



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

DETECÇÃO DA HEPATITE B OCULTA EM DOAÇÕES DE
SANGUE DAS REGIONAIS DE SAÚDE ALTO SOLIMÕES E
AMAZONAS

HELAINÉ DE ARAÚJO VIRGOLINO

MANAUS - AMAZONAS
2013

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

HELAINÉ DE ARAÚJO VIRGOLINO

DETECÇÃO DA HEPATITE B OCULTA EM DOAÇÕES DE
SANGUE DAS REGIONAIS DE SAÚDE ALTO SOLIMÕES E
AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

Orientadora: Prof^ª Dra. Kátia Luz Torres Silva

Co-Orientadora: Prof^ª Dra. Adriana Malheiro

Manaus - Amazonas
2013

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V817d Virgolino, Helaine de Araújo
Detecção da hepatite B oculta em doações de sangue das regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas / Helaine de Araújo Virgolino. 2013
127 f.: il. color; 29.7 cm.

Orientadora: Kátia Luz Torres Silva
Coorientadora: Adriana Malheiro
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. DNA VHB. 2. hepatite B. 3. doadores de sangue. 4. hepatite b oculta. 5. Amazônia. I. Silva, Kátia Luz Torres II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

HELAINÉ DE ARAÚJO VIRGOLINO

**DETECÇÃO DA HEPATITE B OCULTA EM DOAÇÕES DE
SANGUE DAS REGIONAIS DE SAÚDE ALTO SOLIMÕES E
AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

APROVADA EM: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Kátia Luz Torres Silva, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dra. Aya Sadahiro, Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dra. Norma de Paula Cavalheiro, Membro Externo
Universidade de São Paulo

A *Deus*, por ser minha fortaleza.
Ao meu Pai *Aristeu*, meu
incentivador em todos os momentos.
Ao *Miranda* e *Renan* pela
paciência, amor e compreensão.
A minha mãe *Joaquina* e meus
irmãos *Eliane*, *Herivaldo* e *Kátia* por
sempre confiarem no meu potencial.

Dedico

Agradecimentos

A Prof^a. Dra. **Kátia Luz Torres Silva**, pela compreensão, paciência e dedicação com as quais me orientou e pelo exemplo que é para mim de pessoa íntegra, mulher, mãe e profissional, dedicada e humilde. Obrigada pelos ensinamentos e conselhos, fundamentais para o meu aprendizado.

A Prof^a. Dra. **Aya Sadahiro** por ter acreditado em mim sempre e ter demonstrado isso em todos os momentos desta caminhada.

A **Márcia Poinho Encarnação de Moraes** e **Christiane Usui**, por sempre acreditarem e confiarem em mim e me incentivarem à produção científica.

A **Mônica Moresco** minha companheira de mestrado, pelo apoio incondicional e **Isabella Passos** a quem tive a grata surpresa de conhecer, conviver e saborear da sua amizade.

Ao Dr. **José Eduardo Levi** e equipe, Dra. **Micheli Gomes Gouvêa**, Dr. **João Pinho**, e toda sua equipe pela parceria estabelecida e fornecimento de tecnologia para a realização deste estudo.

Aos **Professores da Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA)**, pela dedicação, todos representados na pessoa da Prof^a. Dra. **Adriana Malheiro**.

A Prof^a. Dra. **Maria Cristina dos Santos**, que incentivou a todos nós no início desta jornada.

A equipe do **Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada**, **Meg** e **Ricardo** sempre dispostos a ajudar.

A **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)**, especialmente a equipe técnica da sorologia e setor do interior representado por **Cynara**, **Elcy** e **Neide**, por ajudarem na obtenção das amostras coletadas.

A **Lya** e **Kelly** alunas do **Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)**, que nos ajudaram muito coletando os dados do projeto.

A Equipe técnica da **Fundação Alfredo da Matta** na pessoa do **André Leturiondo** por ceder o espaço da Biologia Molecular para a realização de parte da nossa pesquisa.

A Empresa **Diagnocel** que doou os kits anti-HBc e anti-HBs para a realização do estudo.

A **Secretaria Municipal de Saúde de Manaus (SEMSA)** que permitiu a realização de parte dos exames nas dependências do Laboratório Prof^o. Manoel Bastos Lira.

A equipe da **Gerência de Apoio Diagnóstico** da **Secretaria Municipal de Saúde**, pela compreensão, força, incentivo e ajuda nas horas em que precisei.

Um especial agradecimento a todos os **doadores de sangue** que participaram do estudo e aos técnicos das **Unidades de Coleta Transfusionais** dos interiores, pois sem a colaboração deles o trabalho não teria sido possível.

Aos amigos do mestrado **Andréa Tarragô, Allyson Guimarães, Edilene Martins, Luciana Souza, Paula Taquita, Juliana Lameiras** pessoas fundamentais nesta caminhada.

Aos meus amores e parceiros na vida **José Miranda e Renan** que souberam entender esse período turbulento e me apoiaram em todos os momentos.

Ao meu **Tio Zezinho, Dona Nana, Vera e Dona Dejanira** pessoas que foram presentes e apoiaram a minha família nos momentos mais difíceis.

A minha **Família** que no ano de 2012 viveu um momento especial, fomos surpreendidos pela ida do nosso líder maior a casa do Pai, e mesmo assim não deixamos a peteca cair.

Ao **grupo de amigos e irmãos "Os Excluídos"** que sempre estiveram ao meu lado, dando força, chorando, rindo, orando e trocando experiências de vida.

As minhas amigas de sempre **Dora, Etelvina, Helen, Adriana, Régia e Solange**, por compartilharem todos os momentos ao longo destes dois anos e sempre torceram por mim.

Ao grupo do **Encontro de Casais com Cristo (ECC)** pela fé e oração e a **Deus** que me fez renascer das cinzas.

“... meu Deus, eu confio em ti!...”

Salmos 9:2

RESUMO

A infecção causada pelo vírus da hepatite B (VHB) tem uma distribuição mundial e representa um importante problema de saúde pública. A hepatite B ainda configura um risco na terapia transfusional tendo em vista o potencial de transmissão parenteral. Na triagem sorológica para o VHB são utilizados marcadores que detectam o antígeno de superfície do vírus (HBsAg) e o anticorpo contra o antígeno do core (anti-HBc). A hepatite B oculta (caracterizada pela presença de DNA do VHB, em amostras HBsAg negativas), tem sido um desafio na triagem sorológica de doadores de sangue do interior do Estado do Amazonas onde existem mais de 22% de doações reativas para o marcador anti-HBc de forma isolada. Além disso, estudos conclusivos sobre a frequência da hepatite B oculta são escassos no Estado do Amazonas. Sendo a região de alta prevalência da infecção do VHB, faz-se necessária a investigação da frequência da hepatite B oculta. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a presença da hepatite B oculta em amostras anti-HBc positivas com ou sem a presença do marcador anti-HBs na triagem sorológica de doadores de sangue oriundo das Unidades de Coletas Transfusionais (UCT's) nas regionais de saúde do Alto Solimões e Amazonas, no período de junho/2011 a junho/2012. Foram utilizados métodos sorológicos qualitativos e quantitativos dos marcadores para a infecção e moleculares para detecção, quantificação da carga viral e genotipagem do VHB. A prevalência do anti-HBc total reativo no interior do Estado do Amazonas entre os doadores de sangue foi de 22, 19 %. Foram analisadas 112 amostras anti-HBc reativas e HBsAg negativas, destas, 04 foram positivas para o DNA-VHB. A maior frequência dos doadores de sangue com sorologia reativa para hepatite B oriundos das regionais Alto Solimões e Amazonas apresentam o perfil sorológico anti-HBc e anti-HBs reativos e não são doadores de primeira vez. A prevalência de hepatite B oculta encontrada em doadores oriundos das regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas foi de 3,57%. A presença do marcador anti-HBs em títulos elevados (acima de 100 mUI/ml) não foi associada à ausência da hepatite B oculta em doadores de sangue das regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas. Não houve associação entre a carga viral encontrada e o perfil sorológico para hepatite B dos doadores de sangue DNA VHB positivos. Não foi possível descrever os genótipos das amostras positivas para o DNA VHB. O risco da IOB pode ser comprovado nos Países onde a técnica de detecção de ácido nucleico (NAT) foi implantada e também através dos resultados deste estudo. A ocorrência de infecção oculta pelo vírus da hepatite B leva ao questionamento do algoritmo atualmente estabelecido para triagem de doadores de sangue na região Amazônica. Seria possível também estabelecer novas estratégias para contemplar segurança transfusional, escassez de sangue no interior do estado e grande descarte de hemocomponentes.

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

ABSTRACT

The infection caused by the hepatitis B virus (HBV) has a worldwide distribution and represents a major public health problem. Hepatitis B also sets a risk in transfusion therapy given the potential transmission parenterally. In serological screening for HBV markers are used to detect the virus surface antigen (HBsAg) and antibody to the core antigen (anti-HBc). The occult hepatitis B (characterized by the presence of HBV DNA in HBsAg negative samples), has been a challenge for serological screening of blood donors in the state of Amazonas where there are more than 22% of donations reactive for anti-marker HBc in isolation. Moreover, conclusive studies on the frequency of occult hepatitis B are scarce in the state of Amazonas. As the area of high prevalence of HBV infection, it is necessary to investigate the frequency of hepatitis B hidden. In this context, the present study aimed to evaluate the presence of hepatitis B hidden in samples anti-HBc positive with or without the presence of the marker anti-HBs in serological screening of donor blood from Units collections Transfusion (UCT's) in regional health Alto Solimoes and Amazonas, from June/2011 to June/2012. We used qualitative and quantitative methods of serological markers for infection and molecular detection, quantification of viral load and genotyping of HBV. The prevalence of anti-HBc reactive within the State of Amazonas among blood donors was 22, 19%. We analyzed 112 samples reactive anti-HBc and HBsAg negative, of these, 04 were positive for HBV DNA. The higher frequency of blood donors with reactive serology for hepatitis B from the regional Alto Solimoes and Amazonas have the serological profile anti-HBc and anti-HBs reactive and are not first-time donors. The prevalence of occult hepatitis B in donors from the regional health Alto Solimoes and Amazonas are 3.57%. The presence of the marker in anti-HBs titers (above 100 mIU / ml) is not associated with the absence of occult hepatitis B in blood donors of the regional health Alto Solimoes and Amazonas. No association was found between viral load and hepatitis B serologic profile of blood donors HBV DNA positive. Could not describe the genotypes of samples positive for HBV DNA. The risk of occult infection with hepatitis B virus (OIB) is real and can be seen in countries where the technique was implemented and also through the data of this study. The occurrence of OIB in blood donors in the Amazon region leads to the questioning of the algorithm currently obeyed. You can also establish new strategies to contemplate transfusion safety, blood needs in the state and dispose of blood products.

Keywords: HBV DNA, hepatitis B, blood donors, hepatitis B hidden Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da partícula do vírus da hepatite B (VHB), apresentando os antígenos virais, DNA, polimerase.....	22
Figura 2. Constituição do genoma do VHB com suas estruturas gênicas.....	23
Figura 3. Distribuição geográfica dos diferentes genótipos do VHB no mundo.....	25
Figura 4. Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B no mundo, 2006.....	29
Figura 5. Mapa com as Regionais de Saúde do estado do Amazonas, destacando a Regional Amazonas.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição percentual dos casos de Hepatite B segundo provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação, Brasil, 1999 a 2010.....	31
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da população dos dois grupos de estudo e a chance da frequência do DNA VHB na população de doadores do interior do Estado do Amazonas.....	49
Tabela 2. Tamanho amostral e distribuição nos dois grupos.....	50
Tabela 3. Tamanho amostral e distribuição nos dois grupos para as regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas.....	50
Tabela 4. Mix para amplificação do VHB.....	59
Tabela 5. Sequência de Primers/Probe do VHB.....	60
Tabela 6. Mix para amplificação da região S/POL do VHB por nested PCR.....	62
Tabela 7. Frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B.....	86
Tabela 8. Distribuição das frequências dos perfis dos doadores de sangue de acordo com o gênero, idade e oriundos das regionais de saúde estudadas e seus respectivos grupos de estudo.....	87
Tabela 9. Distribuição das frequências dos fatores de risco para hepatite B em doadores de sangue oriundos das regionais de saúde estudadas e seus respectivos grupos de estudo...	88
Tabela 10. Distribuição da prevalência do DNA VHB nos candidatos à doação de sangue oriunda das regionais de saúde estudada e seus respectivos grupos de estudo.....	89
Tabela 11. Associação do DNA do VHB com os títulos do marcador anti-HBs nos candidatos à doação de sangue oriunda das regionais de saúde estudada e seus respectivos grupos de estudos.....	90
Tabela 12. Distribuição das frequências dos dados demográficos, clínicos, epidemiológicos e laboratoriais VHB nos candidatos à doação de sangue oriundos das regionais de saúde estudadas com amostras anti-HBc total positivas, HBsAg negativas e DNA VHB reativos.....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Interpretação dos resultados sorológicos na infecção por Hepatite B.....	39
Quadro 2. Mudanças de critérios e o impacto na frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B nas doações do interior do Estado do Amazonas	85

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
ALT	Alanina aminotranferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do core do vírus da hepatite B
Anti-HBcIgM	Anticorpo de classe IgM contra o antígeno do core 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 core do vírus da hepatite B
Anti-HDV	Anticorpo contra o antígeno do vírus da hepatite D
AST	Aspartato amino transferase
CAAE	Comitê Apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CMIA	Imunoensaio quimioluminescente por micropartículas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA VHB	Ácido desoxirribonucléico do vírus da hepatite B
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FA	Fosfatase alcalina
FHEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do estado do Amazonas
FUAM	Fundação Alfredo da Matta
FVS	Fundação de Vigilância em Saúde
HBcAg	Antígeno do core do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno “e” do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IBGE	Instituto Brasileiro de geografia e estatística
IOB	Infecção Oculta pelo Vírus B
Km²	Quilômetro por metro quadrado
MS	Ministério da Saúde
mUI/ml	Mili unidade internacional por mililitro

μL	Micro litro
Nm	Nanômetro
NAT	Tecnologia de detecção de ácidos nucléicos
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
Pb	Pares de Base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
POP	Procedimento operacional padrão
pmol/ μL	Picomol por microlitro
rHBcAg	Antígeno do core recombinante
RLU	Unidades relativas de luz
RNA	Acido Ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
STROBE	Fortalecimento do Relatório de Estudos Observacionais em Epidemiologia
SUSAM	Secretaria de Saúde do Estado do Amazonas
SVS/MS	Secretaria de Vigilância da Saúde/ Ministério da Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	Amplificação mediada por transcrição
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
UCT'S	Unidades de Coletas Transfusionais
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UI/ml	Unidades internacionais por mililitro
USP-SP	Universidade de São Paulo
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. O Vírus da Hepatite B	22
2.2. Epidemiologia	28
2.3 Transmissão	30
2.4. Hepatite B Oculta e Segurança Transfusional	32
2.5. Formas Clínicas da Infecção pelo Vírus da Hepatite B	34
2.6. Imunopatogênese.....	36
2.7. Diagnóstico Laboratorial.....	37
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo Geral	43
3.2. Objetivos Específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Desenho do Estudo	45
4.2. População de Estudo	45
4.3. Área de Estudo	45
4.4. Situação Problema	47
4.5. Hipóteses	47
4.6. Grupos de Estudo.....	47
4.7. Calculo Amostral.....	48
4.8. Critérios de Elegibilidade.....	50
4.9. Procedimentos de Coleta de Amostras.....	51
4.10. Amostras	52
4.11. Testes Sorológicos	53
4.11.1. Detecção do HBsAg (ARCHITECT® - ABBOTT)	53
4.11.2. Detecção do Anti-HBc Total.....	54
4.11.3. Detecção do Anti-HBs (ARCHITECT® - ABBOTT)	55
4.12. Ensaio Moleculares.....	56
4.12.1. Extração do DNA VHB.....	56
4.12.2. Controle da Extração – PCR em Tempo Real para B-actina.....	57
4.12.3. PCR em Tempo Real para Detecção e Quantificação de DNA VHB	58

4.12.4. Análise dos Genótipos do VHB	60
4.13. Análises Estatísticas	64
4.14. Aspectos Éticos	64
6. RESULTADOS	65
6.1. Artigo de Revisão	67
6.2. Relato de Caso	79
6.3. Resultados Complementares	85
7. DISCUSSÃO.....	93
8. CONCLUSÕES	101
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
APÊNDICES	118
ANEXOS	125

Introdução

A infecção causada pelo vírus da hepatite B (VHB) é considerada um importante problema de saúde pública, devido à alta prevalência e vasta distribuição Mundial.

Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas foram infectadas por esse vírus em algum momento de sua vida. Destes, aproximadamente 240 milhões estão cronicamente infectadas sob risco de desenvolver doenças graves como cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Além disso, cerca de 600 mil pessoas morrem todos os anos devido às consequências de hepatite B aguda ou crônica (WHO, 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou recentemente dados dos números de casos confirmados de hepatite B no período de 1999 a 2011, estes dados registram as regiões Sudeste, Sul e Norte com maior prevalência do vírus. Dos Estados que compõem a região Norte, Rondônia, Acre e Amazonas se destacam dos demais e juntos representam 75% dos casos notificados na região no período de 12 anos (BRASIL, 2012).

A circulação do vírus da hepatite B no interior do Estado do Amazonas é um problema de saúde pública amplamente relatado na literatura. O inquérito realizado em 1986, sobre a presença do antígenos do vírus da hepatite B nos habitantes do município de Lábrea, já relatava a alta endemicidade para hepatite B na região. Estudos realizados sobre as cidades de Itamarati em 1994 e Eirunepé em 1998, dois municípios localizados no vale do rio Juruá, também detectaram prevalência de moderada a elevada para os marcadores da hepatite B. Portanto, no interior do Estado do Amazonas as regiões próximas aos rios Juruá, Purus e médio Solimões foram consideradas de elevada endemicidade para o vírus da hepatite B (ALECRIM *et al.*, 1986; BRAGA *et al.*, 1994; BRAGA *et al.*, 1998; BRAGA *et al.*, 2004).

A hepatite B ainda configura um risco na terapia transfusional, tendo em vista o potencial de transmissão via parenteral. No Brasil, a prevenção da hepatite B transmitida por transfusão de sangue é realizada utilizando aspectos clínico-epidemiológicos e ensaios

sorológicos por meio de marcadores para detectar o antígeno de superfície do vírus (HBsAg) e o anticorpo contra o antígeno do core (anti-HBc), são marcadores presentes durante a evolução da infecção (BRASIL, 2010).

A detecção do DNA VHB em amostras negativas para HBsAg é definida como infecção oculta pelo vírus da hepatite B (IOB) e a implementação da pesquisa para teste de ácidos nucleicos em bancos de sangue seria um mecanismo eficaz para diminuir o riscos de hepatite B transfusional (ALLAIN & CANDOTTI, 2009; SOFIAN *et al.*, 2010).

O anticorpo anti-HBs é muito importante na clínica médica, devido sua utilização como marcador de proteção e monitoramento da resposta vacinal contra o vírus da hepatite B. Contudo, a presença de altos títulos deste marcador em pacientes anti-HBc positivos e HBsAg negativos pode não estar relacionado à ausência do vírus (SATOHI *et al.*, 2008; WENDEL *et al.*, 2008; ALLAIN & CANDOTTI, 2009; SOFIAN *et al.*, 2010).

A presença da IOB pode ser observada em indivíduos com infecção “resolvida” para VHB, que apresentam positividade para o anti-HBs, em portador de cepas mutantes e em portadores do anti-HBc isolados com níveis de HBsAg indetectáveis (BHATTI *et al.*, 2007; SATOHI *et al.*, 2008).

O Ministério da Saúde em seu Plano Nacional de Atenção Hematológica e Medicina Transfusional estabeleceu ações para ampliar a qualidade da hemoterapia no país e implantou técnicas de detecção de ácidos nucleicos (NAT) na triagem de doadores de sangue em toda a rede nacional para hepatite C e HIV.

A hepatite B apesar de ser uma infecção de alta prevalência e grande impacto de morbidade e mortalidade (principalmente quando pós-transfusional), não está contemplada na agenda nacional dentro deste novo plano, deixando uma lacuna a ser preenchida.

A utilização de técnicas de biologia molecular vem ganhando notoriedade no diagnóstico da hepatite B devido seu alto grau de sensibilidade no diagnóstico de sua forma oculta, pois é possível diagnosticar o DNA VHB em baixas concentrações, onde os títulos de HBsAg estão baixos e são indetectáveis através dos testes sorológicos. Esta metodologia pode contribuir na diminuição da transmissão do vírus por via parenteral.

A região Amazônica é caracterizada como uma das regiões de maior ocorrência de hepatite B do mundo. No interior do Estado do Amazonas existem localidades com taxas significativamente elevadas da doença.

Apesar de sua importância para a saúde pública local, estudos conclusivos sobre hepatite B oculta e dados sobre sua prevalência são escassos no Estado do Amazonas. Neste contexto, o presente projeto avaliou a presença da hepatite B oculta em amostras anti-HBc positivas, com ou sem a presença do marcador anti-HBs, na triagem sorológica de hemocomponentes depositados em banco de sangue de áreas endêmicas do Estado do Amazonas.

