **J Gen Virol**, v.69, p.1383-1389. 1988.

VIANA S., PARANÁ, R.; MOREIRA, R.C.; COMPRI, A.P.; MACEDO, V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the Western Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 4, p. 808-814, 2005.

WANG KS, CHOO QL, WEINER AJ, OU JH, NAJARIAN RC, THAYER RM, et al. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. **Nature**. V. 14, p. 323-508, 1986.

WATANABE, H. et al. Chronic hepatitis delta virus infection with genotype IIb variant is correlated with progressive liver disease. **J. Gen. Virol.**, v. 84. p.3275–3289, 2003.

WEBER, B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. **J. Clin. Virol.**, v. 32, p. 102-112, 2005.

WEI Y.; FOUREL G.; RENARD C-A.; BUENDIA M-A.; TIOLLAIS P. Hepatitis B viruses and hepatocellular carcinoma. In: **Viral hepatitis A to F: an update**. Chicago: American Association for the Study of Liver Diseases, 1994.

WEIZEL, T.M.; MILEY, W. J.; PARKS, T. L.; GOEDERT, J.J.; WHITBY, D.; ORTIZ-CONDE, B.A. Real-time assay for detection and quantification of hepatitis B Virus Genotypes A to G. **J. Clin. Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3325-3333, 2006.

WU, J.C.; CHOO, K.B; CHEN, C.M.; CHEN, T.Z.; HUO, T.I.; LEE, S.D. D. **Lancet**, v. 346, p. 939-941, 1995.

WU JC, CHIANG TY, SHEEN IJ. Characterization and phylogenetic analysis of a novel Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. **J Gen Virol**. v. 13, p. 1105–1113, 1998.

WU J.C; HSU S.C; WANG S.Y. et al. Defective mutations of hepatitis D viruses in chronic hepatitis D patients. **World J Gastroenterol**. v.11, p.1658-1662, 2005.

ZOLLNER, B.; PETERSEN, J.; SCHOTER, M.; et al. Twenty-fold increase in risk of lamivudine resistance HBV subtype. **Lancet**, v.357, p.934-935, 2001.

YUEN, M.F., SABLON E., TANAKA, Y., et al. Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hong Kong. **J. Hepatol.**, v.41, p. 119-125, 2004.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil

Myuki Alfaia Esashika Crispim¹, Nelson Abraham Fraiji¹, Sonia Cordeiro Campello¹, Nicolaus Albert Schriefer², Mariane Martins Araújo Stefani^{3*} and Dagmar Kiesslich¹

Abstract

Background: Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis D virus (HDV) represent important public health problems in the Western Amazon region with reported cases of fulminant hepatitis. This cross sectional study describes HBV and HDV genotypes circulating in the Brazilian Amazon region.

Methods: HBsAg positive individuals (n = 224) were recruited in Manaus/Amazonas State (130 blood donors from the Hematology and Hemotherapy Foundation from Amazonas/HEMOAM; 60 subjects from outpatient clinic) and in Eirunepe city (n = 34) from 2003–2009. Most participants (n = 153) lived in Manaus, 63 were from 20 remote isolated municipalities, 8 lived outside Amazonas State. Genotyping was based on PCR products: HBV genotype A-F specific primers, restricted length polymorphism for HDV. HDV isolates were directly sequenced (delta antigen 405 nucleotide fragment) and phylogenetic analysis performed (MEGA; neighbor-joining, Kimura's two parameter).

Results: Most participants were young adult males and HBV mono-infection predominated (70.5%, 158/224). Among blood donors, outpatient subjects and individuals from Eirunepe, HBV/A prevailed followed by HBV/D and F (p > 0.05). HBV/A was more frequent in blood donors (p < 0.05). HBV-HDV coinfection rate was 8.5% in blood donors (11/130), 65.0% (39/60) in outpatient subjects and 47.0% (16/34) in individuals from Eirunepe. Compared to blood donors, coinfection was higher in outpatient subjects (65.0% versus 8.5%; RR = 5.0; CI 3.4-7.9; p < 0.0001) and in subjects from Eirunepe (47.0% versus 8.5%; RR = 5.5; CI 3.0-9.9; p < 0.0001). HBV-HDV coinfection rates were higher in patients from highly endemic remote cities. Only HDV genotype 3 was detected, HBV/F-HDV/3 predominated (20/38; 52.7%), followed by HBV/A-HDV/3 (31.6%; 12/38) and HBV/D-HDV/3 (15.8%; 6/38).

Conclusions: The description of HBV and HDV genotypes circulating in the western Amazon can contribute to a better understanding of their relevance on the regional epidemics. These infections are highly endemic in the Amazon where their control is challenged by its vast territorial dimension with small, hard-to-reach municipalities dispersed into the jungle and populated by diverse ethnic groups.

Keywords: Hepatitis delta virus, Hepatitis B virus, Genotypes, Molecular epidemiology, Western Amazon, Brazil

Background

Worldwide more than 350 million subjects have chronic infection with hepatitis B virus (HBV) and around 15–20 million people are coinfecting with hepatitis D virus (HDV) [1]. HDV is a defective RNA virus that requires the hepatitis B surface antigen (HBsAg) to become infectious [2].

