

ANDRÉA DE SIQUEIRA CAMPOS LINDENBERG

**INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B EM MATO GROSSO DO SUL:
VARIAÇÕES GENÔMICAS E INFECÇÃO OCULTA**

**CAMPO GRANDE
2013**

ANDRÉA DE SIQUEIRA CAMPOS LINDENBERG

**INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B EM MATO GROSSO DO SUL:
VARIAÇÕES GENÔMICAS E INFECÇÃO OCULTA**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de doutor pelo Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha. Coorientadora: Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro.

**CAMPO GRANDE
2013**

ANDRÉA DE SIQUEIRA CAMPOS LINDENBERG

**INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B EM MATO GROSSO DO SUL:
VARIAÇÕES GENÔMICAS E INFECÇÃO OCULTA**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de doutor pelo Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha. Coorientadora: Prof^a Dra Ana Rita Coimbra Motta de Castro.

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao conceito _____.

Campo Grande, de de 2013.

BANCA EXAMINADORA

NOTA/CONCEITO

Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha - UFMS

Profa. Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro - UFMS

Profa. Dra. Sonia Maria Fernades Fitts - UFMS

Dra. Márcia Maria Ferrairo Janini Dal Fabbro – SESAU

Profa. Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa - FMUSP

DEDICATÓRIA

Aos que motivam minhas conquistas e as fazem valer a pena.

Meus pais Rejane e Flávio pelo amor incondicional.

Meu marido pelo incentivo constante.

Meus filhos Camila, Bruno e Pedro Henrique presentes de Deus.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Rivaldo Venâncio por sua cordialidade ao me receber como sua orientanda neste programa, sempre me incentivando a atingir meus objetivos.

A Professora Dr^a Ana Rita Coimbra Motta Castro, sempre atenciosa e gentil, desde os primeiros contatos aceitou ser minha coorientadora, me auxiliando sempre com muita competência e humanidade, uma grande amiga, muito obrigada.

A professora Dr^a Sonia Maria Fernandes Fitts, pelas diversas colaborações em todas as fases da pesquisa, sua colaboração espontânea e sincera foi importantíssima, uma amiga que sempre contei, muito obrigada.

A Professora Dr^a Anamaria Mello Miranda Paniago pelas sugestões e ajuda nos momentos de apreensão. Amiga de todas as horas, muito obrigada.

Ao Professor Dr. Mauricio Antonio Pompilio, pelas diversas sugestões, competência e contribuição na qualificação desta Tese.

A M^a Silvia Uehara pela amizade e sugestões que colaboraram com a pesquisa, muito obrigada.

A M^a Marina Sawada Torres pela paciência e colaboração ao acesso a informação do Centro de Hematologia de Mato Grosso do Sul (Hemosul), muito obrigada.

A Dr^a. Ines Aparecida Tozetti por sua cordialidade ao me receber como coordenadora deste programa.

Aos alunos, prestativos, companheiros, e opinantes, fizeram os dias mais alegres e me ajudaram a seguir em frente, especialmente Carolina Marlien Duarte da Costa Finotti, Marco Antonio Puga, Tayana Serpa Ortiz Tanaka, Grazielli Rezende, Amanda Engers e todos os outros do laboratório de virologia do NHU-UFMS. Obrigada por todo o auxílio.

Aos profissionais do laboratório de Virologia Molecular da FIOCRUZ-RJ pela contribuição e enriquecimento nos dados deste trabalho.

A colaboração técnica dos profissionais do Lacen. Gilsa muito obrigada pelo apoio.

Aos profissionais dos diversos setores e atividades que me auxiliaram neste trabalho, possibilitando o acesso a informação tão necessária para qualquer pesquisador, em especial, Noeli Campos Silva e Sarah Chavez, muito obrigada.

Aos professores pela competência e empenho em compartilhar seus conhecimentos e experiências, para conquistarmos os melhores resultados.

“A vida é uma luta constante, e vencedor é unicamente aquele que venceu a si próprio.”

AYYAD, 1988.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar o perfil soropidemiológico e molecular da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) em doadores de sangue e em pacientes portadores de hepatite B crônica atendidos em Centros de referência em DIP em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil Central, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2012. Foram analisadas 8.840 amostras de sangue de primodoadores coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Mato Grosso do Sul no período de janeiro a dezembro de 2010. Todas as amostras foram submetidas ao teste imunoenzimático para a detecção dos marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc total. A prevalência global de infecção pelo HBV foi de 3,04% (95%CI: 2,7-3,4). HBsAg foi detectado em 0,19% (95%CI: 0,1-0,3) dos primodoadores estudados. Embora a infecção pelo HBV tenha sido detectada em primodoadores de sangue, esses resultados demonstram um declínio significativo comparado com 9,4% de anti-HBc total e 1,1% de HBsAg relatados em um estudo conduzido anteriormente (2001), em primodoadores no mesmo centro de referência. Dentre as amostras anti-HBc positivas no ano de 2010, 190 foram submetidas a detecção de HBV-DNA por semi-nested PCR e a prevalência de infecção oculta pelo vírus da Hepatite B encontrada foi de 10,5%. Esse índice é considerado elevado considerando-se a redução na prevalência da infecção o que classifica a região como sendo de baixa endemicidade. Quanto ao estudo conduzido nos pacientes portadores crônicos de infecção pelo HBV, 77 amostras de soro foram submetidas a detecção de marcadores de infecção pelo vírus da hepatite Delta (HDV) e submetidos a detecção do HBV-DNA (semi-nested PCR). Os genótipos do HBV e as mutações na região da polimerase foram determinados por sequenciamento. A presença do HBV-DNA foi detectada em 55/77 pacientes crônicos. A identificação dos genótipos foi realizada em 44/50 amostras e os genótipos identificados foram A (43,2%), D (45,4%), F (9,1%) e C (2,3%). Em relação ao genótipo D, os subgenótipos identificados foram: D2 (40%), D6 (35%) e D3 (5%). A análise filogenética das amostras identificadas como genótipo A evidenciou presença de 42,1% do subgenótipo A1, 15,8% do A3 e 15,8% do subgenótipo A4. Quanto ao genótipo F, 3/4 (75%) das amostras eram pertencentes ao subgenótipo F2 e 1/4 (25%) ao subgenótipo F4. Estes dados são compatíveis com o predomínio dos genótipos A e D relatados em diversos estudos conduzidos em nossa região. Além disso, a identificação pela primeira vez do genótipo C caracteriza a introdução de um novo genótipo em nossa região.

Dos 25 pacientes com viremia presente, 2 (8%) apresentaram a tripla mutação na região da polimerase (rtL180M + rtM204V + rtV173L). Foram observadas também 11 substituições de aminoácidos (D07A, Y13H, I91L, I103V, N124H, L129M, Q139N, M145L, K149Q, Y151F, Y221F), detectadas na maioria dos isolados pertencentes ao genótipo D. A substituição do aminoácido V207L foi encontrada em 2/4 isolados pertencentes ao genótipo F. A coinfeção HBV/HDV foi detectada em 1.3% dentre os portadores crônicos. Este é o primeiro estudo que demonstra a infecção pelo HDV e a taxa de ocorrência natural de mutantes na região YMDD em pacientes com hepatite B crônica, monoinfectados e não tratados com lamivudina em Mato Grosso do Sul.

Palavras-chave: Hepatite B oculta em doadores, Hepatite B crônica, Genótipos HBV, Mutação HBV.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the sero epidemiological profile and molecular infection by hepatitis B virus (HBV) in blood donors and in patients with chronic hepatitis B treated at DIP reference centers in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Central Brazil, from January 2010 to December 2012. From January to December, 2010, 8,840 blood samples collected from first-time donors at the Mato Grosso do Sul Hematology Center were analyzed. All samples were subjected to enzyme immunoassay for the detection of serological markers for HBsAg and total anti-HBc. Overall HBV infection prevalence was 3.04% (95%CI: 2.7-3.4). HBsAg was detected in 0.19% (95% CI: 0.1-0.3) of the first-time donors studied. Although HBV infection has been detected in first-time blood donors, these results demonstrate a significant decline in comparison to 9.4% of total anti-HBc and 1.1% of HBsAg reported in a previous study of first-time blood donors conducted in 2001 at the same reference center. Among the samples which were anti-HBc positive in 2010, 190 were subjected to HBV DNA detection by semi-nested PCR and occult hepatitis B virus infection prevalence was found to be 10.5%. This index is considered high given the reduction in prevalence classifying the region as being of low endemicity. Regarding the study conducted in patients with chronic HBV infection, 77 sera were subjected to detection of hepatitis delta virus (HDV) infection markers and HBV-DNA (*semi-nested PCR*). The HBV genotypes and mutations in the polymerase region were determined by sequencing. The presence of HBV-DNA was detected in 55/77 chronic patients. Genotyping was performed for 44/50 samples and the genotypes identified were A (43.2%), D (45.4%), F (9.1%) and C (2.3%). For genotype D, the subgenotypes identified were: D2 (40%), D6 (35%) and D3 (5%). Phylogenetic analysis of the samples identified as genotype A revealed the presence of 42.1% of subgenotype A1, 15.8% of A3 and 15.8% of A4. Regarding genotype F, 3/4 (75%) of the samples were found to belong to subgenotype F2 and 1/4 (25%) to subgenotype F4. These data are consistent with the predominance of genotypes A and D reported in several other studies conducted in our region. Furthermore, the identification of the first characterization of genotype C in our region confirms the introduction of a new genotype. Of the 25 patients with viremia present, 2 (8%) presented a triple mutation in the polymerase region (rtL180M + rtM204V + rtV173L). Eleven amino acid substitutions also were observed (D07A, Y13H, I91L, I103V, N124H, L129M, Q139N, M145L, K149Q, Y151F, Y221F) and were detected in

most of the isolates belonging to genotype D. The substitution of amino acid V207L was found in 2/4 isolates belonging to genotype F. HBV/HDV coinfection was detected in 1.3% of chronic carriers. This is the first study which demonstrates HDV infection and the rate of naturally occurring YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B, who were monoinfected and untreated with lamivudine, in Mato Grosso do Sul.

Key words: Blood donors occult hepatitis B, Chronic hepatitis B, HBV genotypes, HBV mutation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - AMINOÁCIDOS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ALT – Alanina aminotransferase

anti-HCV – antivírus da hepatite C

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST – Aspartato aminotransferase

DM – Diabetes Mellitus

EIA – *Enzyme Immunoassay* – “Ensaio Imunoenzimático”

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – “Ensaio de Anticorpos Ligados a Enzima”

ETV - Entecavir

EUA – Estados Unidos da América

FH – Fibrose Hepática

g/dL – gramas por decilitro

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HAV – Vírus da Hepatite A

HBV – Vírus da Hepatite B

HCC - Carcinoma Hepatocelular

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HCV – Vírus da Hepatite C

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IgG – Imunoglobulina G

IL-28B – Interleucina-28B

INF – Interferon – “alfa-interferona”

INF-peg – Interferon peguilado – “alfapeginterferona”

Kg – quilogramas

LAM - Lamivudina

LTCD8+ – Linfócito T CD8+

mcg – micrograma

mL – mililitros

mm³ – milímetros cúbicos

MS – Mato Grosso do Sul

NANB – Não-A e Não-B

NHE – Núcleo Hospitalar de Epidemiologia

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – “Reação em Cadeia da Polimerase”

PEG – Polietilenoglicol

Riba – Ribavirina

RIBA – *Recombinant Immuno-Blotting Assay* – “Imunotransferência com antígenos recombinantes”

RNA – Ácido Ribonucleico

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

RT-PCR – *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* – “Transcriptase Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase”

Rt-PCR – *Real time-Polymerase Chain Reaction* – “Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real”

PCDT – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

Sinan – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SUS – Sistema Único de Saúde

TAP – Tempo e Atividade de Protrombina

TDF - Tenofovir

TMA – *Transcription Mediated Amplification* – “Amplificação Mediada por Transcrição”

TSH – Hormônio Estimulante da Tireoide

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UI – Unidades Internacionais

U/L – Unidades por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Breve Histórico	16
2.2 Classificação e biologia do vírus da hepatite B	17
<u>2.2.1 Replicação do vírus da hepatite B</u>	22
<u>2.2.2 Distribuição dos genótipos e subgenótipos do HBV</u>	23
<u>2.2.3 Mutações no genoma do HBV</u>	25
2.3 Aspectos clínicos	29
2.4 Diagnóstico laboratorial	31
2.5 Tratamento	33
2.6 Epidemiologia da infecção pelo HBV	35
2.7 HBV e HIV	37
2.8 Infecção oculta pelo vírus da hepatite B	38
2.9 Prevalência da infecção oculta	43
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
5 RESULTADOS	49
5.1 ARTIGO 1: Decrease in Hepatitis B Prevalence Among Blood Donors in Central-West Brazil	50
5.2 ARTIGO 2: Occult Hepatitis B: A Risk for Blood Transfusion	58
5.3 ARTIGO 3: Hepatitis B virus genotypes and YMDD mutations among chronic hepatitis B patients in Central-West Brazil	70
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXO A – PROTOCOLO CEP	123
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO	124

1 INTRODUÇÃO

Hepatite B é uma doença infecciosa associada com a estimativa de 240 milhões de pessoas cronicamente infectadas (OTT *et al.*, 2012). Estima-se que um terço da população mundial tenha evidência sorológica de infecção presente ou passada pelo vírus da hepatite B. Trata-se, portanto de um importante problema de saúde pública (LOK; McMAHON, 2009).

A doença causada pelo vírus da hepatite B (HBV) representa a décima causa de morbidade e mortalidade no mundo. De 15 a 40% desses indivíduos desenvolverão cirrose ou carcinoma hepatocelular (CHC) (GANEM; PRINCE, 2004).

No homem a infecção pelo HBV pode variar da forma inaparente até doença clínica manifesta, a qual pode evoluir de uma forma aguda para cura com imunidade duradoura, mas também para o estado de portador crônico assintomático, que pode progredir para quadro de cirrose e/ou carcinoma hepatocelular. Raramente a evolução pode ser de uma hepatite fulminante. Também existem os carreadores “saudáveis” onde na vigência de quadro imunossuprimível podem reativar a forma aguda da doença (McMAHON, 2010). Há evidência que o HBV persista nos hepatócitos, impedindo assim a completa eliminação do vírus, além do risco de transmissão e reativação na presença de imunossupressão.

A transmissão se dá por via perinatal (vertical), sexual e percutânea. Também pode ocorrer a transmissão horizontal principalmente entre crianças em áreas hiperendêmicas (LOK; McMAHON, 2009).

As hepatites pós-transfusionais ainda representam um grande problema apesar de todos os avanços diagnósticos, epidemiológicos, virológicos, imunológicos e de biologia molecular. Apesar do aumento da sensibilidade dos testes para seleção e triagem de doadores de sangue ainda acontecem infecções pós transfusionais (GERMAIN; GOLDMAN, 2002).

O Brasil é classificado como área de endemicidade intermediária com excessão da região da Amazônia Ocidental onde a endemicidade é alta e também há co-circulação do vírus da hepatite Delta (PEREIRA *et al.*, 2009).

Em recente estudo de base populacional a região Centro-Oeste foi classificada como região de baixa endemicidade, com prevalência do HBsAg menor que 1% (PEREIRA *et al.*, 2009).

Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, foram desenvolvidos estudos de prevalência de hepatite B em populações específicas como afrodescendentes (MOTTA-CASTRO *et al.*,

2008; MATOS *et al.*, 2009), usuários de drogas (FERREIRA *et al.*, 2009), população exposta a risco profissional como bombeiros (CONTRERA-MORENO *et al.*, 2012), indivíduos privados de liberdade (STIEF *et al.*, 2010) e gestantes (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2007), mas faltam dados atualizados da população geral. Atualmente, não existem dados atualizados referentes à prevalência da infecção para o vírus da hepatite B na população de doadores e de pacientes atendidos nos centros de referência de Mato Grosso do Sul. Em 2001, Aguiar *et al.*, relataram 9,4% de infecção pelo HBV (anti-HBc total positivo) em primodoadores de Mato Grosso do Sul. Entretanto, faltam estudos na região que relacionem estes dados com positividade para DNA-HBV.

Considerando que as estratégias de controle, manejo e tratamento de hepatite B dependem primariamente do conhecimento da epidemiologia da infecção, bem como das características clínicas, virológicas e laboratoriais da infecção pelo HBV, este trabalho visa a determinação da prevalência da infecção pelos vírus de hepatite B e a investigação da ocorrência de hepatite B oculta em primodoadores de sangue de Campo Grande-MS, bem como a identificação dos principais genótipos circulantes e das principais mutações no genoma do HBV (região da polimerase) em pacientes portadores de hepatite B crônica. Os resultados obtidos com a execução desse estudo fornecerão informações imprescindíveis para o delineamento das intervenções terapêuticas e epidemiológicas necessárias às populações estudadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Breve Histórico

O termo hepatites virais é convencionalmente utilizado para designar as doenças causadas por vírus hepatotrópicos. As primeiras descrições dessa doença vem de períodos anteriores a Era Cristã, como relatos de surtos de icterícia na Babilônia há mais de 2500 anos, além da descrição de icterícia epidêmica por Hipócrates em 400 a.C. (WENDEL, 2003).

Soldados brasileiros e norte-americanos vacinados contra febre amarela na segunda guerra mundial foram acometidos de duas epidemias distintas. Novos casos foram reconhecidos associados ao uso de agulhas e seringas reutilizadas para a aplicação parenteral para terapias anti-sifilíticas e na profilaxia de sarampo e parotidite (FONSECA, 2010).

O primeiro relato de hepatite transmitida pela inoculação parenteral em escala epidêmica foi em 1885 descrito por Lumen, na cidade alemã de Bremen. Uma epidemia em 191 trabalhadores de um estaleiro naval, de um total de 1.289 indivíduos vacinados contra varíola (vacina preparada com linfa humana) que apresentaram icterícia (FONSECA, 2010).

No final da década de 50 e início da década de 60 alguns autores já conseguiam estabelecer uma associação entre elevação de aminotransferases hepáticas de doadores e desenvolvimento de hepatite pós transfusional, mesmo sem a identificação do agente infeccioso (FONSECA, 2010).

Em 1964 foi descoberto no fígado de paciente anictérico um antígeno denominado hepatite sérica (SH). Em 1965, Blumberg e colaboradores publicaram o que viria a ser uma das mais importantes revelações sobre hepatites, que foi a detecção, no soro proveniente de um aborígene australiano, de um antígeno que reagiria com soros de hemofílicos, denominado antígeno Austrália (BLUMBERG; ALTER; VISNICH, 1965). Estudos subsequentes revelaram que esse “antígeno Austrália” era relativamente raro na população da América do Norte e Oeste europeu, porém prevalente em alguns países africanos e asiáticos e entre pacientes com leucemia, síndrome de Down e hepatite aguda. Em 1968, a correlação do antígeno Austrália (agora designado antígeno de superfície do vírus da hepatite B ou HBsAg) com a infecção pelo HBV foi realizada a partir do soro de portadores do antígeno Austrália (BLUMBERG; SUTNICK; LONDON, 1969).

Os estudos de Dane e colaboradores (1970) conduzidos em microscopia eletrônica, demonstraram a natureza completa do HBV (DANE; CAMERON; BRIGGS, 1970). O anti-HBc, anticorpo dirigido ao core do HBV, foi descoberto posteriormente por Almeida e colaboradores em 1971.

Em 1973 a Organização Mundial da Saúde (OMS) propõe o termo hepatite B em substituição aos termos anteriormente utilizados para designar a doença como: hepatite por soro homólogo, pós transfusional, MS-2, sérica com incubação prolongada ou decorrente do antígeno Austrália (FONSECA, 2010).

Na década de 70 já foi introduzida a triagem sorológica do HBsAg nos bancos de sangue, marco este que possibilitou a redução das hepatites pós- transfusionais (SAID, 2011).

A hepatite B oculta é aquela onde a presença do DNA do vírus da hepatite B (HBV) pode ser detectada no tecido hepático (com ou sem detectabilidade no soro), sem ausência da detecção do antígeno de superfície (HBsAg). Hepatite B oculta foi reportada a primeira vez há 30 anos em um caso onde infecção pelo vírus B ocorreu pós-transfusão sanguínea e o doador apresentava-se com anti-HBc isolado (TABOR *et al.*, 1979).

2.2 Classificação e biologia do vírus da hepatite B

O vírus da hepatite B (HBV) pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus* (ICVTV, 2011).

Na microscopia eletrônica são observadas três formas distintas: partículas completas infecciosas, denominadas partículas de Dane ou virion, partículas incompletas esféricas, partículas incompletas filamentosas, ambas produzidas em excesso e formadas por proteínas do envelope, com cerca de 20 nm de diâmetro (LIANG, 2009) (Figura 1). O soro de indivíduos infectados por esse vírus pode conter mais de 10^9 partículas infecciosas por mL.

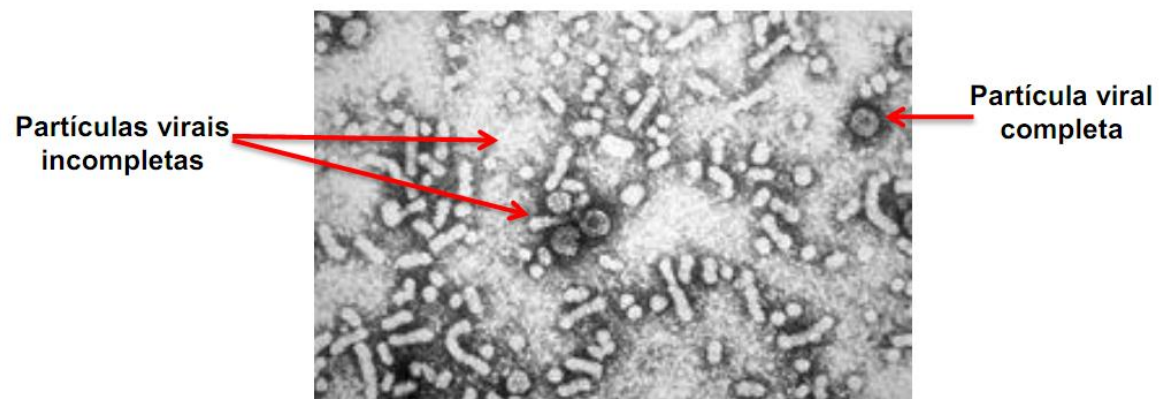


Figura 1 - Partículas do HBV observadas por micrografia eletrônica. Adaptado de Dane *et al.*, 1970.

As partículas virais infecciosas são esféricas com diâmetro de aproximadamente 42 nm (Figura 2). É formada pelo genoma viral, por um envelope externo lipoprotéico, que constitui o antígeno de superfície do HBV (HBsAg), e por um nucleocapsídeo icosaédrico formado pelo antígeno intracelular do core (HBcAg), expresso em hepatócitos infectados (GANEM; PRINCE, 2004).

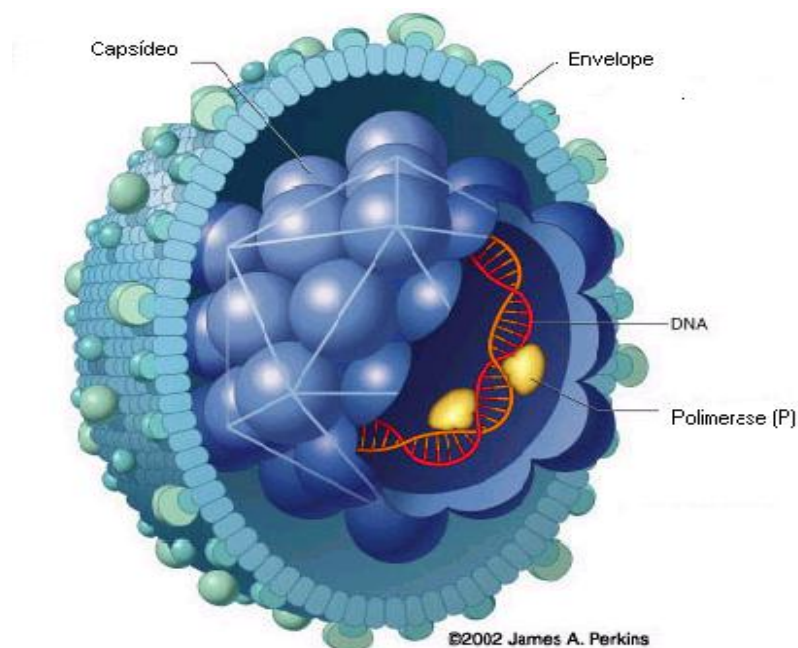


Figura 2 – Representação esquemática do vírus da hepatite B.
Fonte: Hunt *et al.*, 2000 (adaptado)

O genoma do HBV é um dos menores dentre os vírus que infectam o homem constituído por uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla, e possui aproximadamente 3200 pares de bases (pb) (Figura 3). Todo o genoma do HBV é codificante, possuindo 4 ORFs conhecidas como pré-S/S, pré-C/C, P e X. A fita mais longa é complementar ao RNA pré-genômico e possui polaridade negativa ou L (-), está ligada covalentemente em sua extremidade 5' à proteína terminal, tendo um comprimento de 3200 nucleotídeos. A fita menor, de polaridade positiva ou S (+), é incompleta e apresenta-se com tamanho variado, correspondendo entre 50 a 90% do comprimento da fita complementar de polaridade negativa ou L (-). Próxima à extremidade 5' de ambas as fitas, há duas pequenas seqüências de 11 nucleotídeos, que são diretamente repetidas e chamadas de *direct repeats* (DR1 e DR2). Essas seqüências são importantes para a iniciação da replicação do HBV. A circularidade da estrutura genômica é mantida pelo pareamento de bases situado nas terminações 5' de ambas as fitas, formando um final coesivo de 224 pares de bases.