Este projeto pode contribuir para estudos posteriores de imunogenética, análise de características populacionais da região estudada, compreensão de possíveis associações da frequência de “*clearance*” do HBsAg com instalação do quadro de hepatite B oculta com as características genéticas do indivíduo. Além disso, fornecer dados que possa justificar a implementação do NAT a fim de trazer melhorias no serviço de triagem de banco de sangue.

Revisão da Literatura

2.1. O vírus da Hepatite B

A estrutura do VHB é formada por uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico) esférica, com 42 nm, constituídos por um envoltório lipídico contendo o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica contendo o antígeno do core (HBcAg) (**Figura 1**).

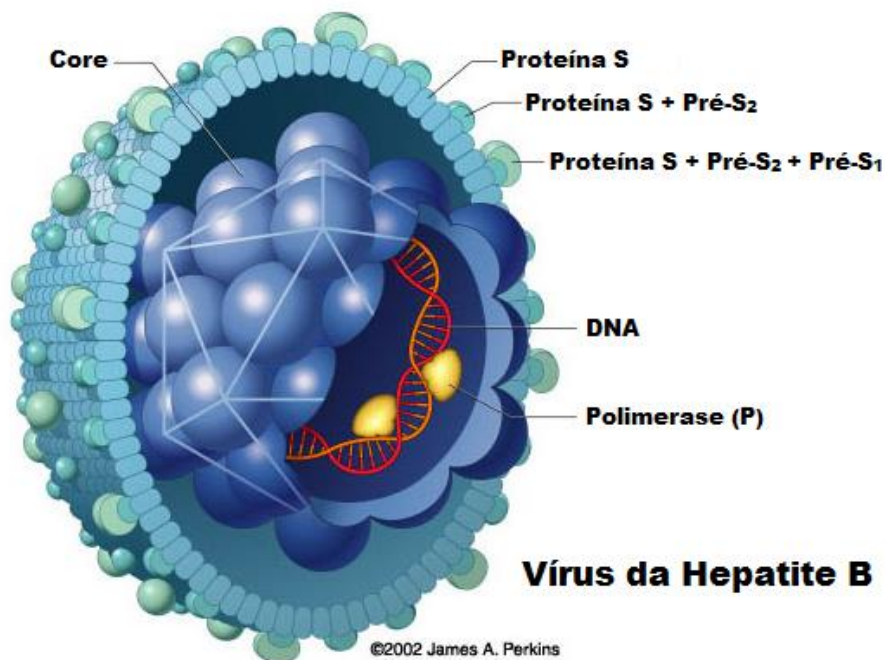


Figura 1. Representação esquemática da partícula viral do VHB, apresentando os antígenos virais, DNA, polimerase.

Fonte: Adaptado de PERKINS, 2002.

O VHB pertence à família *hepadnaviridae* (HOLLINGER *et al.*, 1996), é um vírus não citopático apesar de ter como característica o tropismo por células hepáticas (CHISARI *et al.*, 2010). O seu genoma é formado por DNA de fita parcialmente dupla com aproximadamente 3.200 pares de base (pb) e é composto por 4 genes: S, C, P e X (KRAMVIS *et al.*, 2005).

O gene S codifica o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), composto por 3 proteínas: pré-S₁ que codifica a proteína grande (L), pré-S₂ que codifica a proteína intermediária (M) e S que codifica a proteína menor (S) sendo esta a mais abundante e é composta de 226 aminoácidos, as quais constituem o envoltório viral (KRAMVIS *et al.*, 2005).

O gene C e a região pré-C (pré-core) codificam o antígeno do core (HBcAg) e o antígeno “e” (HBeAg), respectivamente. O gene P codifica a DNA polimerase que possui atividade de transcriptase reversa. O gene X codifica proteínas transativadoras responsáveis pela regulação de promotores virais e celulares (KRAMVIS *et al.*, 2005; NEIVA & FERNANDO, 2006) (**Figura 2**).

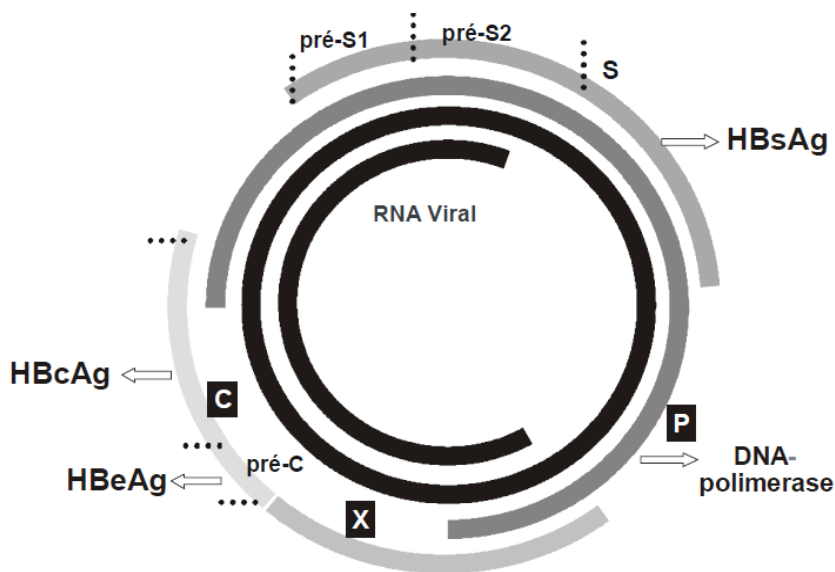


Figura 2. Constituição do genoma do VHB com suas estruturas gênicas

Fonte: NEIVA & FERNANDO, 2006.

A classificação dos genótipos é baseada na comparação da sequência nucleotídica do genoma completo. Para distinguir os diferentes genótipos é necessário encontrar uma divergência intergenotípica de mais de 8% e de 4% para identificar um subgenótipo (KRAMVIS *et al.*, 2005; KURBANOV *et al.*, 2010; ALVARADO-MORA *et al.*, 2012).

Os genótipos do VHB tem uma distribuição geográfica distinta e sua variabilidade genética permite a classificação em ordem alfabética de dez genótipos (A-J) e diversos subtipos definidos com base nas diferenças de sequências no seu genoma (OKAMOTO *et al.*, 1988; NORDER *et al.*, 1994; OLINGER, 2008; TATEMATSU *et al.*, 2009; ALVARADO-MORA *et al.*, 2011).

Atualmente os genótipos estão divididos em pelo menos 24 subgenótipos do VHB assim identificados: para o genótipo A o subgenótipo A1, característico da África e da Ásia; A2, da Europa; e A3 a A5 encontrados principalmente no continente africano. O genótipo B foi classificado em sete subgenótipos distintos: B1 a B7. Para o genótipo C foram classificados cinco subgenótipos: C1 a C5 e para o genótipo D, os subgenótipos D1, D2, D3, D4 e D5. F1, F2, F3 e F4 são os subgenótipos de F. As sequências descritas dos genótipos E e H não apresentam grande variabilidade, não existindo, portanto, para esses genótipos a classificação em subgenótipos (KURBANOV *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos há o predomínio dos genótipos A, D, F, G e H. As regiões Oriental e Central apresentam predominância dos genótipos A e C. No Sul, o genótipo predominante é o A. Na região Ocidental, os genótipos predominantes são o B e o C. No Havaí, predomina o genótipo C, seguido pelos genótipos A e B (CHU *et al.*, 2003).

Em estudo realizado no México com 49 indivíduos, cerca de três quartos estavam infectados pelo genótipo H, seguidos pelo genótipo G, A e D (ALVARADO *et al.*, 2006). Na América do Sul, encontra-se uma alta prevalência do genótipo F na Colômbia e Venezuela (ALVARADO *et al.*, 2006; DEVESSA *et al.*, 2008).

O Genótipo A é encontrado na África, Norte da Europa (subtipo A2), e Índia. Os genótipos B e C são comuns na Ásia. O genótipo D tem uma distribuição mundial e é encontrado predominantemente na região do Mediterrâneo e da Ásia Central. O genótipo E é

comum na África Sub-saariana (subtipo A1), África Ocidental (subtipo A3). Os genótipos E e F são predominantes encontrados na África Ocidental e na população indígena, respectivamente (TATEMATSU *et al.*, 2009; ALVARADO-MORA *et al.*, 2011; KAO, 2011).

Os genótipos F e H estão restritos a América Central e do Sul. O genótipo G tem sido relatado nos EUA, França, Colômbia e Brasil. E o genótipo H foi encontrado na América do Norte e Central (ALVARADO-MORA *et al.*, 2011).

Por meio de análises filogenéticas, um genótipo novo foi caracterizado no Vietnã e Laos e designado como o genótipo I (TRAN *et al.*, 2008; OLINGER *et al.*, 2008; ALVARADO-MORA *et al.*, 2011).

A **Figura 3** demonstra distribuição geográfica dos diferentes genótipos do VHB no mundo.

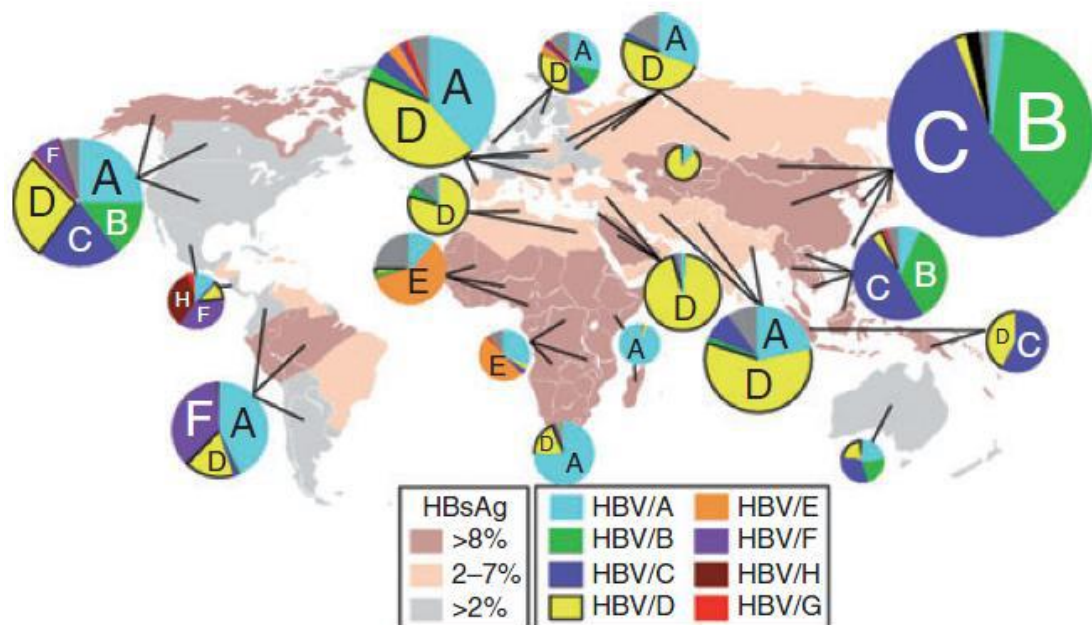


Figura 3. Distribuição geográfica dos diferentes genótipos do VHB no mundo

Fonte: KURBANOV *et al.*, 2010).

No Brasil dependendo da região geográfica estudada notamos variação na prevalência da infecção por VHB. Devido a população ser altamente miscigenada, o padrão de circulação do genótipo do VHB é diferenciado da distribuição encontrada em outros países da América Latina, com genótipos A, D e F sendo os mais prevalentes entre os portadores de VHB (PEREIRA *et al.*, 2009; TONETTO *et al.*, 2009; ALVARADO-MORA *et al.*, 2011).

Mello e colaboradores publicaram em 2007 um estudo sobre a distribuição de genótipos do VHB nas cinco regiões do Brasil. O genótipo A foi o mais prevalente na Região Norte (63,4%), Nordeste (54,2%) e Sudeste (64,3%). O genótipo D foi o mais prevalente no Sul (84,2%). Na Região Centro-Oeste, houve uma distribuição equilibrada dos genótipos A (44,7%) e D (47,6%). O trabalho não relatou a presença do genótipo F nestas regiões (MELLO *et al.*, 2007).

Em estudo realizado com pacientes portadores de Hepatite B em Campinas, Sudeste do Brasil, foram detectados os genótipos A, C, D e F. O Genótipo A foi o mais comum, com uma frequência de 55% (TONETTO *et al.*, 2009).

A população do Sudeste do Brasil é composta de muitos descendentes europeus e africanos, que poderia explicar a alta prevalência do genótipo A. Também é descrita uma taxa relativamente elevada de genótipo D (38%), no Estado de São Paulo provavelmente pela presença de muitos imigrantes da região do Mediterrâneo (TONETTO *et al.*, 2009).

Outro estudo realizado em uma comunidade afro-descendente no Maranhão com alta frequência de infecção por VHB relatou a presença exclusiva do subgenótipo A1. Este estudo revela que este genótipo é encontrado em populações na América entre descendentes da África do Sul. Além disso, o estudo sugere a necessidade de maior análise das seqüências de VHB obtidas de comunidades afro-descendentes, o que permitirá uma melhor compreensão

sobre a rota da migratória da infecção do VHB entre estes dois continentes (ALVARADO-MORA *et al.*, 2011).

No município de Lábrea, na região Amazônica, em estudo publicado no ano de 2012 envolvendo grupos indígenas e não indígenas, foram encontrados três genótipos: A, D e F, sendo o genótipo A o mais frequente (60%), seguido de D (35%) e F (5%). O genótipo F é característico de populações ameríndias, portanto predominantemente encontrado na região Norte. O perfil de distribuição dos genótipos encontrados do VHB reflete o padrão de ocupação histórica da região (DIAS *et al.*, 2012).

Os genótipos do VHB encontrados em diferentes populações geográficas diferem quanto à viabilidade, replicação e sensibilidade às drogas antivirais o que pode levar a implicações na evolução clínica da doença. A razão desta diferença de genótipos numa mesma área de abrangência pode ser justificada pela variedade de etnias e país de origem do carreador do VHB (KUMAR *et al.*, 2011).

É interessante notar que a imigração e as viagens ao redor do mundo têm interferido na distribuição mundial dos genótipos. A consequência deste fluxo de pessoas pode estar alterando o perfil de distribuição no mundo, principalmente em áreas urbanas (KRAMVIS *et al.*, 2005).

O vírus da hepatite B apresenta alterações na sua estrutura genética que podem refletir diretamente no maior ou menor risco de desenvolver cirrose hepática ou hepatocarcinoma no fígado. Principalmente, a heterogeneidade dos genótipos B parece estar relacionada com diferenças na evolução clínica da infecção e na resposta ao tratamento antiviral (ROCANTO *et al.*, 2008; TATEMATSU *et al.*, 2009).

Relatos indicam que o hepatocarcinoma é mais frequente nos pacientes infectados com o genótipo C do que B (FUNG & LOK, 2004; TANAKA & MIZOKAMI, 2007; KAO, 2008).

2.2. Epidemiologia

Estima-se que aproximadamente 2 bilhões de pessoas estão expostas em todo o mundo ao VHB e cerca de 360 milhões de indivíduos com infecção crônica podem estar em risco de complicações de câncer de fígado ou progressiva doença hepática (OCANA *et al.*, 2011).

Na China, sudeste Asiático, na maior parte da África, na maioria das Ilhas do Pacífico, em partes do Oriente Médio e da Bacia Amazônica, a prevalência do VHB é considerada alta podendo variar de 8% a 15%. Dos indivíduos infectados pelo VHB, cerca de 45% vivem em áreas de alta prevalência, onde o risco de infecção supera 60%, com a infecção ocorrendo geralmente durante a infância (TE & JENSEN, 2010).

Aproximadamente 43% dos indivíduos infectados vivem em áreas de prevalência intermediária podendo variar de 2% a 7%, onde o risco de infecção oscila de 20% a 60%, normalmente ocorrendo em todas as faixas etárias. Estas áreas incluem centro-sul e sudoeste da Ásia, leste e sul da Europa, Rússia, bem como América do Sul e América Central. Os 12% restantes vivem em áreas de baixa prevalência, menor que 2%, onde o risco de infecção parece ser inferior a 20%, ocorrendo caracteristicamente na idade adulta. Estas áreas de baixa prevalência incluem os Estados Unidos, Europa Ocidental e Austrália (TE & JENSEN, 2010) **(Figura 4)**.

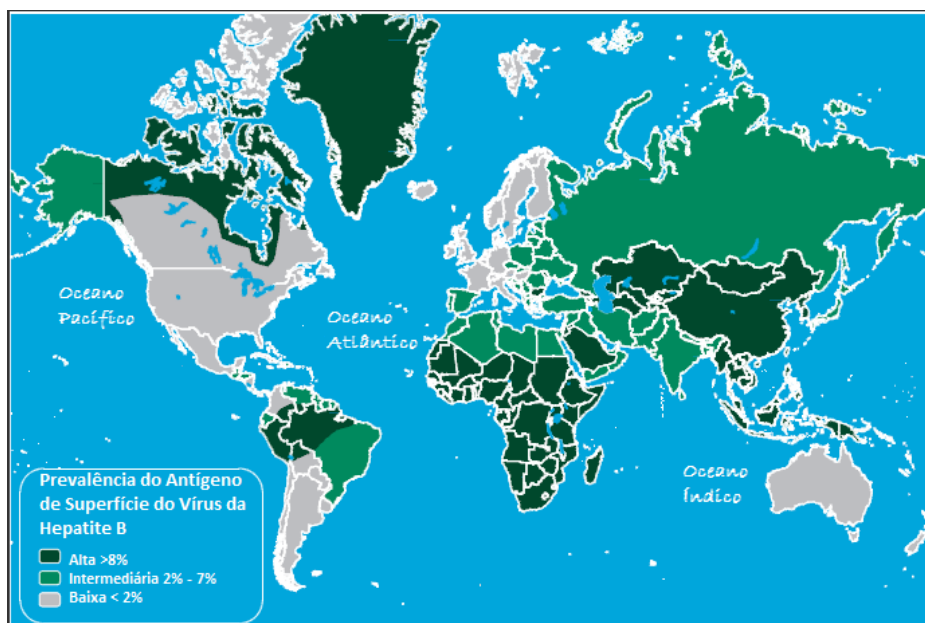


Figura 4. Prevalência da infecção crônica pelo vírus da hepatite B no mundo, 2006.

Fonte: Adaptada de TESHLE, 2011.

No Brasil, a distribuição do VHB apresenta-se bastante heterogênea, estudos avaliando a prevalência do antígeno de superfície em capitais do nordeste, centro-oeste e Distrito Federal demonstraram a presença do vírus na população com índices abaixo de 1% (PEREIRA *et al.*, 2009).

No boletim epidemiológico de hepatites virais divulgado em 2011 para hepatite B a região Sudeste apresentou 36,6% dos casos, seguido do Sul, com 31,6% dos casos notificados, no período de 1999 e 2009. Foi possível observar que, tanto o país, quanto as regiões apresentaram crescimento das taxas de incidência (número de casos a cada 100 mil habitantes). No Brasil, a taxa passou de 0,5%, em 1999, para 5,6%, em 2009. A região Sul registrou os maiores índices desde 2002, seguida da Norte. As taxas observadas nessas duas regiões, em 2009, foram de 13,3 e 12,6 por 100 mil habitantes, respectivamente (BRASIL, 2011). Estes dados identificam a necessidade de aperfeiçoamento da vigilância no Estado do

Amazonas, visando melhorar a da qualidade da informação e da capacidade local para a captação e confirmação de casos.

A Secretaria de Vigilância em Saúde/MS também divulgou o resultado de 7,4% para a prevalência global do marcador de exposição ao VHB (anti-HBc), referente ao conjunto das capitais do Brasil. Para todas as regiões, verificou-se um aumento da positividade do anti-HBc total com a idade. Para o marcador HBsAg, a prevalência global referente ao conjunto das capitais do Brasil foi de 0,37% (BRASIL, 2011).

No interior do Estado do Amazonas, após estudo na cidade de Itamarati, vale do rio Juruá, foi encontrada uma prevalência de 7% para portadores do HBsAg e de 83,3% para a presença do anti-HBc total. Ainda, entre indivíduos reativos para qualquer marcador do VHB, 22,2% foram positivos para o anti-HDV (anticorpo contra o antígeno do vírus da hepatite D) (BRAGA *et al.*, 2004).

Outro estudo, realizado no município de Lábrea, identificou um padrão de endemicidade moderada para o VHB e estimou-se a prevalência de co-infecção com vírus da Hepatite Delta dentro de uma população geral de uma região endêmica da infecção da malária na Amazônia brasileira, detectando a prevalência de 3,3% para o marcador HBsAg e de 49,9% para o marcador anti-HBc total (BRAGA *et al.*, 2005).