HBV and HDV share similar transmission routes, primarily parenteral and sexual routes, but in areas of high endemicity as the Amazon basin, vertical and childhood horizontal transmission of HBV also occurs [3,4]. Several reports have shown that chronic HDV-HBV coinfection is associated with more severe liver disease than chronic HBV monoinfection [5,6]. HDV can be acquired by coinfection with HBV or by superinfection of HBV carrier and the clinical outcome of HDV depends on the modality of infection. Coinfection leads mostly to clearance of HBV-HDV in 95% of patients, whereas superinfection results in chronic

* Correspondence: mmastefani@gmail.com

³Federal University of Goiás, Tropical Pathology and Public Health Institute, Goiânia, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Crispim et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

infection in over 90% of the patients [7]. HDV is a highly pathogenic virus but the range of clinical manifestations vary from mild disease to fulminant hepatitis, as well as a rapidly progressive form of chronic viral hepatitis [8].

Delta hepatitis was endemic in southern Europe where between 1980–1990 the prevalence of anti-HDV antibodies among HBsAg-positive individuals was higher than 20%. Following the implementation of HBV vaccination programs in the 1990s a significant decline in incidence was reported [9]. However, incidence is increasing in northern and central Europe because of immigration from highly endemic areas and intravenous drug use. In the Mediterranean region, in Africa, and in the Middle East, high rates of HBsAg carriers can be coinfecting with HDV whereas in the USA, HDV remains rare and restricted to high-risk groups such as intravenous drug users and hemophiliacs [10,11]. Currently eight different HDV genotypes have been reported and HDV genotype 3 is characteristic of the Amazon region in South America [12–14].

The western Amazon basin (including Brazil, Peru, Ecuador, Venezuela and Colombia) presents one of the highest rates of HBV infection in the world [15–17]. HBV is a DNA virus of high genetic variability comprising eight well-recognized genotypes, A–H and two new proposed genotypes, I and J that show distinct geographic distribution [15,18,19]. HBV genotypes together with viral load and specific viral mutations play a role in disease progression and in particular, HBV genotype can be predictive of clinical outcomes and response to interferon treatment [20]. HBV genotype A prevails in Brazil followed by genotypes D and F, the later one, prevalent in indigenous communities [21,22].

The Brazilian Amazon mainly the Juruá, the Solimões, and the Purus river basins in the State of Amazonas are considered highly endemic regions for HBV and HDV where they represent important public health issues with severe cases of acute and chronic HDV hepatitis [23–26]. Molecular epidemiology studies in this geographic region of continental dimension, including remote and hard-to-reach villages dispersed into the jungle, diverse population composed by different ethnic groups and low demographic density can help delineate improved control measures for HBV-HDV coinfection. In this context, this study describes HBV and HDV genotypes circulating in the Western Amazon region in Brazil and these data contribute to compose the molecular epidemiology map of these viruses indicating their pattern of endemicity in this highly endemic area.

Methods

Study area and subjects

This cross sectional study included individuals with confirmed diagnosis of HBV infection, most of them living in the western Amazon. Individuals were recruited in two

cities (Manaus and Eirunepe) located in the Amazonas State, North Brazil from 2003–2009.

In Manaus city, two different groups of HBsAg positive participants were included and evaluated separately: A. Blood donors, asymptomatic subjects recruited at the main public health reference blood bank in the north Brazilian region "Hematology and Hemotherapy Foundation from Amazonas"/HEMOAM (n = 130); B. Symptomatic subjects recruited at an outpatient clinic ("Araújo Lima Hepatitis Ambulatory Hospital, Federal University of Amazonas"; n = 60). Manaus (the capital of Amazonas State) is the largest city in the Amazon region and is located in the center of the Brazilian Amazon rainforest (great metropolitan area with around 2.2 million inhabitants, situated by the Negro River a few miles before it meets the Solimões River to form the Amazon River). Manaus was historically populated by several local indigenous tribes (mainly "Manaós") and by Portuguese and Spanish immigrants (16th century).

In Eirunepe city, HBV infected subjects were identified after a serological screening for HBsAg positivity among 720 individuals performed in 2009 (34/720; 4.72% prevalence of HBsAg positivity, Kiesslich D unpublished data). Eirunepe city (30665 inhabitants) is located 1160 kilometers away from Manaus, in the southwest part of Amazonas State by the Juruá Valley and is considered a highly endemic region for HBV and HDV infections [27,28]. Eirunepe represents a rather isolated municipality that can be reached only by the Juruá River and by airplane. It was populated during the Rubber Cycle (19th century) resulting from the miscegenation of indigenous people (Kulina tribe), Brazilians from the northeast region, Turkish, Portuguese and Spanish immigrants. No indigenous participant was included in any of the study groups.

Participants

Individuals from both genders, ≥18 years old, with positive HBsAg serology (Murex, Abbot, USA) were included. Serological marker for HDV infection was determined by anti-HD IgG ELISA kit (DiaSorin, Saluggia, Italy). Anti HBV-HDV coinfection was defined by HBsAg positivity and anti-HD positivity. Exclusion criteria were: coinfection with hepatitis C virus (MUREX/Abbot, EUA), or human T cell lymphotropic virus (MUREX/Abbot, EUA), or human immunodeficiency virus (MUREX/Abbot, EUA); patients under interferon or antiviral medication, chronic alcohol consumption and illegal drug use.

HBV genotyping

DNA was extracted from serum using silica-membrane-based nucleic acid purification kit (QIAamp DNA, Qiagen, Germany) and amplified by nested PCR. The first PCR round included primers for the complete HBV surface and in the second round, primers specific for genotypes A, B,

C, D, E, F were included, as previously described [29]. HBV genotypes were identified in PCR products analyzed in 1.5% agarose gel electrophoresis.