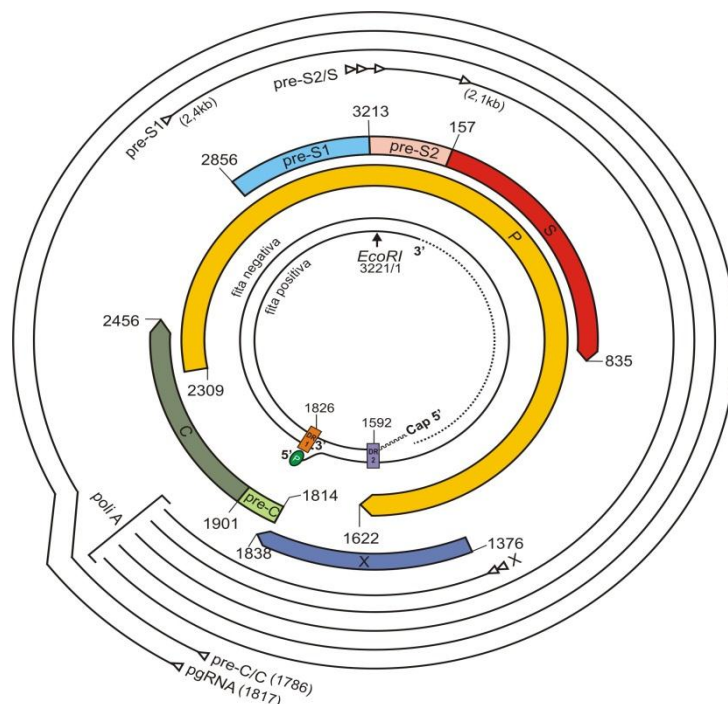


Figura 3 - Modelo esquemático do genoma do HBV (KIDD-LJUNGGREN; MIYAKAWA; KIDD, 2002).

O genoma circular é bastante compacto. A fita L (-) contém quatro unidades de leitura aberta (ORFs), que codificam as proteínas do envelope (pré-S/S), core (pré-core/core), X e polimerase (P), que se sobrepõem (Figura 3). A sobreposição dessas quatro ORFs aumenta a

capacidade de síntese protéica em aproximadamente 50% do esperado para a totalidade do genoma do HBV (KIDD-LJUNGGREN; MIYAKAWA; KIDD, 2002).

A região pré-S/S codifica as proteínas do envelope viral: L (*large*), M (*middle*) e S (*small*), a partir dos códons de iniciação das regiões pré-S1, pré-S2 e S, respectivamente. A proteína S ou HBsAg é o constituinte predominante do envelope, podendo ser também encontrado livre no soro (GOMES; NIEL, 2008).

Todas as três proteínas possuem o mesmo códon de terminação localizado no final da região S. As proteínas L, M e S estão presentes na partícula de Dane, sendo a proteína S a mais abundante no envelope.

A maior proteína que compõe o HBsAg, *large L* (368 aa), é codificada pelas seqüências Pré-S1, Pré-S2 e S, cujo códon de iniciação é localizado no início da região pré-S1. Essa proteína é responsável pelos sítios de ligação do HBV a receptores específicos no hepatócito, essencial para a montagem e infecciosidade do virion (KAO; CHEN, 2002).

A proteína de tamanho intermediário, designada de *middle M* (281 aa), é codificada pelas seqüências pré-S2 e S. Essa região apresenta um epítopo dominante localizado na superfície do envelope viral, de grande importância para a adsorção e penetração do HBV no citoplasma do hepatócito, por meio de receptores celulares para a albumina polimerizada do soro humano (pHSA) (FRANCOIS *et al.*, 2001).

A menor (226 aa) e mais abundante proteína do envelope, *small S* (226 aa), é sintetizada a partir do códon de iniciação localizado no início da região S. Nela, estão localizados os epítomos específicos que são o alvo primário da neutralização viral conferida pela resposta imune do hospedeiro (GLEBE; URBAN, 2007).

A região *Pré-Core/Core* possui dois códons de iniciação na mesma fase de leitura aberta e codifica duas proteínas: proteína “e” (HBeAg) e proteína do *core* (HBcAg). O HBeAg é um antígeno encontrado livre no soro dos indivíduos infectados, cuja detecção está relacionada à taxa de replicação viral. O antígeno HBc é um potente imunógeno (GERLICH *et al.*, 2007).

A região da Polimerase, considerada a maior ORF, codifica a síntese da polimerase viral, sobrepondo-se a todos os outros genes, cuja sobreposição inicia-se no gene C e termina no gene X. O gene P codifica uma poliproteína com atividade de DNA polimerase, com 832 aa e peso molecular de 93,2 kDa, contendo três domínios funcionais: O domínio carboxi-terminal é uma transcriptase reversa com atividade de RNase H. Região espaçadora ou *spacer*, situada entre o primeiro e o segundo domínio, que pode ser removida sem afetar o ciclo viral, sendo sua função ainda não definida. O domínio amino-terminal, necessário como

replicação, estão relacionadas com o desenvolvimento do HCC em 80% do total de casos de portadores crônicos do HBV (GLEB; URBAN, 2007).

2.2.1 Replicação do vírus da hepatite B

Esclarecimentos relacionados ao processo de entrada do HBV nos hepatócitos ainda precisam ser realizados. Estudos envolvendo o HBV sugerem que os domínios pré-S1 e S estão envolvidos na adsorção do HBV, sendo o domínio pré-S1 o principal sítio de ligação do HBV ao complexo de moléculas receptoras presentes nos hepatócitos. Após a adsorção, o vírus penetra no citoplasma dos hepatócitos e perde o envoltório. No interior do hepatócito, o nucleocapsídeo libera o HBV-DNA e este é transportado para o núcleo, onde o DNA viral de fita parcialmente dupla é convertido em DNA circular de fita dupla covalentemente ligada (cccDNA) pela DNA polimerase da célula hospedeira. A molécula de cccDNA é a forma pela qual o HBV persiste na célula hospedeira. A RNA polimerase II do hepatócito atua sobre o cccDNA que serve como molde para transcrição dos RNAs mensageiros funcionais genômicos e pré-genômicos. O pgRNA (pré-genômico) é o molde para a síntese do DNA viral. Os outros três RNAs são transcritos para produção da DNA polimerase do HBV e das proteínas virais, como o antígeno *core* do HBV (HBcAg), o antígeno “e” do HBV (HBeAg) e as proteínas do envelope viral (GOMES; NIEL, 2008).

Como todo hepadnavírus, o HBV replica seu genoma por meio da transcrição reversa do RNA pré-genômico em DNA (BECK; NASSAL, 2007). Inicialmente, é sintetizada a fita de polaridade negativa. Paralelamente, a atividade da RNase H da polimerase viral degrada o molde de RNA. Com o término da polimerização da fita de polaridade negativa, inicia-se a síntese da fita de polaridade positiva, a qual não é formada completamente (BECK; NASSAL, 2007). Após a síntese das duas fitas de DNA, as partículas do *core* maduras são envolvidas pelas proteínas do envelope no retículo endoplasmático rugoso, seguindo depois através do complexo de Golgi, até a superfície da célula onde finalmente os virions são liberados da célula.

2.2.2 Distribuição dos genótipos e subgenótipos do HBV

Pela primeira vez, a variabilidade do HBV foi relatada por Le Bouvier (1971) que descreveu dois determinantes de subtipos mutuamente exclusivos, “d” e “y”. Estes compartilham um determinante de grupo comum, denominado “a”, que é um epítipo conformacional localizado no HBsAg. Existem ainda dois determinantes antigênicos adicionais mutuamente exclusivos descritos por Bancroft *et al.* (1972), o determinante “w” ou “r”, que determina que cada amostra do HBV poderia ser caracterizada como constituinte de quatro principais subtipos do HBsAg – adr, ayr, adw e ayw. Em um amplo estudo realizado por Courouc -Pauty *et al.* (1983), nove subtipos foram caracterizados: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adw2, adw4, ayr, adrq+ e adrq-, de acordo com os determinantes e subdeterminantes antigênicos do HBsAg (COUROUC -PAUTY; PLAN ON; SOULER, 1983).

Anticorpos contra o determinante “a” conferem proteção a todos os subtipos do HBV. Inicialmente, os subtipos do HBsAg foram utilizados em estudos epidemiológicos do HBV e, em alguns casos, para definir rotas nosocomiais de infeção (COUROUC -PAUTY; PLAN ON; SOULER, 1983).

Okamoto *et al.*, em 1988 sugeriram que a determinação dos subtipos poderia ser gradualmente substituída pela classificação do HBV em subgrupos genéticos. A comparação de seq ncias genômicas completas de amostras do HBV possibilitou a classificação das mesmas em dez grupos genéticos, denominados de A até J, com mais de 8% de divergência intergenotípica. Considerando a seq ncia nucleotídica do gene S e relacionando-a com a classificação de Okamoto *et al.* (1988), Norder *et al.* (1992) descreveram dois novos genótipos, E e F. Esses resultados foram confirmados em estudo posterior realizado por Uy *et al.* (1992). Em 1993, Naumann *et al.*, descreveram, no Brasil, uma amostra altamente divergente (15%) em relação   seq ncia genômica das demais, cujo subtipo era adw4 e foi classificado como genótipo F, sendo esse o mais divergente genótipo dentre os já relatados em humanos. Posteriormente, Stuyver *et al.* (2000) identificaram o genótipo G, encontrado em amostras de doadores de sangue provenientes da França e Estados Unidos da América. Mais recentemente, um novo genótipo do HBV, denominado genótipo H, foi descrito em isolados oriundos das Américas Central (Nicarágua) e do Norte (Califórnia) (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002). Os genótipos I e J têm sido encontrados em áreas do Viet m, Laos e Japão (PHUNG *et al.*, 2010; TATEMATSU *et al.*, 2009).

Os genótipos do HBV apresentam genomas de diferentes tamanhos. Os genótipos B, C, F e H possuem um genoma com 3215 nucleotídeos. Isolados pertencentes ao genótipo D apresentam uma deleção de 33 nucleotídeos na região pré-S1, resultando em um tamanho de 3182 nucleotídeos (GERLICH,1991). Os genótipos E e G possuem uma deleção de três nucleotídeos na mesma região da polimerase. Em comparação aos outros genótipos, isolados pertencentes ao genótipo G possuem o maior genoma devido a uma inserção de 36 nucleotídeos na região do gene do core (STUYVER *et al.*, 2000). O genótipo A difere-se dos outros por uma inserção de seis nucleotídeos na região terminal do gene da polimerase que sobrepõe a região do gene core (BARTHOLOMEUSZ; SCHAEFER, 2004).

Estudos conduzidos em diversas regiões geográficas demonstraram que alguns genótipos podiam ser subdivididos em subgenótipos. Dentre os isolados do genótipo A, cinco subgenótipos foram identificados (A1-A5) (McMAHON, 2009; CAO, 2009) que se encontram amplamente distribuídos na Europa, África e Américas. A clássica mutação pré-core localizada no nucleotídeo 1896 consistindo da substituição G-A que cria o stop códon não é encontrada neste genótipo (McMAHON, 2009).

Kramvis *et al.* (1997), Attia (1998) e Kew *et al.* (2005) sugeriram que esse subgenótipo esteja associado com níveis reduzidos do HBV DNA e baixa prevalência do HBeAg, bem como provável associação com carcinoma hepatocelular na África. O Genótipo A quando comparado com genótipo D, está relacionado a melhor resposta quando o tratamento é realizado com interferon alfa (CAO *et al.*, 2009).

O genótipo B apresenta oito subgenótipos. Infecção pelo subgenótipo B2 está associada com carcinoma hepatocelular e recorrência deste em pacientes jovens principalmente em pacientes não cirróticos da China e Taiwan (KAO *et al.*,2000). O subgenótipo B1 está frequentemente associado com hepatite B fulminante no Japão (KUSAKABE *et al.*, 2009).

Genótipo C pode ser subdividido em nove subgenótipos (CAO, 2009). O subgenótipo C1 é predominante na Tailândia e Vietnam, e o C2 encontrado no Japão, Coreia e China (HUY *et al.*, 2004). O subgenótipo C3 foi relatado nas ilhas do pacífico como a Micronésia, Melanésia e Polinésia (CHU *et al.*, 2003, MIYAKAWA; MIZOKAMI, 2003, SCHAEFER, 2005). Este genótipo tem sido amplamente associado com risco de progressão de doença hepática com altas taxas de HCC e aumento do risco de cirrose e HCC comparado com genótipo B (McMAHON, 2009). Também há uma soroconversão HBeAg mais tardia que os outros genótipos o que pode explicar a maior taxa de transmissão vertical nesta região. Genótipos B e C são típicos de descendentes asiáticos que moram no Brasil.

O Genótipo D é distribuído mais uniformemente pela Europa, Rússia, Ásia e região do mediterrâneo, incluído o sul da Europa e norte da África. Também é encontrado nos Estados Unidos e populações indígenas do Ártico e Alasca. Este genótipo pode ser subdividido em sete subgenótipos (CAO *et al.*, 2009) e tem sido associado com a conversão da forma de HBeAg para anti-HBe na adolescência. Estudos na Índia relataram que este genótipo estava mais associado com doença hepática severa e HCC em pessoas jovens que o genótipo A.

O genótipo E é encontrado no oeste da África e este tem como característica a baixa diversidade entre as amostras nesta região do mundo (MULDERS *et al.*, 2004). No Brasil foi detectado em paciente proveniente da África (SITNIK *et al.*, 2007). A associação com progressão da doença hepática não foi estudada.

O genótipo G é o mais incomum de todos os genótipos. Tem sido encontrado na França e Estados Unidos em poucos pacientes (STUYVER *et al.*, 2000). Este é quase que exclusivamente encontrado em pessoas coinfectadas com outros genótipos, geralmente genótipo A (KATO *et al.*, 2002). Este genótipo tem sido associado por alguns autores com a transmissão sexual entre homens (SANCHEZ *et al.*, 2007).

Os genótipos F e H são novos genótipos encontrados primariamente em populações indígenas da América do Norte e do Sul (DEVESA *et al.*, 2004). O genótipo F é dividido em quatro subtipos: F1-F4 (DEVESA *et al.*, 2008).

O genótipo H é encontrado na América Central, primeiramente no México e na Nicarágua (DEVESA; PUJOL, 2007). Ele também tem sido encontrado em imigrantes da região da Califórnia.

No Brasil, os genótipos mais encontrados são o A, D e F, embora na população de origem oriental predominem o B e o C (MELLO *et al.*, 2007).

2.2.3 Mutações no genoma do HBV

Devido às elevadas taxas de replicação viral e a presença da etapa de transcrição reversa em seu ciclo de replicação, erros espontâneos acontecem e mutantes do genoma viral emergem frequentemente. Cometem um erro a cada 10⁴ nucleotídeos copiados para RNA. Destituída de mecanismo de correção na leitura e transcrição do RNA em DNA, a transcrição reversa pode levar a uma alta heterogeneidade e variabilidade genômica, a exemplo do que ocorre com os retrovírus (WEBER, 2005).

A taxa de substituições *in vivo* que ocasiona o surgimento de isolados mutantes depende de fatores relativos ao hospedeiro (*clearance* imune) e ao HBV (características genômicas e replicativas), além de fatores exógenos como vacinas e antivirais que selecionam os *scape mutants* (LOCARNINI, 2004).

Diferentes mecanismos interferindo em nível de tradução ou pós-tradução, incluindo trocas conformacionais, inserção de resíduos básicos bem como mecanismos de redução da síntese ou secreção do HBsAg, podem influenciar isoladamente ou em conjunto, para geração de mutantes, tendo como consequência infecções imuno-silenciosas e/ou padrões sorológicos incomuns ou atípicos (CHIOU *et al.*, 1997; KREUTZ, 2002).

Entre as mutações, a deleção na região Pré-S é frequentemente encontrada em carreadores do HBV (GUNTHER *et al.*, 1999). A região Pré-S exibe a maior heterogeneidade dentre o genoma do HBV, podendo resultar em substituições de aminoácidos, como a troca da glicina pela arginina no códon 145 (G145R) (CARMAN *et al.*, 1990). Esta é a mutação mais frequentemente documentada em todo o mundo, ocasionando mudanças conformacionais que afetam a ligação dos anticorpos neutralizantes e que propicia a disseminação dessas variantes não detectadas pelos testes sorológicos habituais. Mutações dentro deste epítopo foram selecionadas durante a vacinação (CARMAN *et al.*, 1990) e após o tratamento com imunoglobulina de pacientes transplantados de fígado (CARMAN *et al.*, 1996). Além disso, a ausência de reconhecimento do HBsAg dessas variantes pelos anticorpos específicos pode interferir na resposta vacinal, ocorrendo, assim, infecção aguda independentemente da presença de anticorpos (anti-HBs) em níveis protetores e vantagens seletivas dos clones dessas variantes nos portadores crônicos em tratamento (LOCARNINI, 2004; WEBER, 2005). Esse mutante foi identificado a partir de um estudo realizado em Singapura (ZUCKERMAN *et al.*, 1994) onde das 345 crianças, nascidas de mães HBsAg e HBeAg positivas, que receberam imunoglobulina B específica e vacina contra HBV plasma-derivada, 41 foram infectadas com o agente a despeito da presença de anti-HBs. Este mutante tem sido isolado em várias partes do mundo, e não apenas a partir de indivíduos vacinados (CARMAN *et al.*, 1995). A mutação G145R apresenta-se extremamente estável e pode manter a sua habilidade de replicação em altos títulos por vários anos (CARMAN *et al.*, 1990), além de ser transmissível horizontalmente, a despeito da presença de altos títulos de anti-HBs circulante (OON *et al.*, 2000).

Ainda há vários relatos de mutações no gene S afetando resíduos de aminoácidos nas posições 120, 123, 127, 129, 133 e 144 do determinante 'a'. Dentre elas as mais relevantes têm demonstrado serem, além da G145R, as substituições nos resíduos 141 (K141E) e 131

(T131I) e, ainda, a inserção de três aminoácidos entre as posições 123 e 124, as quais podem levar à evasão do vírus à ação neutralizante dos anticorpos específicos e, ainda, reduzir a eficiência de sua detecção pelos ensaios usados no diagnóstico da infecção bem como na triagem sorológica de doadores de banco de sangue (SEDDIGH-TONEKABONI *et al.*, 2000).

Muitos estudos em Taiwan, China, Coreia e Japão indicam que deleção na região Pré-S está associada com progressão da doença hepática (UTAMA *et al.*, 2011). Mais recentemente foi relatado em crianças de Taiwan e outros países asiáticos, portadoras desta mutação, desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (ABE, 2009; HUANG, 2010).

Com relação às mutações que afetam a produção do HBe, observou-se que no curso típico da infecção pelo HBV, ou durante a terapia antiviral na infecção crônica pelo agente, a soroconversão de HBeAg para o anti-HBe é geralmente acompanhada por um decréscimo na replicação viral e remissão da doença hepática (GUNTHER *et al.*, 1999; TACKE *et al.*, 2004; HARRISON, 2006). Dentre alguns pacientes, por razões ainda desconhecidas, a pressão imune associada à soroconversão contribui para o surgimento de variantes virais que se caracterizam por não expressarem HBeAg ou o expressarem em baixos níveis, embora esses pacientes apresentem continuada replicação viral associada ao dano hepático (TACKE *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 2005).

Diversas mutações na região pré-core/core do genoma do HBV têm sido observadas em pacientes HBeAg negativos que apresentam viremia persistente, associadas ao agravamento da doença hepática com progressão para cirrose e HCC, além de elevada incidência de hepatite fulminante (CHU *et al.*, 2003; LOCARNINI, 2004; REZENDE *et al.*, 2005; TONG *et al.*, 2005; WEBER, 2005).

Durante a infecção crônica, dois tipos de variantes do gene C têm sido frequentemente relatados os quais afetam a expressão do HBeAg: mutações na região pré-core (PC) e as mutações na região do Promotor Basal do Core (PBC). A troca da guanina pela adenina no nucleotídeo 1896 na região pré-core, denominada por G1896A, alterando o códon 28 de UGG (TGG) para UAG (TAG), é a mutação mais frequentemente observada que resulta em um códon de terminação (stop-codon prematuro), com conseqüente ausência da síntese do HBeAg. O nucleotídeo guanina (G) na posição 1896 se parecia com o nucleotídeo citosina © na posição 1858 e está envolvido na formação da estrutura *steam-loop*, ϵ (*epsilon*), que é necessária para a estabilização do sinal de encapsidação do RNA pré-genômico no interior do nucleocapsídeo durante o ciclo de replicação viral. A mutação pré-core G1896A é freqüente em pacientes com genótipo D (TAGHAVI *et al.*, 2010).

A sequência de DNA que codifica a região ε é altamente conservada entre os diferentes genótipos. A estabilidade do *steam loop* depende da conservação dos nucleotídeos em algumas posições, como o T (U-1858 no RNA) na posição 1858 (cadeia ascendente do loop) que pareia com A na posição 1896 (cadeia descendente do loop). Caso exista C na posição 1858, esse nucleotídeo irá parear-se com G na posição 1896. O nucleotídeo C na posição 1858 é encontrado principalmente nos genótipos A e F, enquanto que nos genótipos B e E, encontra-se o nucleotídeo T na posição 1858. O nucleotídeo C-1858 é raramente encontrado nos genótipos C e D. Mutações que desestruturam o pareamento das bases podem ocasionar replicações menos eficientes ou a produção de partículas virais não infecciosas (KIDD-LJUNGGREN *et al.*, 2002).

A segunda mutação mais comum é a dupla substituição no promotor do core (A1762T e G1764A), encontrada em experimentos de transfecção que regulam a produção do RNA pré-genômico, resultando na redução do nível de proteínas codificadas (CHU *et al.*, 2003).

Tem sido postulado que o HBeAg induz uma tolerância imune contra ele próprio ou ao HBcAg, ou mesmo para ambos os antígenos. Como o HBeAg compartilha alguns epítomos com o antígeno do core, sua ausência ou presença em concentrações reduzidas na circulação, faz com que o HBcAg seja alvo direto do sistema imune humoral e celular, levando à necrose dos hepatócitos e dano hepático (KRAMVIS; KEW, 1999), o que sugere uma relação próxima entre mutação no promotor basal do core e avanço da doença hepática, com o aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (YOTSUYANAGI *et al.*, 2002).

Outras mutações têm sido descritas na literatura, tais como, A1762T/ G1764A ou A1766G/A1768G, observadas a partir de indivíduos acometidos por hepatite fulminante (KRAMVIS; KEW, 1999), bem como deleções de nt nas posições 1763-1770 ou 1746-1757, envolvendo portadores crônicos assintomáticos (SALLAM; TONG, 2002).

O significado clínico e virológico das mutações na região do pré-core/core são ainda pouco compreendidas. Muitos estudos têm mostrado a associação entre estas mutações e maior dano hepático e carcinoma hepatocelular (KAO *et al.*, 2003).

Mutações no domínio catalítico da região da Polimerase do genoma do HBV, em particular Met-550-Ile ou Met-550-Val no motivo conservado Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD), comprometem a atividade da transcriptase reversa. Essa mutação tem sido associada à perda da atividade inibitória da lamivudina, geralmente efetiva na supressão da replicação viral, levando ao aparecimento de amostras resistentes a essa droga antiviral após longo período de tratamento (YILDIZ *et al.*, 2011) aproximadamente 70% após 48 meses de uso desta medicação (LAI *et al.*, 2003). Fatores que aumentam o risco de mutação de resistência

incluem HBV DNA elevado, níveis de alanino aminotransferase e supressão incompleta da replicação viral (LAI *et al.*, 2003). Resistência a lamivudina pode levar a resistência cruzada com telbivudina e resistência cruzada parcial ao entecavir, mas não ao tenofovir. Resistência cruzada ao adefovir deve ser observada dependendo do perfil da mutação (LOCARNINI; ZOULIM, 2010).