2.3. Transmissão

O VHB é um vírus de DNA altamente contagioso, podendo ser transmitido pela via parenteral ou exposição da mucosa ao sangue infectado, líquido seroso, onde a sua concentração é mais alta, e fluidos corporais, tais como sêmen e fluido vaginal. Dentre as formas de transmissões destacam-se a vertical (transmissão da mãe para o filho), uso de perfurocortantes, contato sexual, e transfusões de sangue (TESHALE, 2011).

Segundo dados publicados pelo Ministério da Saúde em julho de 2011, a exceção do Sudeste, as demais regiões apresentaram uma maior oportunidade de exposição ao VHB para indivíduos com piores condições socioeconômicas. A transmissão sexual foi relevante nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sul, sendo que, nesta última, a transmissão por hemocomponentes também se destacou (BRASIL, 2011).

Em 2011, o Ministério da Saúde também divulgou a distribuição percentual dos casos de hepatite B segundo provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação no Brasil de 1999 a 2010 (BRASIL, 2011) (**Gráfico 1**).

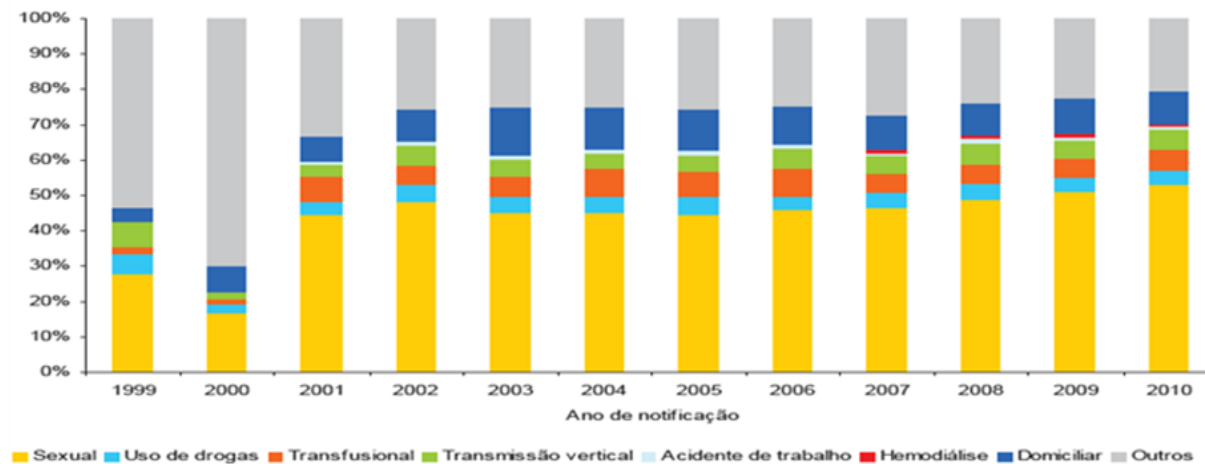


Gráfico 1. Distribuição percentual dos casos de Hepatite B segundo provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação, Brasil, 1999 a 2010.

Fonte: BRASIL, 2011.

O mecanismo de transmissão do VHB na Amazônia ainda não está claramente definido. A transmissão intra-familiar é comumente descrita e está normalmente associada a presença de um portador do VHB na família (CASTILHO *et al.*, 2012).

2.4. Hepatite B Oculta e Segurança Transfusional

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

Os testes HBsAg e anti-HBc são utilizados para a detecção do vírus da hepatite B na triagem sorológica do banco de sangue e na investigação clínica. Contudo, a elevada positividade isolada para o marcador anti-HBc é refletida no aumento de bolsas descartadas (LAUNAY *et al.*, 2011). Esta positividade pode ser consequência de fatores como: reações sorológicas falso-positivas, período da janela imunológica, expressão de imunidade tardia e infecção crônica onde a positividade do anti-HBc pode ocorrer concomitantemente com uma carga viral baixa do VHB, e o HBsAg não é detectado pelos métodos sorológicos habituais, caracterizando IOB (ZANETTI *et al.*, 2006; OCANA *et al.*, 2011).

Em regiões de alta prevalência da hepatite B, algumas alternativas têm sido propostas para evitar a escassez de sangue, são elas: 1) aproveitar doadores anti-HBc reativo/anti-HBs positivo (> 100 mUI/mL), segundo a literatura esse procedimento é controverso pois nem sempre a presença do anti-HBs é indicativo da ausência do DNA VHB; 2) anti-HBc reativo com anti-HBs positivo (< 100 mUI/mL) com DNA VHB negativo; 3) vacinar contra o VHB os doadores que apresentem anti-HBc reativo isolado e verificar soroconversão, também é uma conduta controversa, pois a vacinação pode estimular a resposta imune humoral ou induzir a mutação do vírus nos casos de indivíduos diagnosticados com a hepatite B oculta (SILVA *et*

al., 2005; BHATTI *et al.*, 2007; SATOH *et al.*, 2008; ANTAR *et al.*, 2010; THEDJA *et al.*, 2010; SOFIAN *et al.*, 2010; LAUNAY *et al.*, 2011; ROTH *et al.*, 2012; TANI *et al.*, 2012); 4) importar bolsas de sangue de áreas com baixa prevalência para o anti-HBc; 5) campanhas para motivar os doadores saudáveis e torna-los doadores de repetição.

A infecção pós-transfusional é relatada em diversos estudos que evidenciaram o desenvolvimento da doença após histórico de transfusão sanguínea e transplantes de órgãos a partir de doadores anti-HBc total isolado (PANIGRAHI *et al.*, 2010). Em alguns casos são descritos transmissão transfusional do VHB em situações de ausência de marcadores sorológicos para a infecção, sendo o DNA VHB o único marcador passível de detecção (WENDEL, 2007; LEVICNIK-STEZINAR *et al.*, 2008; WENDEL *et al.*, 2008; HOLLINGER, 2008; ALLAIN & CANDOTTI, 2009; HOLLINGER & DODD, 2009; SOFIAN *et al.*, 2010; CAPEZZUTO *et al.*, 2010; LEUNG *et al.*, 2010; OZASLAN & PURMAK, 2010; LAUNAY *et al.*, 2011).

Em um estudo Koreano envolvendo 12.461 doadores de sangue, onde 1.682 (13,5%) das amostras foram reativas para o anti-HBc e destas, 1.523 (90,5%) positivas para o anti-HBs, a prevalência para IOB foi de 0,016% (SEO *et al.*, 2011).

Um inquérito internacional incluindo 37 países, inclusive o Brasil (São Paulo) reportou os resultados do NAT na triagem de 300 milhões de doadores de sangue para HIV e VHC e mais de 100 milhões para o VHB, num período de 10 anos (1998-2008), este estudo revelou a eficácia do NAT para detecção da ocorrência de IOB nos países que utilizam esta tecnologia (ROTH *et al.*, 2012).

No Brasil, um estudo realizado no banco de sangue de Recife (região Nordeste do país) onde de 1000 amostras testadas 120 (12%) mostraram positividade para o anti-HBc,

destas 2 (1,6%) eram anti-HBs positivo e 13 (10%) tinham DNA VHB reativo (ARRAES *et al.*, 2003).

Um trabalho realizado em Porto Alegre, Sul do país, foi detectado uma prevalência de 3,3% DNAVHB entre os anti-HBc positivos (SILVA *et al.*, 2005). Porém outro estudo na mesma região, não encontrou positividade para o DNAVHB entre as amostras de doadores de sangue nos hemocentros no Sul do Brasil (WOLF *et al.*, 2011).

No Estado do Amazonas não há dados publicados sobre hepatite B oculta em doadores de sangue. Este estudo analisou 3.600 doações oriundas do interior do Estado, destas 835 (23,19%) amostras apresentaram algum marcador sorológico para hepatite B. Neste protocolo foram estudadas 112 amostras com perfil: HBsAg negativo, anti-HBc reativo com ou sem a presença do anti-HBs. Das 112 amostras, 4 apresentaram DNAVHB positivo o que representa uma prevalência de 3,57% de IOB nas regiões estudadas (dados não publicados).

2.5. Formas Clínicas da Infecção pelo Vírus da Hepatite B

A evolução da hepatite B depende de vários fatores, dentre eles, a idade em que a infecção ocorre. A hepatite B também pode resultar infecção aguda sintomática ou assintomática, podendo evoluir para hepatite B crônica, cirrose e hepatocarcinoma (WHO, 2004).

Na hepatite B aguda os sintomas, quando presentes, persistem por várias semanas e incluem em geral coloração amarelada de olhos e urina, fadiga extrema, náuseas, vômitos e dor abdominal (NETTLEMAN, 2013).

O risco de progressão a partir de uma hepatite aguda para a fase crônica é inversamente proporcional à idade. Cerca de 5% das infecções agudas em adultos evoluem

para infecção crônica e 90% dos recém-nascidos que adquirem a infecção por VHB de suas mães no momento do nascimento se tornam cronicamente infectados. Entre as crianças que são infectadas com o VHB com idade entre 1 e 5 anos de idade, 30% a 50% se tornam cronicamente infectadas (TE & JENSEN, 2010).

O perfil sorológico da hepatite B crônica é caracterizado pela persistência do antígeno de superfície do vírus da hepatite B por um período superior a seis meses, com ou sem a presença do antígeno “e” (WHO, 2004).

A evolução da Hepatite B crônica pode ser dividida e classificada em quatro fases:

1. **Fase imunotolerante** – caracterizada pela presença do HBsAg e HBeAg, em níveis séricos elevados de DNA VHB e valores normais ou ligeiramente elevados de alanina aminotransferase (ALT). Na fase aguda este estágio representa o período de incubação antes da resposta imune ao VHB.
2. **Fase imunoativa** – caracterizada igualmente por níveis séricos elevados de DNA VHB, mas com níveis de ALT elevados. Verifica-se acentuada necro-inflamação hepática. Esta fase pode durar de 10 a 20 anos e evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular.
3. **Fase de portador inativo** – caracterizada pela eliminação HBeAg e desenvolvimento do anticorpo contra o antígeno “e” do vírus da hepatite B (anti-HBe) (RIBEIRO, 2002). Os níveis de ALT normalizam e DNA VHB torna-se inferior a 2.000 UI/mL. (TEDDER, 2002).
4. **Fase de reativação** – alguns indivíduos imunocomprometidos, desenvolvem mutações virais (no promotor do pré-core ou core) que não promovem a produção de HBeAg, mas que continuam a ter uma taxa de replicação elevada. Caracteriza-se, ainda, por uma flutuação dos níveis do DNA VHB (2.000 a 2.000.000 UI/mL) e por níveis de ALT,

persistentemente, ou, intermitentemente, elevados. Podendo apresentar progressão nos danos hepáticos (VILLENEUVE, 2005; YIM & LOK, 2006).

A persistência do HBsAg é o principal marcador de risco para o desenvolvimento de doença hepática crônica e hepatocarcinoma. A presença do antígeno “e” do vírus da hepatite B (HBeAg) indica replicação viral. As mutações no gene do antígeno de superfície HBsAg indetectáveis por ensaios comerciais e inibição do VHB por supressão da replicação viral e das proteínas virais representam dois mecanismos diferentes porém fundamentais que levam para infecções ocultas por VHB (KAO, 2008; SAMAL *et al.*, 2012).

2.6. Imunopatogênese

Vários estudos sugerem que o VHB não é diretamente citopático para o hepatócito infectado. Além disso, quando as respostas imunes celulares são deficientes ou farmacologicamente suprimidas, o VHB pode replicar em níveis elevados no fígado de pacientes na ausência de anormalidades citológicas ou de inflamação (CHISARI *et al.*, 2010).

O "clearance" viral ou a eliminação espontânea do HBsAg ocorre durante a fase inativa da infecção crônica e está associada a excelente prognóstico. Vários fatores estão associados a esta eliminação tais como idade, classificação do genótipo, bem como ausência de cirrose e esteatose hepática (CHEN, 2012). Contudo o DNA VHB pode ser detectado até 5 anos depois do "clearance" em 21% dos indivíduos classificados como estando na fase de recuperação da hepatite B (McMAHON, 2009).

Na infecção pelo VHB o “clearance” do HBsAg e a patogênese da doença são em grande parte mediados pela resposta imune adaptativa. Para persistir no organismo o VHB inibe uma resposta imunológica. Curiosamente o VHB "escapa" da resposta imune inata por simplesmente não induzi-la, agindo como um vírus invisível (CHISARI *et al.*, 2010).

A persistência viral é caracterizada por um estado de hiporeatividade relativa do VHB específico de células T. Várias proteínas virais tem sido mostradas para regular a resposta imune adaptativa na infecção pelo VHB, sugerindo que VHB pode empregar estratégias de evasão ativa visando a resposta imune adaptativa (CHISARI *et al.*, 2010). De fato, foi demonstrado que o tratamento antiviral pode superar hiporeatividade das células T CD8⁺ na infecção crônica do VHB, sugerindo que as células T estão presentes neste indivíduo, mas estão suprimidas.

Um estudo recente importante sugere a indução de uma resposta eficaz específica ao VHB de células T CD8⁺ inicialmente dependente de células T CD4⁺, o que pode ser regulado pelo tamanho do inoculo viral (CHISARI *et al.*, 2010).

Na infecção aparentemente "resolvida", as células T citotóxicas são responsáveis por controlar a replicação e os anticorpos anti-HBs controlariam as partículas virais circulantes (OCANA *et al.*, 2011).

2.7. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHB é realizado por meio de testes inespecíficos como a análise de parâmetros bioquímicos e testes específicos, a exemplo os sorológicos e moleculares.

Provas bioquímicas de função hepática, tais como a dosagem de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e bilirrubina são realizadas para fins de diagnóstico, porém não são específicas para as hepatites virais, seus níveis aumentam no soro durante os processos de lesão no parênquima hepático em decorrência da infecção (BRASIL, 2008).

No início da infecção, a replicação do VHB nos hepatócitos antecede as manifestações clínicas, neste período o HBsAg pode ser detectado sem que o indivíduo apresente os sintomas característicos da doença. Após iniciar a sintomatologia e elevação da ALT e AST, os anticorpos de classe IgM contra o antígeno do core do vírus da hepatite B (Anti-HBcIgM) e anticorpos de classe IgG contra o HBcAg (anti-HBcIgM e IgG) podem ser detectados no soro (GONÇALES & CAVALHEIRO, 2006). A positividade para o marcador HBsAg juntamente com o marcador anti-HBc IgM constituem o diagnóstico da hepatite B aguda. O marcador anti-HBc IgM é o único marcador sorológico da infecção pelo VHB durante o período de janela imunológica, que consiste entre o desaparecimento do HBsAg e o aparecimento do anti-HBs. O anticorpo contra o antígeno do core do vírus da hepatite B (anti-HBc) apesar de ser de longa duração não possui capacidade neutralizante, portanto, não confere imunidade protetora (SJOGREN, 1994).

De modo geral, o quadro clínico de uma hepatite B benigna ou aguda se resolve em um período inferior a três meses. Na fase inicial da infecção o marcador do antígeno “e” (HBeAg) que indica fase replicativa do vírus encontra-se com títulos elevados. Pacientes que persistem com evidências de replicação viral (HBeAg reativo) após o terceiro mês apresentam maior probabilidade de desenvolverem formas crônicas de hepatite B (BRASIL, 2008). Contudo, sua ausência não pode ser caracterizada como tal, pois pacientes HBeAg negativo e anti-HBe positivos (mutante pré-core) podem apresentar significativa replicação viral (HUNT *et al.*, 2000; HATZIYANNIS & VASSILOPOULOS, 2001; HATZAKIS *et al.*, 2006). Geralmente, a presença do anti-HBe indica soroconversão do HBeAg, mas sabe-se que o anti-HBe é também detectado entre portadores do mutante pré-core (HATZIYANNIS & VASSILOPOULOS, 2001; BONINO & BRUNETTO, 2003).

Quando o indivíduo se recupera da infecção pelo VHB, o HBsAg não é detectado na circulação, normalmente no período de três a quatro meses, aumentando progressivamente a

concentração do anti-HBs no soro (GONÇALES & CAVALHEIRO, 2006). A maioria dos indivíduos que se recupera de uma infecção natural pelo VHB apresenta reatividade para os marcadores sorológicos anti-HBc e anti-HBs.

A persistência do HBsAg no soro após o período de seis meses do início da infecção constitui o diagnóstico da hepatite B crônica. Os indivíduos que se tornam crônicos, permanecem como portadores do vírus por tempo variado e a evolução da doença dependerá da resposta imune do hospedeiro (JÚNIOR *et al.*, 2008).

No **Quadro 1** são descritos os diferentes marcadores para a infecção: HBsAg, HBeAg, anti-HBc IgM, anti-HBc IgG, anti-HBe e anti-HBs que são utilizados no diagnóstico laboratorial para hepatite B, sendo a presença dos mesmos interpretadas de acordo com as características da evolução da infecção, se aguda ou crônica (BRASIL, 2008; JÚNIOR *et al.*, 2008).

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

Interpretação	HBsAg	HBeAg	anti-HBc IgM	anti-HBc IgG*	anti-HBe	anti-HBs
Susceptível	-	-	-	-	-	-
Incubação	+	-	-	-	-	-
Fase aguda	+	+	+	+	-	-
Fase aguda final ou hepatite crônica	+	+	-	+	-	-
	+	-	-	+	+	-
	+	-	-	+	-	-
Início: fase Convalescente	-	-	+	+	-	-
Imunidade: infecção passada recente	-	-	-	+	+	+
Imunidade: infecção passada	-	-	-	+	-	+
	-	-	-	+	-	- **
Imunidade: resposta vacinal	-	-	-	-	-	+

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

**Com o passar do tempo, o anti-HBs pode estar em níveis indetectáveis pelos testes sorológicos (BRASIL, 2008).

Para detectar a presença do ácido nucléico do vírus da hepatite B (DNA VHB) são realizados testes de biologia molecular que podem ser qualitativos, indicando presença ou ausência do vírus; quantitativos, que determina a carga viral presente na amostra; ou de genotipagem indicando o genótipo do vírus (BRASIL, 2008; RAIMONDO *et al.*, 2008).

No diagnóstico por biologia molecular são usadas várias técnicas, tais como: Reação em Cadeia pela Polimerase ou PCR, hibridização, (branched-DNA) ou b-DNA, PCR em tempo real e Amplificação Mediada pela Transcrição ou TMA. A definição da técnica a ser utilizada depende da informação clínica que se quer obter. São métodos utilizados na confirmação diagnóstica da infecção viral e no seguimento de pacientes com formas crônicas, bem como na avaliação terapêutica de pacientes submetidos a tratamento (DIAZ & MENDONÇA, 2006).

A técnica da PCR vem ganhando notoriedade devido o seu alto grau de sensibilidade no diagnóstico da hepatite B oculta, pois é possível diagnosticar o DNA VHB em baixas concentrações, no período da “janela imunológica”, que consiste entre o desaparecimento do HBsAg e o aparecimento do anti-HBs, onde os títulos de HBsAg ainda estão baixos e são indetectáveis através dos testes sorológicos (FERREIRA, 2000; ARRAES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005; MELLO *et al.*, 2007; JÚNIOR *et al.*, 2008; WENDEL *et al.*, 2008; BUSCHRA *et al.*, 2011).

Em 31 de janeiro de 2003 na Portaria 79, foi determinada a implantação, no âmbito da Hemorrede Nacional, nos Serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos, privados contratados pelo SUS, e exclusivamente privados, a realização dos testes de amplificação e de detecção de ácidos nucléicos (NAT), para HIV e para HCV, nas amostras de sangue de doadores. Porém os testes para o VHB não foram contemplados apesar de serem também essenciais para a segurança em banco de sangue como mostra um inquérito internacional qe

incluiu 37 países, inclusive a cidade de São Paulo no Brasil, que reportou os resultados do NAT na triagem de doadores de sangue para o VHB, num período de 10 anos (1998-2008). Doze dos 37 países que utilizam anti-HBc na triagem e como teste confirmatório, relataram um total de 75 doações positivas pelo NAT no período da janela imunológica (6.8/milhão) e 250 doações foram reativas para o DNA VHB, comprovando a importância e eficácia da utilização da metodologia em banco de sangue, também para o VHB (ROTH *et al.*, 2012).

Objetivos

3.1. Objetivo Geral:

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

3.2. Objetivos Específicos

- Descrever os fatores de risco e dados demográficos relacionados à infecção pelo vírus da hepatite B nas doações de sangue oriundas das regionais de saúde do Alto Solimões e Amazonas;
- Descrever a prevalência do DNA do vírus da hepatite B nas doações de sangue oriundas das regionais de saúde do Alto Solimões e Amazonas com anti-HBc total positivo e HBsAg negativo;
- Analisar a associação entre a presença do DNA do vírus da hepatite B com os títulos do anti-HBs nas amostras reativas para este parâmetro;
- Analisar a associação da carga viral encontrada com o perfil sorológico para hepatite B do doador de sangue envolvido;
- Descrever os genótipos do vírus B encontrados em amostras positivas para DNA VHB.

Material e Métodos

4.1. Desenho do Estudo

Estudo descritivo, observacional, transversal para determinar nas doações de sangue do interior do Estado do Amazonas a presença da hepatite B oculta em amostras HBsAg negativas, anti-HBc total positivas com ou sem o marcador anti-HBs.