HDV genotyping

RNA was extracted from serum using silica-membrane-based nucleic acid purification kit (QIAmp viral RNA, Qiagen, Germany), RNA was reverse transcribed (Superscript TM One step RT PCR Platinum Taq; Invitrogen, Germany) and specific primers for nucleotide (nt) 883–906 and 1288–1265 positions of HDV genome were used [30]. For restriction fragment length polymorphism (RFLP) the amplification products were detected in 1.5% agarose gel and digested with restriction enzyme *SmaI* (5 U) (Life Technologies). Digested products were analyzed by electrophoresis through 6% acrylamide gels according to the size of the fragments: genotype 1 (227–178 bp), genotype 2 (no digestion), genotype 3 (298–107 bp) [30].

HDV sequencing and Phylogenetic Analysis

For a subset of HBV-HDV coinfecting patients, HDV isolates were submitted to direct sequencing of the partial delta antigen genomic region (405 nucleotide fragment within nucleotide positions 883–1288) using internal primers (Big Dye terminator DNA sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) [30]. The sequences were edited manually (BioEdit V.5.0.9) and alignment, phylogenetic and molecular analyses were performed using MEGA version 4 with neighbor-joining method under Kimura's two parameter. A bootstrap test and reconstruction was done 1000 times to confirm the reliability of the phylogenetic tree. HDV sequences from this study were deposited at the GenBank under accession numbers: KF278974 to KF278994.

Statistical analyses

Proportions of genders, different HBV genotypes and HDV infections among groups of participants were compared by chi square and Fisher's exact test. Comparisons

of ages among groups employed ANOVA and Student's t test. Results yielding $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Ethics statement

This study was approved by Institutional Review Boards ("Comite de Etica em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas/UFAM" and "Fundação de Hematologia do Estado de Amazonas/HEMOAM") and all participants provided signed informed consents.

Results

Main features of participants

This molecular study included a total of 224 HBsAg positive individuals from the Brazilian western Amazon that were analyzed according to the recruitment site: A. Blood donors ($n = 130$); B. Outpatient subjects ($n = 60$); C. Subjects from Eirunepe ($n = 34$). In this study group (Table 1) males predominated among blood donors and outpatient subjects while females prevailed among participants from Eirunepe ($p < 0.0001$). Outpatient subjects were older than blood donors and than subjects from Eirunepe ($p < 0.0007$). The majority of patients (153/224; 68.30%) lived in Manaus while 63 individuals lived in 20 different remote municipalities located in the interior of the Amazonas State. Four individuals were from Lábrea, a highly endemic region for both infections. Additionally, 8 patients lived outside Amazonas State: three were from Boa Vista city capital, of Roraima State; one was from Tarauacá city, one from Sena Madureira, Acre State; two participants came from Itaituba and Tucuruí, gold mining cities in Para State and one participant was from Patu city, Rio Grande do Norte State, northeast Brazil.

HBV infection and HBV genotypes

Overall among 224 HBsAg positive cases included in this study, 85.26% (191/224) were genotyped for HBV: 84.61% (110/130) of blood donors, 86.66% (52/60) of

Table 1 Main demographic features, HBV genotypes in Western Amazon, Brazil

Study group	Manaus		Eirunepe	Total
	Blood donors	Outpatients		
Number (n)	130	60	34	224
Male:female#	98:32	38:22	12:22	-
Age# media, range	35 (18–60)	40 (19–66)	33 (18–50)	-
Genotyped HBV samples (n)	110	52	29	191
% HBV A (n/total)*	61.8 (68/110)	44.2 (23/52)	48.3 (14/29)	105
% HBV D (n/total)*	15.4 (17/110)	21.1 (11/52)	17.2 (5/29)	33
% HBV F (n/total)*	22.8 (25/110)	34.6 (18/52)	34.5 (10/29)	53

* $p > 0.05$ for Chi square comparisons of HBV genotypes among Manaus blood donors, Manaus outpatients and Eirunepe individuals; # $p < 0.05$ for Fisher's exact test comparison of HBV A frequencies between Manaus blood donors and outpatients; # $p < 0.001$ for ANOVA comparisons of ages and Chi square comparison of male:female ratios among Manaus blood donors, Manaus outpatients and Eirunepe individuals.

individuals from outpatient clinic in Manaus and 85.29% (29/34) of participants from Eirunepe.

HBV genotypes A, D and F were detected in all three groups: blood donors, subjects recruited in Manaus and in Eirunepe. The frequency of HBV genotypes identified among outpatient subjects and among participants from Eirunepe was similar ($p > 0.05$); therefore comparisons were performed between blood donors versus subjects from Manaus and versus subjects from Eirunepe. In these analyses, the only significant difference in HBV genotype distribution was the higher frequency of HBV/A among blood donors compared to outpatient subjects ($p < 0.05$).

HBV-HDV coinfection and genotypes

In this study, the majority of participants (70.5%, 158/224) had HBV mono-infection whereas around one third were HBV-HDV coinfecting (Table 2). Compared to blood donors, HBV-HDV coinfection was more frequent among subjects from outpatient clinic (65.0% versus 8.5%; RR = 5.0; CI 3.4-7.9; $p < 0.0001$) and among participants from Eirunepe (47.0% versus 8.5%; RR = 5.5; CI 3.0-9.9; $p < 0.0001$).