O aparecimento desta mutação também pode ocorrer de forma espontânea em pacientes que não fizeram uso previo da lamivudina e o valor da carga viral pode ser o fator determinante (TAN *et al.*, 2012). Mutações caracterizadas pela substituição de arginina por glicina na posição 145 (G145R) e 120 (P120T) codificam concomitantemente trocas rtR/W153Q e rtT128N a nível do gene pol, respectivamente (TORRESI *et al.*, 2002). Essas mutações têm sido descritas em pacientes que se encontram sob tratamento com lamivudina (LMV) e imunoglobulina B hiperimune (HBIG) (LOCARNINI; MCMILLAN; BARTHOLOMEUSZ, 2003), as quais restauram a capacidade replicativa do mutante LMV HBV resistente (TORRESI *et al.*, 2002).

Mutantes na região X podem também envolver elementos regulatórios que controlam a replicação viral, como o promotor basal do core e o enhancer III. Tais deleções regulam negativamente o promotor pré-core, impedindo, assim, a síntese de proteínas virais e podem estar associadas com hepatite B fulminante (LOCARNINI, 2004, LOCARNINI; ZOULIM, 2010).

Uma entidade clínica reconhecida como infecção sorologicamente silenciosa tem sido amplamente associada à presença de HBV mutantes do ORF-X do HBV. Alguns destes têm sido caracterizados pela deleção de 8-nt a nível desse gene o que cria um códon de finalização precoce na porção C-terminal da proteína. Essa deleção leva a produção de uma proteína x ‘truncada’ composta por 135 aa, destituída da atividade transativadora da replicação viral (KREUTZ, 2002), o que resulta na supressão da replicação e expressão do DNA com consequente ausência de marcadores sorológicos clássicos (UCHIDA *et al.*, 1994, FUKUDA *et al.*, 1996).

2.3 Aspectos clínicos

O curso natural da infecção pelo HBV inclui cinco fases distintas baseadas na interação vírus-hospedeiro: tolerância imunológica, imune ativa, inativa, crônica HBeAg negativa, clareamento do HBsAg, além da infecção oculta (ZHUANG, 2012).

A fase de imunotolerância é caracterizada pela presença do antígeno HBsAg e do HBeAg. Níveis séricos elevados de HBV-DNA são detectados no soro e valores normais ou minimamente elevados de alanina aminotransferase (ALT). A biópsia hepática mostra fígado de aspecto normal ou apenas com o mínimo de atividade inflamatória. Esta fase pode persistir por 10 a 30 anos em indivíduos infectados no período perinatal, porém pode ser curta ou ausente nos indivíduos que adquiriram na fase adulta. Neste período a taxa de perda espontânea do HBeAg é muito baixa e em virtude dos altos valores de viremia a contagiosidade é muito alta (ZHUANG, 2012).

A fase imunoativa é caracterizada pela positividade do HBeAg. A tolerância imunológica é perdida e o sistema imune desencadeia mecanismos para eliminar as células hepáticas acometidas pelas partículas virais. Esta fase tem o curso flutuante com variações nos níveis de HBV DNA, elevação de ALT, e necroinflamação hepática. Os níveis de HBV DNA são maiores que 20 UI/mL (105 cópias/mL) na fase de HBeAg positivo podendo permanecer elevada ou cair na fase de negatificação do HBeAg. Esta fase ocorre depois de vários anos de tolerância imunológica e é a mais frequentemente alcançada em pacientes que contraíram a doença na idade adulta após a fase de maturação imunológica. Esta termina com a perda do HBeAg.

A fase de portador inativo do vírus caracteriza-se pela negatificação do HBeAg, baixos níveis de HBV DNA (menor que 2.000 UI/mL) ou indetectabilidade deste, ALT normal, e histologia hepática inativa. Antes de classificarmos o paciente como carreador inativo, devemos fazer o controle dos níveis de ALT e HBV DNA pelo menos a cada 3-4 meses.

Na fase de reativação, o HBeAg anteriormente negativo volta a positivar. Os valores de HBV DNA aumentam permanecendo entre 2.000 e 20.000 UI/mL, ALT torna-se elevada e ocorre necroinflamação hepática moderada ou grave com variáveis estágios de fibrose. Esta fase geralmente ocorre na vigência de imunossupressão do hospedeiro em virtude de uso de quimioterapia, uso de imunossupressores ou por mutações virais permitindo assim o escape à vigilância imunológica do hospedeiro. Em vigência de mutação pré-core e/ ou core-promoter que decorre da substituição de nucleotídeos nessas regiões, ocorre incapacidade de expressão do HBeAg ou mesmo a sua expressão em níveis muito baixos. Nestes casos mesmo na vigência de replicação viral o HBeAg é negativo (McMAHON, 2010).

Após estes estágios pode ocorrer a perda do HBsAg com a persistência do HBV DNA em níveis baixos, caracterizando a chamada hepatite oculta. O dano histológico desta fase pode ser consequência das injúrias hepáticas sofridas anteriormente. A imunossupressão pode levar a um quadro de reativação das fases anteriores inclusive com reativação do HBeAg.

O carreador “saudável” é aquele paciente que apresenta o HBsAg por mais de seis meses com valores de enzimas hepáticas normais. Eles são negativos para o HBeAg e são associados com baixo ou indetectável nível de HBV DNA. O risco de progressão para cirrose e hepatocarcinoma é baixo (TORBENSON; THOMAS, 2002).

A persistência do HBsAg detectável por seis meses ou mais é definida como hepatite B crônica. Estes pacientes têm variações no valor das enzimas hepáticas e dos níveis do HBV DNA. Em alguns pacientes o HBeAg é indetectável apesar da persistente replicação do vírus (OCANA *et al.*, 2011). Isto deve ocorrer em virtude de mutação que evita a expressão da proteína “e”. Esta mutação está localizada na região promotora do núcleo basal (A1762T e G1764A) e na região pre-core (G1896A) (QIN *et al.*, 2009).

O clareamento viral do HBsAg pode acontecer durante o curso da doença crônica de forma espontânea, sendo este de probabilidade crescente. A taxa de clareamento relatada por Chu *et al.* (2007) foi de 8,1% nos primeiros 10 anos de acompanhamento, com aumento para 24,9% depois de 20 anos e 44,7% após 25 anos de infecção pelo HBV.

2.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da infecção pelo HBV se baseia em vários critérios laboratoriais como a detecção de marcadores sorológicos e moleculares. Também o acompanhamento do curso clínico da infecção e monitoramento desta é baseado nos ensaios sorológicos como o ensaio imunenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos e antígenos específicos do HBV, além de testes imunohistoquímicos e nos ensaios moleculares que detectam qualitativa e/ou quantitativamente o HBV-DNA (PAWLOTSKY, 2003).

Cerca de 4 semanas após exposição surge o HBsAg que é o primeiro marcador sorológico a aparecer no paciente infectado pelo vírus B. Concomitantemente, HBeAg, HBV-DNA e DNA polimerase já podem ser detectados. Este é o período de alta infecciosidade devido à concentração elevada de virions no sangue. Com o desaparecimento do HBsAg surge o anticorpo anti-HBs, caracterizando assim o fim da fase aguda da infecção e início da fase de convalescença. O anti-HBs é marcador de imunidade ou recuperação da infecção pelo HBV e da imunidade conferida pela vacinação (LIANG, 2009).

Nos hepatócitos infectados, podemos detectar o antígeno HBc, que é um potente imunógeno, e estimula uma efetiva resposta humoral com produção de anti-HBc IgM durante o curso da infecção aguda. Este é o único marcador que define a etiologia da infecção como hepatite B aguda e é o primeiro anticorpo a ser detectado. A fração IgM também pode ter

períodos de elevação nos quadros de agudização (*Flare*) de quadros crônicos HBeAg positivos. Durante a fase de convalescença, os títulos de anti-HBc IgM diminuem enquanto os títulos de anti-HBc IgG aumentam, permanecendo detectáveis por toda a vida (HOLLINGER, 2008). O anticorpo total contra o nucleocapsídeo da hepatite B (anti-HBc total) é o principal marcador para estudo da prevalência da infecção causada pelo HBV.

O marcador anti-HBc total persiste juntamente com anti-HBs em pacientes com quadros de infecção passada com conseqüente imunidade ao HBV. O anti-HBc pode ser detectado isoladamente.

A definição de hepatite B crônica é referida pela persistência do HBsAg por um período superior a seis meses. Pode estar associada à detecção do HBV DNA e do marcador HBeAg (em indivíduos que não apresentam mutações que impeçam a expressão dessa proteína), risco de transmissão viral e presença de processo hepático inflamatório, podendo evoluir para cirrose e HCC (HADZIYANNIS; VASSILOPOULOS, 2001, LOK; McMAHON, 2001).

O HBeAg é um marcador encontrado no soro de indivíduos com infecção aguda ou crônica, indicando títulos elevados do HBV-DNA e infecciosidade. O desaparecimento do HBeAg e o surgimento do anti-HBe sugere diminuição ou ausência da replicação viral (HADZIYANNIS; VASSILOPOULOS, 2001).

Os métodos bioquímicos realizados para a avaliação da função hepática são a dosagem de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transpeptidase (γ -GT), bilirrubinas, dentre outros. Níveis séricos elevados de ALT estão relacionados com a gravidade da hepatite B crônica. Aumento nos níveis de γ -GT, queda na concentração da albumina, hiperbilirrubinemia ou tempo de protrombina prolongado indicam avanço no estado de dano hepático. Na cirrose hepática os níveis de AST excedem os níveis de ALT.

As técnicas de detecção molecular do HBV DNA nas formas qualitativa e quantitativa têm sido utilizadas na confirmação da viremia pelo HBV, determinação da carga viral, monitoramento da atividade replicativa do vírus, progressão da doença hepática e resposta ao tratamento antiviral em pacientes cronicamente infectados (BADUR; AKGUN, 2001).

Os princípios das técnicas moleculares utilizadas para detecção e quantificação do HBV-DNA no sangue (soro) baseiam-se no sinal de amplificação seguido de hibridização molecular (incluindo os métodos de captura híbrida e *branched* DNA) ou métodos de amplificação do HBV-DNA (incluindo reação de cadeia da polimerase - PCR ou transcrição mediada por amplificação - TMA) (PAWLOTSKY, 2003).

2.5 Tratamento

O primeiro antiviral via oral aprovado para tratamento da hepatite B foi a lamivudina em 1998. Após este, outras drogas foram liberadas para uso e controle da doença. Atualmente as terapias aprovadas incluem interferon alfa, interferon peguilado (peg-alfa 2a), e cinco nucleosídeos/nucleotídeos análogos: lamivudina, adefovir, entecavir, telbivudina e tenofovir (ZHUANG, 2012).

Diversas estratégias de tratamento têm sido propostas pelos consensos mundiais levando-se em consideração o perfil de cada doente e as variabilidades virais. Outras formas de decisão incluem o tempo de uso de cada droga e a barreira genética das mesmas (GADANO *et al.*, 2011).

O tratamento não está indicado para todas as fases da hepatite viral B, ficando restrito aos casos onde ocorre dano hepático. Esta avaliação geralmente está relacionada a três critérios: níveis de HBV DNA no soro, valores de ALT e severidade da doença hepática evidenciada pela biópsia (ZHUANG, 2012).

O objetivo do tratamento é aumentar a qualidade de vida e sobrevida do paciente prevenindo a progressão da doença para cirrose e a descompensação dos quadros já instalados, além de evitar o aparecimento do hepatocarcinoma e a morte (BRUNETTO; BONINO, 2004). Isto deve ser conseguido com a supressão da replicação viral. O ideal é a perda do HBsAg e soroconversão para anti-HBs, mas outras metas do tratamento como a soroconversão do HBeAg nos casos onde este é positivo, a indetectabilidade do HBV DNA por técnicas de PCR e a normalização dos níveis de ALT.

Os diversos consensos existentes para tratamento da hepatite B crônica não indicam tratamento na fase de imunotolerante e na fase de portador inativo. Nestas o valor da ALT geralmente é normal.

No protocolo brasileiro (BRASIL, 2011), pacientes com HBeAg positivo com ALT elevada está indicado o tratamento mesmo sem a necessidade de quantificação do HBV DNA. A biópsia deve ser indicada nos casos de ALT normal, se o paciente for do sexo masculino e maior que 40 anos. A indicação do tratamento deverá ser realizada para aqueles que tiverem atividade inflamatória ou fibrose maior ou igual a 2. A indicação nestas situações será de interferon por 16 a 24 semanas.

No consenso da sociedade européia (EASL, 2012), nos casos HBeAg positivo com ALT elevada o tratamento está indicado sem a necessidade de biópsia hepática. Naqueles com

ALT normal e HBV DNA elevado se maior que 30 anos e ou história familiar de CHC ou cirrose está indicado a realização de biópsia e tratamento de acordo com o resultado.

No consenso americano (AASLD, 2009), nos casos de HBeAg positivo com HBV DNA maior que 20.000 cópias e ALT normal, esta enzima deverá ser monitorada a cada 3 a 6 meses e a biópsia está indicada se esta aumentar entre 1-2 vezes o limite superior de normalidade e se o paciente tiver idade superior a 40 anos. Nos casos de ALT maior que 2 vezes o limite superior o tratamento está indicado.

Nos casos de HBeAg negativo no protocolo brasileiro (BRASIL, 2011) acima de 2000 cópias está indicado tratamento por tempo indefinido com tenofovir e nos casos onde houver contra-indicação ao uso desta medicação deverá ser prescrito entecavir.

Nos consensos europeu (EASL, 2012) e americano (AASLD, 2009) os casos HBeAg negativos com aumento de ALT e de HBV DNA o tratamento está indicado.

A infecção crônica pelo HBV não pode ser completamente erradicada devido a persistência do DNA circular (ccc-DNA) no núcleo de hepatócitos infectados onde pode ocorrer a reativação. Esta incorporação no núcleo celular também pode favorecer a oncogênese e o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular sem a necessidade do aparecimento do estágio de cirrose (ZHUANG, 2012).

O interferon é uma citocina com propriedades imunomodulatórias, imunoproliferativas e antivirais (HARIA; BENFIELD, 1995). A taxa de eficácia do tratamento com interferon alfa é de somente 15% - 41% (KAO *et al.*, 2000) e o uso desta medicação causa diversos efeitos colaterais (JANSSEN *et al.*, 1990). Os eventos adversos associados ao uso de interferon alfa peguilado são similares aos observados no uso de interferon alfa.

A relevância clínica dos genótipos não está completamente estabelecida até o momento e poucos estudos têm sugerido influência dos genótipos e subgenótipos na clínica, prognóstico e resposta ao tratamento (CAO, 2009).

O uso do Interferon em pacientes com genótipo B apresenta melhor resposta que em pacientes com genótipos C, D e naqueles que apresentam genótipos mistos (MA *et al.*, 2007). O uso de interferon alfa peguilado apresenta um melhor valor preditor de resposta com alta possibilidade de perda de HBeAg e HBsAg em pacientes com genótipos A (47% e 14%) e B (44% e 9%) comparados com genótipos C (28% e 3%) e D (25% e 2%) (FLINK *et al.*, 2006).

A maior limitação do uso de análogos de nucleosídeo e nucleotídeo no tratamento da hepatite B crônica encontra-se na emergência de cepas mutantes que podem levar a uma exacerbação do quadro (VAN BOMMEL *et al.*, 2010).

A lamivudina é um análogo de nucleosídeo inibidor da enzima transcriptase reversa. Esta é uma medicação barata, bem tolerada e efetiva. O uso prolongado induz a emergência de cepas mutantes lamivudina resistente, sendo esta de 15% no primeiro ano, e 50% após 3 anos de uso da mesma (MOSKOVITZ *et al.*, 2005). A principal mutação é a YMDD e suas variantes como a YIDD e a YVDD (MOSKOVITZ *et al.*, 2005). A emergência desta mutação está associada com aumento do HBV DNA e níveis de ALT, além do agravamento da histologia hepática (RIZZETTO *et al.*, 2005). O aparecimento de mutação YMDD não está associado com o genótipo do HBV (AKUTA *et al.*, 2003).

Outros antivirais como o adefovir, entecavir e tenofovir tem sido utilizados com sucesso no tratamento da hepatite B crônica. O uso de entecavir em pacientes que já apresentam resistência a lamivudina tem demonstrado o surgimento de cepas resistentes também a esta medicação (NAGASAKI *et al.*, 2007).

O tenofovir tem demonstrado alta atividade antiviral e eficácia em pacientes virgens de tratamento e também naqueles já resistentes a outros tratamentos (VAN BOMMEL *et al.*, 2010).

2.6 Epidemiologia da infecção pelo HBV

A infecção pelo vírus da hepatite B tem distribuição global. O homem é o único reservatório. A hepatite B é uma das doenças infecciosas mais comuns e já infectou dois bilhões de pessoas em todo o mundo, incluindo cerca de 400 milhões de casos de infectados cronicamente (LOK; McMAHON, 2007; EASL, 2012).

A prevalência da infecção na população geral varia em diferentes regiões do mundo. O Brasil é um país de grandes extensões e é considerado como uma área de baixa prevalência para a infecção pelo vírus da hepatite B (NASCIMENTO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2009). No entanto, bolsões de alta prevalência de HBV foram relatados na Amazônia (BRAGA *et al.*, 2012), Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo (SOUTO, 1999) e comunidade afro-descendente de Mato Grosso do Sul (MOTTA-CASTRO *et al.*, 2003).

A hepatite B continua a ser a mais freqüente infecção transmitida por transfusão sanguínea (CANDOTTI *et al.*, 2011, GUTIÉRREZ-GARCÍA *et al.*, 2011). Nos países não endêmicos o risco de infecção transfusional pelo vírus da hepatite B varia de 1 em 282.000 a 1 em 357.000 (DWYRE *et al.*, 2011). No Brasil, entre os doadores de sangue, a prevalência varia de 0,3% a 1,5% para HBsAg e de 3,7% a 11,1% para anti-HBc (NASCIMENTO *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2011; ANJOS *et al.*, 2011).

A hepatite B é transmitida principalmente através de exposição percutânea ou de mucosas aos fluidos corporais ou a sangue contaminado. De acordo com os fluidos corpóreos a concentração de vírus é variável. As maiores concentrações são verificadas no sangue e secreções serosas, diminuindo consideravelmente no sêmen, fluido vaginal e saliva (MAHONEY, 1999).

A exposição parenteral é associada com a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). As transfusões de sangue têm o risco de transmitir infecções como hepatite B e C. Para diminuir a sua gravidade, a Organização Mundial de Saúde recomenda exames de sangue pré-transfusional. O risco de infecção residual a partir de vírus da hepatite B (HBV) é maior do que vírus da hepatite C (HCV) em área não-endêmica (KWON; LEE, 2011).

Com a introdução da testagem do HBsAg nas rotinas dos bancos de sangue na década de 70 o risco de transmissão tem diminuído. Entretanto a transmissão do HBV por componentes de sangue negativos para HBsAg ainda ocorre em virtude de existência de infecção oculta pelo vírus da hepatite B (NIEDERHAUSER *et al.*, 2008). Nesta teremos a presença de HBV DNA na ausência de HBsAg.

No Brasil (Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004 – ANVISA), bem como em alguns países desenvolvidos como os Estados Unidos, França e Japão, as amostras de doadores de sangue são submetidas ao rastreamento para os marcadores HBsAg e anti-HBc (PEREIRA, 2003). Essa estratégia minimizou a possibilidade de transmissão do vírus da hepatite B via transfusão sanguínea, com a rara exceção daquelas doações efetuadas durante o período que antecede a expressão do HBsAg, ou seja, na fase de pré-antigenemia (BODHIPHALA *et al.*, 1999).

Em 1971, o teste para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) foi introduzido para a triagem de doadores de sangue, e depois de 1986, o teste para anticorpos para o antígeno do núcleo B (anti-HBc) foi implementado para reduzir ainda mais o risco de transmissão de doenças nas doações (SILVEIRA *et al.*, 2011).

Apesar das limitações inerentes ao diagnóstico para detecção do HBsAg (ZERVOU *et al.*, 2001) adotados na triagem sorológica de doadores, esse risco na maioria das vezes está associado a doadores soronegativos para HBsAg, mas que se encontram no período de janela imunológica de uma infecção recente (BODHIPHALA *et al.*, 1999). Há, também a situação dos portadores crônicos do HBV, com níveis indetectáveis de HBsAg (CHEMIN *et al.*, 2001) ou, ainda, aqueles indivíduos infectados com formas mutantes do HBV (FUKUDA *et al.*, 1996; JONGERIUS *et al.*, 1998).

Alguns estudos têm estabelecido o risco de hepatite B pós-transfusional em receptores de sangue proveniente de doadores HBsAg negativo e anti-HBc positivo (LARSEN; HETLAND; SKAUG, 1990; ALLAIN *et al.*, 1999), e na totalidade destes casos, o risco de transmissão está associado à presença do genoma do HBV, em amostras anti-HBc positivas (ALLAIN, 2004).

2.7 HBV e HIV

A história natural da Hepatite B é modificada pela associação com a infecção pelo vírus do HIV. Estas duas viroses compartilham as mesmas rotas de transmissão (SORIANO *et al.*, 2010).

A prevalência mundial de coinfeção varia de 5 a 10 % (THIO, 2009), nos estudos brasileiros as taxas de prevalência podem variar de 1.6% a 8.5% (MENDES-CORREA *et al.*, 2000; MONTEIRO *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2004; TOVO *et al.*, 2006; ZAGO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2001; PORTELINHA FILHO *et al.*, 2009).

A infecção pelo HIV tem um impacto negativo em todas as fases da história natural da hepatite B, levando a progressão mais rápida da doença hepática para fibrose, maiores níveis de HBV DNA, e baixa perda do HBsAg (PUOTI *et al.*, 2006; KONOPNICKI *et al.*, 2005) além do aumento do risco de carcinoma hepatocelular em pacientes com baixos níveis de células CD4 (PUOTI *et al.*, 2006; KONOPNICKI *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2011). É importante ressaltar que a hepatite B crônica não interfere na progressão da Aids (KONOPNICKI *et al.*, 2005), mas o inverso é verdadeiro.

Há necessidade de mais estudos para determinar qual o tratamento ideal para esta população, sendo que os dados de pessoas monoinfectados pelo HBV são muitas vezes extrapolados para a população de coinfectados HIV-HBV.

As recomendações de tratamento antirretroviral em pacientes coinfectados com HIV e HBV seguem as mesmas recomendações dos pacientes HIV negativos, *status* do HBeAg, valor do HBV-DNA, níveis de ALT e histologia hepática (EASL, 2009). Existe recomendação para uso de medicamentos que possuem ação antiviral contra ambos os vírus HIV e HBV. O uso de tenofovir associado a entricitabina mais uma terceira droga anti-HIV é o preconizado pela sociedade Européia de estudo do fígado (EASL). No Brasil a recomendação é o uso de tenofovir com lamivudina, associados a outro medicamento de ação exclusiva anti-HIV (BRASIL, 2011). Em alguns pacientes que ainda não apresentam indicação de tratamento anti-HIV, a hepatite B deve ser tratada inicialmente com a

preferência de uso de adefovir e telbivudina que não possuem atividade anti-HIV. O uso da lamivudina, entecavir e tenofovir é contra-indicado como droga única no tratamento da hepatite B em pacientes coinfectados devido sua baixa barreira genética e risco de resistência (EASL, 2009).

A reativação da infecção pelo HBV após a retirada do esquema HAART pode ocorrer apesar desta ser rara (BLOQUEL *et al.*, 2010).

2.8 Infecção oculta pelo vírus da hepatite B

Muitos aspectos da infecção oculta pelo vírus da hepatite B são ainda pouco conhecidos, no entanto, essa condição possui grande significado para a saúde pública em virtude do risco de transmissão.

Vários autores tentaram definir infecção oculta pelo vírus da hepatite B. Em 2008 Nevertheless, endossado pela Associação para Estudo do Fígado (EASL), e pelo consenso da conferência de Taormina (Itália) ocorrido no mesmo ano, definiu infecção oculta pelo vírus da hepatite B como a presença do DNA do vírus no tecido hepático (com ou sem detectabilidade no soro), sem presença de antígeno de superfície (HBsAg), pelos ensaios disponíveis. Esse consenso também definiu o valor de cutoff para a detecção do HBV DNA em menor que 200 UI/mL, ou seja, uma concentração de HBV DNA maior que 200 UI/mL deve ser interpretada como uma infecção por escape de cepas mutantes e não como infecção oculta (OCANA *et al.*, 2011; ROMERO *et al.*, 2011).

A maioria dos casos de hepatite B oculta é secundária a infecção aguda auto-limitada (BLACKBERG; KIDD-LJUNGGREN, 2000), o que sugere ausência de completa eliminação viral após a resolução de uma infecção aguda e manutenção de um nível de viremia baixo, reprimido pela resposta imune (HOLLINGER, 2008). Os pacientes que se recuperam da infecção aguda podem carrear genoma do HBV por anos sem apresentar qualquer evidência clínica ou laboratorial (MICHALAK *et al.*, 1994) com risco de transmissão para outras pessoas.