O desenho do estudo foi baseado na iniciativa “STROBE” - “*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*” (Aprimorando a Apresentação de Resultados de Estudos Observacionais em Epidemiologia) (VON ELM *et al.*, 2007; MALTA *et al.*, 2010).

4.2. População de Estudo

A população estudada foi composta por candidatos a doação de sangue provenientes das Unidades de Coletas Transfusionais (UCT's) nas regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas, constituídas por 24 municípios, no período de junho de 2011 a junho de 2012.

4.3. Área de estudo

O Estado do Amazonas é formado por 62 municípios, abrange uma extensão de 1.559,161,682 Km² e segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgado em 2010 sua população compreende cerca de 3.483.985 habitantes (<http://www.ibge.gov.br/home>). Para o delineamento deste estudo foi considerado o mapa da Secretaria Estadual de Saúde do ano 2010 que classificou o Estado do Amazonas em sete regionais de saúde de acordo com a calha dos rios e suas características geográficas, são eles: Alto Solimões, Amazonas, Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo (Jutaí/ Solimões/ Juruá) (<http://www.saude.am.gov.br/>).

Este estudo é parte de um projeto maior que prevê fazer abrangência a todo Estado do Amazonas compreendendo todas as doações de sangue oriundas no período de execução do mesmo. Então considerando o desafio geográfico e as diferenças epidemiológicas regionais este estudo analisou as doações de sangue proveniente das regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas (**Figura 5**) em outro protocolo do grupo de pesquisa foi realizado estudo paralelo nas regionais de saúde Baixo Amazonas, Entorno de Manaus, Médio Amazonas, Rio Negro e Solimões e Triângulo (Jutaí/ Solimões/ Juruá).



Figura 5. Mapa com as regionais de saúde do Estado do Amazonas destacando o Alto Solimões (A) e Amazonas (B).

Fonte: SUSAM/Fundação de Vigilância em Saúde (FVS), 2010.

Municípios pertencentes às regionais de saúde deste protocolo:

- A. Alto Solimões:** Amaturá, Benjamim Constant, Tonantins, São Paulo de Olivença, Ataláia do Norte, Santo Antônio do Içá, Tabatinga.

B. Amazonas: Tapauá, Canutama, Lábrea, Pauini, Boca do Acre, Borba, Novo Aripuanã, Manicoré, Humaitá, Apuí, São Gabriel da Cachoeira, Santa Izabel do Rio Negro, Barcelos, Ipixuna, Guajará, Codajás, Coari.

4.4. Situação Problema

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

4.5. Hipóteses

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

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

4.6. Grupos de Estudo

Para efeito de realização de análise do ponto de corte (*cut-off*) de positividade do anti-HBs, de acordo com a rotina estabelecida pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM, as amostras das doações estudadas foram divididas em dois grupos:

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

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

4.7. Cálculo Amostral

Para cálculo da magnitude do efeito foram considerados três aspectos:

1. Em áreas endêmicas a presença do DNA VHB em unidades de sangue derivadas de amostras anti-HBs positivas (com anti-HBc positivo/HBsAg negativo) acontece com uma prevalência de 1,5% e em amostras anti-HBs negativas com prevalência de 8%, respectivamente (BHATTI *et al.*, 2007).

2. Em áreas não endêmicas a presença do DNA VHB está presente em unidades de sangue derivadas de amostras anti-HBs positivas (com anti-HBc positivo/HBsAg negativo) acontece com uma prevalência de 0,8% e em amostras anti-HBs negativas com prevalência de 2,8%, respectivamente (HOLLINGER, 2008).

3. Entre os doadores do interior do Estado do Amazonas existe diferença na distribuição dos doadores anti-HBs positivos e negativos (anti-HBc positivos/HBsAg negativos), sendo esta demonstrada na **Tabela 1**.

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

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

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

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

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

Tabela 2. Tamanho amostral e distribuição nos dois grupos.

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

Estimativa: 95% de confiança

Nível de significância estatística (α): 0,05

Poder ($1-\beta$): 0,80 $\beta=0,2$

O número amostral representado na **Tabela 2** corresponde à representação de todo o Estado do Amazonas. Especificamente para este protocolo que corresponde às regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas, a amostragem está disposta na **Tabela 3** de acordo com a quantidade de doações das áreas estudadas.

Tabela 3. Tamanho amostral e distribuição nos dois grupos para as regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas

Grupo A	Grupo B	Total
816	136	952

4.8. Critérios de Elegibilidade

Doações provenientes de:

- Doadores de sangue das Regionais de Saúde Alto Solimões e Amazonas com os marcadores: HBsAg negativo, anti-HBc total positivo com ou sem o anti-HBs;
- Ambos os gêneros;

- Com ou sem a presença de outros marcadores sorológicos para outras patologias.

4.9. Procedimentos de Coleta de Amostras

No momento em que o candidato a doação de sangue comparecia na Unidade de Coleta Transfusional, o técnico colaborador da pesquisa apresentou ao doador(a) de sangue a proposta do estudo, esclarecendo seus objetivos e a metodologia a ser utilizada.

O candidato a doação ao concordar com a pesquisa foi convidado a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (**Apêndice A**). O colaborador do estudo aplicou um Questionário Epidemiológico dirigido por um roteiro padronizado (**Apêndice B**) contendo perguntas que analisam aspectos demográficos e epidemiológicos do indivíduo para detectar possíveis fatores de risco para hepatite B.

Se não houve a aceitação do candidato à doação na participação do estudo, o mesmo continuou tendo o seu atendimento de triagem e doação de sangue conforme a rotina do serviço.

Após a entrevista, houve a coleta de 5mL de sangue venoso em tubo de ensaio devidamente identificado e sem anticoagulante por um técnico qualificado. Esta amostra após sofrer coagulação espontânea, foi centrifugada a 3.000 rpm durante 5 minutos, o soro foi separado e conservado a -20°C conforme procedimento rotineiro estabelecido e padronizado pela Fundação HEMOAM.

As amostras, os TCLEs e os Questionários Epidemiológicos foram embalados, identificados e encaminhados a Fundação HEMOAM conforme a logística e fluxo já existente na rotina institucional.

Os técnicos das Unidades de Coletas Transfusionais do interior do Estado foram previamente instruídos e receberam um Manual de Procedimento Operacional Padrão (POP), contendo todas as orientações para os procedimentos de abordagem ao doador, entrevista, coleta e processamento da amostra e de transporte da mesma.

Todas as orientações técnicas adicionais foram repassadas durante as visitas técnicas realizadas regularmente nos municípios pelo Departamento de Unidades Hemoterápicas da Fundação HEMOAM.

4.10. Amostras

O Departamento de Unidades Hemoterápicas recebeu e conferiu todo o material (TCLE, Questionário Epidemiológico e as amostras) enviado pelas Unidades de Coletas Transfusionais.

No laboratório de sorologia da Fundação HEMOAM todas as amostras foram submetidas à detecção de marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc através do teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Este procedimento técnico foi posteriormente substituído pelo imunoensaio quimioluminescente por micropartículas (CMIA) – ARCHITECT® - ABBOTT/Alemanha devido a decisões institucionais.

Após a realização dos testes de rotina, foram preparadas duas alíquotas: uma para a realização dos ensaios previstos neste estudo; outra para compor soroteca, com fins de análises e estudos posteriores, conforme previsto na Portaria 092/2005 – GHEMOAM, dos doadores que se enquadraram nos critérios de inclusão.

A amostra que apresentou sorologia reativa para anti-HBc sem presença do HBsAg, foi testada para o marcador anti-HBs no Laboratório da Secretaria de Saúde do Município de

Manaus Professor Manoel Bastos Lira, empregando-se o teste quantitativo imunoensaio quimioluminescente por micropartículas (CMIA) – ARCHITECT® - ABBOTT/Alemanha (Doação realizada pela empresa Diagnocel LTDA).

Todos os resultados e o ponto de corte/*cut-off* dos testes e o título dos anticorpos anti-HBs foram registrados em planilha de controle (**Apêndice C**).

4.11. Testes Sorológicos

4.11.1. Detecção do HBsAg (ARCHITECT® - ABBOTT)

É um imunoensaio de duas etapas para detecção quantitativa, usando a tecnologia quimioluminescência por micropartículas (CMIA), para determinar a presença de HBsAg em soro ou plasma. Na primeira etapa, a amostra e as micropartículas paramagnéticas revestidas com anti-HBsAg são combinadas. O HBsAg presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas com anti-HBs.

Após lavagem, na segunda etapa o conjugado de anti-HBsAg marcado com acridina é adicionado. Prosseguindo para outro ciclo de lavagem, as soluções pré-trigger (pré-ativadora) e trigger (ativadora) são adicionadas à mistura de reação.

A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades relativas de luz (RLU). A concentração de antígeno de superfície da hepatite B na amostra é determinada usando-se uma curva de calibração do ARCHITECT® - ABBOTT HBsAg previamente gerada. Se a concentração da amostra for maior ou igual a 0,05 UI/mL, a amostra é considerada reativa para HBsAg. Os ensaios foram realizados conforme padronização do fabricante.

4.11.2. Detecção do Anti-HBc Total

Para a detecção qualitativa do anti-HBc primeiramente foi utilizado o ensaio Murex anti-HBc total ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), este é baseado em microcavidades revestidas com antígeno *core* recombinante da hepatite B (HBcAg).

As amostras e controles são incubados nos poços e qualquer anti-HBc presente na amostra ou controle liga-se ao HBcAg. Qualquer excesso de anticorpo é removido por lavagem.

O Conjugado (anti-HBc monoclonal conjugado com peroxidase de rábano silvestre) é então adicionado aos poços. Uma segunda incubação é realizada durante a qual o conjugado liga-se a qualquer HBcAg da superfície do poço não bloqueado pelo anti-HBc da amostra teste.

Após a lavagem para remoção de qualquer conjugado não ligado, uma solução contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio é adicionada aos poços. Os poços que não contêm anti-HBc e, portanto, o conjugado ligado, desenvolvem uma coloração azul/verde que se converte em laranja quando a reação da enzima é bloqueada com ácido sulfúrico. A intensidade da coloração pode ser determinada espectrofotometricamente. A intensidade da coloração é maior na ausência de anti-HBc e diminui com o aumento das concentrações de anti-HBc na amostra. Os ensaios foram realizados conforme padronização do fabricante.

No decorrer do estudo a Fundação HEMOAM substituiu o teste ELISA do anti-HBc pelo ensaio ARCHITECT® - ABBOTT anti-HBc II, imunoensaio de duas etapas para a detecção qualitativa do anti-HBc em soro e plasma humano que usa a tecnologia de quimioluminescência por micropartículas (CMIA), com protocolos de ensaio flexíveis, denominados Chemiflex.

Na primeira etapa, a amostra, o diluente de ensaio, o diluente de amostra e micropartículas paramagnéticas revestidas com rHBcAg são combinados. O Anti-HBc presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas com rHBcAg e a mistura de reação é lavada

Na segunda etapa, o conjugado marcado com acridina anti-humana é adicionado. Seguindo outro ciclo de lavagem, as soluções pré-deflagradora e deflagradora são adicionadas à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades relativas de luz (RLU).

Existe uma relação direta entre a quantidade de anti-HBc na amostra e as RLU detectadas pelo sistema óptico do ARCHITECT® - ABBOTT. A presença ou ausência de anti-HBc na amostra é determinada comparando o sinal quimioluminescente na reação com o sinal *cut-off* determinado a partir de uma calibração ativa do ARCHITECT® - ABBOTT anti-HBc II. Se o sinal quimioluminescente na amostra for maior ou igual ao sinal *cut-off*, a amostra é considerada reativa para anti-HBc. Os ensaios foram realizados conforme padronização do fabricante.

4.11.3. Detecção do Anti-HBs (ARCHITECT® - ABBOTT)

O imunoensaio compreende de duas etapas para a determinação quantitativa do anti-HBs em soro e plasma humano e usa a tecnologia de quimioluminescência por micropartículas (CMIA).

Na primeira etapa, a amostra e micropartículas paramagnéticas revestidas com HBsAg recombinante são combinadas. O anti-HBs presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas com rHBsAg.

Após a lavagem, na segunda etapa o conjugado marcado com acridina anti-humana é adicionado. Seguindo outro ciclo de lavagem, as soluções pré-deflagradas e deflagradoras são adicionadas à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades relativas de luz (RLU).

A concentração de anti-HBs na amostra é determinada usando uma curva de calibração ARCHITECT® - ABBOTT anti-HBs previamente gerada. Se a concentração for maior ou igual a 10,00 mUI/mL, a amostra é considerada reativa para anti-HBs. Os ensaios foram realizados conforme padronização do fabricante.

4.12. Ensaios Moleculares

As técnicas para extração do VHB DNA e PCR em tempo real para β -actina foram realizadas no laboratório de biologia molecular da Fundação Alfredo da Matta (FUAM). Para a detecção e quantificação do VHB DNA utilizou-se o laboratório de biologia molecular da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo/SP. Quando positivas para o DNA VHB as amostras foram submetidas às técnicas de amplificação e sequenciamento para a detecção e genotipagem do DNA VHB no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (USP). Todos os resultados foram computados em uma ficha geral de registro e acompanhamento para composição do banco de dados do estudo (**Apêndice C**).

4.12.1. Extração do DNA VHB

Para extração do DNA viral, a partir de 1000 μ L de soro sanguíneo, foi utilizado o Kit QIAamp® UltrasensTM Virus (QIAGEN/USA). O Kit é composto pelos reagentes: *Buffer AC*, *RNA Carrier*, *Buffer AR*, *Proteinase K*, *Buffer AB*, *Buffer Aw1* e *AW2* e o AVE. O *Buffer*

AC (isopropanol) é um reagente que forma complexos com ácidos nucleicos, e estes complexos foram sedimentados por baixa centrifugação para formar um precipitado. Este precipitado foi ressuspenso em um volume pequeno de *Buffer* antes da purificação do ácido nucleico usando o procedimento QIAamp, permitindo de forma eficiente e sensível o isolamento do ácido nucleico viral. O *Buffer* AC e o RNA *Carrier* foram adicionados ao soro. Após um curto período de incubação, a amostra foi centrifugada em baixa velocidade para sedimentar os complexos de ácidos nucleicos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuspenso em *Buffer* AR (cloridrato de guanidina) e proteinase K, e incubado por 10 min a 40°C. As condições vinculativas foram ajustadas pela adição do *Buffer* AB (etanol e Nonidet) e do lisado aplicado a uma coluna de spin QIAamp. Durante uma breve centrifugação, o DNA ligou-se seletivamente à membrana QIAamp deixando passar os contaminantes. Os contaminantes restantes e inibidores de enzima foram removidos por centrifugação em duas etapas de lavagem, e os ácidos nucleicos virais puros foram eluídos em 60µL de Tampão de Eluição (AVE).

4.12.2. Controle da Extração – PCR em Tempo Real para β -actina

Para a verificação da viabilidade do DNA extraído, foi realizado a PCR em tempo real para β -actina humana através do sistema de detecção SYBR® Green (Applied Biosystems). O SYBR® Green se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador que emite uma fluorescência verde. O SYBR® Green não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena. Porém, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA. No início da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR® Green. As moléculas não-ligadas do SYBR® Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo sendo este subtraído durante a análise do programa. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do

SYBR® Green podem ligar-se na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do SYBR® Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do SYBR® Green são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004). As PCRs foram realizadas no termociclador STEP ONE PULS (Applied Biosystems, Warrington, UK) seguindo os parâmetros de ciclagem: 10 minutos à 95°C para ativação da Taq polimerase, seguido por 40 ciclos de desnaturação à 59°C por 15seg, anelamento e extensão à 60°C por 60seg. Sequências de primers para β -actina: senso (5' TGACAAAACCTAACTTGCGC 3') e anti-senso (5' ATAAAGCCATGCCAATCTCA 3').

4.12.3. PCR em Tempo Real para Detecção e Quantificação de DNA VHB

A amplificação do DNA VHB foi realizada através da tecnologia de PCR em tempo real utilizando o protocolo padronizado pela Fundação Pró Sangue/SP. Este protocolo tem como fundamento o uso do sistema TaqMan® Univerval Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, USA) que é uma sonda com fragmentos de DNA marcado para hibridizar outra molécula de DNA, utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. O DNA alvo é detectado e quantificado por comparação a uma curva padrão de DNA VHB (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2005).

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

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

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

Tabela 4. Mix para amplificação do VHB

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

Tabela 5. Sequência de Primers/Probe do VHB

	Região	Primers	Coordenadas
VHB Foward:		5' – GTGTCTGCGGCGTTTTATCAT – 3'	225-245
VHB Reverse:	S	5' – GGACAAACGGGCAACATACCT – 3'	303-323
VHB Probe:		5' FAM - ATCCTGCTGCTATGCCTC - NFQ 3'	256-273
Produto amplificado 98pb			

*A numeração para localização dos sítios de anelamento dos primers e sonda foi baseada na sequência AF129506 retirada do GenBank,

4.12.4. Análise dos Genótipos do VHB

As amostras que apresentaram carga viral detectável por PCR em tempo real foram submetidas à amplificação pela metodologia de nested PCR para posterior sequenciamento e caracterização dos genótipos e subgenótipos do VHB. Para isso foram realizadas três diferentes estratégias, que consistiram na amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos dos genes S/Polimerase do VHB. Os *primers* selecionados para essas reações foram desenhados a partir da análise de um alinhamento de sequências do genoma completo do VHB obtidos no *GenBank*, banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, MD, EUA) e assim como os *primers* utilizados na PCR em tempo real, eles anelam em regiões conservadas entre todos os genótipos do VHB.

Procedimentos rigorosos para técnica de diagnóstico de amplificação de ácidos nucleicos foram seguidas para evitar resultados falso-positivos (KWOCK & HIGUCHI, 1989). Além disso, foram incluídos controles negativos entre as amostras para minimizar a

possível ocorrência de contaminação cruzada entre as amostras e um controle positivo para análise da eficácia da reação.

Inicialmente amplificou-se um fragmento compreendendo todo o gene S e uma parte do gene da polimerase. Para a primeira PCR foram utilizados os *primers* PS3132F (25 pmol/ μ L) e 2920RM (25 pmol/ μ L) para gerar um fragmento de 1506 pares de base e os *primers* PS3201F (25 pmol/ μ L) e 1285R (25 pmol/ μ L) para gerar o fragmento da 2^a PCR de 1306 pb. Os *primers* selecionados foram desenhados a partir da análise de um alinhamento de sequências do genoma completo do VHB obtidos no *GenBank*, banco de dados do NCBI. Os *primers* foram desenhados e a reação foi padronizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto de Medicina Tropical/USP (dados não publicados).

As reações da primeira PCR para a obtenção do fragmento de 1506pb foi realizada montando-se um mix descrito na **Tabela 6**.

Tabela 6. Mix para amplificação da região S/POL do VHB por nested PCR

Reagente	Volume	Concentração
Água Milli-Q	72,5 µL	
Tampão de PCR (Invitrogen™ Life Technologies)	10 µL	10x
dNTP's (Invitrogen™ Life Technologies)	6 µL	10mM
MgCl ₂ () (Invitrogen™ Life Technologies)	4 µL	50mM
<i>primer</i> PS3132F (sense) (Invitrogen™ Life Technologies)	1 µL	25 pmol/ µL
<i>primer</i> 2920RM (antisense) (Invitrogen™ Life Technologies)	1 µL	25 pmol/ µL
Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen™ Life Technologies)	0,5 µL	(2,5 U)
DNA	5 µL	
Volume Final	100 µL	

Esta mistura foi submetida a uma programação de amplificação no termociclador Eppendorf MasterCycler ® Gradiente obedecendo a condição de 94 °C por 1 minuto para provocar a desnaturação das fitas seguido de 35 ciclos nas seguintes condições: 94 °C por 30 segundos, 48 °C por 30 segundos (anelamento dos *primers*), 72 °C por 1 minuto e 40 segundos (extensão) e no fim 72 °C por 5 minuto (para finalização de alguma polimerização incompleta). Esta primeira etapa gerou produto amplificado de 1506 pb.

Em seguida foi preparado outro mix contendo os mesmos volumes e proporções do mix descrito na **Tabela 6** com a substituição pelo par de *primers* PS3201F (como sense) e 1285RM (como antisense), e o material template de 5 µL do produto amplificado da reação anterior. A mistura foi submetida à programação de amplificação no termociclador Eppendorf MasterCycler ® Gradiente obedecendo protocolo descrito anteriormente, alterando somente na temperatura de 48 °C por 30 segundos (anelamento dos *primers*) para 54°C. O produto amplificado do nested PCR foi de 1306 pb.

Naqueles casos em que não foi possível amplificar utilizando esse conjunto de *primers*, foi realizada nova etapa de nested PCR para amplificação de um fragmento de 734 pb dessa mesma região genômica utilizando os *primers* FHBS1 (SITNIK *et al.*, 2004) e RADE1M (GOMES-GOUVÊA *et al.*, 2009) para gerar o fragmento da 1ª PCR e FHBS2 (SITNIK *et al.*, 2004) e RADE2M (GOMES-GOUVÊA *et al.*, 2009) para gerar o fragmento da 2ª PCR.