Among 66 HBV-HDV coinfecting individuals, 52 had HBV genotyped and 38 had both HBV and HDV genotyped (Table 2). HDV genotype 3 was identified in all coinfecting patients recruited in the western Amazon region. HBV/F-HDV/3 predominated (20/38; 52.7%), followed by HBV/A-HDV/3 (31.6%; 12/38) and HBV/D-HDV/3 (15.8%; 6/38). The frequency of HDV/3 coinfection among blood donors was lower (RR = 0.53; CI 0.24-1.11; $p = 0.054$). HDV/3 coinfection was not significantly associated with HBV genotypes A or F. The relative risk of HDV/3 coinfection among outpatient subjects harboring HBV/D was borderline (RR = 0.51; CI 0.22-1.5; $p = 0.07$).

HDV phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis of 21 isolates showed that HDV genotype 3 sequences circulating in the western Amazon

in Brazil are intermixed with sequences from other western Amazon countries as Venezuela, Colombia and Peru (Figure 1). Four HDV/3 sequences of patients coming from Lábrea region were intermixed with other genotype 3 sequences from Venezuela, Peru and other Brazilian sequences (GenBank accession numbers KF278983, KF278984, KF278988 and KF278993).

In Eirunepe, HDV genotype 3 sequences (KF278985 and KF278996) with high bootstrap were identified in individuals that did not have any clear epidemiological link, indicating a small local transmission cluster in the Juruá Valley. HDV/3 sequences from individuals living in several remote, isolated cities located in Purús, Negro and Amazonas basins indicate that this genotype is widely dispersed throughout the Amazonas State.

Discussion

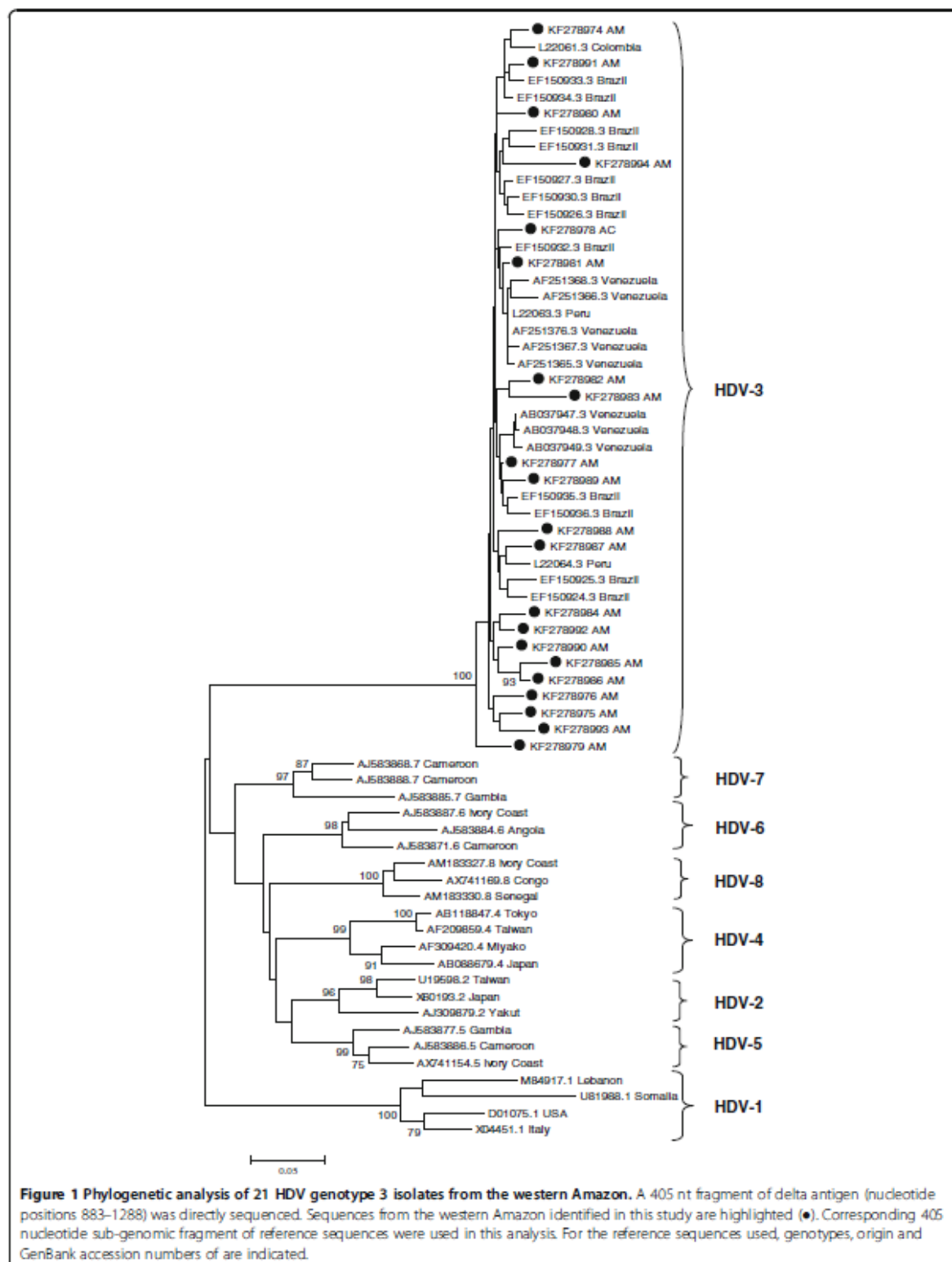
This molecular epidemiology study describes HBV and HDV genotypes circulating in the Brazilian western Amazon including Manaus city, the capital and largest metropolitan area of Amazonas State and several small, remote municipalities dispersed into the Amazon jungle. Blood donors from Manaus, outpatient subjects from several interior cities and subjects from Eirunepe city, located by the Juruá Valley, a highly endemic area were investigated. In this study, HBV mono-infection with genotype A predominated and genotypes D and F were also detected. HDV genotype 3 was the only genotype identified. HBV genotypes A, D and F and HDV/3 cases identified in subjects from the western Amazon depicted in Figure 2 confirm the wide distribution of these variants within this highly endemic area. In particular, HDV/3, which seems to be unique to the Amazon basin, is indeed disseminated throughout the area. Since HBV genotypes are known to impact clinical outcomes, surveillance studies remain important to identify prevailing genotypes and the possible introduction of new ones.