Existem outras situações onde ocorre a persistência do genoma viral no núcleo dos hepatócitos (HUO *et al.*, 1998; TORBENSON; THOMAS, 2002) após eliminação espontânea de uma infecção crônica (LORIOT *et al.*, 1997; HUO *et al.*, 1998), ou, ainda, em uma infecção crônica submetida ao tratamento bem sucedido (LARRUBIA, 2011).

Vários possíveis mecanismos têm sido citados como responsáveis pela patogênese da hepatite B oculta, o que sugere um caráter multifatorial. Há fatores relacionados ao

hospedeiro e ao vírus, importantes na supressão da replicação viral e manutenção da infecção sob controle (HOLLINGER; SOOD, 2010; LARRUBIA, 2011).

Podemos relatar fatores relacionados ao hospedeiro como a tolerância imunológica e a imunossupressão. Os fatores relacionados ao agente são a expressão de proteínas anômalas e as mutações em regiões genômicas codificantes (CANDOTTI; ALLAIN, 2009; LARRUBIA 2011).

A base molecular da infecção oculta está relacionada com o ciclo de vida do HBV. Um passo essencial é a produção de um DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) que persiste no núcleo da célula como um episomo e serve como um modelo para transcrição do gene. A persistência e estabilidade em longo prazo de moléculas cccDNA virais em conjunto com o tempo de meia vida dos hepatócitos implica que a infecção pelo HBV, uma vez que tenha ocorrido, pode eventualmente persistir (ZOULIM, 2005).

Em muitos casos, a infecção oculta tem sido descrita em indivíduos com evidências sorológicas de exposição prévia ao HBV (anti-HBc total e anti-HBs positivos ou anti-HBc isolado) e também em indivíduos soronegativos para todos os marcadores virais (BRÉCHOT *et al.*, 2001).

Em todos os casos, é recomendado o uso de um teste altamente sensível e específico, como o teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAT), ou seja, a técnica de PCR, com limites de detecção de <10 cópias de DNA de HBV por reação (RAIMONDO *et al.*, 2008).

Nessa condição fisiopatológica, os níveis de DNA no soro desses pacientes permanecem abaixo de 104 genomas por mL de soro (menor 200 UI/mL), em uma situação em que o HBsAg não mais poderia ser detectado, também já na ausência do HBeAg. Nesse contexto, a ausência de marcadores sorológicos do HBV não exclui a presença no soro de DNA e de partículas virais infecciosas, com elevado potencial de transmissão (BRÉCHOT *et al.*, 2001). Dessa forma, a hepatite oculta, é reconhecida por duas principais características: ausência do HBsAg e baixa replicação viral do HBV (SAID, 2011). A melhor identificação nos últimos anos tem ocorrido em virtude da alta sensibilidade das técnicas de biologia molecular (RAIMONDO *et al.*, 2008).

O padrão sorológico da hepatite B oculta pode apresentar-se de formas diferenciadas. Após a resolução da hepatite B e depois de poucos meses como carreador, o HBsAg não é mais detectado caracterizando o padrão sorológico anti-HBc e/ou anti-HBs positivo. No padrão com anti-HBc e anti-HBs negativos, os valores de HBV DNA são baixos (LLEDO *et al.*, 2011).

A análise de DNA extraído de fragmento hepático seria o método metodologicamente mais correto para diagnóstico de infecção oculta, mas pouco viável de ser realizado na rotina. Além disso, ensaios padronizados e válidos para detecção do HBV DNA em tecido hepático não estão aprovados pelo FDA (RAIMONDO *et al.*, 2008).

Há casos caracterizados como “falsa” hepatite oculta. Os vírus detectados nesses casos são carreadores de mutação no HBsAg (na região S) que não são reconhecidos por algumas detecções de rotina (RAIMONDO *et al.*, 2008).

Infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) está fortemente associada com hepatite B oculta com HBV DNA detectável em cerca de 30% e 50% nas biópsias hepáticas (LOK; McMAHON, 2007; DE LA FUENTE, 2011) e, além disso, tem sido mostrado que as proteínas do core do HCV são capazes de inibir *in vitro* a replicação do HBV por meio da regulação da transcrição (LARRUBIA, 2011). A coinfeção com o vírus da hepatite C regula negativamente a replicação viral do HBV (DE LA FUENTE *et al.*, 2011).

A maioria dos portadores da hepatite B oculta é assintomática e são descobertos através de investigação laboratorial. A importância clínica dessa condição para os portadores saudáveis está relacionada à transmissão e ao prognóstico (ROMERO *et al.*, 2011).

Embora o significado clínico da hepatite B oculta permaneça incerto os dados mais recentes sugerem o papel importante da reativação da doença em pacientes submetidos à imunossupressão com potentes drogas imunossupressoras, como o rituximabe (anti-CD20), alemtuzumab (anti-CD52) ou infliximabe (anti-fator de necrose tumoral) ou portadores de doenças imunossuprimíveis como o caso do vírus HIV (ROMERO *et al.*, 2011; ALAVIAN *et al.*, 2012).

É desconhecido o mecanismo que parece suprimir a replicação e a expressão do HBV juntamente com a incapacidade do sistema imune de facilitar o completo clearance viral. Parece que qualquer condição que leve a uma imunodeficiência como a Aids ou quimioterapia pode levar a reativação e replicação viral para uma forma ativa ou fulminante (ROMERO *et al.*, 2011; ALAVIAN *et al.*, 2012).

A reativação funcional do HBV eventualmente leva a sistemática resposta imune de células T de memória contra hepatócitos infectados que progridem para inflamação hepática e hepatite viral. Após o restabelecimento do sistema imunológico depois de terminar o tratamento imunossupressor é possível que a hepatite aguda possa ocorrer, sendo importante em doenças malignas hematopoiéticas, hematológicas, transplante de células tronco e de órgãos (RAIMONDO *et al.*, 2008; LARRUBIA, 2011).

Em algumas situações, a investigação para hepatite B oculta deveria ser realizada de rotina como: pacientes infectados pelo vírus da hepatite C com elevadas taxas de replicação viral e dano hepático (KANNANGAI *et al.*, 2007), paciente submetido a tratamento imunossupressor para várias condições clínicas, triagem de doação de sangue, pacientes com doenças hepáticas sem diagnóstico, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SAID, 2011).

Todos os portadores do HBV mesmo na forma oculta estão predispostos a transmitir o HBV via transfusão sanguínea ou de transplante de órgãos.

Acredita-se que o risco seja insignificante quando o anti-HBs está presente (valor maior que 10 UI) mesmo em níveis baixos (ALLAIN, 2004; SATAKE *et al.*, 2007).

Atualmente, a hepatite oculta é a principal causa de hepatite B pós-transfusional nos países ocidentais (REGAN *et al.*, 2000) e em países como a Índia e Taiwan, onde a incidência deste problema é considerável.

O risco é elevado, mas ele não é de 100% e existem várias teorias para explicar o porquê nem todos os receptores de material biológico HBV-DNA-positivo contraem a doença: (1) a vacinação prévia ou a doença prévia em receptores pode induzir imunidade ao HBV, (2) a infusão concomitante de anti-HBs em outro componente de sangue, (3) a presença de complexos imunes, (4) dose mínima infecciosa de HBV, (5) a presença de partículas virais defeituosas ou incompetentes para replicação, e (6) a interferência viral a partir de um outro agente patogênico (HCV) (HOLLINGER; SOOD, 2010).

Atualmente em virtude da melhoria das técnicas laboratoriais diagnósticas, infecção pós-transfusão tem diminuído.

Após o transplante de órgãos de pacientes com anti-HBc positivo, pode ocorrer a transmissão da infecção pelo HBV. Principalmente naqueles receptores que são negativos para todos os marcadores de HBV. Cholongitas *et al.* (2010) revisaram 39 estudos que incluíam 903 transplantes de doadores anti-HBc positivos. A infecção pelo HBV foi desenvolvida por 19% dos receptores de órgãos, mas foi menos frequente nos receptores de órgãos de doadores anti-HBc e anti-HBs positivos.

O risco é particularmente aumentado nos transplantes de fígado, mas é menor quando se tratam de rim, coração e medula óssea (DICKSON *et al.*, 1997; STRASSER; McDONALD, 1999).

A hepatite B oculta é inócua por si só. O manejo desta de uma maneira geral deve ser realizado em situações de imunocompetência, principalmente quando outras causas importantes de doença hepática estão presentes. O dano hepático leve produzido pelo vírus

oculto pode contribuir para piorar o curso da doença já anteriormente estabelecida (LLEDO *et al.*, 2011).

Todos os pacientes indicados para receber quimioterapia e imunoterapia devem ser testados para hepatite B ou viremia (HBV DNA) nos casos onde o anti-HBc é positivo, antes de iniciar a terapia, especialmente se eles são positivos para anticorpos de outros antígenos virais (HCV). Esses pacientes devem ser monitorados por vários meses ou anos após a interrupção do tratamento (RAIMONDO *et al.*, 2007). Identificação precoce de reativação virológica é essencial para iniciar a terapia antiviral e impedir a ocorrência de hepatite B, o que pode ser muito perigoso (RAIMONDO *et al.*, 2007; HUI *et al.*, 2006).

Quanto ao risco de adquirir hepatite oculta via transplante de órgãos não se sabe se a imunização anti-hepatite B com uma adequada resposta anti-HBs pode modular a infecção (HOLLINGER; SOOD, 2010). A profilaxia com agentes antivirais impede a reativação da hepatite na maioria desses casos (SAMUEL *et al.*, 2006).

Em carreadores do HBV recebendo quimioterapia ou terapia imunossupressiva, o risco de reativação é alto particularmente se Rituximabe é utilizado sozinho ou associado a corticoide (EASL, 2009). Vacinação contra hepatite B em pacientes soronegativos para anti-HBs é recomendado.

Para aqueles com hepatite oculta, uma abordagem terapêutica é prudente para iniciar a terapia antiviral para o HBV (lamivudina, telbivudina, adefovir, entecavir ou tenofovir) antes da quimioterapia. Essa terapia deve ser continuada por ≥ 6 meses após a interrupção do tratamento imunossupressor. Se o tratamento for planejado por um longo período (> 12 meses) é previsto o uso em seguida de adefovir, entecavir, ou tenofovir, se uma resposta mais rápida é necessária. A terapia antiviral é geralmente mal sucedida se iniciada após a alanina aminotransferase tornar-se elevada (HOLLINGER; SOOD, 2010). Para aqueles pacientes que estão HBV-DNA-negativo e anti-HBc positivo, a seguinte abordagem pode ser considerada com base na cinética de reativação (HOLLINGER; SOOD, 2010; HUI *et al.*, 2006): (1) monitorar em intervalos de 4 semanas com o HBV-DNA NAT (limite inferior de detecção de <10 IU/mL) e iniciar a terapia antiviral quando o resultado for maior que 30 IU/mL, ou (2) monitorizar com intervalos a cada 4 semanas com um ensaio altamente sensível para HBsAg (limite inferior de detecção $<0,1$ ng/mL) e iniciar a terapia antiviral quando o teste tornar-se positivo. Mais estudos são necessários para esclarecer a utilidade clínica, segurança e custo-efetividade destas estratégias na hepatite oculta.

2.9 Prevalência da infecção oculta

A prevalência de hepatite B oculta na população é variável e dependente do grau de risco de se infectar pelo HBV da população estudada, o que por sua vez depende do grau de endemicidade da região. Áreas de maior endemicidade estão mais propensas a apresentar hepatite oculta. Essa casuística também é dependente da sensibilidade e da especificidade dos testes utilizados (GUTIÉRREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Há poucos estudos sobre a prevalência da infecção B oculta na população em geral. Minuk *et al.* (2005) detectaram uma prevalência de infecção oculta em 18% daqueles com evidência sorológica de infecção por HBV anterior, e em 8% dos indivíduos soronegativos para o HBV. Estudos conduzidos na Coreia, (KIM *et al.*, 2007) encontraram HBV DNA em 16% dos indivíduos saudáveis com valores de transaminases normais e que eram HBV/HCV negativos. Hui *et al.* (2005) detectaram genomas HBV oculto em 15% dos doadores de células-tronco hematopoiéticas saudáveis de Hong-Kong. Raimondo *et al.* (2008) investigaram a prevalência de hepatite B oculta em indivíduos sem doença do fígado por meio da análise de DNA de extratos hepáticos através da realização de quatro diferentes ensaios in-house de nested-PCR de amplificação. Sequências de DNA do HBV foram detectadas em tecidos do fígado a partir de 16 dos 98 casos examinados (16,3%). O DNA foi detectado em 10 dos 16 (62,5%) casos anti-HBc positivos e em 6 de 82 (7,3%) dos casos com marcadores sorológicos negativos. Os autores concluíram que o status hepatite oculta foi fortemente relacionado com o nível de anticorpos anti-HBV.

Estudos de Cacciola *et al.* (1999), em pacientes com hepatite C crônica, mostraram que em virtude do compartilhamento de muitas das mesmas vias de transmissão a coinfeção entre os vírus HCV e HBV é comum. Trabalhos de Bréchet e colaboradores (2001) em revisão de trabalhos de hepatite C detectaram a prevalência de hepatite oculta variando de 20% a 30% quando essa análise foi realizada no soro e de 40% a 50% quando a pesquisa foi em fragmento hepático.

Nos quadros de hepatite criptogênica a associação de hepatite oculta ocorre de maneira expressiva (CHEMIN *et al.*, 2001, BERASAIN *et al.*, 2000), podendo essa prevalência variar de 19% a 31%.

Nos pacientes submetidos a hemodiálise que estão sob grande risco de contrair infecções de forma parenteral, não só em virtude da quantidade de hemotransfusão e procedimentos invasivos mas também pelos quadros de imunossupressão, a prevalência pode variar de 0% a 36% (GUTIÉRREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

A transmissão da infecção oculta pelo HBV pode ocorrer de mães assintomáticas em convalescência da fase aguda da doença. Em um modelo utilizando marmotas, o vírus do HBV foi detectado em células do sistema fagocítico mononuclear de sangue periférico e células hepáticas de recém-nascidos (COFFIN; MICHALAK, 1999).

A elevada prevalência de hepatite B oculta em portadores do HIV ocorre não somente pelo compartilhamento das mesmas vias de contaminação, mas também pelo quadro de imunossupressão associado. Os estudos publicados registram prevalências que variam de 0% a 89% (NUNEZ *et al.*, 2002, RODRIGUEZ-TORRES *et al.*, 2007). Questões relacionadas ao valor de contagem de células de CD4 e uso prévio de lamivudina e ou tenofovir são questões que necessitam ser avaliadas e podem interferir na história natural da doença oculta (JARDIM *et al.*, 2008). Portanto hepatite B oculta não tem impacto clínico quando a reconstituição imunológica é conseguida com HAART contendo pelo menos uma droga antiviral inibidor de HBV (GUTIÉRREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Em doadores de sangue a presença de hepatite B oculta pode permitir o contágio dos receptores desse material biológico.

Um resumo da prevalência de marcadores sorológicos em doadores de sangue HBsAg negativos em diferentes regiões do mundo pode ser visto nos estudos de Hollinger (2008). Na América do Norte o DNA do HBV foi detectado em 0,1% - 1,05% daqueles que foram HBsAg negativo e anti-HBc-positivo (com ou sem anti-HBs), e o DNA do HBV foi detectado em 2,03% - 2,8 % na categoria de anti-HBc isolado (sem anti-HBs) (O'BRIEN *et al.*, 2007). Os estudos de prevalência na Europa revelam que o HBV DNA foi detectado em 0% - 1,59% daqueles que foram HBsAg negativo e anti-HBc-positivo (com ou sem anti-HBs), e HBV DNA não foi detectado em pacientes que eram anti-HBc apenas (ALLAIN *et al.*, 1999). Os estudos de prevalência no Oriente Médio, e Ásia revelaram que o HBV DNA foi detectado em 1,09% a 3% dos que foram HBsAg negativo e anti-HBc-positivo (com ou sem anti-HBs), e que o HBV DNA foi detectado em 8,1 % na categoria de anti-HBc isolado (sem anti-HBs) (BHATTI *et al.*, 2007).

No Brasil, na cidade de Porto Alegre, estudo de prevalência em pacientes infectados pelo VHC e portadores de carcinoma hepatocelular não detectou a presença de HBV DNA em amostras de soro da população estudada (ARAUJO *et al.*, 2004). Na mesma região também não foi detectada em doadores de sangue (WOLFF; FUCHS; BRANDÃO, 2011). A prevalência de hepatite B oculta descrita por Jardim *et al.* (2008) foi de 5% em Campinas.

Na região amazônica, conhecida pela sua alta prevalência de hepatite B na população não foi observada associação significativa entre hepatite B oculta e fatores de risco clássicos para infecção pelo HBV (BARROS JUNIOR *et al.*, 2008).

A hepatite B oculta tem sido diagnosticada em doentes com doença hepática criptogênica crônica, e pode estar associada com a progressão da fibrose hepática e desenvolvimento de cirrose. Pacientes infectados com HBV podem apresentar-se com redução progressiva da replicação viral e os níveis séricos de HBsAg. O antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) pode desaparecer com o tempo, apesar da presença de lesão grave do fígado já estabelecida.

Tem sido relatado que a monitorização dos níveis séricos de HBV-DNA e os níveis de enzimas hepáticas, podem ser úteis no tratamento de doentes com infecção oculta e doença de fígado criptogênica em dois aspectos: (1) para prever o risco de cirrose ou carcinoma hepatocelular e (2) para decidir sobre a possibilidade de um tratamento antiviral para impedir a reativação do HBV ou de transmissão, no caso de transplantes. No entanto, o papel da hepatite oculta em acelerar o desenvolvimento de cirrose ainda não está resolvido. Estudos prospectivos com critérios bem definidos de seleção dos pacientes e técnicas laboratoriais padronizados são necessários (SAID, 2011).

Necrose e inflamação podem estar presentes em biópsias de pacientes com infecção oculta pós-infecção aguda (ROMERO *et al.*, 2011). Admite-se que paciente com infecção oculta, mas sem doença hepática associada não apresenta repercussões hepáticas significantes (RAIMONDO *et al.*, 2008).

Os dados relatados com relação a prevalência da associação de cirrose criptogênica e infecção oculta variam de 1,9% a 28% (KAVIANI *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2009). Essa disparidade ocorre em virtude da falta de padronização de testes laboratoriais diagnósticos utilizados no diversos estudos.

O papel da cirrose criptogênica pelo HBV ainda não está bem definido (ROMERO *et al.*, 2011), apesar de hepatite B oculta ter sido detectada em doentes com doença de fígado criptogênica crônica (CHEMIN *et al.*, 2001), e pode estar associada com a progressão da fibrose hepática e o desenvolvimento de cirrose nestes doentes.

O papel pró-oncogênico não é apenas uma consequência da integração de DNA viral ao genoma do hospedeiro. Outros fatores podem contribuir (RAIMONDO *et al.*, 2007): (1) a persistência de replicação do vírus pode induzir ligeira necro-inflamação hepática que continua por toda a vida, (2) cepas ocultas geralmente persistem como genomas livres, e mantêm a capacidade de transcrever e replicar (CHEMIN; ZOULIM, 2009), e (3) hepatite

oculta pode contribuir para a progressão para cirrose, que é o factor de risco mais importante para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. No entanto, maiores estudos sobre a patogênese do vírus oculto são necessários para melhores esclarecimentos (LLEDÓ *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os aspectos epidemiológicos e moleculares da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) em primodoadores de sangue e em pacientes portadores de hepatite B crônica em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil Central.

3.2 Objetivos Específicos

- Estimar a prevalência de infecção pelo vírus da hepatite B em primodoadores de sangue em Campo Grande;
- Investigar a ocorrência de infecção oculta pelo vírus da hepatite B em primodoadores de sangue estudados;
- Identificar os principais genótipos do HBV em pacientes portadores de hepatite B crônica;
- Identificar as principais mutações na região da polimerase do genoma do HBV em portadores de hepatite B crônica;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados encontram-se descritos detalhadamente nos artigos científicos, os quais são apresentados a seguir.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente tese serão apresentados sob a forma de artigos publicados, submetido e a ser submetido à publicação em revistas científicas indexadas e estão listados de acordo com a ordem em que as publicações serão discutidas.

ARTIGO 1

DECREASE IN HEPATITIS B PREVALENCE AMONG BLOOD DONORS
IN CENTRAL-WEST BRAZIL

SUBMETIDO E ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA JOURNAL
OF VENOMOUS ANIMALS AND TOXINS INCLUDING TROPICAL
DISEASES

Decrease in hepatitis B prevalence among blood donors in Central-West Brazil

Andrea Siqueira Campos Lindenberg¹, Ana Rita Coimbra Motta-Castro¹, Marco Antonio Puga¹, Tayana Serpa Ortiz Tanaka¹, Marina Sawada Torres², Sonia Maria Fernandes-Fitts^{1*},
Rivaldo Venancio da Cunha¹

Abstract:

Background: The aim of the present study was to estimate hepatitis B virus seroprevalence among first-time blood donors in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, in the central-western region of Brazil.

Findings: A retrospective analysis of first-time voluntary blood donor records, from January 2010 to December 2010, was conducted at the Hematology Center of Mato Grosso do Sul. The prevalence of the HBsAg and anti-HBc serological markers and their respective 95% confidence intervals were calculated. Chi-square analysis was performed between the seroprevalence previously found in 2001 and the one determined by the current study. Results were considered statistically significant if $p < 0.05$. Among 8,840 subjects, 269 (3.04%, 95% CI: 2.7-3.4) were positive for HBV markers. The prevalence rate of HBsAg was 0.19% (95% CI: 0.1-0.3) and anti-HBc alone was 2.85% (95% CI: 2.5-3.2). **Conclusions:** There was no statistically significant difference regarding gender. However, an important association was observed between HBV infection and older age ($p < 0.01$). The seroprevalence of HBV infection in first-time blood donors diminished from 2001 to 2010 ($p < 0.01$). Such decrease suggests an improvement in the recruitment of safe donors, the positive impact of vaccination programs and the decreasing of HBV infection prevalence in the general population.

Key words: hepatitis B virus, prevalence, blood donors.

*Correspondence: sonia.fernandes@ufms.br

¹Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

FINDINGS [heading 1]

Hepatitis B is one of the most common infectious diseases throughout the globe and has infected two billion people, including an estimated 350 million chronically infected cases (1, 2).

Parenteral exposure has been shown to be associated with hepatitis B virus (HBV) infection. Blood transfusions carry the risk of transfusion-transmitted infections such as hepatitis B and C. In order to measure their severity, the World Health Organization has recommended a pre-transfusion blood test. The residual risk of infection from HBV is higher than that of hepatitis C virus (HCV) in non-endemic countries (3).

In 1971, hepatitis B surface antigen (HBsAg) test was introduced for screening blood donors, and after 1986, antibody tests to hepatitis B core antigen (anti-HBc) were implemented to further reduce the risk of infectious agents in the blood supply (4).

The prevalence of infection in the general population varies in different regions of the world. Although Brazil is considered a low endemic country, there are areas that are highly endemic for HBV in the Amazon region (5). In Brazil, among blood donors, the prevalence ranges from 0.3% to 1.5% for HBsAg and from 3.7% to 11.1% for anti-HBc (4, 6, 7).

The aim of the present study was to estimate the seroprevalence of HBV infection among first-time blood donors in the city of Campo Grande, the capital city of the state of Mato Grosso do Sul, in the central-western region of Brazil.

A retrospective analysis of blood donor data from January 2010 to December 2010 was conducted in the Hematology Center of Mato Grosso do Sul (HEMOSUL). People who attended the center voluntarily for their first blood donation were selected by the standard criteria for healthy blood donors after answering a standardized questionnaire to evaluate epidemiological data. First-time blood donor was defined as a donor who donated for the first and only time. The protocol used in the present study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul.

Blood donor samples were screened for the presence of HBsAg and total anti-HBc by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (bioMérieux, Netherlands). Positive samples were retested using the same serological assay.

The prevalence of the HBsAg and anti-HBc serological markers and their respective 95% confidence intervals (95% CI) were determined. Chi-square analysis was performed between the seroprevalence published in 2001 and seroprevalence found in this study (2010) and was considered statistically significant if $p < 0.05$.