Para a primeira PCR foram utilizados os *primers* FHBS2 (como sense) e RADE2M (como antisense) diluído em um mix semelhante ao descrito na **Tabela 6**. A PCR foi realizada conforme os seguintes parâmetros de ciclagem: 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C (primeira PCR) ou 50 °C (segunda PCR) durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto, todo esse processo depois da desnaturação inicial a 94°C em 1 minuto. O produto amplificado do nested PCR foi de 734 pb.

Por fim, as amostras com carga viral detectável por PCR em tempo real e nas quais não foram possíveis as amplificações do DNA viral por nested PCR utilizando os *primers* citados anteriormente, foram submetidas à amplificação com *primers* que amplificam um fragmento menor da região S do genoma do vírus, resultando no produto amplificado de 416 pb: FHBS1 e RHBS1 para gerar o fragmento da 1ª PCR; e FHBS2 e RHBS2 para gerar o fragmento da 2ª PCR (SITNIK *et al.*, 2004).

O mix de reagentes utilizados para estas reações foi o mesmo descrito na **Tabela 6**, havendo substituição apenas dos *primers*. As condições de amplificação para as duas rodadas da nested PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C durante 20 s, seguido por 30 ciclos de 94 °C, durante 20 s, 56 °C durante 20 s, e 72 °C, durante 30 s, com uma etapa de extensão final a 72 °C durante 1 minuto num termociclador Eppendorf MasterCycler ® Gradiente.

4.13. Análises Estatísticas

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

4.14. Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM em outubro de 2009 sob o n° CAAE 0014.0.112.000-09, sendo o mesmo aprovado (**Anexo A**).

Na detecção de presença de DNA do VHB nas amostras de doadores de sangue, será feita a notificação para a Diretoria Técnica da Fundação HEMOAM e também ao Comitê de Hemovigilância da Instituição para as devidas providências. Os Indivíduos serão notificados e orientados.

Resultados

Os resultados deste estudo estão apresentados de três maneiras:

- 6.1.** Manuscrito do Artigo de Revisão: “Desafio do Diagnóstico da Hepatite B Oculta em Áreas Endêmicas”. Que será submetido na revista “*Brazilian Journal of Infectious Diseases*”..... 67
- 6.2.** Manuscrito de Relato de Caso: “Detecção da Hepatite B Oculta em Doador de Sangue do Interior do Estado do Amazonas”. Que será submetido na revista “*Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*”79
- 6.3.** Resultados Complementares: Apresentação dos resultados deste estudo na íntegra.....85

Desafio do Diagnóstico da Hepatite B Oculta em Áreas Endêmicas

Artigo de Revisão / Review Article

Helaine de Araújo Virgolino¹, Mônica Nascimento dos Santos Moresco¹, Márcia Poinho Encarnação de Moraes², Isabella da Motta-Passos¹, José Eduardo Levi^{3,4}, Kátia Luz Torres^{1,2}

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

2- Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas/Amazonas/Brazil.

3- Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Brazil.

4- Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo/Brazil.

Palavras-chaves: Hepatite B Oculta (IOB), Teste de Detecção de Ácidos Nucléicos (NAT).

RESUMO

A infecção oculta pelo vírus da hepatite B (IOB) é definida pela presença de HBV DNA no fígado ou no soro de indivíduos negativos para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). Cerca de um terço da população mundial têm evidência sorológica de hepatite B, passada ou presente. O diagnóstico da infecção pelo HBV geralmente é realizado por meio de marcadores sorológicos e virológicos. A disponibilidade de métodos moleculares altamente sensíveis é necessária para o diagnóstico da IOB principalmente nos pacientes imunodeprimidos, nos doadores de sangue, em indivíduos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana e nos pacientes que se submetem a transplante de fígado onde pode ser um risco para a reativação de uma infecção causada por HBV. A IOB pode causar doença criptogênica no fígado, contribuir para a exacerbação aguda da hepatite B crônica, alterar a progressão da doença e da resposta ao tratamento de hepatite C crônica, ou levar ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Diante deste contexto, este artigo tem como objetivo abordar os entraves dos métodos de diagnóstico para detectar infecção oculta pelo HBV.

INTRODUÇÃO

A infecção oculta pelo vírus da hepatite B (IOB) apresenta relevância clínica e epidemiológica tendo em vista o desafio da detecção diagnóstica dificultada e a necessidade do início breve do tratamento, sendo portanto tema atual de discussões¹.

A IOB é a persistência do genoma viral no tecido do fígado ou no soro de indivíduos negativos para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). Os casos de hepatite B oculta apresentam uma quantidade muito baixa de HBV DNA no soro (<200 UI / ml)^{1,2}.

A frequência com que ocorre a hepatite B oculta será dependente da prevalência da infecção em determinada população^{3,4}. De acordo com a Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL), cerca de um terço da população do mundo têm evidência sorológica de hepatite B, passada ou presente, baseadas na presença do marcador anti-HBc e HBsAg⁵. A prevalência da infecção por HBV pode variar de 8% a 15% no sudeste Asiático, África, Oriente Médio e Bacia Amazônica, de 2% a 7% no centro-sul e sudoeste da Ásia, leste e sul da Europa, Rússia, bem como América do Sul e América Central e menor que 2%, nos Estados Unidos, Europa Ocidental e Austrália⁶.

No Brasil, a endemicidade do HBV é heterogênea, sendo a doença mais prevalente na região norte do país^{7, 8,9}. No interior do Estado do Amazonas existem localidades com taxas significativamente elevada da doença. Estudos realizados no Estado do Amazonas encontraram a prevalência para o HBsAg na população em geral de 2% a 9%, e para anti-HBc de 5% a 76%^{10,11,12}. Além da infecção pelo HBV há também a presença no Estado do Amazonas da coinfeção pelo vírus Delta. Em 1983, nos primeiros estudos no Estado do Amazonas, já se discutia a participação do vírus da hepatite B na etiopatogenia da hepatite fulminante de Lábrea, local onde ocorreram os primeiros registros desta entidade¹³.

O diagnóstico da infecção pelo HBV geralmente é realizado por meio de marcadores sorológicos e virológicos¹⁴. Em particular, nos últimos 10 anos, a disponibilidade de métodos moleculares altamente sensíveis resultou na detecção de infecções ocultas por HBV em vários cenários clínicos^{1,14}. Há ainda muitas lacunas a serem preenchidas na compreensão de diretrizes específicas sobre o diagnóstico e tratamento da infecção oculta pelo HBV, principalmente em áreas endêmicas para o HBV e deficientes do diagnóstico molecular.

Diante deste contexto, este artigo tem como objetivo abordar os entraves dos métodos de diagnóstico para detectar infecção oculta pelo HBV em áreas endêmicas.

IOB e a Biologia Viral

Uma das causas da IOB é a persistência de baixos níveis de replicação viral do HBV¹⁵. O ciclo de replicação do HBV começa com a fixação do vírion ao hepatócito¹⁶. Dentro do núcleo dos hepatócitos, a síntese da cadeia positiva do HBV DNA é concluída e o genoma viral é convertido em um DNA circular covalentemente fechado (cccDNA)¹⁶. O cccDNA é o modelo para o RNA pregenômico, que é transcrito de forma inversa da fita negativa do HBV DNA¹⁶.

Há duas fontes de entrada do cccDNA na célula: novas partículas do vírus para o hepatócito e por translocação do HBV DNA recentemente sintetizado a partir do citoplasma do hepatócito, ou seja o HVB DNA replicado pode retornar ao núcleo por meio de uma via intracelular, o que pode resultar em uma "auto" amplificação de cccDNA^{16,17}. Essa persistência ocorre por conversão no hepatócito de um HBV DNA circular covalentemente fechado (cccDNA), o qual, em seguida, liga-se a proteínas⁵. Este cccDNA é a base molecular

da infecção oculta da hepatite B, devido a sua estabilidade e longa duração de persistência nos núcleos de hepatócitos⁵.

Todo este processo é resultante da supressão da replicação do HBV hospedeiro ou mutação viral principalmente na proteína S¹⁵. A IOB também pode estar associada com a integração da sequência do HBV no genoma do hospedeiro¹⁵.

A associação da IOB com variantes virais que expressam mutações que modificam a imunogenicidade ou mesmo alterem a produção dos diferentes antígenos virais é um campo amplamente debatido. Estudos antigos já descreviam que a transcrição hepática do HBV pode ser associada com intermediários replicativos de HBV DNA persistentes em doentes que fizeram clearance para o HBsAg no soro, sugerindo que o HBV não está em estado latente, mas passando por baixo nível de replicação¹⁸.

O mecanismo de mutação de escape é associado com IOB, o que também leva a reatividade diminuída em ensaios de detecção de HBsAg¹⁸. O genótipo D encontrado em infecções por vírus da hepatite B oculta (IOBs), possui uma elevada frequência de substituições de aminoácidos na região hidrofílica na principal proteína de superfície pequena (proteína S) refletindo possivelmente um mecanismo de mutação de fuga para escapar da detecção pelo sistema imune do hospedeiro¹⁸. Por outro lado, o genótipo C do HBV, mutante basal promotor do core e mutante de deleção pré-S pode estar associado com um risco aumentado de desenvolvimento de hepatocarcinoma¹⁹.

IOB e Implicações na Detecção Diagnóstica

Mutações no gene do antígeno de superfície HBsAg indetectáveis por ensaios comerciais e inibição de HBV por supressão da replicação viral e das proteínas virais representam dois mecanismos diferentes porém fundamentais que levam para infecções ocultas por HBV^{14,20}. Portanto, a detecção do DNA do HBV sem o HBsAg, com ou sem a presença de anticorpos contra o HBV fora do "período da janela" e da fase aguda define infecção oculta pelo HBV^{21,22}.

O diagnóstico da hepatite B depende da sensibilidade relativa dos ensaios HBsAg e DNA do HBV²¹. Devido à análise molecular moderna sabe-se que o genoma viral do HBV pode persistir indefinidamente em indivíduos anteriormente infectados HBsAg negativos⁵.

O diagnóstico laboratorial da hepatite B realiza-se rotineiramente através de métodos sorológicos²³. Tais métodos são fundamentais não somente para o diagnóstico, mas também para o acompanhamento da infecção viral, avaliação do estado clínico do paciente e na aplicação da terapêutica específica²³. Evidentemente, o melhor método para o diagnóstico da IOB é o exame das células do fígado quanto à presença de HBV DNA^{24,25}. No entanto, devido à natureza invasiva da biópsia e a possibilidade de danos indesejáveis ao fígado durante o procedimento, os estudos mais recentes sobre IOB são realizadas em amostra de sangue periférico^{24,25}.

A detecção de hepatite B oculta requer ensaios de elevada sensibilidade e especificidade, com um limite inferior de detecção a 10 UI / mL para o DNA do vírus da hepatite B (HBV) e <0,1 ng / mL para o HBsAg²⁶.

Os testes sorológicos de detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e do anticorpo contra antígeno do núcleo do HBV (anti-HBc) tem sido, historicamente, os marcadores de rastreio para a hepatite B, enquanto que teste de detecção de ácido nucleico (NAT), é empregado na detecção de HBsAg negativo, anti-HBc negativo em

doações de unidades de sangue durante a o período da janela imunológica²⁷. Os papéis da sorologia quantitativa do HBV e do intra DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) merecem mais estudos¹⁴.

Diversos fatores estão envolvidos no diagnóstico da IOB, tais como variantes virais que transportam HBsAg mutante e não são reconhecidos por anticorpos monoclonais específicos utilizados em ensaios de detecção comerciais para HBsAg, baixa carga viral em circulação normalmente <200 UI/ml, resultado da supressão da forte replicação viral e a expressão do gene pode ter resultado na resposta imune do hospedeiro^{1,28,29,30}.

Em regiões de alta prevalência como na Amazônia, a hepatite B oculta ocorre em frequência pouco relatada por ocorrência de subnotificação dos casos. Um estudo pioneiro recentemente realizado entre doadores de sangue do Estado do Amazonas demonstrou a ocorrência de hepatite B oculta em 2,7% dos doadores de sangue (dados não publicados). Apesar disso, no Brasil a triagem dos doadores de sangue por testes moleculares (NAT) não é utilizada na rotina dos bancos de sangue. Estes dados revelam os riscos da presença da infecção oculta apresentando o desafio do diagnóstico clínico assim como da triagem de doadores de sangue em regiões endêmicas . A IOB desafia os esforços para eliminar infecção pelo HBV pós-transfusional, particularmente em receptores de sangue imunodeficientes³¹.

O diagnóstico da IOB é importante nos pacientes gravemente imunodeprimidos como os que recebem quimioterapia sistêmica, radioterapia, ou imunoterapia, em indivíduos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana e nos pacientes que se submetem a transplante de fígado onde pode ser um risco para a reativação de uma infecção causada por HBV¹⁵.

A IOB pode causar doença criptogênica no fígado, contribuir para a exacerbação aguda da hepatite B crônica, alterar a progressão da doença e da resposta ao tratamento de

hepatite C crônica, ou levar ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular³². Em um estudo no Japão ficou demonstrado também à alta taxa de carcinogênese hepatocelular realizados em pacientes com cirrose não-B e não-C³³.

O diagnóstico sorológico e virológico é particularmente importante para os médicos que fazem a triagem da infecção pelo HBV em áreas endêmicas e para monitorar a progressão da doença hepática em portadores de HBV. Assim o tratamento pode ser eficaz e iniciado cedo, antes do desenvolvimento avançado da doença no fígado¹⁴. Descobertas como a que ocorreu no Japão para identificação do genótipo J demonstra que há necessidade de mais estudos em técnicas de identificação do HBV principalmente em regiões endêmicas³⁴. Na era dos antivirais altamente potentes aprovados para o tratamento da hepatite B crônica é de importância crucial a utilização de ensaios altamente sensíveis para detecção e quantificação de HBV DNA³⁵.

Como os pacientes com IOB não tem detectáveis no soro o antígeno de superfície para hepatite B (HBsAg) e geralmente possuem baixos níveis de HBV ($< 10^4$ UI/ml), os ensaios HBsAg utilizando na rotina são provavelmente ineficazes na detecção IOB^{21,32}. Como em alguns casos a IOB são anti-HBc positivo, este marcador também é incluído como um parâmetro sorológico para detectar a infecção por IOB³². No entanto, ainda existe uma parcela considerável de pacientes IOB que são negativos para todos os marcadores sorológicos da infecção por HBV¹. Assim, uma nova abordagem para detectar e estudar IOB é necessária³².

Portanto novos estudos estão sendo propostos visando o diagnóstico da hepatite B oculta como o realizado recentemente na China com microRNA. Após a identificação de quatro miRNAs, let-7c, miR-23b, miR-122, e miR-150 estes foram diferencialmente expressos em soro com IOB e comparado com o soro controle³². O perfil dos quatro miRNAs

demonstrou que estes podem ser considerados biomarcadores altamente sensíveis e precisos para a detecção de IOB independentemente do paciente ser HBsAg positivo ou negativo³²

CONCLUSÃO

Apesar de recentemente notarmos um aumento em pesquisas sobre a Hepatite B oculta, ainda há muitas perguntas não respondidas sobre o papel da IOB no desenvolvimento e progressão das doenças hepáticas crônicas e hepatocarcinomas, são necessárias respostas consistentes para questões como: existem diferenças entre a IOB detectada em áreas de baixa prevalência e em áreas de alta prevalência de infecção pelo HBV? Será que os métodos utilizados no diagnóstico da Hepatite B tem a sensibilidade, especificidade e precisão adequada?

É muito importante que o diagnóstico por biologia molecular seja incorporado à rotina diária dos laboratórios de banco de sangue de forma mais ampla a fim de permitir a detecção de infecção oculta pelo HBV em áreas endêmicas como a região amazônica e possivelmente descobrir as particularidades que justifiquem elevada endemicidade e elevada transmissão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raimondo, G; Allain, JP; Brunetto, MR; Buendia, MA; Chen, DS; Colombo, M; Craxì, A; Donato, F; Ferrari, C; Gaeta, GB; Gerlich, WH; Levrero, M; Locarnini, S; Michalak, T; Mondelli, MU; Pawlotsky, JM; Pollicino, T; Prati, D; Puoti, M; Samuel, D; Shouval,

- D; Smedile, A; Squadrito, G; Trépo, C; Villa, E; Will, H; Zanetti, AR; Zoulim, F. **Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection.** *J Hepatol* 49: 652-657, 2008
2. Gutiérrez-García, M; Fernandez-Rodriguez, CM; Lledo-Navarro, JL; Buhigas-Garcia, I. **Prevalence of occult hepatitis B virus infection.** *World J Gastroenterol* 28; 17(12): 1538-1542, 2011
3. Shahmoradi, S; Yahyapour, Y; Mahmoodi, M; Alavian, SM; Fazeli, Z; Jazayeri, SM. **High prevalence of occult hepatitis B virus infection in children born to HBsAg-positive mothers despite prophylaxis with hepatitis B vaccination and HBIG.** *Journal of Hepatology* 57;515–521, 2012
4. Paschale, MDe; Manco, MT; Belvisi, L; Brando, B; Latella, S; Agrappi, C; Mirri, P; Gatti, A; Clerici, P. **Prevalence of markers of hepatitis B virus infection or vaccination in HBsAg-negative subjects.** *Blood Transfus* 10: 344-50, 2012
5. Ocana, S; Casas, ML; Buhigas, I; Lledo, JL. **Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection.** *World J Gastroenterol* 28; 17(12): 1553-1557, 2011
6. Te, HS; Jensen, DM. **Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview.** *Clin. Liver Dis* 14:1-21, 2010
7. Costa, CA; Kimura, LO. **Molecular epidemiology of hepatitis B virus among the indigenous population of the Curuçá and Itaquai Rivers, Javari Valley, State of Amazonas, Brazil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45(4), 2012
8. Pereira, LM; Martelli, CM; Merchan-Hamann, E; Montarroyos, UR; Braga, MC; de Lima, ML; Cardoso, MR; Turchi, MD; Costa, MA; de Alencar, LC; Moreira, RC; Figueiredo, GM; Ximenes, RA. **Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil.** *Am J Trop. Med. Hyg.* 81: 240-247, 2009
9. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico:Hepatites Virais** 82, 2011

10. Braga, WSM; Silva, EB; Souza, RAB; Tosta, CE. **Seroprevalence of hepatitis B virus and malaria infection in Lábrea, Brazilian western Amazon: estimates of coinfection rates.** *Rev Soc Bras Med Trop* 38(3):218-223, 2005
11. El Khouri, M; Cordeiro, Q; Luz, DABP; Duarte, LS; Gama, MEA; Corbett, CEP. **Endemic hepatitis B and C virus infection in a Brazilian eastern Amazon region.** *Arq Gastroenterol* 47(1):35-41, 2010
12. Braga, WSM; Castilho, MC; Borges, FG; Martinho, ACS; Rodrigues, IS; Azevedo, EP; Scazufca, M; Menezes, PR. **Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon.** *Rev Soc Bras Med Trop* 45(1):13-17, 2012
13. Fonseca, JCF; Souza, RAB; Brasil, LM; Araújo, JR; Ferreira, LCL. **Hepatite Fulminante na Amazônia Brasileira.** *Rev Soc Bras Med Trop* 37(supl II): 93-95, 2004
14. Kao, JH. **Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers.** *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2(4):553-62, 2008
15. Shire, LR; Roberts, MB. **Occult hepatitis B virus infection: Bit player or role player?** *Hepatology* 54(3), 2011
16. Lok, AS; McMahon, BJ. **Chronic hepatitis B.** *Hepatology* 34: 1225-1241, 2001
17. Block, TM; Guo, H; Guo, Ju-Tao. **Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians.** *Clin Liver Dis* 11(4): 685–706, 2007
18. Mason, AL; Xu, L; Guo, L; Kuhns, M; Perrillo, RP. **Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen.** *Hepatology* 27(6):1736-42, 1998
19. Ito, K; Tanaka, Y; Orito, E; Sugiyama, M; Fujiwara, K; Sugauchi, F; Kato, T; Tokita, H; Izumi, N; Kato, M; Yuen, MF; Lai, CL; Gish, RG; Ueda, R; Mizokami, M. **T1653 mutation in the box alpha increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection.** *Clin Infect Dis* 42:1–7, 2006
20. Samal, J; Kandpal, M; Vivekanandan, P. **Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection.** *Clin Microbiol Rev* 25 (1): 142-63, 2012

21. Allain JP. **Occult hepatitis B virus infection.** *Transfus Clin Biol* 11(1):18-25, 2004
22. Fukuda, R; Ishimura, N; Niigaki, M; Hamamoto, S; Satoh, S; Tanaka, S; Kushiyama, Y; Uchida, Y; Ihihara, S; Akagi, S; Watanabe, M; Kinoshita, Y. **Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance.** *JMed Virol* 58: 201-207, 1999
23. Ferreira, MS. **Diagnóstico e tratamento da hepatite B.** *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 4, 2000
24. Raimondo G, Navarra G, Mondello S, Costantino L, Colloredo G, Cucinotta E; Di Vita, G; Scisca, C; Squadrito, G; Pollicino , T. **Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease.** *J Hepatol.* 48(5):743-6, 2008
25. Arababadi, KM; Hassanshahi, G; Pourfathollah, AA; Zarandi, ER; Kennedy, D. **Post-Transfusion Occult Hepatitis B (OBI): A Global Challenge for Blood Recipients and Health Authorities.** *Hepat Mon.* 11(9):714-718, 2011
26. Hollinger, FB; Sood, G. **Occult hepatitis B virus infection: a covert operation.** *J Viral Hepat* 17: 1-15, 2010
27. Kuhns, MC; Busch, MP. **New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods.** *Mol Diagn Ther.* 10(2):77-91, 2006
28. Gerlich, WH; Bremer, C; Saniewski, M; Schuttler, CG; Wend, UC; Willems, WR. **Glebe D: Occult hepatitis B virus infection: detection and significance.** *Digest Dis* 28:116-125, 2010
29. Zhang, R; Wang, L; Li, J. **Hepatitis B virus transfusion risk in China: proficiency testing for the detection of hepatitis B surface antigen.** *Transfusion Med* 2010
30. Liu, Y; Li, P; Li, C; Zhou, J; Wu, C; Zhou, Yi-Hua. **Detection of hepatitis B virus DNA among accepted blood donors in Nanjing, China.** *Virology Journal* 7:193, 2010
31. Hollinger, FB. **Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult.** *Transfusion* 48: 1001–1026, 2008

32. Chen, Y; Li, L; Zhou, Z; Wang, N; Zhang, Chen-Yu; Zen, K. **A pilot study of serum microRNA signatures as a novel biomarker for occult hepatitis B virus infection.** *Med Microbiol Immunol* 201:389–395, 2012
33. Ikeda, K; Kobayashi, M; Someya, T; Saitoh, S; Hosaka, T; Akuta, N; Suzuki, F; Suzuki, Y; Arase, Y; Kumada, H. **Occult hepatitis B virus infection increases hepatocellular carcinogenesis by eight times in patients with non-B, non-C liver cirrhosis: a cohort study.** *J Viral Hepat* 16:437-443, 2009
34. Tatematsu, K; Tanaka, Y; Kurbanov, F; Sugauchi, F; Mano, S; Maeshiro, T; Nakayoshi, T; Wakuta, 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.* 83(20):10538, 2009
35. Paraskevis, D; Beloukas, A; Haida, C; Katsoulidou, A; Moschidis, Z; Hatzitheodorou, H; Varaklioti, A; Sypsa, V; Hatzakis, A. **Development of a new ultra sensitive real-time PCR assay (ultra sensitive RTQ-PCR) for the quantification of HBV-DNA.** *Virology Journal* 7:5, 2010

Detecção da Hepatite B Oculta em Doador de Sangue do Interior do Estado do Amazonas.