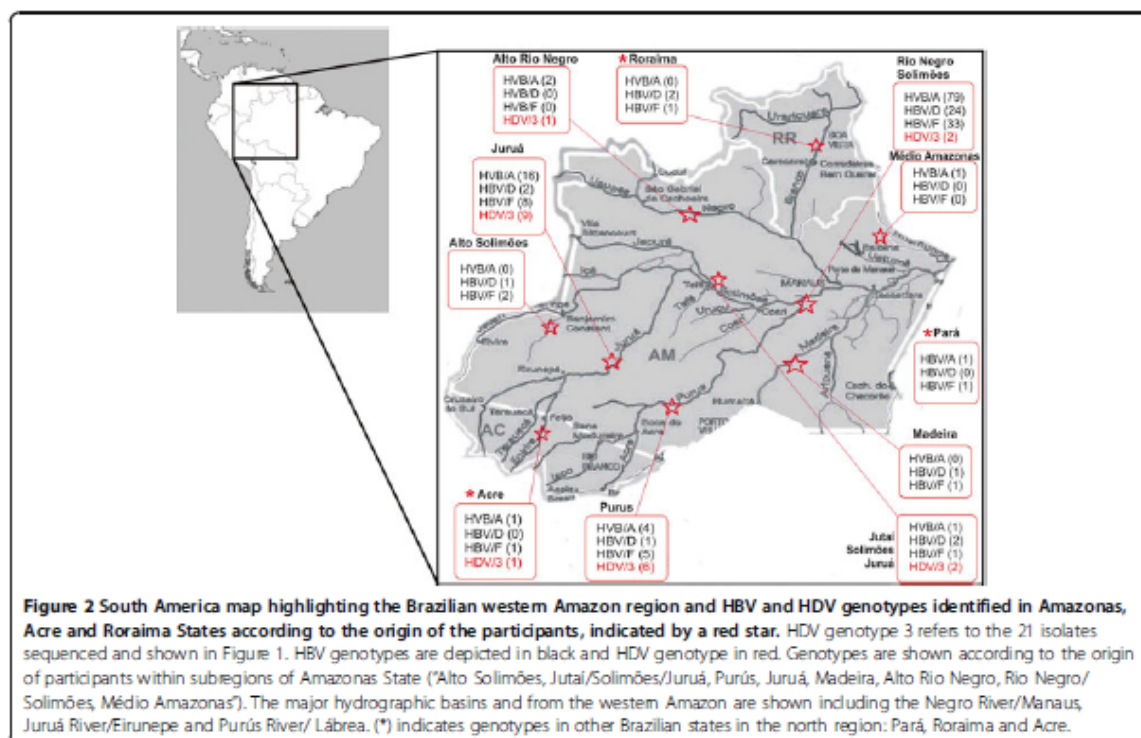
Brazil and Colombia were the first Latin American countries to introduce universal vaccination against HBV. In the western Amazon region, a widespread vaccination program was implemented in 1999, however, HBV and HDV infections currently remain important public health problems given the high burden reported by public health services. Additionally, the effect of HBV vaccination on mortality is not clear [31]. Even under universal HBV vaccination programs, surveillance in western Amazon should be continued to help delineate improved measures to control these infections and molecular epidemiology studies are important to define the regional pattern of endemicity. The importance of surveillance studies can be highlighted by the recent reports of high rates of HBV and HDV coinfection in developed countries mainly due to the immigration of patients from highly endemic regions and to the increased intravenous drug use [32-34]. The

Table 2 HDV-HBV co-infection and genotypes in the Western Amazon, Brazil

Study group	Manaus		Eirunepe	Total
	Blood donors	Outpatients		
Participants (n)	130	60	34	224
HBV HDV coinfection %	8.5 (11/130)	65.0 (39/60)	47.0 (16/34)	66
Genotyped HBV samples (n)	8/11	33/39	11/16	52/66*
HBV/A HDV/3	1	9	2	12
HBV/D HDV/3	3	3	-	6
HBV/F HDV/3	2	13	5	20

*Among 66 HBV-HDV co-infected individuals, 52 had HBV genotyped and 38 had both HBV and HDV genotyped.





Amazon region attracts a significant number of migrants and tourists from all over the world and should be monitored regarding the possible introduction of different HBV and HDV genotypes that circulate in other countries, as well as their potential impact on clinical outcomes of coinfection regionally.