A total of 8,840 first-time blood donors aged between 18 to 65 years, who were considered healthy individuals and eligible for blood donation, participated in this study. The majority of individuals were males (60.6%, $n = 5,358$) between 18 and 39 years old (81.2%, $n = 7,074$), representing typical characteristics of blood donors in Brazil. Among the 8,840 subjects, 269 (3.04%, 95% CI: 2.7-3.4) were positive for HBV markers. The prevalence rate of HBsAg was 0.19% (95% CI: 0.1-0.3) and anti-HBc alone was 2.85% (95% CI: 2.5-3.2). There was no statistically significant difference with respect to gender. A significant association was observed between HBV infection and older age ($p < 0.01$) (Table 1).

As shown in Table 2, the seroprevalence of HBV infection in first-time blood donors was reduced significantly from 2001 to 2010 ($p < 0.01$).

Table 1. Prevalence of hepatitis B viral infection among first-time blood donors by gender and age in Campo Grande, Brazil, 2010

Variable	HBV	%	Odds ratio	<i>p</i>
	Positive/Total		(95% CI)	
Gender				
Female	107/3,482	3.07	1.0	
Male	162/5,358	3.02	0.98 (0.76-1.27)	0.94
Age (years)				
18-28	99/4,990	1.98	1.0	
29-39	75/2,258	3.32	1.70 (1.24-2.33)	< 0.01
40-50	61/1,130	5.40	2.82 (2.01-3.95)	< 0.01
51-66	34/462	7.36	3.92 (2.57-5.97)	< 0.01

Table 2. Difference in the prevalence of hepatitis B viral infection among first-time blood donors between 2001 and 2010, Campo Grande, Brazil

Variable Year	HBV	%	Odds ratio	<i>p</i>
	Positive/Total		(95% CI)	
2001*	52/552	9.42	3.31 (2.40-4.57)	< 0.01
2010	269/8,840	3.04		

*Aguiar *et al.* (8)

Despite the decreasing of the global HBV infection, the use of serological markers for blood donor screenings is still important, since HBV remains a great risk for blood transfusion patients (3, 9). In this study, the prevalence of HBV infection was 3.04% (95%CI: 2.7-3.4) and 0.19% (95%CI: 0.1-0.3) for total anti-HBc and HBsAg, respectively, suggesting the presence of HBV infection in first-time blood donors. However, this is a significant drop

compared to 9.42% for total anti-HBc and 0.72% for HBsAg prevalence rate reported by Aguiar *et al.* (8).

Considering that HBV infection prevalence in blood donors depends on several factors, including the prevalence of the virus in the general population and the sensitivity of screening tests, it is reasonable to assume that the observed decline may have been due to the implementation of safety measures. Particularly because the screening tests used over the past decade were of similar sensitivity and performed in the same laboratory (Hemorrede Laboratory of Mato Grosso do Sul) with similar technical capabilities.

The cause of such declined rates is multifactorial and most likely due to the increase in vaccination programs conducted in the general population, implementation of a national strategy for blood safety and better data quality. Although over the past few years several studies have shown a decreasing trend of HBV seroprevalence among blood donors, others have found opposite results (10-16). According to Niederhauser (17), immunization campaigns are efficient in reducing the risk of transfusion-transmitted HBV.

During the last four decades, blood donor profiles have changed as a result of the implementation of HBV screening, which has steadily reduced the risk of transmitting the virus through blood transfusion (18). Moreover, there is a cumulative effect of increasing public health awareness (19). In the population-based multicentric survey of hepatitis B infection in central-west Brazil, the prevalence of HBV rates classify the region as low endemic, rather than intermediate endemic as defined by previous studies (5). Such drop may be the explanation for the lower seroprevalence of HBV infection among blood donors found by Aguiar *et al.* (8).

Significant increase in the seroprevalence of HBV was observed among older people. The lower prevalence among donors under 30 years old could be associated with hepatitis B vaccination program, which was initiated at the beginning of the 1990s in Brazil. Moreover, higher prevalence among older donors indicates a longer time of viral exposure, as corroborated by O'Brien *et al.* (20), Nkrumah *et al.* (13) and Seo *et al.* (21).

Statistical analysis showed no significant difference in HBV infection prevalence according to gender. This finding is similar to those found by Japhet *et al.* (22), Nascimento *et al.* (6) and Ataallah *et al.* (23).

Our results demonstrate the importance of updated information on HBV prevalence. The significant decrease of HBV infection between 2001 and 2010 among first-time blood donors suggests an improvement in the recruitment of safer donors, the positive impact of vaccination programs and the drop of HBV infection prevalence in the general population.

This is a welcoming result since the safety of blood products also brings benefits to the general population and guides new prevention strategies.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that there are no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

ASCL, ARCMC, SMFF and RVC designed the study. MAP and TSOT did most of the laboratory work. MST, SMFF and ASCL provided and checked the clinical data for patients. ASCL, ARCMC and SMFF wrote the manuscript. All authors reviewed the draft and approved the final version.

AUTHORS' INFORMATION

¹Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil;

²Mato Grosso do Sul Hematology Center, Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to particularly acknowledge the Hematology Center of Mato Grosso do Sul (HEMOSUL).

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The present study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul (n. 1721/2010).

Received: September 4, 2012.

Accepted: December 4, 2012.

Published:

REFERENCES

- 1.Lok AS, McMahon BJ: **Chronic hepatitis B.** *Hepatology* 2007, **45**(2):507-9.
- 2.European Association For The Study of the Liver: **EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B.** *J Hepatol* 2009, **50**(2):227-42.
- 3.Kwon SY, Lee CH: **Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection.** *Korean J Hepatol* 2011, **17**(2):87-95.
- 4.Silveira L, Schiavon Lde L, Silva KP, Lopes TB, Zaccaron MR, Narciso-Schiavon JL: **Clinical and epidemiological profile of blood donors with positive serology for viral hepatitis in southern Brazil.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2011, **44**(3):269-73.
- 5.Pereira LM, Martelli CM, Merchán-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* 2009, **81**(2):240-7.
- 6.Nascimento MC, Mayaud P, Sabino EC, Torres KL, Franceschi S: **Prevalence of hepatitis B and C serological markers among first-time blood donors in Brazil: a multi-center serosurvey.** *J Med Virol* 2008, **80**(1):53-7.
- 7.Anjos GR, Martins RM, Carneiro MA, Brunini SM, Teles AS: **Epidemiology of hepatitis B vírus infection in first-time blood donors in the southwestern region of Goiás, central Brazil.** *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011, **33**(1):38-42.
- 8.Aguiar JI, Aguiar E, Paniago A, Cunha R, Galvão L, Daher R: **Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen in blood donors in the middle West region of Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, **96**(2):185-7.
- 9.Candotti D, Allain JP: **Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection.** *J Hepatol* 2009, **51**(4):798-809.
- 10.Khedmat H, Alavian SM, Miri SM, Amini M, Abolghasemi H, Hajibeigi B, Alaeddini F, Fallahian F: **Trends in seroprevalence of hepatitis B, hepatitis C, HIV, and syphilis infections in iranian blood donors from 2003 to 2005.** *Hepat Mon* 2009, **9**(1):24-8.
- 11.Kafi-abad SA, Rezvan H, Abolghasemi H: **Trends in prevalence of hepatitis B virus infection among Iranian blood donors, 1998-2007.** *Transfus Med* 2009, **19**(4):189-94.
- 12.Chimparlee N, Oota S, Phikulsod S, Tangkijvanich P, Poovorawan Y: **Hepatitis B and hepatitis C virus in Thai blood donors.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011, **42**:609-61.
- 13.Nkrumah B, Owusu M, Aweru P: **Hepatitis B and C viral infections among blood donors. A retrospective study from a rural community of Ghana.** *BMC Res Notes* 2011, **4**:529.

- 14.Dhruva GA, Agravat AH, Pujara KM: **Seroprevalence of HIV, HBV, HCV and syphilis in blood donors in saurashtra region of Gujarat: declining trends over a period of 3½ years.** *OJHAS* 2012, **11**(1):1-2.
- 15.Durro V, Qyra S: **Trends in prevalence of hepatitis B virus infection among Albanian blood donors, 1999-2009.** *Virol J* 2011, **8**:96.
- 16.Tessema B, Yismaw G, Kassu A, Amsalu A, Mulu A, Emmrich F, Sack U: **Seroprevalence of HIV, HBV, HCV and syphilis infections among blood donors at Gondar University Teaching Hospital, Northwest Ethiopia: declining trends over a period of five years.** *BMC Infect Dis* 2010, **10**:111.
- 17.Niederhauser C: **Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection.** *J Blood Med* 2011, **2**:91-102.
- 18.Dwyre DM, Fernando LP, Holland PV: **Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century.** *Vox Sang* 2011, **100**:92-8.
- 19.Karki S, Ghimire P, Tiwari BR, Maharjan A, Rajkarnikar M: **Trends in hepatitis B and hepatitis C seroprevalence among Nepalese blood donors.** *Jpn J Infect Dis* 2008, **61**(4):324-6.
- 20.O'Brien SF, Xi G, Fan W, Yi QL, Fearon MA, Scalia V, Goldman M: **Epidemiology of hepatitis B in Canadian blood donors.** *Transfusion* 2008, **48**(11):2323-30.
- 21.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* 2011, **51**(8):1840-6.
- 22.Japhet MO, Adesina OA, Donbraye E, Adewumi MO: **Hepatitis B core IgM antibody (anti-HBcIgM) among hepatitis B surface antigen (HBsAg) negative blood donors in Nigeria.** *Virol J* 2011, **8**:513.
- 23.Ataallah TM, Hanan KA, Maysoun KS, Sadoon AA: **Prevalence of hepatitis B and C among blood donors attending the National Blood Transfusion Center in Baghdad, Iraq from 2006-2009.** *Saudi Med J* 2011, **32**(10):1046

ARTIGO 2

OCCULT HEPATITIS B: A RISK FOR BLOOD TRANSFUSION

A SER ENCAMINHADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA
TRANSFUSION

Occult hepatitis B: a risk for blood transfusion

Andrea Siqueira Campos Lindenberg (1), Sonia Maria Fernandes-Fitts (1), Marco Antonio Puga (1), Tayana Serpa Ortiz Tanaka (1), Marina Sawada Torres (2), Rivaldo Venâncio da Cunha (1), Ana Rita Coimbra Motta-Castro (1).

(1) Federal University of Mato Grosso do Sul

(2) Centro de Hematologia de Mato Grosso do Sul

INTRODUCTION

Hepatitis B is one of the most common infectious diseases and has infected two billion people worldwide, including an estimated 400 million chronically infected cases.^{1,2} Blood transfusions are one of the major sources of hepatitis B virus transmission (HBV infection) and the risk for transfusion hepatitis B virus (HBV) transmission still persists today despite advanced technologies and improved blood donor screening.³ Hepatitis B remains the most frequent transfusion-transmitted viral infection.^{4,5} In nonendemic countries, the risk of acquiring hepatitis B infection, hepatitis C infection, or human immunodeficiency virus via blood transfusion ranges from 1 in 282,000 to 1 in 357,000, from 0.3 to 0.5 in 1,000,000 and 1 in 1.5 million units, respectively.³ The risk can be higher due to the possibility of occult hepatitis B (OBI) virus infection, which is defined as persistence of hepatitis B virus DNA in hepatitis B surface antigen (HBsAg) negative individuals.⁶ Occult hepatitis B can be detected only by hepatitis B virus (HBV) nucleic acid testing (NAT) which is performed in blood transfusion centers of several countries,⁷ but currently is not performed in all Brazilian centers. Moreover, there is recent evidence which suggests blood obtained from donors with OHB could be infectious.⁸

Despite its potential clinical importance, epidemiology of occult HBV infection is still unknown. Knowledge on HBV prevalence is the first step to understanding its full clinical impact. In the region of Mato Grosso do Sul, no studies on this new clinical entity in blood banks have been conducted to date. The aim of this study was to determine the prevalence of occult hepatitis B virus infection in first-time blood donors. Results of this study are important given the intention of the Ministry of Health to implement the performance of this nucleic acid test (NAT) throughout the country.

MATERIAL AND METHODS

Study subjects

A total of 8,840 serum samples collected during the period of January 2010 to December 2010 at the Hematology Center (HEMOSUL), Campo Grande, MS, from first-time blood donors enrolled in this study were analyzed. All apparently healthy individuals, aged 18 to 65 years, who presented voluntarily for their first blood donation, were selected by the standard criteria for healthy blood donors after answering a standardized questionnaire for evaluating epidemiological data. The protocol used in the present study was approved by the Ethical Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul, under protocol n°. 1721/2010.

HBV serologic tests

Serum samples of donors were tested for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B core antibody (anti-HBc) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (bioMérieux bv, Boxtel, The Netherlands). Patients with results initially reactive to any infection marker were subjected to a new collection and the sera were tested in duplicate. HBsAg positive samples were tested for anti-HBc IgM, HBeAg and anti-HBe detection by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA), using the Cobas® e601 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to manufacturer instructions. The prevalence of the serological markers (HBsAg and anti-HBc) and their respective 95% confidence intervals (CI) were determined. Every sample that was negative for HBsAg but positive for anti-HBc was also tested for the presence of HBV-DNA by PCR assay.

Genome extraction and DNA amplification

All anti-HBc positive samples were submitted to DNA extraction using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Germany). After precipitation, the pellet was dried and resuspended in 50 µL of Elution Buffer. The pre-S/S genome region was partially amplified by semi-nested PCR. The primers used in the first round were PS1 (5'-CCATATTCTTGGAACAAGA-3', nucleotide position 2826-2845) and P3 (5'-AAAGCCCCAAAAGACCCACAA-3', nucleotide position 1019-1000). The second round was conducted by using one sense primer (PS1) and two antisense primers S2 (5'-GGGTTTAAATGTATACCCAAAA-3', nucleotide position 819-841), and S22 (5'-GTATTTAAATGGATACCCACAGA-3', 819–841).

After an initial denaturation step (2 min at 94°C), DNA was amplified using 30 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, and 72°C for 1m30s, followed by a final elongation step (7 min at 72°C). The first round of amplification was performed with 1 µL of DNA and one unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, San Diego, CA) in a final volume of 25 µL. The second round of amplification was performed in a final volume of 50 µL, using 1 µL of the first round PCR product, sense primer S1 (5'-CTTCTCGAGGACTGGGGACC-3', 124–143) and antisense primers S2 and S22, under the following conditions: an initial denaturation step (3 min at 94°C), followed by 30 cycles of 95°C for 30 sec, 52°C for 40 sec, and 72°C for 2 min, followed by a final elongation step (7 min at 72°C).

Ten microliters of the amplification product (about 1,200 bp in length) was loaded on 2% agarose gels, electrophoresed, stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

The nucleotide sequences of the amplified regions were determined by direct sequencing using specific HBV primers, C5, C8, X1, X3, P1,P2, P3, P01, PS1, PS4, PS2, PS8, S1, S2, S22, S4 and S18 (Table 1). Sequencing reactions were processed using an ABI3730+ automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were analyzed and the phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method using MEGA program version 4 with bootstrap value of 1,000 replications.⁹

Prevalence and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated. Chi-squared test or Chi-square tests for trend were performed when appropriate. Crude and adjusted odds ratio with 95% CI were calculated to determine the strength of association between variables by univariate analysis using EPINFO 6.04 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, US). Results were considered significant when p value <0.05.

RESULTS

Out of the 8,840 samples screened, 269 (3.04%, CI 95%: 2.7–3.4) were positive for HBV markers. Notably, 17/8840 (0.19%) (CI 95%: 0.1–0.3) were positive for HBsAg and 252/8,840 (2.85%) (CI 95%: 2.5–3.2) were positive for total anti-HBc. The majority of individuals were male (60.6%, 5,358/8,840), and/or between the ages of 18 to 39 years old (81.2%, 7,074/8,840), which represent typical characteristics of blood donors in Brazil. A significant association was observed between HBV infection and older age (p<0.01) (Table I). However, there was no statistically significant difference with respect to gender.

Table I. Univariate analysis of factors associated with hepatitis B infection in first-time blood donors in Campo Grande, Brazil, 2012.

Risk factor	HBV Positive/Total	%	<i>Odds ratio</i> (95% CI¹)	<i>P</i>
Gender				
Female	107/3,482	3.07	1.0	0.94
Male	162/5,358	3.02	0.98 (0.76 – 1.27)	
Age (years)				
18 - 28	99/4,990	1.98	1.0	<0.01
29 - 39	75/2,258	3.32	1.70 (1.24 – 2.33)	
40 - 50	61/1,130	5.40	2.82 (2.01 – 3.95)	
51 - 66	34/462	7.36	3.92(2.57 – 5.97)	

⁽¹⁾CI: confidence interval of 95%)

Out of the 225 anti-HBc positive samples, 190 were tested for HBV-DNA by semi-nested PCR and 20/190(10.52%) of these were found to be positive. Thus, the overall prevalence of occult hepatitis B virus infection (OBI) in 190 blood donors was 10.52%.Of the 20 HBV-DNA positive samples, 13 (65%)were male and 7 (35%) were female. All individuals with OBIs were clinically asymptomatic and negative for HBsAg and antibodies against hepatitis C virus (HCV), HIV, and *Treponema pallidum*. There was no statistically significant association between HBV-DNA and gender, however a significantly higher percentage of HBV DNA positivity (18.57%) among younger age group (age <29) donors was observed (p<0.01) (Table II).

Table II. Analysis of gender and age with HBV-DNA in first-time blood donors in Campo Grande, Brazil, 2012.

Grande, Brazil, 2012.				
Variable	HBV-DNA Positive/Total	%	<i>Oddsratio</i> (95% CI ¹)	<i>P</i>
Gender				
Female	7/74	9.45	1.0	0.70
Male	13/116	11.20	0.83(0.28 – 2.37)	
Age (years)				
< 29	13/70	18.57	1.0	0.00
> 29	7/120	5.83	3.68(1.28 – 10.88)	

⁽¹⁾CI: confidence interval of 95%)

DISCUSSION

The presence of HBV-DNA in HBsAg negative blood samples represents a major clinic impact for the safety of the blood supply. Since the first report of occult hepatitis B virus infection in 1979, there have been continuous publications about this clinical condition in different populations, including HIV or HCV infected individuals and hemodialysis patients.^{5, 10}

The blood donor population is indicated for occult hepatitis B investigation because of the risk of transmission to recipients.¹¹

In this study, the overall prevalence of HBV-DNA among HBsAg negative and anti-HBc positive healthy blood donors was 10.52% (20/190). This condition configures occult hepatitis B virus infection, which has the potential to transmit hepatitis B through blood transfusion. Several studies have documented transmission of occult hepatitis B infection by transfusion or organ transplant.^{8,12,13}

Interestingly, despite increased infection with increasing age, our results showed a statistically significant higher percentage of HBV DNA positivity (18.57%) among younger donors with age less than 29 years. A higher proportion of OBH among the younger age group has also been reported by Panigrahi *et al.*¹⁴ The younger donors were vaccinated against hepatitis B in childhood and are sexually active individuals. This could theoretically explain a higher exposition to the virus and the presence of mutants selected under the pressure of the immune response. However, this requires further study.

Mechanisms, such as window period of HBV infection, presence of viruses that are genetically mutated, marked reduction in viral replication and gene expression, could explain the persistence of the HBV genome without HBsAg in the blood of apparently healthy individuals.⁶ Capezzuto *et al.* identified two cases of occult HBV infection in which sequencing of the S and pre-core regions of the HBV genome revealed the presence of point mutations beyond low viral load in the circulation.¹⁵ Confirming these findings, recently, other authors also have reported mutations and low viral load in the circulation of apparently healthy blood donors with occult hepatitis B virus infection.^{14,16 - 21}

The occult infection prevalence of 10.52% uncovered in our studies considered high given the central region of Brazil represents an area of low endemicity for hepatitis B virus infection. Regarding the rate of occult hepatitis B virus infection from blood donors, prevalences range between 0% and 30% in different regions of the world^{14,22,23} or even in different areas of the country.^{24,25} According to studies on occult hepatitis B virus infection in

blood donors, such a wide range of prevalence is not completely understood and could result from virological, immunological, methodological, and epidemiological factors as well as immunogenetic characteristics.¹⁶ Moreover, the blood donor selection prior to testing, race and ethnic diversity, reactivity in different HBsAg or anti-HBc assays, the HBV subtypes and regional characteristics are conditions that may influence occult hepatitis B virus infection prevalence.^{17, 26 – 28}

Low, intermediate, or high endemic areas have been shown to have different occult HBV infection rates. HBV DNA tests in blood donors have demonstrated that occult HBV infection in regions with low HBV endemicity is rare.²⁶ In the Central Province of Iran, a region with low HBV prevalence, out of 531 cases, 11(2.1%) had isolated anti-HBc and HBV-DNA was not detected in any of the cases.²⁹

Considering regions with high HBV infection prevalence, where anti-HBc percentages range from 18.3% to 43.4%, HBV-DNA was detected in a high percentage of samples, reaching a detection rate of nearly 30%.^{14,20,24,25,30} On the other hand, some publications have shown very low prevalence of occult hepatitis B virus infection, ranging between 0.15% to 1.1% in India^{28, 31, 32}, 0.016% in Korea¹⁹ and 3.4% in China³³, which is a highly endemic region for HBV. Of note, in India, Panigrahi *et al.*¹⁴ registered 30.1% of total donations were anti-HBc positive, indicating a very high rate of exposure to HBV infection among the blood donors and 30% were HBV DNA positive. In the same country, another study by Makroo *et al.*³² showed the presence of HBV DNA was detected in only 0.15% of anti-HBc-positive and HBsAg-negative blood donor sera.

Corroborating with our results, several studies have found a high prevalence of occult hepatitis B virus infection in low endemicity regions. Jafarzadeh *et al.* examined 270 HBsAg negative sera obtained from healthy blood donors from a nonendemic region in Iran. They found that 5.18% (14/270) of these donors were positive for anti-HBc. The prevalence of occult HBV infection in healthy blood donors was 28.57% (4/14).²⁷ Currently, Iran is classified as having a low endemicity for hepatitis B infection and HBV-DNA was detected in 36/121(29.7%) anti-HBc samples from blood donors.²³ According to Garcia-Montalvo and Ventura-Zapata (2011), high HBV DNA prevalence among HBsAg-negative blood donors from Mexico is particularly significant since Mexico is considered a low HBV prevalence region.¹⁶ In Cairo, Egypt, a region considered to have low endemicity, the prevalence of anti-HBc in HBsAg negative blood donors was 13.3% (20/150) and HBV-DNA was detected in 2/20 (20%).³⁴

Brazil is a large country and is considered as lowly endemic for hepatitis virus

infection in most of the region.^{35,36} However, pockets which are highly endemic for HBV have been reported in the Amazon region,³⁷ Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo³⁸ and afro-descendant communities in Mato Grosso do Sul.³⁹

Among Brazilian blood donors, the prevalence for anti-HBc ranges from 3.7% to 11.1%^{35, 40-41} and few studies have been conducted on occult hepatitis B virus infection in blood donors from Brazil. Wolff *et al.* did not uncover any cases of occult hepatitis B in their anti-HBc positive samples from southern Brazil. The authors noted that blood samples were collected between 1995 and 1997, and they believe the prevalence of occult hepatitis B would be different if more recent samples were tested.⁴² In the same region, analyzing samples collected in 2001, HBV-DNA was detected in 5/150 (3.3%) anti-HBc positive samples.⁴³ In São Paulo in southeast Brazil, Arraes *et al.* also did not observe any HBV-DNA positive samples collected from August 1994 to July 1997.⁴⁴ Another study in northeast Brazil reported 3/107 (2.80%) blood donors had occult hepatitis B virus infection.⁴⁵

Our result of 10.52% of occult hepatitis B virus infection in first time apparently healthy blood donors represents the most recent data performed using modern molecular assay.

In conclusion, our study supports the presence of occult HBV infections in apparently healthy blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen and suggests that occult hepatitis B infection prevalence is much more complex than differences in anti-HBc endemicity. Greater emphasis should be given for occult hepatitis B virus surveillance since it is still a risk for blood transfusions. The results of this study reinforce the essential need for establishing more sensitive blood screening as nucleic acid testing (NAT).

Abstract

The aim of this study was determine the prevalence of occult hepatitis virus infection in first-time blood donors of Midwest Brazil. A total of 8,840 serum samples of first-time blood donors were tested for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B core antibody (anti-HBc) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (bioMérieux bv, Boxtel, The Netherlands). All samples that were negative for HBsAg but positive for anti-HBc were also tested for HBV-DNA presence of by PCR assay. Out of the 8,840 samples screened, 269 (3.04%, CI 95%: 2.7–3.4) were positive for HBV markers. One-hundred ninety anti-HBc positive samples were tested for HBV-DNA by semi-nested PCR, of which 20/190 (10.52%) were positive. Thus, the overall prevalence of occult hepatitis B virus infection

(OBI) in 190 blood donors was 10.52%. In conclusion, our study supports the presence of occult HBV infections in apparently healthy blood donors negative for surface antigen hepatitis B virus and reinforces the essential need for establishing more sensitive blood screening, such as nucleic acid testing (NAT).