RELATO DE CASO

Titulo Corrente: Hepatite B Oculta em Doador de Sangue no Estado do Amazonas

Helaine de Araújo Virgolino¹, Mônica Nascimento dos Santos Moresco¹, Márcia Poinho Encarnação de Moraes², Isabella da Motta-Passos¹, Michele S. Gomes-Gouvêa³, José Eduardo Levi^{4,5}, Kátia Luz Torres^{1,2}

- 1- Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas- Amazonas/Brazil.
- 2- Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas/Amazonas/Brazil.
- 3- Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Brazil.
- 4- Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Brazil.
- 5- Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo/Brazil.

RESUMO

Um caso da presença de hepatite B oculta foi diagnosticado na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas- HEMOAM, em doador de sangue do interior do Estado do Amazonas com perfil sorológico HBsAg negativo, anti-HBc positivo, anti-HBs negativo, carga viral positiva e genotipagem. Descrevemos a investigação laboratorial e abordagem epidemiológica.

ABSTRACT

A case of the presence of occult hepatitis B was diagnosed at Hospital Foundation of Hematology-HEMOAM Amazon in blood donor in the state of Amazonas with negative serological profile HBsAg, anti-HBc positive, anti-HBs negative, viral load positive and genotyping. We describe the research laboratory and epidemiological approach.

Palavras-chaves: Hepatite B Oculta (IOB), Doador de Sangue, Teste de Detecção de Ácidos Nucléicos (NAT).

INTRODUÇÃO

A infecção causada pelo vírus da hepatite B (VHB) é de alta prevalência e apresenta-se disseminada mundialmente, sendo considerado um importante problema de saúde pública, configurando um risco na terapia transfusional, tendo em vista o potencial de transmissão via parenteral. No Brasil, a prevenção da hepatite B transmitida por transfusão de sangue é realizada utilizando aspectos clínico-epidemiológicos e ensaios sorológicos por meio de marcadores para detectar o antígeno de superfície do vírus (HBsAg) e o anticorpo contra o antígeno do core (anti-HBc). A detecção do DNA VHB em amostras negativas para HBsAg é definida como infecção oculta pelo vírus da hepatite B (IOB) e a implementação da pesquisa de ácidos nucleicos (NAT) em amostras de sangue de doadores em bancos de sangue é um mecanismo eficaz para diminuir o risco de hepatite B transfusional^{1,2}.

O Ministério da Saúde em seu Plano Nacional de Atenção Hematológica e Medicina Transfusional estabeleceu ações para garantir a qualidade da hemoterapia no país e implantou para hepatite C e HIV a tecnologia do NAT na triagem de doadores de sangue em toda a rede nacional. Apesar da hepatite B ser uma infecção de alta prevalência e grande impacto de morbidade e mortalidade (principalmente quando pós-transfusional), não está contemplado na agenda nacional dentro deste novo plano, deixando uma lacuna a ser preenchida.

Apesar de sua importância estudos conclusivos sobre hepatite B oculta e dados sobre sua prevalência são escassos no Estado do Amazonas. Este estudo relata a presença da hepatite B oculta em doador de sangue do interior do Estado do Amazonas com perfil sorológico: HBsAg negativo, anti-HBc positivo e anti-HBs negativo.

RELATO DO CASO

I.S.O, homem, 36 anos, vida conjugal estável, não trabalhador da área da saúde, natural e procedente da cidade do interior do Estado do Amazonas, Fonte Boa, localizada a oeste da capital Manaus, doador de repetição, relata que nunca recebeu transfusão sanguínea, nunca teve hepatite, nunca morou com alguém que teve hepatite, mãe nunca teve hepatite, ser vacinado contra hepatite B, ao doar sangue na Unidade de Coleta e Transfusão da Unidade de Saúde em Fonte Boa apresentou sorologia negativa para o marcador HBsAg, porém soropositiva para o marcador anti-HBc e negativo para Anti-HBs, carga viral com resultado positivo (3,6 IU/mL), apresentando genótipo A1. Os ensaios de triagem foram realizados pelos métodos de ensaio imunoenzimático, Quimioluminescência, PCR em tempo real para detecção e quantificação da carga viral e técnicas de amplificação por nested PCR para detecção, sequenciamento e genotipagem do DNA VHB.

DISCUSSÃO

Estudos realizados no Estado do Amazonas encontraram a prevalência para o HBsAg na população em geral de 2% a 9%, e para anti-HBc de 5% a 76%^{3,4}. Alguns municípios como Santo Antônio do Iça e Eirunepé se destacam com sorologia positiva para o VHB na investigação epidemiológica da população geral e em sorologias realizadas no Laboratório de Saúde Pública do Estado do Amazonas para fechar os casos suspeitos de hepatite B. No município de Lábrea interior do Estado do Amazonas um estudo de soro prevalência de base populacional foi realizado com o objetivo de estimar a prevalência do VHB e fatores de risco da infecção na área rural do município, depois de 19 anos de introdução da vacina. Metade dos indivíduos investigados mostraram reatividade de 52,1% para o anti-HBc total e prevalência de 6,2% para o HBsAg⁵. Foi demonstrado que a infecção pelo VHB ainda é um

importante problema de saúde pública e que a vacinação poderia ter tido maior impacto sobre a epidemiologia do VHB⁵.

A presença do genótipo A1 encontrado neste estudo não difere dos resultados encontrados para caracterizar os genótipos do VHB nesta região, realizado no município de Lábrea, em indivíduos indígenas e não indígenas, onde foram classificados três genótipos: A (60%), seguido do D (35%) e F (5%)⁶. Outro estudo realizado em amostras de fígado de 14 pacientes oriundos do rio Purus, no oeste da Bacia Amazônica no Brasil (municípios de Boca do Acre e Pauíni, no Estado do Amazonas e Sena Madureira, no Estado do Acre) mostrou que os genótipos do VHB estavam associados aos casos de hepatite B fulminante na seguinte proporção: D (21,4%), A (28,6%) e F (50,0%), e foi possível classificar os subgenótipos D3, D4, A1e F2a, dentro de cada genótipo caracterizado⁷.

A presença do genótipo A e D na região Amazônia pode está associada a influência da origem africana, da colonização européia e a presença de vendedores ambulantes libaneses na região amazônica durante o período de exploração da borracha^{6,8}. O genótipo F encontrado em algumas aldeias no interior do Estado do Amazonas é característico das populações ameríndias e sua origem está associada a população nativa do Brasil, América do Sul e Central^{9,10,11}.

Em outro estudo também em região endêmica, foi descrito que a presença do DNA VHB em unidades de sangue derivadas de amostras anti-HBs positivas (com anti-HBc positivo/HBsAg negativo) acontece com uma prevalência de 1,5% e em amostras anti-HBs negativas com prevalência de 8%¹².

Apesar da presença do anti-HBs indicar proteção contra o VHB e este ser utilizado em algumas regiões endêmicas como critério para transfusão do hemocomponente, vários estudos demonstram que a presença de títulos elevados deste anticorpo não garante ausência do DNA VHB¹.

A ocorrência de infecção oculta pelo vírus da hepatite B em doadores de sangue na região Amazônica leva ao questionamento do algoritmo atualmente obedecido. Sendo necessário também estabelecer novas estratégias para contemplar segurança transfusional, escassez de sangue no interior do Estado e descarte de hemocomponentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allain, JP; Candotti, D. **Diagnostic Algorithm for HBV safe transfusion.** *Blood Transfus* 7(3):174-182, 2009
2. Sofian, M; Aghakhani, A; Izadi, N; Banifazl, M; Kalantar, E; Eslamifar, A; Ramezani, A. **Lack of occult hepatitis B virus infection among blood donors with isolated hepatitis B core antibody living in an HBV low prevalence region of Iran.** *Int J Infect Dis* 14(4):e308-310, 2010
- 3 Braga, WS; Silva, EB; Souza, RA; Tosta, CE. **Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e pelo plasmódio em Lábrea, Amazonas: estimativa da ocorrência de prováveis coinfeções.** *Rev Soc Bras Med Trop* 38(3):218-223, 2005
4. El Khouri, M; Cordeiro, Q; Luz, DA; Duarte, LS; Gama, ME; Corbett, CE. **Endemic hepatitis B and C virus infection in a Brazilian eastern Amazon region.** *Arq Gastroenterol* 47(1): 35-41, 2010
5. Braga, WS; Castilho, MdaC; Borges, FG; Martinho, AC; Rodrigues, IS; Azevedo, EP; Scazufca, M; Menezes, PR. **Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon.** *Rev Soc Bras Med Trop* 45(1):13-17, 2012
6. Dias, AL; Oliveira, CM; Castilho, MdaC; Silva, MdoS; Braga, WS. **Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the Western Brazilian Amazon.** *Rev Soc Bras Med Trop* 45(1):9-12, 2012
7. Gomes-Gouvêa, 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* 90:2638-2643, 2009

8. Castilho, MdaC; Oliveira, CM; Gimaque, JB; Leão, JD; Braga, WS. **Epidemiology and molecular characterization of hepatitis b virus infection in isolated villages in the western brazilian amazon.** *Am J Trop Med Hyg* 87(4):768-774, 2012
9. Mello, FC; Souto, FJ; Nabuco, LC; Villela-Nogueira, CA; Coelho, HS; Franz, HC; Saraiva, JC; Virgolino, HÁ; Motta-Castro, AR; Melo, MM; Martins, RM; Gomes, SA. **Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates.** *BMC Microbiol* 7: 103, 2007
10. Devesa, M; Loureiro, CL; Rivas, Y; Monsalve, F; Cardona, N; Duarte, MC; Poblete, F; Gutierrez, MF; Botto, C; Pujol, FH. **Subgenotype Diversity of Hepatitis B Virus American Genotype F in Amerindians From Venezuela and the General Population of Colombia.** *J Med Virol* 80(1): 20-26, 2008
11. Torres, C; Piñeiro y Leone, FG; Pezzano, SC; Mbayed, VA; Campos, RH. **New perspectives on the evolutionary history of hepatitis B virus genotype F.** *Mol Phylogenet Evol* 59(1):114-122, 2011
12. Bhatti, FA; Ullah, Z; Salamat, N; Ayub, M; Ghani, E. **Anti-hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice.** *Transfusion* 47(1):74-79, 2007

6.3. Resultados Complementares

Após o início deste estudo a Fundação HEMOAM, visando garantir a qualidade dos hemocomponentes oriundos do interior do Estado, adotou mudanças nas estratégias de coleta e abastecimento de sangue no interior do Estado do Amazonas. Os critérios de triagem anteriormente utilizados para aproveitamento de hemocomponentes HBsAg negativos, anti-HBc total reativo e anti-HBs reativo (>100 mUI/mL), foi substituído pelo critério de descarte de unidades HBsAg reativo e/ou anti-HBc reativo.

Os antigos doadores de repetição do interior que apresentavam o marcador anti-HBc total reativo passaram a ser considerados inaptos e não mais foram realizados os testes para o marcador anti-HBs.

Desta forma, a média de doações oriundas do interior do Estado reduziu de 6.600 para 3.600/ano (FHEMOAM, 2012), representando uma queda de aproximadamente 50% de hemoderivados. As mudanças de critérios e o impacto na frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B nas doações do interior do Estado do Amazonas estão demonstradas no **Quadro 2**.

Quadro 2. Mudanças de critérios e o impacto na frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B nas doações do interior do Estado do Amazonas

INÍCIO DO PROJETO	APÓS O INÍCIO DO PROJETO
O interior do Estado do Amazonas utilizava hemocomponentes: HBsAg negativo, anti-HBc reativo e anti-HBs (>100 mUI/mL)	Inaptidão de doadores com anti-HBc reativo Descarte de unidades HBsAg reativo e/ou anti-HBc reativo
Total de doações oriundas do interior do Estado/ano: 6.600	Total de doações oriundas do interior do Estado/ano: 3.600
Frequência de anti-HBc total reativo: 2.160 (32,7%)	Frequência de anti-HBc total reativo: 887 (24,6%)
Frequência de anti-HBs reativo: 1.836 (85%) e anti-HBs negativo: 324 (15%)	Não realização do anti-HBs

Durante o período de estudo de junho de 2011 a junho de 2012, foram registrados na Fundação HEMOAM 3.600 doações de sangue oriundas do interior do Estado do Amazonas (Núcleo de Estatística da Fundação HEMOAM - Sistema de Acompanhamento de Doadores - SAD).

Destas, 835 doações apresentaram marcadores sorológicos para hepatite B (HbsAg, anti-HBc e/ou anti-HBs), o que determinou um índice de descarte de 23,19%. Portanto, a frequência dos marcadores de hepatite B para o descarte dos hemocomponentes ficou assim distribuída: 0,22% (8/3600) de HBsAg reativo, 22,19% (799/3600) de anti-HBc reativo e 0,77% (28/3600) de HBsAg/anti-HBc reativo.

O total de 456 doações foi proveniente das regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas. Deste universo, de acordo com os critérios de elegibilidade foram incluídas neste protocolo 112 amostras com perfil sorológico HBsAg negativo, anti-HBc total positivo, com ou sem anti-HBs. Destas, 88 (78,5%) correspondem ao grupo A (HBsAg negativo, anti-HBc positivo, Anti-HBs positivo) e 24 (21,5%) correspondem ao grupo B (HBsAg negativo, anti-HBc positivo, Anti-HBs negativo), conforme descrito na **Tabela 7**.

Tabela 7. Frequência dos marcadores sorológicos para hepatite B

Grupos		Distribuição da amostra do estudo
		(n=112) <i>f_i</i> %
	anti-HBs positivo	
Grupo A	(a-HBc+/HBsAg-)	88 (78,5%)
	anti-HBs negativo	
Grupo B	(a-HBc+/HBsAg-)	24 (21,5%)

Fatores de Risco e Dados Demográficos

Na análise das características demográficas da população efetivamente incluída no estudo (n=112) observou-se que a frequência do sexo feminino foi de 17% (n=15) no grupo A e 8% (n=2) no grupo B. Para o sexo masculino esta frequência foi de 83% (n=73) no grupo A e 92% (n=22) no grupo B. A média da idade e a procedência estão apresentadas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Distribuição das frequências dos perfis dos doadores de sangue de acordo com o gênero, idade e oriundos das regionais de saúde estudadas e seus respectivos grupos de estudo.

Variáveis	GRUPOS		P*
	A	B	
	(anti-HBc+/anti-HBs+) (n=88)	(anti-HBc+/anti-HBs-) (n=24)	
	fi %	fi %	
Gênero			
Masculino	73(83%)	22(92%)	0,5203**
Feminino	15(17%)	2(8%)	
Idade			
Média + SD	44,11 ±10,66	41,83 ±9,28	0,3085*
Procedência (Regionais de Saúde)			
Alto Solimões	37(42%)	5(21%)	0,0622**
Amazonas	51(58%)	19(79%)	

*Valor de p.; **Teste exato de Fisher

Através do questionário epidemiológico foi possível fazer uma investigação quanto à frequência da presença de fatores de risco relacionados à infecção pelo vírus da hepatite B. Entre as doações estudadas observou-se diferença significativa entre o grupo A e o grupo B no que diz respeito ao fato de ser doador de primeira vez. A distribuição das frequências dos fatores de risco está demonstrada na **Tabela 9**.

Tabela 9. Distribuição das frequências dos fatores de risco para hepatite B em doadores de sangue oriundos das regionais de saúde estudadas e seus respectivos grupos de estudo.

Variáveis	GRUPOS		P*
	A		
	(anti-HBc+/anti-HBs+)	B	
	(n=88)	(anti-HBc+/anti-HBs-)	
	fi %	(n=24)	
		fi %	
Primeira doação			
Não	72 (82%)	14(58%)	0,0342[‡]
Sim	7 (8%)	6(25%)	
Informação não fornecida	9 (10%)	4(17%)	
Trabalha na área de saúde			
Não	51 (58%)	13(54%)	0,6804 [‡]
Sim	25 (28%)	06(25%)	
Informação não fornecida	12 (14%)	05(21%)	
Recebeu transfusão sanguínea			
Não	74 (84%)	19(80%)	0,5675 [‡]
Não sabe	1 (1%)	1(4%)	
Sim	4 (5%)	0 (0%)	
Informação não fornecida	9 (10%)	4(16%)	
Teve hepatite			
Não	73 (83%)	19(80%)	0,6317 [‡]
Sim	6 (7%)	1(4%)	
Informação não fornecida	9 (10%)	4(16%)	
Sua mãe já teve hepatite			
Não	73(83%)	15(62%)	0,1541 [‡]
Não sabe	5(6%)	5(21%)	
Sim	1(1%)	0(0%)	
Informação não fornecida	9(10%)	4(17%)	
Já fez alguma cirurgia na vida			
Não	51(58%)	16(66%)	0,2970 [‡]
Sim	28(32%)	4(17%)	
Informação não fornecida	9 (10%)	4(17%)	
Imunizado contra VHB			
Não	2(2%)	2(8%)	0,5862 [‡]
Não sabe	6(7%)	2(8%)	
Sim	71(81%)	16(67%)	
Informação não fornecida	9(10%)	4(17%)	
Tem tatuagem ou piercing			
Não	69(78%)	17(71%)	0,6585 [‡]
Sim	10(11%)	3(12%)	
Informação não fornecida	9(10%)	4(17%)	
Tem o hábito de compartilhar material pérfuro cortante de uso pessoal			
Não	69(78%)	17(71%)	0,6585 [‡]
Sim	10(11%)	3(12%)	
Informação não fornecida	9(10%)	4(17%)	
Faz uso de bebidas alcoólicas			
Não	49(56%)	8(33%)	0,1498 [‡]
Sim	30(34%)	12(50%)	
Informação não fornecida	9(10%)	4(17%)	

*Valor de p.; [‡]Teste Qui-Quadrado (χ^2).

Prevalência do DNA do VHB

Entre as doações de sangue estudadas observou-se a presença do DNA VHB em 04 amostras (4/112 – 3,57%) provenientes da regional Amazonas. A distribuição das doações positivas para DNA VHB entre os grupos de estudo e da procedência está apresentada na **Tabela 10**.

Tabela 10. Distribuição da prevalência do DNA VHB nos candidatos à doação de sangue oriunda das regionais de saúde estudada e seus respectivos grupos de estudo.