In this study, HBV genotypes A, D and F were identified and genotype A predominated among blood donors recruited in Manaus city. Our data corroborate previous reports showing that HBV genotype A prevails in Brazil including the northern region, followed by genotypes D and F [21,35-40]. In general, these studies have shown that about half of HBV circulating in Brazil is genotype A, probably introduced from Africa by slave trade, and in the north region, European and Lebanese immigrants have also played a role in genotype A introduction. Implications of genotype A in HBV therapy and disease progression have been well reported. Patients infected with HBV genotypes A and B have better responses to interferon-based therapy than patients infected with genotypes C and D. The predominance of HBV genotype A in the Brazilian western Amazon region, especially in Manaus, indicates that the majority of these individuals may benefit from interferon therapy.

Some molecular epidemiology studies from the Brazilian Amazon have also shown the circulation of HBV genotype

F [38-40]. In the Amazon, HBV/F has been described in isolated tribes that did not have contact with non-indigenous population, whereas among tribes that had contact with non-indigenous populations, genotypes A and D have been introduced [22,41]. In our study, no indigenous participant was included and genotype F predominated among subjects recruited in an outpatient clinic that came from interior cities indicating that genotype F circulates beyond indigenous populations.

HDV/3 is considered the most divergent genotype and previous studies indicate that it is common in the Amazon Basin although genotype 1 has also been described in this region [42]. Results from the current study indicate wide dissemination and predominance of HDV genotype 3 in coinfecting individuals from the western Amazon. As expected, the phylogenetic analyses showed that the HDV genotype 3 sequences from this study were intermixed with sequences from other western Amazon countries such as Colombia, Peru and Venezuela. Four HBV-HDV coinfecting patients came from the highly endemic Lábrea region where a severe hepatitis outbreak caused by HDV, known as Lábrea hepatitis or black fever was reported [23]. In the current study, most coinfecting patients that were genotyped harbored HBV/F-HDV/3 combination as previously reported [14], however, HBV/A-HDV/3 and HBV/D-HDV/3 coinfections were also detected. In Europe,

most HBV-HDV coinfecting patients harbor HBV genotype D but infection with genotype A can also occur [43]. Our study corroborates the diversity of HBV genotypes in HDV coinfection.

One interesting molecular finding was that the majority of HBV/F-HDV/3 cases from the current study was detected among subjects recruited in an outpatient clinic in Manaus. The severity of HDV infection seems to be influenced by the HDV genotypes and HDV/3 has been associated with higher pathogenicity, generally fulminant hepatitis [12,44]. In South America HBV/F-HDV/3 coinfection has been associated with increased severity of the disease. Although out of the scope of the present study, the identification of higher frequency of HBV/F-HDV/3 genotypes among symptomatic patients with liver disease seeking medical care in an outpatient clinic, confirms the poorer clinical outcomes determined by these genotypes. A previous study from our group in the same geographic region, suggested a role for HBV genotype in disease progression in which more severe liver inflammation was seen in HDV/3-HBV/F coinfecting patients compared to patients mono infected with HBV/F [45]. The combination of HBV/F-HDV/3 is highly, if not invariably pathogenic, however in the current study HBV/F-HDV/3 coinfection was also detected in a low proportion of healthy blood donors. This finding indicates that this association is not "per se" pathogenic, although for unexplained reasons, the risk of liver disease in patients with this viral combination is indeed increased.

In this study, the frequency of HDV coinfection was lower in blood donors from Manaus and the higher rate of coinfection detected in Eirunepi city, probably reflects the high endemicity for these viruses already described in this region located by the Juruá Valley. PCR amplification rates and identification of HBV genotypes in this study was around 85% and around 79% for HDV. This amplification rate for HBV can be considered high, since HDV coinfection spontaneously suppresses HBV, limiting amplification rates and analysis of HBV genotypes [45,46]. Standardization of "in house"-HDV-RNA assays is important to allow comparisons of results among studies. The HDV genotype 3 sequences generated in this study and deposited in a public gene bank contribute to the somewhat limited number of HDV sequences available from this endemic region. Although a significant number of individuals participated in this study, we acknowledge that our sample size may not be representative of the vast geographic territory of the western Amazon. However, molecular studies from this region need to take into account limitations and logistic difficulties to reach and screen inhabitants of remote, small municipalities dispersed into the jungle, such as the screening performed in Eirunepi city.

Conclusion

The description of HBV and HDV genotypes circulating in the western Amazon is important to reveal both their pattern of endemicity and their relevance on the regional epidemics. The Amazon is a highly endemic region for these infections and their control is challenged by its vast territorial dimension, with small, hard-to-reach municipalities dispersed into the jungle, and by the diverse ethnic composition of those affected. Surveillance of HBV and HDV genotypes in the western Amazon region, together with universal HBV vaccination, better educational programs about these viruses including their modes of transmission and improvements in socioeconomic conditions in these remote areas remain the cornerstone for better control strategies.

Abbreviations

CI: Confidence interval; DNA: Deoxyribonucleic acid; ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay; HBsAg: Hepatitis B surface antigen; HBV: Hepatitis B virus; HDV: Hepatitis D virus; HEMOAM: Hematology and Hemotherapy Foundation from Amazonas; nt: Nucleotide; PCR: Polymerase chain reaction; RFLP: Restriction fragment length polymorphism; RNA: Ribonucleic acid; RR: Relative risk.

Competing interests

The authors declare that there are no competing interests.