REFERENCES

1. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45(2):507-39.
2. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57(1):167-85.
3. Dwyre DM, Fernando LP, Holland PV. Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. *Vox Sang* 2011;100(1):92-8.
4. Candotti D, El Chaar M, Allain JP. Transfusion transmission of hepatitis B virus: still learning more about it. *ISBT Science Series* 2011; 6:234–240.
5. Gutierrez-Garcia ML, Fernandez-Rodriguez CM, Lledo-Navarro JL, Buhigas-Garcia I. Prevalence of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2011;17(12):1538-42.
6. Larrubia JR. Occult hepatitis B virus infection: a complex entity with relevant clinical implications. *World J Gastroenterol* 2011;17(12):1529-30.
7. Niederhauser C. Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. *J Blood Med* 2011; 2:91-102.
8. Yuen MF, Wong DK, Lee CK, Tanaka Y, Allain JP, Fung J, Leung J, Lin CK, Sugiyama M, Sugauchi F, Mizokami M, Lai CL. Transmissibility of hepatitis B virus (HBV) infection through blood transfusion from blood donors with occult HBV infection. *Clin Infect Dis* 2011 Mar 1; 52(5):624-32.
9. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24(8):1596-9.
10. Ramezani A, Banifazl M, Mohraz M, Rasoolinejad M, Aghakhani A. Occult hepatitis B virus infection: A major concern in HIV-infected patients: Occult HBV in HIV. *Hepat Mon* 2011; 11(1):7-10.
11. Ocana S, Casas ML, Buhigas I, Lledo JL. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2011; 17(12):1553-7.
12. Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, Tadokoro K. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion* 2007 Jul; 47(7):1197-205.

13. Taira R, Satake M, Momose S, Hino S, Suzuki Y, Murokawa H, Uchida S, Tadokoro K. Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection caused by blood components derived from donors with occult HBV infection in Japan. *Transfusion* 2012 Oct 4.
14. Panigrahi R, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Mahapatra PK, et al. Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for transfusion. *Virol J* 2010; 7:204.
15. Capezzuto C, Franchi E, Urbani S, Romano L, Franchini M. Occult hepatitis B in blood donors: a description of two cases. *Blood Transfus* 2010; 8(4):297-302.
16. Garcia-Montalvo BM, Ventura-Zapata LP. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico. *Ann Hepatol* 2011; 10(2):133-41.
17. Liu Y, Li P, Li C, Zhou J, Wu C, Zhou YH. Detection of hepatitis B virus DNA among accepted blood donors in Nanjing, China. *Virol J* 2010; 7:193.
18. Manzini P, Girotto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, et al. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica* 2007; 92(12):1664-70.
19. 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* 2011; 51(8):1840-6.
20. Thedja MD, Roni M, Harahap AR, Siregar NC, Ie SI, Muljono DH. Occult hepatitis B in blood donors in Indonesia: altered antigenicity of the hepatitis B virus surface protein. *Hepatol Int* 2010; 4(3):608-14.
21. 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* 2011 May; 49(5):1730-7.
22. Beltran M, Berrio-Perez M, Bermudez MI, Rey-Benito G, Camacho B, Forero P, Molina GC, Fals O, Piscioti I, Oliveros Y, Cortes A, De La Hoz F. [Absence of occult hepatitis B in Colombian blood donors]. *Biomedica* 2011 Oct-Dec; 31(4):580-9. Spanish.
23. Delavari M, Shahabi-Nejad N, Renzaho AMN, Zahedi MJ, Owhadi AR. Frequency of Anti-HBc & HBV DNA detection in blood donors of Kerman province, Iran. *J Blood Disord Transfus* 2011; 2:105.
24. Bhattacharya P, Chandra PK, Datta S, Banerjee A, Chakraborty S, Rajendran K, Basu SK, Bhattacharya SK, Chakravarty R. Significant increase in HBV, HCV, HIV and

- syphilis infections among blood donors in West Bengal, Eastern India 2004-2005: exploratory screening reveals high frequency of occult HBV infection. *World J Gastroenterol* 2007 Jul 21; 13(27):3730-3.
25. Asim M, Ali R, Khan LA, Husain SA, Singla R, Kar P. Significance of anti-HBc screening of blood donors and its association with occult hepatitis B virus infection: Implications for blood transfusion. *Indian J Med Res* 2010; 132:312-7.
 26. Hennig H, Puchta I, Luhm J, Schlenke P, Goerg S, Kirchner H. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood* 2002; 100(7):2637-41.
 27. Jafarzadeh A, Kazemi-Arababadi M, Mirzaeem, Pourazar A. Occult hepatitis B virus infection among blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Acta Medica Iranica* 2008, 46(1): 27-32.
 28. Ismail AM, Devakumar S, Anantharam R, Fletcher GJ, Subramani T, John GT, Daniel D, Abraham P. Low frequency of occult hepatitis B infection in anti-HBc seropositive blood donors: experience from a tertiary care centre in South India. *Blood Transfus* 2012 Apr;10(2):230-2.
 29. 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* 2010 Apr;14(4):e308-10.
 30. Alsharkawy E, Mahmoud A, Mokareb HA, Mohamad HI. Detection of hepatitis B viraemia in HBsAg negative blood donors. *El-Minia Med., Bul.*, 2010; 21(1): 55-65.
 31. Maheswari KS, Arun R, Arumugam P. The Prevalence of the Hepatitis B Core Antibody and the Occult Hepatitis B Infection Among Voluntary Blood Donors in Chennai, India. *J Clin Diagn Res* 2012; 6(10): 1710–1712.
 32. Makroo RN, Chowdhry M, Bhatia A, Arora B, Rosamma NL. Hepatitis B core antibody testing in Indian blood donors: A double-edged sword! *Asian J Transfus Sci* 2012;6(1):10-3.
 33. Yuan Q, Ou SH, Chen CR, Ge SX, Pei B, Chen QR, Yan Q, Lin YC, Ni HY, Huang CH, Yeo AE, Shih JW, Zhang J, Xia NS. Molecular characteristics of occult hepatitis B virus from blood donors in southeast China. *J Clin Microbiol* 2010 Feb;48(2):357-62.
 34. El-Sherif AM, Abou-Shady MA, Al-Hiatmy MA, Al-Bahrawy AM, Motawea EA. Screening for hepatitis B virus infection in Egyptian blood donors negative for hepatitis B surface antigen. *Hepatol Intern* 2007; 1(4): 469-470.

35. Nascimento MC, Mayaud P, Sabino EC, Torres KL, Franceschi S. Prevalence of hepatitis B and C serological markers among first-time blood donors in Brazil: a multi-center serosurvey. *J Med Virol.* 2008; 80: 53-57.
36. Pereira LMMB, Martelli CMT, Merchan-Hamann E, Montarroyos UR, Braga MC, Lima MLC, Cardoso MRA, Turchi MD, Costa MA, Alencar LCA, Moreira RC, Figueiredo GM, Ximenes RAA. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81(2): 240-247.
37. Braga WS, Castilho Mda C, 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* 2012 Feb;45(1):13-7.
38. Souto FJD. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *Gastroenterol Endosc Digest* 1999; (4)18:143-150.
39. Motta-Castro AR, Yoshida CF, Lemos ER, Oliveira JM, Cunha RV, Lewis-Ximenez LL, et al. Seroprevalence of Hepatitis B virus infection among an Afro-descendant community in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(1):13-7.
40. Silveira L, Schiavon LL, Silva KP, Lopes TB, Zaccaron MR, Narciso-Schiavon JL. Clinical and epidemiological profile of blood donors with positive serology for viral hepatitis in southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44: 269-273.
41. Anjos GRLC, Martins RMB, Carneiro MAS, Brunini SM, Teles SA. Epidemiology of hepatitis B virus infection in first-time blood donors in the southwestern region of Goiás, central Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011; 33(1): 38-42.
42. Wolff FH, Fuchs SC, Brandao AB. Absence of occult hepatitis B among blood donors in southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2011; 15(2): 159-62.
43. Silva CM, 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* 2005; 51(1): 24-9.
44. Almeida Neto C, Strauss E, Sabino EC, Sucupira MCA, Chamone DAF. Significance of Isolated Hepatitis B Core Antibody in Blood Donors from São Paulo. *Rev Inst Med trop S. Paulo.* 2001 July-Aug; 43 (4):203-208.
45. Arraes LC, Ximenes R, Andrieu JM, Lu W, Barreto S, Pereira LM, Castelo A. The biological meaning of anti-HBC positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003 May-Jun;45(3):137-40.

ARTIGO 3

HEPATITIS B VIRUS GENOTYPES AND YMDD MUTATIONS AMONG
CHRONIC HEPATITIS B PATIENTS IN CENTRAL-WEST BRAZIL.

.

A SER ENCAMINHADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BRAZILIAN
JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES

Hepatitis B virus genotypes and YMDD mutations among chronic hepatitis B patients in Central-West Brazil.

Andrea Siqueira Campos Lindenberg (1); Ana Rita Coimbra Motta-Castro (1), Marco Antonio Puga (1); Caroline Soares (1); Tayana Serpa Ortiz Tanaka (1); Francisco Mello (2); Bárbara V. Lago (2); Carolina Marlien Duarte da Costa Finotti (1) ; Livia Bertolacci (2); Sonia Maria Fernandes-Fitts (1); Rivaldo Venâncio da Cunha (1).

(1) Federal University of Mato Grosso do Sul

(2) Laboratório de virologia FIOCRUZ

Hepatitis B is a serious public health problem of global importance. Nearly 400 million people are infected chronically with HBV around the world. Chronic carriers are exposed to the development of complications arising from hepatitis B infection, resulting in cirrhosis, hepatocellular carcinoma, liver failure or death (McMAHON, 2010).

Divergence analyses of HBV genomic sequences has led to the identification of ten HBV genotypes (A through J) and several subgenotypes, which vary in geographic distribution and often present specific demographic characteristics (NAITO; HAYASHI; ABE, 2001; KIRSCHBERG *et al.*, 2004; USUDA *et al.*, 2000; WEISS *et al.*, 2004; RONCATO; BALLARDIN; LUNGE, 2008). Brazil is a country geographically divided into several regions which have been colonized by people of different ethnic backgrounds. Therefore, HBV genotype distribution may differ in these regions. The most frequent genotypes are A, D and F, but genotypes C and G have also been reported (MELLO *et al.*, 2007).

Knowledge on HBV genotypes is very important for clinical treatment. Studies have suggested possible pathogenic and therapeutic differences among HBV genotypes (McMAHON, 2009). Several viral factors appear to strongly influence outcome in HBV infection, including HBV genotype, DNA levels over time, and specific HBV viral mutations (KRAMVIS; KEW, 2005).

The main treatment for chronic hepatitis B (CHB) is antiviral therapy. Several synthetic nucleoside/nucleotide analogs (NAs), licensed for CHB treatment have been developed to suppress viral replication by inhibiting viral polymerase activity and to provide improvement in liver histopathology; thereby preventing associated mortality. Treatment goals include the prevention of complications such as cirrhosis, liver de-compensation and

hepatocellular carcinoma. On the other hand, prolonged treatment with antiviral drugs is often associated with a high occurrence of resistant mutations in the HBV genome. (SONG *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2012)

Although lamivudine is an effective and well tolerated medication, the nucleoside analogue requires a lengthy treatment period and, thus, resistance is an important concern. Resistance to lamivudine is associated with mutations in the HBV polymerase gene (ALLEN *et al.*, 1998)

Long-term use of lamivudine has become the most important cause of treatment failure and may lead to the emergence of tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) mutation in the highly conserved YMDD motif of the HBV DNA polymerase gene catalytic domain (C domain) (ALLEN *et al.*, 1998; CHAYAMA *et al.*, 1998). In general, the methionine at codon 204, which is replaced by either isoleucine (rtM204I, YIDD variant) or valine (rtM204V, YVDD variant), is the predominant mutation causing lamivudine resistance. This primary LAM-resistant mutant, rtM204V/I, has also been associated with flares of liver disease (DIENSTAG *et al.*, 1999).

The present study aimed to determine the genotypes/subgenotypes, the prevalence and pattern of YMDD mutations as well as their virological and clinical characteristics among chronic HBV-infected patients in Central-West Brazil.

Methods

Study Population

This cross-sectional study was conducted using samples from 77 chronically HBV-infected patients recruited from the "Esterina Corsini" University Hospital of the Federal University of Mato Grosso do Sul (HU/UFMS) and in the Reference Center of Infectious and Parasitic Diseases (CEDIP) in Campo Grande – MS, from September 2010 until December 2012. Chronic HBV patients, defined as the presence of HBV surface antigen (HBsAg) for at least 6 months, who consented to participate in the investigation by signing the consent form, were interviewed regarding socio-demographic data, risk characteristics associated with HBV infection, coinfections and duration of nucleoside/nucleotide analog (NA) therapy. Data on CD4 cell counts, serum alanine aminotransferase (ALT) levels, HBV serology, and HIV and HBV viral load were also obtained, either at the same time or within 3 months prior to or after the serum was taken. Participation was voluntary. Interviews were conducted individually to guarantee the full privacy of the research participants. Blood samples were collected from all

individuals who were treated with different therapeutic strategies. This study was approved by the Human and Animal Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul (accession number: 1721/2010-UFMS).

HBV/HCV/HDV serology

Serum samples of 77 participants were tested for anti-HCV, anti-HDV, anti-HIV, hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B core antibody (anti-HBc) and hepatitis B surface antibody (anti-HBs) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (bioMérieux bv, Boxtel, the Netherlands). Patients with results initially reactive to any infection marker were subjected to the new collection and sera were tested in duplicate. Anti-HCV and anti-HIV antibody positive samples were retested by "line immunoassay" (III INNO-LIA HCV Ab, Innogenetics, Belgium) and Western Blot assay, respectively. HBsAg positive samples were tested for anti-HBc IgM, HBeAg and anti-HBe detection by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA), using the Cobas® e601 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to manufacturer's instructions.

Genome extraction and amplification

HBsAg positive samples were submitted to DNA extraction using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Germany), according to manufacturer's instructions. After precipitation, the pellet was dried and resuspended in 50 µL of Elution Buffer. The pre-S/S genome region was amplified by semi-nested PCR. The primer pair used in the first round were PS1 (5'-CCATATTCTTGGGAACAAGA-3', nucleotide position 2826-2845) and P3 (5'-AAAGCCCCAAAAGACCCACAA-3', nucleotide position 1019-1000). The second round was conducted using one sense primer (PS1) and a mixture of two anti-sense primers S2 (5'-GGGTTTAAATGTATACCCAAAA-3', nucleotide position 819-841), and S22 (5'-GTATTTAAATGGATACCCACAGA-3', 819–841). After an initial denaturation step (3 min at 94°C), DNA was amplified using 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1m30s, followed by a final elongation step (7 min at 72°C). The first round of amplification was performed with 1 µL of DNA and one unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, San Diego, CA) in a final volume of 25 µL. The second round of amplification was performed in a final volume of 50 µL, using 1 µL of the first round PCR product, sense primer S1 (5'-CTTCTCGAGGACTGGGGACC-3', 124–143) and antisense primers S2 and S22, under the following conditions: an initial denaturation step (3 min at 94°C), followed by 30 cycles of

95°C for 30 s, 52°C for 10 s, and 72°C for 2 min, followed by a final elongation step (7 min at 72°C), as previously described (MELLO *et al.*, 2012 BMC). The lower detection limit of the PCR assay was 100 copies/mL. Ten microliters of amplification product (about 1,200 bp in length) was loaded on 2% agarose gels, electrophoresed, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. PCR products were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Pr omega, Madison, USA), and were prepared for sequencing using a Big Dye terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with external primers PS1 and S2/S22, internal sense primer S4 and anti-sense primer S7. Sequencing reactions were processed using an ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were aligned using the ClustalW program and the phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method using MEGA version 4.0 software with bootstrap value of 1,000 replications (TAMURA *et al.*, 2007). Results are expressed as mean $\pm$ SD. Data were analyzed by independent sample t-tests. Fisher's exact tests and Student's t-tests were used for comparison of groups. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

In the present study, serum samples from 77 HBsAg-positive patients were studied. The main baseline patient characteristics of the study population are shown in Table 1. Of 77 HBsAg-positive patients, 41 (53.3%) were males and 36 (46.7%) were females. Mean patient age was 42 years with a range of 17 to 68 years. Among the 77 patients with chronic hepatitis B, 20 (25.9%) were declared under the use of NAs. Among them, 1 patient was undergoing a LAM monotherapy regimen and 5 patients were receiving combination therapy of LAM plus tenofovir (TDF), adefovir (ADV) or entecavir (ETV). HBV-DNA was detected in 50/77 (64.9%) HBV chronically infected patients. Of those with detectable HBV viraemia, 88% (44/50) were not taking any antiviral treatment and 80% of them had normal ALT values.

Table 1: Main baseline characteristics of 77 HBsAg-positive patients, Campo Grande-MS

Characteristic	N=77	%
Gender		
Female	36	46.7
Male	41	53.3
Age (years)		
≤ 25	11	14.3
26 – 35	13	16.8
36 – 45	22	28.6
46 – 55	20	26.0
> 55	11	14.3
Placeofbirth		
MS	43	55.8
Otherstates	34	44.2
Family Income (Minimum wage¹)		
< 1	3	3.9
1–3	51	66.2
≥ 4	23	29.9
Number of people per household		
1	8	10.4
2 – 4	54	70.1
5 – 10	15	19.5
Treatment		
Patientsunder LAM monotherapy	1	
Patientsunder TDF monotherapy	6	
Patientsunder ETV monotherapy	8	
Patients under TDF + LAM combination therapy	3	
Patients under ADF + LAM combination therapy	1	
Patients under ETV + LAM combination therapy	1	
Previous TDF use	1	
Previous LAM use	1	
Median time of LAM use(months)	24	
Median time of TDF use(months)	24	
Median time of ADF use(months)	60	
Median time of ETV use(months)	13	

LAM = lamivudine; TDF = tenofovir; ADF = adefovir; ETV = entecavir

Among 77 HBsAg positive patients, 7.8% (6/77) were HBeAg positive and 71 (92.2%) were positive for anti-HBe. Biochemical and virological profiles of these 77 patients revealed approximately 38% of them had alanine aminotransferase of up to 1.0 times the normal level (upper limit 40 U/L) and 63.3% had HBV-DNA viral load more than 50 UI/mL (Table 2). There was no statistically significant difference between HBeAg status in terms of gender, age, ALT levels, HBV-DNA viral load and genotype ($P > 0.05$). Table 2

Table 2 - Characteristics and genotypes among HBV-infected patients, according to HBeAg status.

status.

Variable	HBeAg		P ^a
	Positive (n= 6)	Negative (n= 71)	
Gender			
Female(n=36)	2	34	0.40
Male (n=41)	4	37	
Age (years)			
≤ 45	4	44	0.59
> 45	2	27	
ALT levels*			
Normal	5	38/61	0.29
Elevated	1	23/61	
HBV DNA viral load**			
< 50 UI/mL	1	5/60	0.56
> 50 UI/mL	5	38/60	
Genotype**			
A	1/3	18/41	0.52
D	2/3	18/41	
C	-	1/41	
F	-	4/41	

Of 77 HBV chronically HBV-infected patients, 6 (7.8%) had HIV co-infection. Among them, the mean CD4 T-cell count was 724.6 (± 465.9) cells/ μ l. A total of 33.3% of patients had elevated ALT values and only one (16.6%) was HBeAg positive (Table 3).

Only one (1.3%) anti-HDV positive patient was identified. Current HDV infection was confirmed by PCR and genotype of this case was determined to be HDV-1 by phylogenetic sequence analysis. No patient had HCV infection.

Table 3 - Characteristics and genotypes among HBV/HIV-infected patients

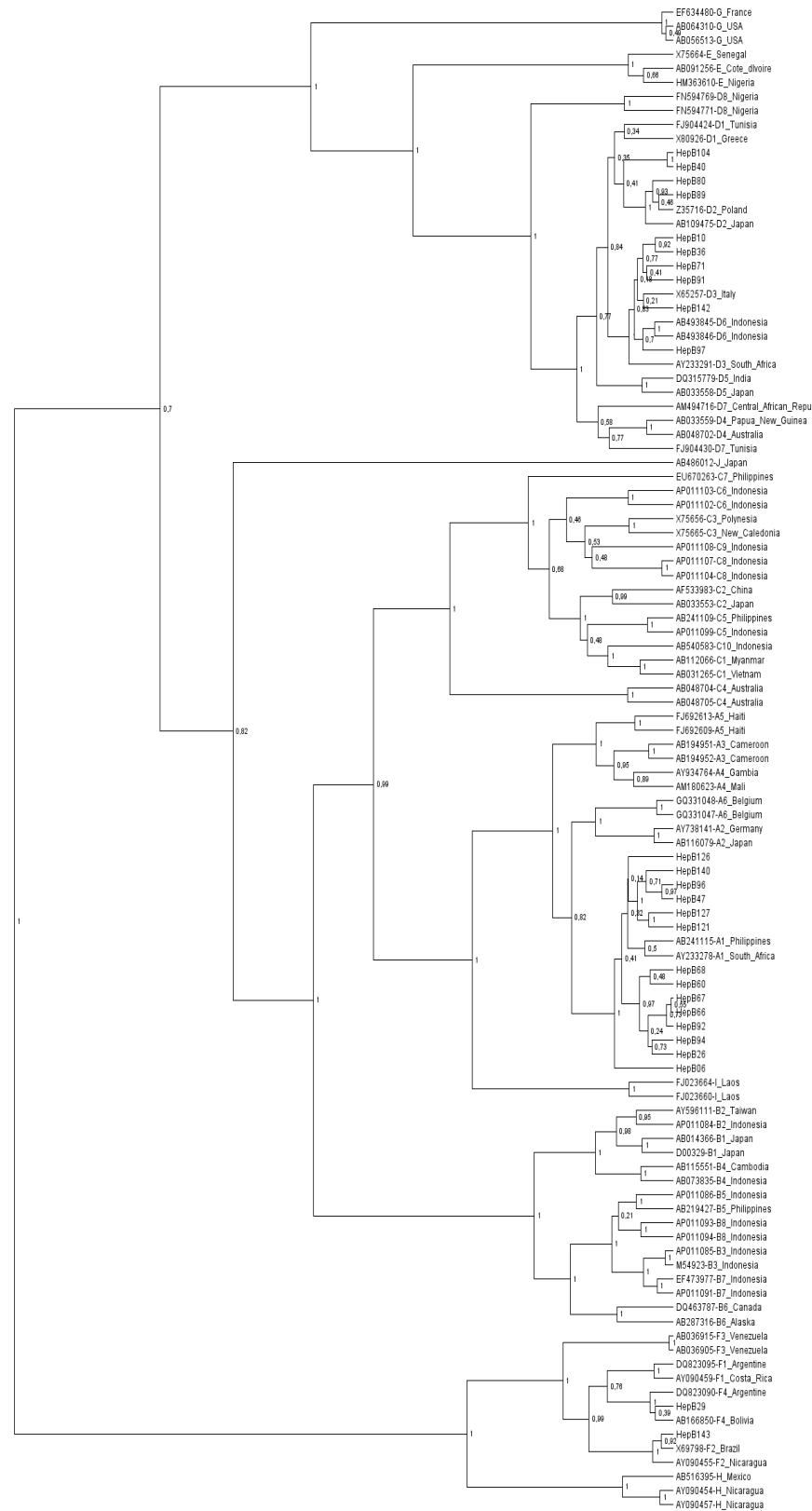
Patient	HBV-DNA Viral load (UI/ml)	Genotype	HBeAg	ALT	Time of LAM use (months)	TDF	CD4 (cell/μl)
Hep 37	ND	ND	Nonreactive	N	1	1	1276
Hep 49	ULD	D2	Nonreactive	1X	24	24	422
Hep 56	533	ND	Reactive	N	36	36	709
Hep 74	ND	ND	Nonreactive	N	6	6	433
Hep 112	413	ND	Nonreactive	1X	24	1	1303
Hep 124	46	ND	Nonreactive	N	8	8	205

ND: not done

ULD: under limit of detection

HBV-DNA was positive in 64.9% (50/77) of patients and the HBV genotype was determined in 44 of 50 patients which presented detectable viral load. In 27 cases, the HBV-DNA viral load was undetectable by PCR. A phylogenetic analysis showed the predominance of two HBV genotypes, D (45.4%) and A (43.2%), and genotype F was found in 9.1%. Among genotype A samples, 8/19 (42.1%) were classified as subgenotype A1, 15.7% as subgenotype A3 and 15.7% as subgenotype A4. The subgenotype distribution from genotype D was: D2 (40%), D6 (35%) and D3 (5%). A phylogenetic analysis of genotype F samples assigned 3/4 (75%) to subgenotype F2 and 1/4 (25%) to subgenotype F4. Only one isolate clustered with genotype C (2.3%) and was isolated from a Japanese descendant patient who had been infected by sexual transmission. A phylogenetic tree based on the 72 representative HBV genetic sequences, analyzed with GenBank accession numbers is presented in Figure 1. No obvious differences were observed in gender and HBeAg positive rate between HBV/A and HBV/D infected patients ($P > 0.05$).