Regionais de Saúde	DNA VHB+	
	<i>fi</i> %	
	GRUPOS	
	A	B
	(anti-HBc+/anti-HBs+)	(anti-HBc+/anti-HBs-)
	(n=88)	(n=24)
Alto Solimões	0	0
Amazonas	3	1
Total	3 (4,2%)	1(1,4%)

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

Quanto à associação da presença do DNA VHB com os títulos do anti-HBs nas amostras reativas para este parâmetro, das 112 amostras que foram submetidas a PCR, 04 apresentaram positividade, sendo que 03 amostras apresentaram positividade ao anti-HBs (≥ 100 mUI/mL) e 01 foi negativa ao anti-HBs. Os títulos estão demonstrados na **Tabela 11**. Portanto, a presença do marcador anti-HBs em títulos elevados não está associada à ausência de hepatite B oculta (**Tabela 11**).

Tabela 11. Associação do DNA do VHB com os títulos do marcador anti-HBs nos candidatos à doação de sangue oriunda das regionais de saúde estudada e seus respectivos grupos de estudos.

	PCR		OR (IC 95%)	P*
	Positivo	Negativo		
	n=4 <i>fi</i> %	n=108 <i>fi</i> %		
anti-HBs mUI/mL			0,8118 (0,0805-8,179)	1,0000
Grupo A \geq 100 (n=88) <i>fi</i> %	3(3%)	85(97%)		
Grupo B \leq 100 (n=24) <i>fi</i> %	1(4%)	23(96%)		

**Teste de Fisher (Vienna, 2012)*

Associação da carga viral encontrada com o perfil sorológico para hepatite B dos doadores de sangue envolvidos e descrição dos casos positivos para a presença do DNA VHB.

Ao analisar a carga viral verificou-se uma variação de 6,5 a 6751 UI/mL e para o marcador sorológico anti-HBs a variação foi de 33,94 a >1000 mUI/mL.

Quanto às histórias de risco, verificou-se que um indivíduo era doador de primeira vez, apresentou comportamento sexual de risco, não relatou história vacinal para hepatite B e apresentou histórico de uso abusivo de bebida alcoólica.

A análise da carga viral, dos títulos dos marcadores sorológicos e das histórias de risco dos quatro doadores com presença do DNA do VHB está descritos na **Tabela 12**.

Tabela 12. Distribuição das frequências dos dados demográficos, clínicos, epidemiológicos e aboratoriais VHB nos candidatos à doação de sangue oriundos das regionais de saúde estudadas com amostras anti-HBc total positivas, HBsAg negativas e DNA VHB reativos.

Variáveis	DOADORES DNA VHB+			
	Grupo A		Grupo B	
	(anti-HBc+/anti-HBs+)		(anti-HBc+/anti-HBs-)	
	(n=88)		(n=24)	
	1	2	3	4
Município	Apuí	Coarí	Manicoré	Humaitá
Sexo	M*	M	M	M
Idade	37	42	50	63
Primeira doação	Não	Não	Não	Sim
Estado civil	Mora com alguém	Casado	Casado	Mora com alguém
Trabalha na área de saúde	Não	Sim	Não	Não
Recebeu transfusão sanguínea	Não	Não	Não	Não
Teve hepatite	Não	Não	Não	Não
Mora com alguém que teve hepatite	Não	Não	Não	Não
Parceiro teve hepatite	Não	Não	Não	Não sabe
Mãe teve hepatite	Não	Não Sabe	Não	Não
Usa medicamentos injetáveis sem prescrição médica	Não	Não	Não	Não
Fez cirurgia	Não	Não	Não	Sim
Vacinado	Sim	Sim	Sim	Não Sabe
Tem tatuagem ou piercing	Não	Não	Sim	Não
Compartilha material perfuro cortante	Não	Não	Não	Sim
Fez acupuntura	Não	Não	Não	Não
Nos últimos 12 meses quantos parceiros sexuais	-	1	1	3
Faz uso de bebidas alcoólicas	Não	Não	Não	Sim
Quantas doses de bebida	-	-	-	≥3
anti-HBc total reativo (S/CO)	8,19***	0,080**	6,13***	4,96***
anti-HBs mUI/mL	>1000	>1000	284,09	33,94
DNA VHB: UI/mL	21,5	6,5	6751	9,6

*M, masculino; **ELISA; ***Quimioluminescência

Análise dos genótipos do VHB

Quatro amostras foram positivas para presença do DNA HBV pela metodologia de PCR em tempo real na fase de detecção. Todas foram submetidas a realização de diferentes estratégias metodológicas previstas neste estudo para gerar produto adequado para a genotipagem. No entanto, não foi possível alcançar a amplificação do DNA e consequentemente descrever os genótipos das amostras positivas para o DNA VHB.

Discussão

Para garantir a segurança transfusional e evitar transmissão do vírus da hepatite B utiliza-se nos bancos de sangue, além da triagem epidemiológica, a triagem sorológica utilizando-se dos marcadores iniciais para investigação da Hepatite B: HBsAg e anti-HBc. Na tentativa de detecção da infecção oculta, alguns serviços de hemoterapia em países utilizam a pesquisa do DNA VHB pelo teste NAT. A introdução destes testes nos bancos de sangue garantiu a diminuição do risco da infecção pelo vírus B (ALLAIN & CANDOTTI, 2009; ALLAIN & CANDOTTI, 2011; NIEDERHAUSER, 2011).

No Brasil a triagem sorológica preconizada pelo Ministério da Saúde para prevenir a infecção pelo vírus da hepatite B em banco de sangue inclui os testes HBsAg e anti-HBc (BRASIL, 2010), ficando o NAT (Testes de Detecção de Ácido Nucléicos) fora do algoritmo proposto. Sua utilização limita-se a alguns bancos de sangue privados no país (WENDEL *et al.*, 2008; ROTH *et al.*, 2012).

No período deste estudo 3.600 doações foram realizadas no interior do Estado, destas 887 (24,6%) apresentaram algum marcador positivo para VHB distribuídos da seguinte forma: 8 (0,9%) HBsAg positivo, 799 (95,7%) anti-HBc positivo isolado e 28 (3,3%) HBsAg e anti-HBc positivo.

A região Amazônica é caracterizada como uma das regiões do mundo de maior ocorrência de Hepatite B. No interior do Estado do Amazonas existem localidades como taxas significativamente elevada da doença. Estudos realizados no Estado do Amazonas encontraram a prevalência para o HBsAg na população em geral de 2% a 9%, e para anti-HBc de 5% a 76% (BRAGA *et al.*, 2005; EL KHOURI *et al.*, 2010). Alguns municípios como Santo Antônio do Iça, Eirunepé se destacam com sorologia positiva para o VHB na investigação epidemiológica da população geral em sorologias realizadas no Laboratório de

Saúde Pública do Estado do Amazonas para fechar os casos suspeitos de hepatite B (dados não publicados).

Neste estudo a prevalência do marcador sorológico anti-HBc total nos doadores de sangue variou entre 36,6 – 63,4%, nas regionais estudadas. No município de Bejamim Constant na regional de saúde Alto Solimões a prevalência do anti-HBc foi de 31,25%, seguido de Apuí 25% na regional Amazonas. Esse resultado não difere de outros estudos realizados no interior do Estado do Amazonas. No município de Lábrea interior do Estado do Amazonas um estudo de soro prevalência de base populacional foi realizado com o objetivo de estimar a prevalência do VHB e fatores de risco de infecção na área rural do município, depois de 19 anos de introdução da vacina. Metade dos indivíduos investigados mostrou reatividade de 52,1% para o anti-HBc total e prevalência de 6,2% para o HBsAg (BRAGA *et al.*, 2012). Foi demonstrado que a infecção pelo VHB ainda é um importante problema de saúde pública e que a vacinação poderia ter tido maior impacto sobre a epidemiologia do VHB (BRAGA *et al.*, 2012).

A prevalência do anti-HBc encontrada neste estudo é alta quando comparada com outras regiões do país onde a prevalência da hepatite B é considerada moderada. Um estudo multicêntrico em hemocentros demonstrou uma prevalência de 2,8% em São Paulo, 3,4% em Belo Horizonte e 4,7% em Recife (ALMEIDA-NETO *et al.*, 2012). Portanto a região Amazônica tem características epidemiológicas diferentes quando comparada a outros Estados.

Os resultados da prevalência do anti-HBc no interior do Estado do Amazonas, não diferem de outros estudos em regiões de alta prevalência para hepatite B. Uma pesquisa na Idonésia demonstrou a prevalência de 43,4% para o anti-HBc reativo e HBsAg negativo (THEDJA *et al.*, 2010). A elevada positividade do anti-HBc deve-se a vários fatores tais

como: reações sorológicas falso-positivas, período da janela imunológica, expressão de imunidade tardia, infecção crônica, onde a positividade do anti-HBc pode ocorrer concomitantemente com uma baixa carga viral do VHB, sendo o HBsAg negativo, caracterizando IOB (ALLAIN & CANDOTTI 2009; NIEDERHAUSER, 2011).

Em regiões endêmicas, similares à região Amazônica, como a Ásia, na terapia transfusional a triagem sanguínea pelo anti-HBc geralmente não é utilizada, porque a taxa de positividade é tão elevada que muitos hemocomponentes seriam descartados, utiliza-se então a estratégia do marcador anti-HBs em altos títulos (acima de 100 mUI/mL) que é indicativo de imunidade adquirida, como critério de triagem sorológica (SATO *et al.*, 2008).

Apesar da presença do anti-HBs indicar proteção contra o VHB e este ser utilizado em algumas regiões endêmicas como critério para transfusão do hemocomponente, vários estudos demonstram que a presença de títulos elevados deste anticorpo não garante ausência do DNA VHB (ALLAIN & CANDOTTI, 2009; ROTH *et al.*, 2012). Também há relatos na literatura de casos de doadores que apresentaram IOB com carga viral variando entre <20 e 500UI/mL, porém não infecciosos (ALLAIN & CANDOTTI, 2009). No nosso estudo três dos quatro doadores DNA VHB positivos apresentaram o anti-HBs > 100mUI/mL. Portanto não encontramos relação entre os títulos de anti-HBs com a carga viral do vírus B.

No Japão hemocomponentes não-reativos para HBsAg e DNA HBV, mas reativo para o anti-HBc com títulos <1:32 ou anti-HBc com títulos >1:32 com anti-HBs > 200 mUI / ml são considerados adequados para transfusão, baseados em um estudo da correlação entre títulos do anti-HBc títulos e níveis do DNA VHB em unidades de sangue HBsAg negativo (TANI *et al.*, 2012).

A presença dos marcadores anti-HBc e anti-HBs com ausência do HBsAg e presença de baixa carga viral do VHB, levanta a possibilidade de que a infecção oculta é a

consequência de uma série de eventos concomitantes, incluindo a presença de mutações na região determinante associada com uma forte redução na replicação viral e expressão do gene. Como consequência as características estruturais do vírus e a resposta imunológica do indivíduo mascaram a presença do HBsAg soro/plasma, comprometendo a segurança transfusional (CAPEZZUTO *et al.*, 2010).

Neste estudo foram encontrados 04 casos de hepatite B oculta entre os 112 oriundos das regionais do Alto Solimões e Amazonas. Portanto, a prevalência encontrada para hepatite B oculta entre os doadores de sangue oriundos das regionais estudadas foi de 3,57%.

Em Porto Alegre, região de baixa endemicidade, foi realizado um estudo em doadores de sangue e a prevalência encontrada para hepatite B oculta foi de 3,3% (SILVA *et al.*, 2005). Outro estudo em doadores de sangue no Nordeste Brasileiro encontrou uma prevalência de 2,7% para IOB (ARRAES *et al.*, 2003).

Os resultados aqui apresentados para hepatite B oculta diferem de outras regiões endêmicas e assemelham-se a de índices de países de baixa prevalência como na Itália onde foi descrito ser de 4,8% (MANZINI *et al.*, 2007). Na Índia um estudo para investigar a hepatite B oculta de 220 doações de sangue com o perfil HBsAg negativo e anti-HBc positivo foi encontrado o DNA VHB em 30% dos doadores (PANIGRAHI *et al.*, 2010).

Em outro estudo também em região endêmica, foi descrito que a presença do DNA VHB em unidades de sangue derivadas de amostras anti-HBs positivas (com anti-HBc positivo/HBsAg negativo) acontece com uma prevalência de 1,5% e em amostras anti-HBs negativas com prevalência de 8% (BHATTI *et al.*, 2007). Este procedimento foi utilizado recentemente em nossa região.

O problema da infecção oculta pelo VHB é um assunto bastante debatido e vários relatos de casos de transfusão associados à infecção do VHB são encontrados na literatura.

Em um estudo no Centro de Transfusão de Sangue da Eslovênia, foi comprovada a transmissão do vírus da hepatite B por transfusão sanguínea em duas pacientes recém-transfundidas (LEVICNIK-STEZINAR *et al.*, 2008). A transfusão sanguínea de hemocomponentes HBsAg negativo com baixa carga viral do VHB ($<10 \text{ UI/mL}^{-1}$) pode ser infeccioso em receptores imunossuprimidos com imunidade deficiente contra a infecção por VHB (LEUNG, 2010; GERLICH *et al.*, 2010). Outro estudo na Itália demonstrou a presença do DNA VHB em um doador não imunizado contra o VHB, sem história de fatores de risco para infecção, com a enzima alanina aminotransferase normal, HBsAg negativo, anti-HBc reativo, anti-HBs positivo e com histórico de 50 doações realizadas (CAPEZZUTO *et al.*, 2010).

No Brasil há relato de IOB por hemocomponentes negativos para os marcadores sorológicos da hepatite B, porém com o DNA VHB positivo, em dois pacientes imunodeficientes (WENDEL *et al.*, 2008). Portanto a transfusão de hemocomponentes HBsAg negativos e DNA VHB são considerados infecciosos, sendo sua infectividade muito debatida, uma vez que mesmo a presença do anti-HBs pode não ter efeito quando o indivíduo é exposto a elevada carga viral do VHB (SATAKE *et al.*, 2007). A baixa carga viral no sangue transfundido e a condição imunossupressora do receptor pode retardar o aparecimento da IOB (BOUIKE *et al.*, 2010).

Do total de doações sanguíneas realizadas para este estudo 85% tiveram como doador o sexo masculino e 15% do sexo feminino, este fato é uma realidade para a mulher devido a vários fatores tais como: gravidez, período menstrual, amamentação. Estes fatores comprometem a doação feminina. Contudo não houve significância estatística entre os grupos. Na capital Manaus este quadro já começou a mudar, no ano de 2011, 77% das doações foram do sexo masculino e 23% do sexo feminino, este fato é atribuído às campanhas e informações realizadas pelo hemocentro (FHEMOAM, 2011). Os dados encontrados em

Manaus são semelhantes aos que foram encontrados nos hemocentros no Paraná/Brasil onde 61% são doadores do sexo masculino e 39% feminino (Ramos & Ferraz, 2010). Na Itália em outro estudo registrou outra realidade onde o percentual de doações masculina foi de 58,3% e 41,7% feminino (MANZINI *et al.*, 2007).

Neste estudo observou-se que entre os quatro doadores de sangue que foram positivos para o DNA VHB, três eram imunizados contra o vírus da hepatite B e destes nenhum relatou exposição aos fatores de riscos. Porém o quarto doador era primodoador, apresentou comportamento sexual de risco, não relatou história vacinal para hepatite B e apresentou histórico de uso abusivo de bebida alcoólica. Foi observado em um estudo realizado na Alemanha que indivíduos vacinados podem resolver o problema para a infecção do VHB, mas também podem desenvolver a infecção por IOB (GERLICH *et al.*, 2010).

A vacina contra o vírus da hepatite B faz parte do Plano Nacional de Imunização desde setembro de 1998, contempla três doses para obter uma titulação protetora de anticorpos. Alguns fatores como tabagismo, obesidade e fatores genéticos ligados a determinados alótipos de HLA, podem influenciar na resposta adequada ou não do sistema imune do indivíduo a vacinação (GERLICH *et al.*, 2010).

Um dos objetivos deste estudo foi caracterizar os genótipos do VHB em doadores de sangue do interior do estado do Amazonas. Foram analisadas por *nested* PCR as 4 amostras com carga viral detectável por PCR em tempo real. Para isso foram realizadas três diferentes estratégias, que consistiram na amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos dos genes S/Polimerase do VHB. Contudo as amostras foram negativas para a técnica por *nested* PCR. Vários fatores podem ter contribuído para este resultado tais como: baixa carga viral, baixa qualidade da amostra por perda do DNA viral em virtude das condições de transporte e armazenamento e sensibilidade do *neste* PCR inferior ao PCR em tempo real.

Um estudo amplo em mais de 100 milhões de doações testadas para VHB, realizado em conjunto com 27 países, por dez anos comprovou a eficácia na implementação de triagem por NAT e demonstrou que a utilização desta metodologia pode evitar a ocorrência de IOB entre os doadores assintomáticos, em janela imunológica, HBsAg negativo (ROTH *et al.*, 2012).

No Estado do Amazonas existe uma preocupação quanto ao algoritmo estabelecido pelo Ministério da Saúde para hepatite B, por se tratar de uma região endêmica para o VHB. Sendo necessário avaliar o impacto do algoritmo atual na qualidade dos hemocomponentes e na manutenção do estoque de sangue principalmente no interior do Estado, aonde há um descarte elevado de unidades de sangue por apresentar o anti-HBc reativo. A elevada positividade do anti-HBc provoca a necessidade de envio de hemocomponentes da capital (Manaus) para o interior do Estado.

Conclusões

A maior frequência dos doadores de sangue com sorologia reativa para hepatite B oriundos das regionais Alto Solimões e Amazonas apresentam o perfil sorológico anti-HBc e anti-HBs reativos e não são doadores de primeira vez.

A prevalência de hepatite B oculta em doadores oriundos das regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas é de 3,57%.

A presença do marcador anti-HBs em títulos elevados (acima de 100 mUI/ml) não está associada à ausência da hepatite B oculta em doadores de sangue das regionais de saúde Alto Solimões e Amazonas.

Não houve associação entre a carga viral encontrada e o perfil sorológico para hepatite B dos doadores de sangue DNA VHB positivos.

Não foi possível descrever os genótipos das amostras positivas para o DNA VHB.

Considerações Finais

Este estudo mostra que métodos moleculares mais sensíveis são necessários a fim de evitar a transmissão do vírus da hepatite B e garantir maior eficácia da triagem sorológica e consequentemente qualidade dos hemocomponentes e segurança na transfusão sanguínea. O diagnóstico pelo NAT é importante principalmente nos casos da janela imunológica e nas infecções aparentemente resolvidas. Contudo, o Ministério da Saúde não preconiza este teste nos hemocentros públicos e isto é motivo de preocupação na segurança transfusional.

O risco da IOB é real e pode ser comprovado nos Países onde a técnica foi implantada e também através dos dados deste estudo. A ocorrência de infecção oculta pelo vírus da hepatite B em doadores de sangue na região Amazônica leva ao questionamento do algoritmo atualmente obedecido. É possível também estabelecer novas estratégias para contemplar segurança transfusional, necessidade de sangue no interior do Estado e descarte de hemocomponentes.

Referências Bibliográficas

Alecrim, WD; Marreiros, LS; Alecrim, MGC; Miranda Santos, IKF. **Inquérito sobre presença de HBsAg em habitantes da Lábrea-Amazonas.** *Rev Soc Bras Med Trop* 19: 58-59, 1986

Allain, JP & Candotti, D. **Diagnostic Algorithm for HBV safe transfusion.** *Blood Transfu* 7: 174-82, 2009

Allain, JP & Candotti, D. **Hepatitis B in transfusion medicine: still a problem?** *J Biologicals* 40(3): 7-1, 2011

Almeida-Neto, C de; Strauss, E; Sabino, E.C.; Sucupira, M.C.A.; Chamone, D.A.F. **Significance of isolated hepatitis B core antibody in blood donors from São Paulo.** *Rev Inst Med Trop* 43(4): 203-208, 2008

Alvarado, EC; Sablon, E; Conde, GCJ; Juare, FL; Rui, ML; Aguilar, BS. **Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: predominant circulation of hepatitis B virus genotype H.** *World J Gastroenterol* 12(40):6540-5, 2006.

Alvarado-Mora, MV; Botelho, L; Gomes-Gouvêa, MS; Souza, VF; Maria C Nascimento, MC; Pannuti, CS; Carrilho, FJ; Pinho, JRR. **Detection of Hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil.** *Virol J* 8: 415, 2011

Alvarado-Mora, MV; Romano, CM; Gomes-Gouvêa, MS; Gutierrez, MF; Carrilho, FJ; Pinho, JRR. **Phylogenetic analysis of complete genome sequences of hepatitis B virus from an Afro-Colombian community: presence of HBV F3/A1 recombinant strain.** *Virol J* 9:244, 2012

Antar, W; El-Shokry, MH; Abd EWA; Hamid; Helmy MF. **Significance of detecting anti-HBc among Egyptian male blood donors negative for HBsAg.** *Transfus Med* 20(6): 409-13, 2010

Arraes, LC; Ximenes, R; Andrieu, J; Wei-Lu; Barreto, S; Pereira, LMMB; Castelo, A. **The biological meaning of anti-HBc positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers.** *Rev Inst Med Trop* 45(3):137-140, 2003

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

Bonino, F; Brunetto, MR. **Chronic hepatitis B e antigen (HBeAg) negative, anti-HBe positive hepatitis B: an overview.** *J of Hepatology* 39: 160-S163, 2003.