Authors' contributions

MAEC: acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafted the manuscript critically; NAF: conception and design of the work, revised the manuscript; SCC: contributed in the acquisition of the data; NAS: analysis and interpretation of data, revised the manuscript critically; MMA: analysis and interpretation of data, drafted and revised the article critically; Kesslich: conception and design of the work, coordination of field and laboratory work, revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

MAEC, NAF, SCC, DK: Hematology and Hemotherapy Foundation from Amazonas/HEMOAM Research Laboratory, Amazonas Blood Center, Manaus, Amazonas, Brazil; NAS: Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; MMA: Federal University of Goiás, Tropical Pathology and Public Health Institute, Goiânia, Goiás, Brazil.

Acknowledgements

The authors are thankful for all participants' cooperation. We are also thankful to Ludimila Cardoso and Cintia Mara de Oliveira for phylogenetic expertise and to Marcelo Mira for technical expertise in reveal both map design. MMA Stefani is a recipient of a fellowship from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq grant # 304869/2008-2); MMA Stefani and A Schrieffer are supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas/FAPEAM/PPV grant. This study was sponsored by FAPEAM and CNPq.

Author details

¹Hematology and Hemotherapy Foundation from Amazonas/HEMOAM Research Laboratory, Amazonas Blood Center, Manaus, Brazil. ²Federal University of Bahia, Salvador, Brazil. ³Federal University of Goiás, Tropical Pathology and Public Health Institute, Goiânia, Brazil.

Received: 24 September 2013 Accepted: 14 February 2014

Published: 21 February 2014

References

1. Wedemeyer H, Manns MP: Epidemiology, pathogenesis and management of Hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010, **7**(1):31-40.

2. Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, London WT, Sly DL, Purcell RH: Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis* 1980, **141**(5):590-602.
3. Torres JR: Hepatitis B and Hepatitis Delta virus infection in South America. *Gut* 1996, **38**(2):548-555.
4. Gish RG, Gadanho AC: Chronic Hepatitis B: current epidemiology in the Americas and implications for management. *J Viral Hepat* 2006, **13**(12):787-798.
5. Saracco G, Rosina F, Brunetto MR, Amoroso P, Careda F, Farci P, Plantino P, Borino F, Rizzetto M: Rapidly progressive HBsAg positive hepatitis in Italy. The role of hepatitis delta virus infection. *J Hepatol* 1987, **5**(3):274-281.
6. Fatovich G, Boscaro S, Noventa F, Pomato E, Stenico D, Alberti A, Ruol A, Realdi G: Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. *J Infect Dis* 1987, **155**(5):931-935.
7. Wedemeyer H: Hepatitis D - diagnosis and treatment. In *Hepatology, A Clinical Textbook*. Volume 3. 3rd edition. Germany: Flying Publisher; 2012:174-188.
8. Farci P, Niro GA: Clinical features of hepatitis D. *Semin Liver Dis* 2012, **32**(3):228-236.
9. Gaeta GB, Strofollini T, Chiaramonte M, Asdone T, Stomaliuolo G, Lobello S, Sagnelli E, Brunetto MR, Rizzetto M: Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian multicenter study. *Hepatology* 2000, **32**(4):824-827.
10. Amini N, Alavian SM, Kabir A, Aalei-Andabli SH, Saeedi Hosseini SY, Rizzetto M: Prevalence of hepatitis d in the eastern mediterranean region: systematic review and meta analysis. *Hepat Mon* 2013, **13**(1):e8210.
11. Rizzetto M, Ciando A: Epidemiology of hepatitis D. *Semin Liver Dis* 2012, **32**(3):211-219.
12. Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL: A genotype of Hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**(19):9016-9020.
13. Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouveia MS, Gutierrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, Pinho JR: Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: a Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol* 2011, **11**(1):103-108.
14. Gomes-Gouveia MS, Soares MC, Bensabath G, de Carvalho-Mello IM, Brito EM, Souza OS, Queiroz AT, Carrilho FJ, Pinho JR: Hepatitis B virus and Hepatitis Delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *J Gen Virol* 2009, **90**(11):2638-2643.
15. Te HS, Jensen DM: Epidemiology of Hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis* 2010, **14**(1):1-21.
16. Gayotto LC: Hepatitis Delta in South America and especially in the Amazon region. *Prog Clin Biol Res* 1991, **364**:123-135.
17. De La Horiz RF, Martinez DM, Iglesias GA, Rojas MC: Factores de riesgo en la transmisión de la Hepatitis B en la Amazonia Colombiana. *Biomedica (Bogotá)* 1992, **12**(1):5-9.
18. Yu H, Yuan Q, Ge SX, Wang HY, Zhang YL, Chen QR, Zhang J, Chen PJ, Xia NS: Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "F". *PLoS One* 2010, **5**(2):e9297.
19. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugawachi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakita M, Miyakawa Y, Mizokami M: 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 Virol* 2009, **83**(20):10538-10547.
20. Lin CL, Kao JH: The clinical implications of Hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol* 2011, **26**(1):123-130.
21. Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, Sariva JC, Virgolino HA, Motta-Castro AR, Melo MM, Martins RM, Gomes SA: Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 2007, **7**:103.
22. Bliz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araújo M, Costa L, Monsalve DC, Torres JR, Fields HA, Lambert S, Van Geyt C, Norder H, Magnus LO, Echevarria JM, Stuyver L: Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1998, **36**(3):648-651.
23. Bensabath G, Dias LB: Labrea hepatitis (Labrea black fever) and other fulminant forms of hepatitis in Sena Madureira, Acre and Boca do Acre, Amazonas, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1983, **25**(4):182.
24. Bensabath G, Hadler SC, Soares MC, Fields H, Dias LB, Popper H, Maynard JE: Hepatitis Delta virus infection and Labrea hepatitis. Prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon Basin. *JAMA* 1987, **258**(4):479-483.
25. Fonseca JCF, Simonetti SR, Schatzmayr HG, Castejón MJ, Cesário AL, Simonetti JP: Prevalence of infection with Hepatitis Delta virus (HDV) among carriers of Hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988, **82**(3):469-471.
26. Fonseca JCF: Hepatitis D. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002, **35**:181-190.
27. Braga WS, Brasil LM, de Souza RA, Castilho Mda C, da Fonseca JC: The occurrence of hepatitis B and delta virus infection within seven Amerindian ethnic groups in the Brazilian western Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001, **34**(4):349-355.
28. IBGE: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=130140&search=amazonas%2Cjuruenepe>.
29. Naito H, Hayashi S, Abe K: Rapid and specific genotyping system for Hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type specific primers. *J Clin Microbiol* 2001, **39**(1):362-364.
30. Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, Gomez H, McCarthy M, Watts DM, Hyams KC, Gerin JL: Hepatitis B virus (HBV)/Hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon Basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis* 1996, **174**(5):920-926.
31. Tavares-Neto J, Almeida D, Soares MC, Uchoa R, Viana S, Darub R, Farias E, Rocha G, Vitvitski L, Paraná R: Seroprevalence of Hepatitis B and C in the Western Brazilian Amazon Region (Rio Branco, Acre): a pilot study carried out during a hepatitis B vaccination program. *Braz J Infect Dis* 2004, **8**(2):133-139.
32. Manesis EK, Vouli G, Dalekos G, Vasileadis T, Manolaki N, Hourta A, Koutsounas S, Vafiadis I, Nikolopoulou G, Giannoulis G, Germanidis G, Papatheodoridis G, Touloumi G: Prevalence and clinical course of Hepatitis Delta infection in Greece: a 13-year prospective study. *J Hepatol* 2013, **59**(5):949-956.
33. Shadur B, MacLachlan J, Cowie B: Hepatitis D Virus in Victoria 2000-2009. *Intern Med J* 2013, **43**(10):1081-1087.
34. Ho E, Detenre P, Nkuze M, Delwaide J, Colle I, Michielsens: Coinfection of Hepatitis B and Hepatitis Delta virus in Belgium: A multicenter BASL study. Prospective epidemiology and comparison with HBV monoinfection. *J Med Virol* 2013, **85**(9):1513-1517.
35. Ferreira RC, Teles SA, Dias MA, Tavares VR, Silva SA, Gomes SA, Yoshida CF, Martins RM: Hepatitis B virus infection profile in hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors and genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **101**(6):689-692.
36. Moraes MTB, Niel C, Gomes AS: A polymerase chain reaction-based assay to identify genotype F of Hepatitis B virus. *Braz J Med Biol Res* 1999, **32**(1):45-49.
37. Dial AL, Oliveira CM, Castilho Mda C, Silva MS, Braga WS: Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012, **45**(1):9-12.
38. Viana S, Paraná R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V: High prevalence of Hepatitis B virus and Hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**(4):808-814.
39. Victoria FS, Oliveira CMC, Victoria MB, Victoria CB, Ferreira LCL: Characterization of HBeAg-negative chronic Hepatitis B in western Brazilian Amazonia. *Braz J Infect Dis* 2008, **12**(1):27-37.
40. Conde SR, Mota Lde J, Barbosa MS, Amaral Ido S, Miranda EC, Soares Mdo C, Brito EM, Souza Odo S, de Araújo MT, Demachki S, Rebello JR, Mesquita MG, Denis AB, Ishak R: Prevalence of hepatitis B virus genotypes and the occurrence of precore mutation A-1896 and to correlate them with the clinical presentation of chronic hepatitis, in a population group of the Eastern Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004, **37**(2):33-39.
41. Bertolini DA, Moreira RC, Soares MCP, Bensabath G, Lemos MF, Mello IMVG, Pinho JRR: Genotyping of Hepatitis B virus in indigenous populations from Amazon region, Brazil [abstract]. *Virus Res* 2000, **5**:101.
42. Paraná R, Kay A, Molinet F, Viana S, Silva LK, Salcedo JM, Tavares-Neto J, Lobato C, Rios-Leite M, Matteoni L, D'Oliveira A Jr, Tauli P, Trépo C: HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: a preliminary report. *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75**(3):475-479.
43. Soriano V, Grint D, d'Aminio Monforte A, Horban A, Leen C, Poveda E, Antunes F, de Wit S, Lundgren J, Rockstroh J, Peters L: Hepatitis delta in HIV-infected individuals in Europe. *AIDS* 2011, **25**(16):1987-1992.

44. Nakano T, Shapiro CN, Hadler SC, Casey JL, Mizokami M, Otto E, Robertson BH: Characterization of Hepatitis D virus genotype III among Yucpa Indians in Venezuela. *J Gen Virol* 2001, **82**(9):2183-2189.
45. Kesslich D, Crispim MA, Santos C, Ferreira FL, Fraiji NA, Kominakis SV, Diaz RS: Influence of Hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of diseases in patients coinfecting with HBV and Hepatitis Delta virus. *J Infect Dis* 2009, **199**(11):1608-1611.
46. Rizzetto M: Hepatitis D: thirty years after. *J Hepatol* 2009, **50**(5):1043-1050.

doi:10.1186/1471-2334-14-94

Cite this article as: Crispim et al.: Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infectious Diseases* 2014 **14**:94.