Figure 1 – Neighbor-joining phylogenetic tree based on complete Large S gene from 25 Brazilian HBV chronically infected patients (HepB) and 72 reference strains with different genotypes retrieved from GenBank. The numbers at the nodes represent the bootstrap support values (% obtained for 1,000 replicates)



YMDD mutation rate and type

Polymerase region sequencing was performed on 25 of the 77 patients. No patient was coinfecting with HIV. The YMDD mutation was detected in 2 (8%) out of 25 HBV isolates. The mutation type was YVDD. These patients (HepB 40 and HepB 104) developed the double rtL180M + rtM204V lamivudine-resistance mutation and the additional rtV173L mutation, which is also associated with lamivudine resistance. These patients were on ETV monotherapy varying from 12 to 24 months, with low HBV-DNA viral load. Although these patients had LAM-resistant mutations, they had never received LAM treatment. In addition, the genotype of these patients was D2 and both of them were positive for anti-HBe. In the P region and in comparison with the reference gene, 11 amino acid substitutions (D07A, Y13H, I91L, I103V, N124H, L129M, Q139N, M145L, K149Q, Y151F, Y221F) were detected in most of the genotype D isolates. The amino acid substitution V207L was found in 2/4 isolates classified as genotype F. Among patients undergoing treatment with TDF monotherapy (2/25) and ETV monotherapy (4/25), no TDF resistance mutations or ETV resistance mutations were found. There was no significance difference in the frequency of polymerase mutations in HBV from HBeAg^{+ve} and HBeAg^{-ve} individuals. Also, univariate analysis revealed genotype A was associated with detectable HBV-DNA viremia (HBV-DNA > 50 IU/mL). The demographic and clinical features of the study group are summarized in Table 4.

Table 4 – Mutational patterns in the polymerase gene of HBV chronic patients

Patients	HBV-DNA UI/ml	Genotype	HBeAg	ALT	LAM	TDF	ETV	3TC resistance mutations
Hep 6	40,000	A4	Nonreactive	1X	NA	NA	3	wt
Hep 10	864	D6	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 26	4,770	A4	Nonreactive	1X	NA	NA	1	wt
Hep 29	3,640	F4	Nonreactive	1X	NA	1	NA	wt
Hep 36	198,000	D6	Nonreactive	1X	NA	NA	NA	wt
Hep 40	53	D2	Nonreactive	1X	NA	NA	24	L180M/M204V/V173L
Hep 47	205	A1	Nonreactive	1X	NA	6	NA	wt
Hep 60	87	A1	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 66	49,000	D	Reactive	1x	NA	NA	NA	wt
Hep 67	50,000	A1	Reactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 68	2,010	A1	Nonreactive	1X	NA	NA	NA	wt
Hep 71	165	A	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 80	ND	D2	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 89	1,900	D2	Reactive	1x	NA	NA	NA	wt
Hep 91	ND	D	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 94	52,300	D	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 96	ND	F2	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 97	69	D2	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 104	94	D2	Nonreactive	N	NA	NA	12	L180M/M204V/V173L
Hep 121	2,549	A1	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 126	32,000	A1	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 127	25,200	A1	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 140	34,000	A1	Nonreactive	N	NA	NA	NA	wt
Hep 142	4,424	D3	Nonreactive	1X	NA	NA	NA	wt
Hep 143	77	F2	Nonreactive	N	24	NA	NA	wt

Discussion

This is the first molecular epidemiological study on HBV infection among chronic HBV infected-patients carried out in Mato Grosso do Sul, Central-West Brazil.

In contrast with other studies, presence of HBeAg in chronic HBV-infected patients was not associated with gender, age, ALT levels, HBV DNA viraemia or HBV genotypes.

The indications for hepatitis B infection treatment are based mainly on the combination of three criteria: serum HBV-DNA levels (above 2000 IU/mL) and/or serum

ALT levels (above the upper limit of normal/ULN) and liver biopsy (moderate to severe active necroinflammation and/or fibrosis histological grade A2 or stage F2 by METAVIR scoring) (ZHUANG, 2012). Only 22% of patients with detectable viremia who met treatment criteria were taking antiviral drugs

The results of this study demonstrated HBV genotypes D and A with subgenotypes A1 and D2/D6, respectively, are predominant in chronic HBV-infected patients from Mato Grosso do Sul, Central-West Brazil. Our findings (of genotypes D, A and F) are consistent with previous studies on the distribution of HBV genotypes in Brazil. This could be the consequence of the intensely migratory and highly miscegenated character of the Brazilian population (MELLO *et al.*, 2007; MOTTA-CASTRO *et al.*, 2008; ARAUJO *et al.*, 2004). One genotype C case was identified in a Japanese descendant patient, noting that the presence of this genotype has been described in Asian descendants living in Brazil, but was never previously described in our region (MELLO *et al.*, 2007).

Hepatitis D virus (HDV) infection is a widespread disease that has affected a large number of populations with hepatitis B virus (HBV) infection. The epidemiology of HDV and HBV are very similar but with some differences. HDV is distributed worldwide with more than 24% of HBV carriers having HDV markers. The Mediterranean region, Southwest Asia, and parts of Africa are endemic for HDV infection (GAETA *et al.*, 2000). In Brazil, the hepatitis delta endemic areas correspond to the Western Amazon states, including Rondonia State (BONINO *et al.*, 1985; FONSECA *et al.*, 1988; LIAW *et al.*, 1990; TORRES, 1996). Low prevalence of HDV infection among chronic HBV patients was observed.

In HBV/HIV coinfecting patients, the indications for therapy are the same as in HIV negative patients. In agreement with recent HIV guidelines, recommendations state that most coinfecting patients should simultaneously receive treatment for both HIV and HBV therapy. Lamivudine and tenofovir have activities against both infections and are contraindicated as single agents for hepatitis B in coinfecting patients. In contrast with other studies, prolonged use of lamivudine does not lead to YMDD mutations among the HBV/HIV coinfecting patients under studied.

Our results also indicated that YVDD mutation (L180M/M204V/V173L) occurred in low frequency in this study. The emergence of mutations on the P gene in HBV chronically infected patients has already been described in several studies (BENHAMOU *et al.*, 1999; WOLTERS *et al.*, 2002; AUDSLEY *et al.*, 2009). The clinical course of hepatitis B in patients with lamivudine-resistant mutants is variable and the long-term outcome remains to be determined. In some patients, emergence of lamivudine-resistant mutants may be

accompanied by acute exacerbations of liver disease and rarely hepatic decompensation (BARTHOLOMEW *et al.*, 1997; DIENSTAG *et al.*, 2003; LIAW *et al.*, 1999; TIPPLES *et al.*, 1996). Despite resistance to lamivudine, detected in 2 patients with YVDD mutants, HBV DNA viral load and ALT levels were low. This might have resulted from the decreased replication efficiency of the mutants (LIAW *et al.*, 2000; MELEGARI; SCAGLIONI; WANDS, 1998; ONO-NITA *et al.*, 1999).

The correlation between the emergence rate of lamivudine resistance and HBV genotypes remains unclear and conflicting data have been reported (ZHENG *et al.*, 2003; CHENG, 2006; ZHENG *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2006). Naturally occurring YMDD motif variants were detected in 2 patients infected with genotype D. A comparison relating different HBV genotypes was not able to be performed since the study was conducted in a genotype D dominant group.

Although all the YMDD mutations occurred in patients with genotype D, the relationship between YMDD mutation and HBV genotypes was not able to be performed since the study was conducted in a genotype D dominant group and in the small number of cases of this mutation.

Additionally, all patients with YMDD mutation were anti-HBe positive. However this relationship was not statistically significant, this result does not accord with several studies (KOBAYASHI, IDE, SATA, 2003, DA SILVA *et al.*, 2000; YE, WANG, GUO, 2002) but accord with the study of Da Silva *et al.*, 2000.

Although mutations in YMDD motif increase during lamivudine treatment, many studies reported this mutation could also be spontaneous (TSUBOTA, 2006). Sequence analysis showed the triple substitution rtL180M + rtM204V + rtV173L lamivudine-resistance mutations, detected in only 2 individuals, did exist naturally among these patients. Furthermore, the presence of mutants resistant to LAM in chronic hepatitis B patients not treated with lamivudine, highlights the need for the inclusion of tenofovir (TDF) or entecavir (ETV), to which these mutants are sensitive, in the treatment regimen of these patients (MELLO *et al.*, 2012). Tan *et al.* (2012) observed gender and age were not related with spontaneous YMDD mutations, suggesting pathogen factors rather than host genetic factors are the determinants of natural YMDD mutants.

As expected, none of the patients had been exposed to TDF treatment. Our data are also consistent with the absence of TDF-associated mutations (rtA194T + rtL180M + rtM204V) reported by other studies (SHELDON *et al.*, 2005; AUDSLEY *et al.*, 2009).

In our study genotype A had a positive correlation with detectable HBV-DNA viral load and this is associated with high viral load which facilitates viral transmission (KIDDLUNGREN *et al.*, 2006).

In conclusion, this study demonstrates that Central-West Brazilian CHB patients are infected mainly with HBV genotypes D and A. Also this is the first report to demonstrate HBV/HDV coinfection and a low rate of the natural YMDD motif mutant occurrence in lamivudine-untreated HBV carrier monoinfected patients from Central-West Brazil.

REFERENCES

ALLEN, M. I.; DESLAURIERS, M.; ANDREWS, C. W.; TIPPLES, G. A.; WALTERS, K. A.; TYRRELL, D. L.; BROWN, N.; CONDREAY, L. D. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. **Hepatology**, v. 27, n. 6, p. 1670-7, Jun. 1998.

ARAUJO, N. M.; MELLO, F. C.; YOSHIDA, C. F.; NIEL, C.; GOMES, S. A. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. **Archives of Virology**, v. 149, n. 7, p. 1383-95, Jul. 2004.

AUDSLEY, J.; ARRIFIN, N.; YUEN, L. K.; AYRES, A.; CROWE, S. M.; BARTHOLOMEUSZ, A.; LOCARNINI, S. A.; MIJCH, A.; LEWIN, S. R.; SASADEUSZ, J. Prolonged use of tenofovir in HIV/hepatitis B virus (HBV)-coinfected individuals does not lead to HBV polymerase mutations and is associated with persistence of lamivudine HBV polymerase mutations. **HIV Medicine**, v. 10, n. 4, p. 229-35, Apr. 2009.

BARTHOLOMEW, M. M.; JANSEN, R. W.; JEFFERS, L. J.; REDDY, K. R.; JOHNSON, L. C.; BUNZENDAHL, H.; CONDREAY, L. D.; TZAKIS, A. G.; SCHIFF, E. R.; BROWN, N. A. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. **The Lancet**, v. 349, n. 9044, p. 20-2, Jan 4. 1997.

BENHAMOU, Y.; BOCHET, M.; THIBAUT, V.; DI MARTINO, V.; CAUMES, E.; BRICAIRE, F.; OPOLON, P.; KATLAMA, C.; POYNARD, T. Long-term incidence of hepatitis B virus resistance to lamivudine in human immunodeficiency virus-infected patients. **Hepatology**, v. 30, n. 5, p. 1302-6, Nov. 1999.

BONINO, F.; CAPORASO, N.; DENTICO, P.; MARINUCCI, G.; VALERI, L.; CRAXI, A.; ASCIONE, A.; RAIMONDO, G.; PICCININO, F.; ROCCA, G. Familiar clustering and spreading of hepatitis delta virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 1, n. 3, p. 221-226, 1985.

CHAYAMA, K.; SUZUKI, Y.; KOBAYASHI, M.; TSUBOTA, A.; HASHIMOTO, M.; MIYANO, Y.; KOIKE, H.; KOIDA, I.; ARASE, Y.; SAITOH, S.; MURASHIMA, N.;

IKEDA, K.; KUMADA, H. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. **Hepatology**, v. 27, n. 6, p. 1711-6, Jun. 1998.

CHENG, Y.; SEET, B. L.; ONG, C. S.; WASSER, S.; TAN, T. M.; PETER, F. J.; LIM, S. G. Are in vitro hepatitis B core promoter mutations important for clinical alterations in viral load? **Antiviral Research**, v. 69, n. 3, p. 142-51, Mar. 2006.

DA SILVA, L. C.; DA FONSECA, L. E.; CARRILHO, F. J.; ALVES, V. A.; SITNIK, R.; PINHO, J. R. Predictive factors for response to lamivudine in chronic hepatitis B. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 42, p. 189-196, 2000.

DIENSTAG, J. L.; GOLDIN, R. D.; HEATHCOTE, E. J.; HANN, H. W.; WOESSNER, M.; STEPHENSON, S. L.; GARDNER, S.; GRAY, D. F.; SCHIFF, E. R. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. **Gastroenterology**, v. 124, n. 1, p. 105-117, Jan, 2003.

DIENSTAG, J. L.; SCHIFF, E. R.; MITCHELL, M.; CASEY, D. E.; GITLIN, N.; LISSOOS, T.; GELB, L. D.; CONDREAY, L.; CROWTHER, L.; RUBIN, M.; BROWN, N. Extended lamivudine retreatment for chronic hepatitis B: maintenance of viral suppression after discontinuation of therapy. **Hepatology**, v. 30, n. 4, p. 1082-1087, Oct, 1999.

FONSECA, J. C.; SIMONETTI, S. R.; SCHATZMAYR, H. G.; CASTEJÓN, M. J.; CESÁRIO, A. L.; SIMONETTI, J. P. Prevalence of infection with hepatitis delta virus (HDV) among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 3, p. 469-471, 1988.

GAETA, G. B.; STROFFOLINI, T.; CHIARAMONTE, M.; ASCIONE, T.; STORNAIUOLO, G.; LOBELLO, S.; SAGNELLI, E.; BRUNETTO, M. R.; RIZZETTO, M. Chronic hepatitis D: a vanishing Disease? An Italian multicenter study. **Hepatology**, v. 32, n. 4, pt. 1, p. 824-827, Oct, 2000.

KIDD-LJUNGGREN, K.; HOLMBERG, A.; BLACKBERG, J.; LINDQVIST, B. High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 4, p. 352-7, Dec. 2006.

KIRSCHBERG, O.; SCHUTTLER, C.; REPP, R.; SCHAEFER, S. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus—e no types A-F. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, n. 1, p. 39-43, Jan. 2004.

KOBAYASHI, S.; IDE, T.; SATA, M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. **Journal of Hepatology**, v. 34, p. 584-586, 2003.

KRAMVIS, A.; KEW, M. C. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 12, n. 5, p. 456-64, Sep. 2005.

LI, Y. H.; HE, Y. F.; JIANG, W. Q.; WANG, F. H.; LIN, X. B.; ZHANG, L.; XIA, Z. J.; SUN, X. F.; HUANG, H. Q.; LIN, T. Y.; HE, Y. J.; GUAN, Z. Z. Lamivudine prophylaxis

reduces the incidence and severity of hepatitis in hepatitis B virus carriers who receive chemotherapy for lymphoma. **Cancer**, v. 106, n. 6, p. 1320–1325, 2006.

LIAW, Y. F.; CHIEN, R. N.; YEH, C. T.; TSAI, S. L.; CHU, C. M. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. **Hepatology**, v. 30, n. 2, p. 567-572, Aug, 1999.

LIAW, Y. F.; CHIU, K. W.; CHU, C. M.; SHEEN, I. S.; HUANG, M. J. Heterosexual transmission of hepatitis delta virus in the general population of an area endemic for hepatitis B virus infection: a prospective study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 5, p. 1170-1172, Nov, 1990.

LIAW, Y. F.; LEUNG, N. W.; CHANG, T. T.; GUAN, R.; TAI, D. I.; NG, K. Y.; CHIEN, R. N.; DENT, J.; ROMAN, L.; EDMUNDSON, S.; LAI, C. L. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. **Gastroenterology**, v. 119, n. 1, p. 172-180, Jul, 2000.

McMAHON, B. J. Natural history of chronic hepatitis B. **Clinical in Liver Diseases**, v. 14, n. 3, p. 381-96, Aug. 2010.

McMAHON, B. J. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. **Hepatology International**, v. 3, n. 2, p. 334-42, Jun. 2009.

MELEGARI, M.; SCAGLIONI, P. P.; WANDS, J. R. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. **Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 628-633, Feb, 1998.

MELLO, F. C.; SOUTO, F. J.; NABUCO, L. C.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; COELHO, H. S.; FRANZ, H. C.; SARAIVA, J. C.; VIRGOLINO, H. A.; MOTTA-CASTRO, A. R.; MELO, M. M.; MARTINS, R. M.; GOMES, S. A. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiology**, v. 7, n. p. 103, 2007.

MELLO, F. C.; LAGO, B. V.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; FERNANDES, C. A.; GOMES, S. A. Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and chronically infected patients. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 96, Jun 6. 2012.

MOTTA-CASTRO, A. R.; MARTINS, R. M.; ARAUJO, N. M.; NIEL, C.; FACHOLI, G. B.; LAGO, B. V.; MELLO, F. C.; GOMES, S. A. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. **Archives of Virology**, v. 153, n. 12, p. 2197-205, 2008.

NAITO, H.; HAYASHI, S.; ABE, K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.1, p. 362-364, 2001.

ONO-NITA, S. K.; KATO, N.; SHIRATORI, Y.; MASAKI, T.; LAN, K. H.; CARRILHO, F. J.; OMATA, M. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication

and lamivudine resistance: A study by in vitro full-length viral DNA transfection. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 939-945, Mar, 1999.

RONCATO, M.; BALLARDIN, P. A. Z.; LUNGE, V. R. Influence on its genotypes of the treatment for type B hepatitis: review. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre & Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 28, n. 3, p. 188-193, 2008.

SHELDON, J.; CAMINO, N.; RODES, B.; BARTHOLOMEUSZ, A.; KUIPER, M.; TACKE, F.; NUNEZ, M.; MAUSS, S.; LUTZ, T.; KLAUSEN, G.; LOCARNINI, S.; SORIANO, V. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. **Antiviral Therapy**, v. 10, n. 6, p. 727-34, 2005.

SONG, M. N.; HONG, M. Z.; LUO, D. Q.; HUANG, W. Q.; MIN, F.; FAN, R. H.; WU, W. B.; ZHANG, L. Efficacy of 3 years of adefovir monotherapy in chronic hepatitis B patients with lamivudine resistance. **World Journal of Hepatology**, v. 4, n. 12, p. 389-93, Dec 27, 2012.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-9, Aug. 2007.

TAN, Y.; DING, K.; SU, J.; TRINH, X.; PENG, Z.; GONG, Y.; CHEN, L.; CUI, Q.; LEI, N.; CHEN, X.; YU, R. The naturally occurring YMDD mutation among patients chronically infected HBV and untreated with lamivudine: a systematic review and meta-analysis. **PLOS One**, v. 7, n. 3, p. e32789, 2012.

TIPPLES, G. A.; MA, M. M.; FISCHER, K. P.; BAIN, V. G.; KNETEMAN, N. M.; TYRRELL, D. L. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. **Hepatology**, v. 24, n. 3, p. 714-717, Sep, 1996.

TORRES, J. R. Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America. **Gut**, v. 38, n. 2, p. 48-55, 1996.

TSUBOTA, A. How do naturally occurring YMDD-motif mutants influence the clinical course of lamivudine-naïve patients with chronic hepatitis B virus infection? **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 12, p. 1769-71, Dec. 2006.

USUDA, S.; OKAMOTO, H.; TANAKA, T.; KIDD-LJUNGGREN, K.; HOLLAND, P. V.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Differentiation of hepatitis B virus genotypes D and E by ELISA using monoclonal antibodies to epitopes on the preS2-region product. **Journal of Virology Methods**, v. 87, n. 1-2, p. 81-9, Jun. 2000.

WEISS, J.; WU, H.; FARRENKOPF, B.; SCHULTZ, T.; SONG, G.; SHAH, S.; SIEGEL, J. Real time TaqMan PCR detection and quantitation of HBV genotypes A-G with the use of an internal quantitation standard. **Journal of Clinical and Virology**, v. 30, n. 1, p. 86-93, May. 2004.

WOLTERS, L. M.; NIESTERS, H. G.; HANSEN, B. E.; VAN der ENDE, M. E.; KROON, F. P.; RICHTER, C.; BRINKMAN, K.; MEENHORST, P. L.; de MAN, R. A. Development of

hepatitis B virus resistance for lamivudine in chronic hepatitis B patients co-infected with the human immunodeficiency virus in a Dutch cohort. **Journal of Clinical and Virology**, v. 24, n. 3, p. 173-181, Apr, 2002.

YAN, M. H.; ZHANG, C.; LING, Q.; ZHOU, R. F. Detection of YMDD motif mutations in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B. **Zhonghua Ganzangbing Zazhi**, v. 11, p. 430-431, 2003.

YE, X. G.; WANG, R. L.; GUO, H. B. Detection and analysis of YMDD mutate genes in patients of chronic hepatitis B before being treated. **Zhonghua Jianyan Yixue Zazhi**, v. 25, p. 248, 2002.

ZHENG, M.; CAI, W.; WENG, H.; LIU, R. Determination of serum fibrosis indexes in patients with chronic hepatitis and its significance. **Chinese Medical Journal**, v. 116, n. 3, p. 346-349, 2003.

ZHENG, P. Y.; ZHANG, D. Y.; LU, G. F.; YANG, P. C.; QI, Y. M.; WANG, B. S. Effects of lamivudine on the function of dendritic cells derived from patients with chronic hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 34, p. 4641-4645, 2007.

ZHUANG, H. Updates of EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 20, n. 6, p. 427-9, Jun. 2012.

6 DISCUSSÃO

A discussão referente aos trabalhos desenvolvidos será discutida de acordo com a população estudada.

- Doadores de sangue do Centro de Hematologia de Mato Grosso do Sul (Hemosul);
- Portadores de hepatite B crônica atendidos nos centros de referência de Campo Grande.

A hepatite B é uma das doenças infecciosas mais comuns e já infectou dois bilhões de pessoas em todo o mundo, incluindo cerca de 400 milhões de casos de infectados cronicamente (LOK; MCMAHON, 2007; EASL, 2012). O sangue é uma das principais fontes de transmissão do vírus da hepatite B (HBV) e os riscos de transmissão via transfusional ainda persistem (DWYRE *et al.*, 2011), apesar das tecnologias mais avançadas e da melhora na triagem de doadores de sangue. A hepatite B continua a ser a mais frequente infecção viral transmitida por transfusão (CANDOTTI *et al.*, 2011, GUTIÉRREZ-GARCÍA *et al.*, 2011).

O primeiro artigo, relacionado ao estudo conduzido em primodoadores de Mato Grosso do Sul e intitulado Decrease in hepatitis B prevalence among blood donors in Central-West Brazil, foi submetido e aceito para publicação no *The Journal of Venous Animals and Toxins including Tropical Diseases* (artigo 1).

Em 1971, a testagem do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) foi introduzida para a triagem de doadores de sangue e, depois de 1986, a pesquisa de anti-HBc foi implementada para reduzir ainda mais o risco de propagação de agentes infecciosos (SILVEIRA *et al.*, 2011). Em virtude de sua gravidade, a Organização Mundial de Saúde recomenda exame na triagem pré-transfusional para diagnosticar os possíveis portadores hepatite B e os que já tiveram contato com a mesma através da pesquisa do HBsAg e do anti-HBc total respectivamente.

A prevalência da infecção pelo HBV na população em geral varia em diferentes regiões do mundo. Embora o Brasil seja considerado um país de intermediária endemicidade algumas áreas são altamente endêmicas, como é o caso da região amazônica (PEREIRA *et al.*, 2009).

No Brasil, a prevalência dentre os doadores de sangue varia de 0,3% a 1,5% para HBsAg e de 3,7% a 11,1% para anti-HBc (SILVEIRA *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*; 2008; ANJOS *et al.*, 2011).

O risco de infecção pós transfusional é uma realidade e a redução da prevalência de marcadores associados à infecção pelo vírus da hepatite B é um importante relato. Neste estudo a prevalência de infecção pelo HBV considerando a detecção dos anticorpos anti-HBc totais foi de 3,04 (IC 95%: 2.7 – 3.4) e do HBsAg 0.19% (IC 95%: 0.1 – 0.3) o que demonstra a presença de infecção pelo HBV em primodoadores.

Em 2001 Aguiar e colaboradores em estudo realizado no mesmo Hemocentro encontrou a prevalência de 9,4% de anti-HBc total e 1,1% de HBsAg. Este fato comparado ao estudo atual revela um importante declínio.