Bouike, Y; Imoto, S; Mabuchi, O; Kokubunji, S; Kai, S; Okada, M; Taniguchi, R; Momose, S; Uchida, S; Nishio, H. **Infectivity of HBV DNA positive donations identified in look-back studies in Hyogo-Prefecture, Japan.** *Transfus Med* 21(2): 107-15, 2011

Braga, WSM; Brasil, LM; Castilho, MC; Botelho, RA; Carapeços, GM; Borborema, CAT; Fonseca, JCF. **Surveillance of icteric syndromes – a study of the impact of hepatitis B vaccine in hiperendemic population.** *Rev Gastroenterol Mex* 59(2):107,1994.

Braga, WSM; Melo, HO; Cossate, MDB; Castilho, MC; Souza, RAB; Brasil, LM; Fonseca, JCF. **Prevalência de marcadores sorológicos dos vírus da hepatite B e Delta em população assintomática: estudo do impacto do uso da vacina contra hepatite B em áreas hiperendêmicas, Itamarati-Amazonas, Vale do rio Juruá.** *Rev Soc Bras Med Trop* 31:31, 1998

Braga, WSM; Brasil, LM; Souza, RAB; Melo, MS; Rosas, MDG; Castilho, MC; Fonseca, JCF. **Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite Delta (VHD) em Lábrea, Rio Purus, Estado do Amazonas.** *Epidemiol Serv Saúde* 13(1): 35-46, 2004

Braga, WSM; Silva, EB; Souza, RAB; Tosta, CE. **Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e pelo plasmódio em Lábrea, Amazonas: estimativa da ocorrência de prováveis coinfeções.** *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (3): 218-223, 2005

Braga, WSM; Castilho, MC; Borges, FG; Martinho, ACS; Rodrigues, IS; Azevedo, EP; Scazufca, M; Menezes, PR. **Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after**

nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 45(1):13-17, 2012

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

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Brasília: Ministério da Saúde; RDC nº 57,** 2010

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico:Hepatites Virais.** Brasília: Ministério da Saúde Ano II, nº 01, 2011

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico: Hepatites Virais.** Ano III, nº01, 2012

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

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

Castilho, MdaC; Oliveira, CM; Gimaque, JB; Leão, JD; Braga, WS. **Epidemiology and molecular characterization of hepatitis b virus infection in isolated villages in the western brazilian amazon.** *Am J Trop Med Hyg* 87(4):768-774, 2012

Chen, YC; Wen, JJ; Chu, CM; Liaw, YF. **Decreasing Levels of HBsAg Predict HBsAg Seroclearance in Patients with Inative Chronic Hepatitis B Virus Infection.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 10:1016, 2012

Chisari, FV; Isogawa, M; Wieland, SF. **Pathogenesis of hepatitis B vírus infection.** *Pathologie Biologie* 58: 258-266, 2010

Chu, CJ; Keeffe, EB; Han, SH; Perillo, RP; Min, AD; Soldevila-Pico, C; Carey, W; Brow, RS Jr; Luketic, VA; Terrault, N; Lok, AS. **Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study.** *Gastroenterology* 125(2):444-451, 2003

Devesa, M; Loureiro, CL; Rivas, Y; Monsalve, F; Cardona, N; Duarte, MC; Poblete, F; Gutierrez, MF; Botto, C; Pujol, FH. **Subgenotype Diversity of Hepatitis B Virus American Genotype F in Amerindians From Venezuela and the General Population of Colombia.** *J Med Virol* 80: 20–26, 2008

Dias, ALB; Oliveira, CMC; Castilho, MC; Socorro, M do; Silva, P; Braga, WSM. **Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the Western Brazilian Amazon.** *Rev Soc Bras Med Trop* 45(1): 9-12, 2012

Diaz, RS; Mendonça, JS. **I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Diagnóstico e Manuseio da Hepatite B (e Delta).** *Braz J infect dis* 1-86, 2006

El Khouri, M; Cordeiro, Q; Luz, DABP; Duarte, LS; Gama, MEA; Corbett, CEP. **Endemic hepatitis B and C virus infection in a Brazilian eastern Amazon region.** *Arq Gastroenterol* 47(1): 35-41, 2010

Ferreira, MS. **Diagnóstico e tratamento da hepatite B.** *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 4, 2000

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

Fung, SK; Lok, A S. **Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection?** *Hepatology* 40:790–792, 2004

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

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

Gomes-Gouvêa, MS; Soares, MCP; Bensabath, G; Carvalho-Mello, IMVG de; Brito, EMF; Souza, OSC; Queiroz, ATL; Carrilho, FJ; Pinho, JRR. **Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region.** *Journal of General Virology* 90: 2638–2643, 2009

Gonçales, NSL; Cavalheiro, NP. **I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Diagnóstico e Manuseio da Hepatite B (e Delta).** *The Brazilian Journal of infectious diseases.* 1-86, 2006

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

Hatziyannis, SJ; Vassilopoulos, D. **Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B.** *Hepatology* 34: 617-624, 2001

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

Hollinger, FB. **Hepatitis B virus.** In: Fields, BN; Knipe, DM; Howley, PM; Chanock, RM; Melnick, JL; Monath, TP; Roizman, B; Straus, SE. *Fields virology.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 2738-802, 1996

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

Hunt, CM; McGill, JM; Allen, ML; Condreay, LD. **Clinical relevance of hepatitis B viral mutations.** *Hepatology* 31: 1037-1044, 2000

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados do Censo 2010 publicados no Diário Oficial da União.** Disponível em: http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/index.php. Acessado em 07 de setembro de 2011

Júnior, GMB; Braga, WSM; Oliveira, CMC; Castilho, MC; Araújo, JR. **Hepatite B crônica oculta: prevalência e aspectos em população de elevada endemicidade de infecção pelo**

vírus da hepatite B na Amazônia Ocidental Brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop* 41 (6): 596-601, 2008

Kao, JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2(4): 553-62, 2008

Kleinman, SH; Lelie, N; Busch, MP. Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion. *Tranfusion* 49 (11): 2454-2489, 2009.

Kramvis, A; Kew, M; Francois, G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23: 2409–2423, 2005

Kumar, K; Kumar, M; Rahaman, SkH; Singh, TB; Patel, SK; Nath, G. Distribution of Hepatitis B virus genotypes among healthy blood donors in eastern part of North India. *Asian J Transfus Sci* 5(2): 144-149, 2011

Kurbanov, F; Tanaka, Y; Mizokami, M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res* 40: 14–30, 2010

Kwok, S; Higuchi, R. Precautions for PCR. *Nature* 339: 237-238, 1989.

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

Leung, VKS. A probable case of transfusion-transmitted hepatitis B virus infection in an immunosuppressed recipient caused by an occult HBV-infection donor with negative ID-NAT. *Transfus Med* 20: 276-277, 2010.

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

Kao, JH. **Molecular epidemiology of hepatitis B virus.** *Korean J Intern Med* 26: 255–261, 2011

Malta, M; Cardoso, LO; Bastos, FI; Ferreira, MM; Silva, CMFP. **Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais.** *Saúde Pública* 44 (3): 559-65, 2010

Manzini, P; Gitotto, M; Borsotti, R; Giachino, O; Guaschino, R; Lanteri, M; Testa, D; Ghiazza, P; Vacchini, M; Danielle, F; Pizzi, A; Valpreda, C; Castagno, F; Curti, F; Maqistroni, P; Abate, ML; Smedile, A; Rizzetto, M. **Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection.** *Hematologica* 92 (12): 1664-1670, 2007.

McMahon, BJ. **The Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection.** *Hepatology.* 49(5): S45-55, 2009

Mello, FC; Souto, FJ; Nabuco, LC; Villela-Nogueira, CA; Coelho, HS; Franz, HC; Saraiva, JC; Virgolino, HÁ; Motta-Castro, AR; Melo, MM; Martins, RM; Gomes, SA. **Hepatitis b virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates.** *BMC Microbiology* 7, 1471-2180, 2007

Neiva, SLG; Fernando, G Jr.. **I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Diagnóstico e Manuseio da Hepatite B (e Delta).** *Braz J infect dis* 1-86, 2006

Nettleman, N. **Hepatitis B.** Disponível em: www.emedicinehealth.com/hepatitis_b/page3_em.htm#hepatitis_b_symptoms. Acessado em: 14 de março de 2013.

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

Norder, H; Couroucé, AM; Magnius, LO. **Complete genomes, phylogenic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes.** *Virology* 198: 489-503, 1994

Novais, CM; Pires-Alves, M. **PCR em tempo real.** *Rev Biotecnol Ciên Desenvol* 33, 2004

Ocana, S; Casas, ML; Buhigas, I; Lledo, JL. **Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection.** *World J Gastroenterol* 17(12): 1553-1557, 2011

Okamoto, H; Tsuda, F; Sakugawa, H; Sastroewignjo, RI; Imai, M; Miyakawa, Y; Mayumi, M. **Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes.** *J Gen Virol* 69: 2575-83, 1988

Olinger, CM; Jutavijittum, P; Hubschen, JM; Yousukh, A; Samounry, B; Thammavong, T; Toriyama, K; Muller, CP. **Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia.** *Emerg Infect Dis* 14: 1777-80, 2008

Ozaslan, E; Purnak, T. **Controversies about occult hepatitis B virus infection.** *World J Gastroenterol* 15(39): 4986-4987, 2009.

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

Pereira, LM; Martelli, CM; Merchan-Hamann, E; Montarroyos, UR; Braga, MC; de Lima, ML; Cardoso, MR; Turchi, MD; Costa, MA; de Alencar, LC; Moreira, RC; Figueiredo, GM; Ximenes, RA; Hepatitis Study Group. **Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil.** *Am J Trop Med Hyg* 81: 240-247, 2009

Perkins, JA. **Rochester Institute of Technology**, 2002

Raimondo, G; Allain, JP; Brunetto, MR; Buendia, MA; Chen, DS; Colombo, M; Craxì, A; Donato, F; Ferrari, C; Gaeta, GB; Gerlich, WH; Levrero, M; Locarnini, S; Michalak, T; Mondelli, MU; Pawlotsky, JM; Pollicino, T; Prati, D; Puoti, M; Samuel, D; Shouval, D; Smedile, A; Squadrito, G; Trépo, C; Villa, E; Will, H; Zanetti, AR; Zoulim, F. **Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection.** *J Hepatol* 49: 652-657, 2008

Ribeiro, RM; Lo, A; Perelson, AS. **Dynamics of hepatitis B virus infection.** *Microbes Infect* 4: 829-35, 2002

Roncato, M; Ballardin, PAZ; Lunge, VR. **Influencia dos Genótipos no Tratamento da Hepatite B.** *Rev HCPA* 28(3): 188-93, 2008

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

Samal, J; Kandpal, M; Vivekanandan, P. **Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection.** *Clin Microbiol Rev* 25 (1): 142-63, 2012

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

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

Seo, DH; Whang, DH; Song, EY; Kim, HS; Park, Q. **Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen and occult hepatitis B virus infections in Korean blood donors.** *Transfusion* 51: 1840-1846, 2011

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

Sitnik, R; Pinho, JRR; Bertolini, DA; Bernardini, AP; Silva, LC; Carrilho, FJ. **Hepatitis B Virus Genotypes and Precore and Core Mutants in Brazilian Patients.** *J Clin Microbiol* 42(6): 2455–2460, 2004

Sjogren, M. **Serologic diagnosis of viral hepatitis.** *Gastroenterol Clin North Am* 23:457-478, 1994

Sofian, M; Aghakhani, A; Izadi, N; Banifazl, M; Kalantar, E; Eslamifar, A; Ramezani, A. **Lack of occult hepatitis B virus infection among blood donors with isolated hepatitis B core antibody living in an HBV low prevalence region of Iran.** *Braz J infect dis* 14: 308–310, 2010

SUSAM - Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas. **Mapa das Regionais de Saúde do Amazonas 2010.** Disponível em: <http://www.saude.am.gov.br/>. Acesso em 10 de junho de 2011

Tanaka, Y; Mizokami, M. **Genetic diversity of hepatitis B virus as an important factor associated with differences in clinical outcomes.** *J Infect Dis* 195:1–4, 2007

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

Tatematsu, K; Tanaka, Y; Kurbanov, F; Sugauchi, F; Mano, S; Maeshiro, T; Nakayoshi, T; Wakuta, 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 Virology* 83: 10538-10547, 2009

Te, HS; Jensen, DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis* 14:1-21, 2010

Tedder, RS; Ijaz, S; Gilbert, N. **Evidence for a dynamic host-parasite relationship in e-negative hepatitis B carriers.** *J Med Virol* 68: 505-12, 2002

Teshale, EH. CDC - Center Disease Central. **Center of Disease control and prevention. Infectious Diseases to travel, 2011.** Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellow.book/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-b.htm>. Acessado em: 05 de novembro de 2012

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

Tonetto, PA; Gonçalves-Neiva, SL; Fais, VC; Vigani, AG; Gonçalves Eduardo, SL; Feltrin, A; Jr Gonçalves Fernando, L. **Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil.** *BMC Infect Dis* 9:149, 2009

Tran, TT; Trinh, TN; Abe, K. **New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam.** *J Virol* 82: 5657–63, 2008

Vienna, ACR. **A language and environment for statistical computing.** *R Foundation for Statistical-Development Core Team 2012.* Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acessado em: 30 de outubro de 2012

Villeneuve, JP. **The natural history of chronic hepatitis B virus infection.** *J Clin Virol* 34 (1): 139-S42, 2005

Von Elm, E; Altman, DG; Egger, M; Pocock, SJ; Gøtzsche, PC; Vandenbroucke, JP. **The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies.** *BMJ* 335 (7624): 806-8, 2007

Wendel, S; Levi, JE; Biagini, DC; Allain, JP. **A probable case of hepatitis B virus transfusion transmission revealed after a 13-month-long window period.** *Transfusion* 48 (8): 1602-8, 2008

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

WHO - World Health Organization. **Weekly Epidemiological Record** 79: 255-64, 2004.

WHO - World Health Organization. **Hepatitis B.** *Fact Sheet No. 204*, 2012

Wolf, FH; Fuchs, SC; Brandão, ABM. **Absence of occult hepatitis B among donors in southern Brazil.** *Braz J Infect Dis* 15: 159-162, 2011

Zheng, X; Ye, X; Zhang, L; Wang, W; Shuai, L; Wang, A; Zeng, J; Candotti, D; Allain, JP; Li, C. **Characterization of Occult Hepatitis B Virus Infection from Blood Donors in China.** *J Clin Microbiol* 49(5):1730, 2011

Yim, HJ; Lok, ASF. **Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005.** *Hepatology* 43:173-81, 2006

Zanetti, AR; Romanò, L; Zappà, A; Velati, C. **Changing patterns of hepatitis B infection in Italy and NAT testing for improving the safety of blood supply.** *J Clin Virol* 36: S51-S55, 2006

Apêndices

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TÍTULO DO ESTUDO Detecção da hepatite B oculta nas doações de sangue do interior do Estado do Amazonas.

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

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será aplicado um questionário contendo perguntas sobre possíveis comportamentos de exposição à infecção a hepatite B. Posteriormente será coletada amostra de 0,5mL de sangue para análise da presença do DNA do vírus. As análises serão realizadas na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus. Se a sua amostra após a análise não estiver dentro dos critérios exigidos por este projeto, este documento torna-se inválido.

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

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

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

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

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

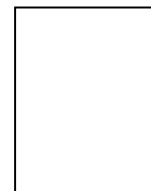
USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue periférico) será utilizado para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos

posteriores. Os questionários serão arquivados sob a guarda do pesquisador principal deste estudo.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

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

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



Número da bolsa (macarrão): _____

dactiloscópica)

(Assinatura do entrevistador)

(Impressão

Data: ____/____/____

Nome da Cidade: _____

APÊNDICE B

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Título do projeto: Detecção da hepatite B oculta nas doações de sangue do interior do Estado do Amazonas.

Código do projeto: _____ (preenchido em Manaus)

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

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

Comentários: _____

Responsável pela
entrevista: _____

(colocar o nome completo em letra de forma)

Data: ____/____/____

APÊNDICE C

PLANILHA DE CONTROLE DOS CASOS

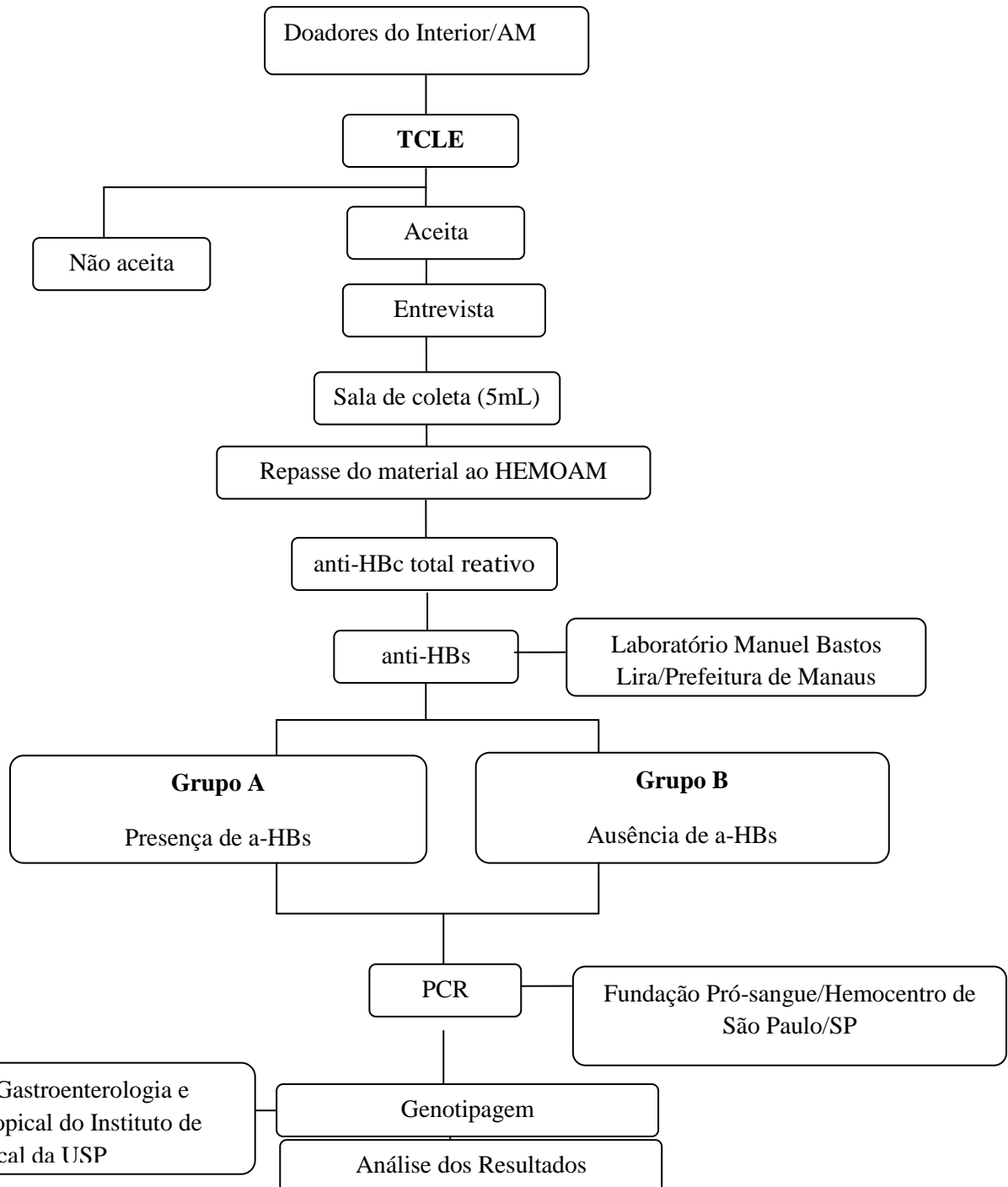
Deteção da hepatite B oculta nas doações de sangue do interior do Estado do Amazonas.

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

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

APÊNDICE D

FLUXOGRAMA METODOLÓGICO



TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexos



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

I. Identificação

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

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

Pesquisador responsável: Márcia Poinho Encarnação de Moraes

Data de Reapresentação ao CEP: 17/11/2009

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

II. Objetivos

Geral:

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

Específicos:

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

III. Sumário do projeto

Descrição e caracterização da amostra:

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



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

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

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

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

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

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

Data Parecer: 25/11/2009


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

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 AV. CONSTANTINO NERY, 4397 – CHAPADA – CEP 69050-002 – MANAUS/AMAZONAS
 FONE (92) 3635-0113 FAX (92) 3635-0112
 E-mail: cep_hemoam@hotmail.com