A prevalência da infecção pelo HBV depende de vários fatores, como a prevalência do vírus na população geral e a sensibilidade dos testes utilizados.

Quanto aos testes utilizados na década passada esses já apresentavam sensibilidade similar aos atuais e, além disso, as amostras foram processadas no mesmo laboratório utilizado como referência na hemorrede de Mato Grosso do Sul.

A causa do declínio é multifatorial e pode estar associada com aumento de programas de vacinação na população geral, maiores estratégias de segurança em bancos de sangue e melhor qualidade dos dados. Nos últimos anos muitos estudos têm mostrado tendência para o declínio da infecção pelo HBV dentre doadores de sangue. . De acordo com Niederhauser *et al.* (2008), campanhas de imunização são eficientes para reduzir o risco de Hepatite B pós transfusional.

No estudo multicêntrico de base populacional para investigação de infecção pelo vírus da hepatite B a região Centro-Oeste, foi classificada região como sendo de baixa endemicidade (PEREIRA *et al.*, 2009). Entretanto, estudos anteriores definiam essa região como de endemicidade intermediária. Essa importante redução reflete uma soroprevalência significativamente menor de infecção por HBV dentre os doadores de sangue mostrados anteriormente por Aguiar *et al.*, em 2001.

A soroprevalência da infecção pelo HBV aumentou significativamente com o aumento da idade. A prevalência mais baixa nos doadores com idade inferior a 30 anos pode ser associada com o impacto da vacinação contra hepatite B, que se iniciou no princípio da década de 1990 no Brasil. Além disso, uma alta prevalência em doadores com idades mais avançadas indica um tempo muito maior para a exposição viral. Estes dados encontram-se de acordo com O'Brien *et al.* (2008), Nkrumah (2011) e Seo *et al.* (2011).

A análise estatística não mostrou diferença significativa na prevalência de infecção pelo HBV de acordo com o gênero. Esse achado também foi reportado por Japhet *et al.* (2011), Nascimento *et al.* (2008) e Ataallah *et al.* (2011).

Nossos resultados mostram a importância de atualização constante da prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B. A queda significativa na prevalência do HBV entre 2001 e 2010, dentre os primodoadores sugere uma melhora no recrutamento e pré-triagem de doadores, além do impacto dos programas de vacinação o que consequentemente resultou em redução no índice de infecção na população em geral. Felizmente, estes resultados refletem a segurança dos produtos derivados do sangue e também traz novas estratégias de controle e prevenção da infecção pelo HBV.

O segundo artigo, ainda relacionado ao estudo conduzido em primodoadores de Mato Grosso do Sul e intitulado Occult hepatitis B: a risk for blood transfusion, encontra-se em fase de submissão para a revista *Transfusion* (artigo 2).

A preocupação com a qualidade do sangue fornecido pelos hemocentros é uma realidade mundial e com o avanço tecnológico dos métodos de diagnóstico laboratoriais, novas entidades clínicas tornam-se foco de preocupação com necessidade de investigação detalhada (NIEDERHAUSER *et al.*, 2008).

Uma nova entidade clínica tem sido definida como a persistência de HBV-DNA na ausência do antígeno de superfície (HBsAg). Essa condição pode aumentar o risco de infecção pós transfusional (LARRUBIA, 2011). A hepatite B oculta pode ser diagnosticada apenas pela detecção do vírus da hepatite B por meio do teste de ácido nucleico (NAT), que é realizada em centros de transfusão de sangue de vários países (NIEDERHAUSER, 2011), porém, essa nova metodologia ainda não é realizada em todos os hemocentros brasileiros.

A despeito de sua importância clínica potencial, a epidemiologia da infecção oculta pelo HBV ainda é desconhecida sendo que o conhecimento da prevalência é a primeira etapa o para a compreensão e associação com o verdadeiro significado clínico.

Mecanismos como período de janela da infecção por HBV, a presença de vírus que são geneticamente mutados, marcada redução na replicação e expressão de genes virais, tentam explicar a persistência de genomas do HBV sem HBsAg no sangue de indivíduos aparentemente saudáveis (ZOULIM, 2005).

Capezzuto *et al.* (2010) identificaram dois casos de infecção oculta pelo HBV onde o sequenciamento das regiões S e pré-core do genoma do HBV revelaram a presença de mutações, além da carga viral baixa na circulação. Confirmando esses resultados, recentemente outros autores também relataram mutações e baixa carga viral na circulação de doadores de sangue aparentemente saudáveis, com hepatite B oculta (GARCÍA-MONTALVO; VENTURA-ZAPATA, 2011; LIU *et al.*, 2010;. MANZINI *et al.*, 2007; PANIGRAHI *et al.*, 2011;. SEO *et al.*, 2011;THEJA *et al.*, 2010, ZHENG *et al.*, 2011).

O presente estudo conduzido em doadores de sangue aparentemente saudáveis, a prevalência de positividade para o HBV-DNA em doadores de sangue HBsAg negativo e com anti-HBc total positivo, foi de 10,52%. Este índice configura a presença de infecção oculta pelo vírus da hepatite B, com potencial de transmitir esta infecção por meio da transfusão e representa o dado mais recente que, conseqüentemente, foi realizada com o teste molecular moderno.

Nossos resultados são considerados altos, uma vez que a região central do Brasil é uma área de baixa endemicidade para vírus da hepatite B. No que diz respeito à taxa de infecção oculta pelo vírus da hepatite B a partir de doadores de sangue, a prevalência varia entre 0% e 30% em diferentes regiões do mundo (BELTRAN *et al.*, 2011; PANIGRAHI *et al.*, 2011; DELAVARI *et al.*, 2011), ou mesmo em áreas diferentes em um mesmo país (BHATTACHARYA *et al.*, 2007, ASIM *et al.*, 2010).

De acordo com os estudos sobre a infecção oculta pelo vírus da hepatite B em doadores de sangue, a grande variedade de tal prevalência não é totalmente compreendida e pode ser consequência de fatores virológicos, imunológicos, metodológicos, epidemiológicos e características imunogenéticas (GARCIA-MONTALVO; VENTURA-ZAPATA, 2011). Além disso, a diversidade étnica da população estudada, diferentes métodos de detecção de HBsAg ou anti-HBc, diferentes genótipos e subgenótipos do HBV e características regionais, são condições que podem influenciar a prevalência da hepatite B oculta (HENNING *et al.*, 2002; JAFARZADEH *et al.*, 2008; ISMAIL *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012).

Foi documentado que áreas de baixa, média ou alta endêmicidade têm diferentes taxas de infecção oculta pelo HBV. É rara a prevalência de infecção oculta em doadores de sangue em regiões com baixa endemicidade HBV (HENNING *et al.*, 2002). Na Província Central do Irã, considerada uma região de baixa prevalência para o HBV, dos 531 casos, 11 (2,1%) tinham anti-HBc total isolado e o HBV-DNA não foi detectado em nenhum dos casos (SOFIAN *et al.*, 2010).

Considerando-se as regiões de elevada prevalência da infecção por HBV, onde o anti-HBc varia entre 18,3% a 43,4%, o HBV-DNA foi detectado em elevada percentagem de amostras com até 30% de detecção (BHATTACHARYA *et al.*, 2007; ALSHARKAWY *et al.*, 2010; THEDJA *et al.*, 2010; ASIM *et al.*, 2010; PANIGRAHI *et al.*, 2011).

Por outro lado, algumas publicações demonstraram prevalência muito baixa de infecção oculta pelo vírus da hepatite B variando entre 0,15% e 1,1% na Índia (ISMAIL *et al.*, 2011; MAHESWARI *et al.*, 2012; MAKROO *et al.*, 2012), 0,016 % na Coreia (SEO *et al.*, 2011) e 3,4% na China (YUAN *et al.*, 2010), que são regiões de alta endemicidade para o

HBV. É importante destacar que na Índia Panigrahi *et al.* (2011) registrou 30,1% do total de doações eram antiHBc positivas o que indica um índice muito elevado de exposição ao HBV, dentre esses 30% eram também HBV DNA positivos. No mesmo país, outro estudo realizado por Makroo *et al.* (2012) mostrou que apenas 0,15% de doadores com anti-HBc positivos e HBsAg-negativo tinham a presença de HBV-DNA nos seus soros.

Em concordância com o nosso índice elevado de infecção oculta, em vários estudos foram encontrados alta prevalência de infecção oculta pelo vírus da hepatite B em áreas de baixa endemicidade. Jafarzadeh *et al.* 2008 examinou 270 soros HBsAg negativo obtido de doadores de sangue saudáveis de região não endêmica no Irã e a positividade para o anti-HBc total foi de 5,18%. A prevalência de infecção oculta pelo HBV em doadores de sangue saudáveis foi de 28,57% (4/14). Ainda, na mesma região classificada com de baixa endemicidade, Delavari *et al.* 2011 encontraram 29,7% de infecção oculta pelo HBV em doadores de sangue.

Preconizadas por Garcia-Montalvo e Ventura-Zapata (2011), alta prevalência do DNA do HBV entre doadores de sangue HBsAg negativos do México é particularmente significativo, porque o México é considerado uma região de baixa prevalência de HBV. No Cairo, Egito, considerando a baixa endemicidade, a prevalência de anti-HBc em HBsAg negativos foi de 13,3% (20/150) e o HBV-DNA foi detectado em 2/20 (20%) (EL-SHERIF *et al.*, 2007).

O Brasil é um país de grandes dimensões e a região Centro-oeste é considerada uma área de baixa endemicidade para a infecção pelo vírus da hepatite B (NASCIMENTO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2009). No entanto, bolsões de alta endemicidade de HBV foram relatados na Amazônia (BRAGA *et al.*, 2012), Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo (SOUTO, 1999) e em comunidades afro-descendentes de Mato Grosso do Sul (MOTTA-CASTRO *et al.*, 2003).

Dentre os doadores de sangue no Brasil, a prevalência de anti-HBc varia entre 3,7% a 11,1% (GONÇALES *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2008; SILVEIRA, 2011; ANJOS *et al.*, 2011) e poucos estudos têm sido realizados sobre hepatite B oculta nessa população. Wolff *et al.*, 2011 não encontraram um único caso de hepatite B oculta em suas amostras anti-HBc positivas do Sul do Brasil. Os autores referem que as amostras de sangue foram coletados entre 1995 e 1997, e acreditam que a prevalência de hepatite B oculta seria diferente se amostras mais recentes fossem testados. Na mesma região, analisando amostras coletadas em 2001, o HBV-DNA foi detectado em 5/150 (3,3%) das amostras de anti-HBc positivas (SILVA *et al.*, 2005). Em São Paulo, Sudeste do Brasil, Arraes *et al.* (2001) não encontraram

HBV-DNA positivo em amostras coletadas de agosto de 1994 a julho de 1997. Outro estudo, no Nordeste do Brasil, Arraes *et al.* (2003), relataram que 3/107 (2,80%) de doadores de sangue tinham vírus da hepatite B oculta.

O nosso resultado de 10,52% de infecção oculta pelo vírus da hepatite B em primodoadores aparentemente saudáveis representam o dado mais recente que, conseqüentemente, foi obtido com um teste molecular moderno.

É interessante ressaltar que em nosso estudo a infecção aumentou com a idade, por outro lado, nossos resultados mostraram uma percentagem estatisticamente significativa de maior positividade de HBV DNA (18,57%) entre os doadores mais jovens com idade inferior a 29 anos. Maior proporção de infecção oculta foi encontrada em grupo mais jovem, também foi relatado por Panigrahi *et al.* (2011). Os doadores mais jovens foram vacinados contra a hepatite B na infância e muitos são indivíduos sexualmente ativos, o que teoricamente poderia explicar a maior exposição ao vírus e a possibilidade da presença de mutantes selecionados pela resposta da pressão imunológica. No entanto, isso requer um estudo mais aprofundado.

Em conclusão, nosso estudo apoia a presença de infecção oculta pelo HBV em doadores de sangue aparentemente saudáveis negativos para o antígeno da superfície da hepatite B e sugere que as variações na prevalência de infecção oculta da hepatite B é muito mais complexa do que a diferença de endemicidade de anti-HBc. Maior ênfase deve ser dada para essa nova entidade clínica, pois a infecção oculta pelo vírus da hepatite B ainda é um risco para a transfusão de sangue o que reforça a necessidade de estabelecimento de triagem do sangue com testes mais sensíveis como o teste de ácido nucléico (NAT).

Considerando que as estratégias de controle de qualquer doença dependem primariamente do conhecimento da epidemiologia da infecção, a caracterização do perfil soropidemiológico e molecular da infecção pelo HBV representa uma grande contribuição no processo de implementação de estratégias de controle dessa doença.

O terceiro artigo intitulado *Genotypes and YMDD mutations of hepatitis B virus among chronic hepatitis B patients in Central-West Brazil*, conduzido nos pacientes portadores crônicos da infecção pelo HBV de nossa região encontra-se em processo de submissão.

O conhecimento molecular do vírus da hepatite B tem permitido cada vez mais a correlação com a evolução e prognóstico da doença. Estudos têm sugerido diferenças nas respostas terapêuticas entre genótipos do HBV e evolução da doença (MCMAHON, 2009).

Análises de divergência de sequências genômicas do HBV levou à identificação de 10 genótipos que variam de A a J, que apresentam variações na distribuição geográfica e tem

características diversas (RONCATO; BALLARDIN; LUNGE, 2008). O Brasil é um país geograficamente dividido em várias regiões que foram colonizadas por diferentes origens étnicas. Portanto, a distribuição dos genótipos do HBV pode ser diferente nessas regiões. Os genótipos mais frequentes são A, D, E e F, mas genótipos C e G foram também relatadas no nosso país (SITNIK *et al.*, 2004; MELLO *et al.*, 2007; MOTTA-CASTRO *et al.*, 2008).

Os resultados deste estudo mostraram que os genótipos A e D, bem como os subgenótipos A1 e D2/D6, respectivamente, são predominantes nos pacientes cronicamente infectados estudados. A detecção dos genótipos A, D e F são consistentes com estudos anteriores sobre a distribuição de genótipos do HBV no Brasil (TONETTO *et al.*, 2009, SITNIK *et al.*, 2004). Este poderia ser em consequência do caráter migratório intenso e altamente miscigenado da população brasileira (MELLO *et al.*, 2007; MOTTA-CASTRO *et al.*, 2008; ARAUJO *et al.*, 2004). Além disso, estudos conduzidos no Brasil em pacientes cronicamente infectados pelo HBV também relatam o predomínio do genótipo D, seguido pelos genótipos A e F (REZENDE *et al.*, 2005; HADDAD *et al.*, 2010).

O genótipo C foi identificado em um paciente com descendência asiática, sendo este o primeiro relato do encontro deste genótipo em nossa região. Diversos estudos conduzidos em diferentes regiões do Brasil, tanto em portadores crônicos do HBV quanto na população brasileira em geral observaram a presença deste genótipo em descendentes asiáticos que vivem no Brasil (SITNIK *et al.*, 2004; MELLO *et al.*, 2007; BOTTECHIA *et al.*, 2008, DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A população oriental geralmente encontra-se infectada por isolados pertencentes aos genótipos B e C do HBV. Pacientes infectados com estes genótipos apresentam pior prognóstico, com progressão mais frequente para cirrose e carcinoma hepatocelular (KAO *et al.*, 2000). A infecção pelo genótipo C é mais severa que pelo genótipo B (KAO *et al.*, 2000) e o genótipo C está associado com maior taxa de mutação na região core promoter associado com maior patogenicidade (DING *et al.*, 2001).

A infecção pelo vírus da hepatite D (HDV) é uma doença generalizada que afeta um grande número de pacientes infectados pelo HBV. A epidemiologia do HDV e HBV é muito semelhante, mas com algumas diferenças. Estima-se que 18 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo VHD entre os 350 milhões de portadores crônicos do HBV no mundo. Apresenta distribuição geográfica variada sendo endêmico na região do Mediterrâneo, no Sudoeste da Ásia, e em partes da África (GAETA *et al.*, 2000). No Brasil, as áreas endêmicas de hepatite D correspondem aos estados da Amazônia Ocidental, incluindo Rondônia (BONINO *et al.*, 1985; FONSECA *et al.*, 1988; LIAW *et al.*, 1990; TORRES, 1996). Baixa

prevalência de infecção pelo VHD entre pacientes crônicos do HBV foi observada, apenas um (1,3%) paciente foi identificado como anti-HDV positivo.

A infecção pelo HIV tem um impacto negativo em todas as fases da história natural da Hepatite B, levando a progressão mais rápida da doença hepática para fibrose, maiores níveis séricos de HBV DNA, e menor taxa de perda do HBsAg (PUOTI *et al.*, 2006; KONOPNICKI *et al.*, 2005), além do aumento do risco de carcinoma hepatocelular em pacientes com contagem de células CD4 mais baixas (PUOTI *et al.*, 2006; KONOPNICKI *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2011). É importante ressaltar que a Hepatite B crônica não interfere na progressão da Aids (KONOPNICKI *et al.*, 2005) mas o inverso é verdadeiro. A prevalência mundial de coinfeção HBV/HIV varia de 5 a 10% (THIO, 2009). Em estudos conduzidos no Brasil, as taxas de prevalência de coinfeção variaram de 1,6% a 8,5% (MENDES-CORREA *et al.*, 2000; MONTEIRO *et al.*, 2004; TOVO *et al.*, 2006; ZAGO *et al.*, 2007; PORTELINHA FILHO *et al.*, 2009). Apesar do número limitado de pacientes cronicamente infectados pelo HBV estudados, a prevalência da coinfeção HBV/HIV encontrada foi de 7,8%.

Todos os seis pacientes portadores da coinfeção HBV/HIV faziam uso de medicação antirretroviral e o valor médio de células CD4 no momento do início do estudo era superior a 500 células/mm³. As recomendações atuais consideram o benefício do início mais precoce de terapia antirretroviral em pessoas infectadas pelo HIV e assintomáticas, em virtude da coinfeção com o HBV. As recomendações de tratamento são as mesmas dos pacientes HIV negativos e o uso de medicamentos como a lamivudina e o tenofovir, que tenham atuação nos dois vírus é o recomendado (BRASIL, 2011).

Vários medicamentos estão licenciados para o tratamento da hepatite B crônica. Os objetivos do tratamento antiviral incluem a prevenção da cirrose, evitar a descompensação hepática e o carcinoma hepatocelular. O tratamento prolongado com medicamentos antivirais análogos de nucleosídeo/nucleotídeo, está frequentemente associado a uma elevada ocorrência de mutações em diferentes regiões do genoma do HBV com consequente resistência viral ao tratamento (YILDIZ *et al.*, 2011, LOCARNINI; ZOULIM, 2010).

A utilização de lamivudina, análogo de nucleosídeo de uso oral, por longo prazo é a causa mais importante de fracasso de tratamento e pode levar ao aparecimento de mutações no motivo YMDD (tirosina-metionina-aspartato-aspartato) (YILDIZ *et al.*, 2011; LAI *et al.*, 2003). Neste estudo, nossos resultados indicaram que a mutação YMDD, tipo YVDD (M204V) acompanhada pela dupla mutação L180M/V173L ocorreu em 8% das amostras estudadas. O aparecimento de mutações no motivo YMDD na região da polimerase em

pacientes cronicamente infectados por HBV já foi descrita em vários estudos (BENHAMOU *et al.*, 1999; WOLTERS *et al.*, 2002; AUDSLEY *et al.*, 2009). O curso clínico da hepatite B em pacientes com mutantes resistentes à lamivudina é variável. Em alguns pacientes, o surgimento de mutantes pode ser acompanhado de episódios agudos de doença hepática e raramente descompensação hepática (BARTHOLOMEW *et al.*, 1997; DIENSTAG *et al.*, 2003; LIAW *et al.*, 1999, TIPPLES *et al.*, 1996). Apesar da resistência a lamivudina ter sido detectada em apenas 2 pacientes com mutantes YVDD, os níveis de HBV DNA (viremia) e os níveis de ALT apresentaram-se baixos. Estes resultados indicam que apesar da resistência a lamivudina, alguns pacientes com mutação YMDD apresentam níveis de HBV DNA e ALT significativamente baixos. Isto pode ser resultado da diminuição da eficiência da replicação dos mutantes (LIAW *et al.*, 2000; MELEGARI *et al.*, 1998, ONO-NITA *et al.*, 1999).

Embora a taxa de ocorrência das mutações YMDD aumentem durante o tratamento com lamivudina, muitos estudos relataram que esta mutação também pode ser espontânea e ocorrer naturalmente, podendo variar de 0% a 27,7% para portadores assintomáticos e de 0% a 26,9% entre os portadores HBV crônicos (KOBAYASHI *et al.*, 2001; MATSUDA *et al.*, 2004; TSUBOTA, 2006; TAN *et al.*, 2012). Análise da sequência mostrou que a substituição tripla rtL180M + rtM204V + rtV173L da resistência a lamivudina foram detectadas em apenas dois indivíduos (8%), que não fizeram uso prévio desta medicação. Além disso, a presença de mutantes resistentes ao LAM em doentes com hepatite B crônica não tratada com lamivudina indica a necessidade de inclusão no regime terapêutico de tenofovir (TDF) ou entecavir (ETV), para que estes mutantes sejam adequadamente suprimidos (MELLO *et al.*, 2012). Tan *et al.* (2012) observaram que o gênero e idade não foram relacionadas com mutações espontâneas na região YMDD sugerindo que fatores associados ao patógeno em vez de fatores genéticos do hospedeiro são os determinantes de mutantes naturais no motivo YMDD da região da polimerase.

A correlação entre a taxa de surgimento de resistência à lamivudina e genótipos do HBV permanece obscura e dados divergentes têm sido publicados (ZHENG, 2003; CHENG, 2006; ZHENG, 2007; YAN, 2003 e LI, 2006). Apesar da ocorrência da mutação YMDD em pacientes infectados pelo HBV genótipo D, a relação entre a mutação YMDD e genótipos do HBV não pôde ser determinada, em virtude da não ocorrência desta mutação em pacientes infectados pelo genótipo A do HBV. Além disso, todos os pacientes com a mutação espontânea YMDD eram HBeAg negativos e anti-HBe positivos. Este resultado está de acordo com os resultados encontrados em diversos estudos provavelmente pelo fato de que

mutações YMDD não estão relacionadas com mutações da região pré-core (KOBAYASHI *et al.*, 2003, 2001, SILVA *et al.*, 2000; DA EYE *et al.*, 2002),

Interessantemente, a mutação V207L foi encontrada em dois pacientes classificados como genótipo F. Um desses pacientes faz uso de monoterapia com lamivudina há 24 meses. Um estudo conduzido na Itália relatou a presença e persistência de M204I em um paciente que havia deixado de usar lamivudina há 24 meses seguido da emergência de um novo e distinto tipo de YMDD mutante, nomeado de M204V, V207L (ORLANDO *et al.*, 2008).

Dentre os pacientes que faziam uso de tenofovir (2/25) e entecavir (4/25), nenhum apresentou mutação de resistência a estes antivirais. Nossos dados são consistentes com a ausência de mutações associadas ao uso do ETV e TDF (I169T, T184G, S202G/I, M250V e A194T) relatados por outros estudos (SHELDON *et al.*, 2005; AUDSLEY *et al.*, 2009).

Em conclusão, este é o primeiro estudo que demonstra a distribuição dos genótipos do HBV e a prevalência da coinfecção HBV/HDV em pacientes cronicamente infectados pelo HBV. Além disso, demonstrou baixa taxa de ocorrência natural de mutantes na região YMDD em pacientes com hepatite B crônica monoinfectados e não tratados com lamivudina no Centro-Oeste do Brasil.

7 CONCLUSÕES

- A prevalência de infecção pelo HBV em primodoadores de sangue foi de 3,04% (95% CI: 2.7-3.4) para anti-HBc total e 0,19% (95% CI: 0.1-0.3) para o HBsAg, sugerindo a presença de infecção pelo HBV em primodoadores. Este dado demonstra o declínio significativo na prevalência da infecção pelo HBV quando comparado com as taxas de 9.4% de anti-HBc total e 1.1% de HBsAg relatada em estudo anterior (2001) conduzido no mesmo hemocentro da nossa região.
- Nos primodoadores de sangue estudados foi encontrada uma prevalência elevada de infecção oculta pelo HBV (10,52%) quando comparada às observadas nos diversos estudos conduzidos em doadores de sangue no Brasil.
- Houve o predomínio dos genótipos D (45,4%) e A (43,2%) entre os pacientes cronicamente infectados pelo HBV estudados;
- O genótipo C do HBV foi descrito pela primeira vez em nossa região no grupo de pacientes estudados.
- Mutações no motivo YMDD do tipo YVDD (rtL180M + rtM204V + rtV173L) associadas a resistência a lamivudina foram observadas em 8% dos pacientes cronicamente infectados pelo HBV, monoinfectados e não tratados com lamivudina;
- A coinfeção HBV/HDV foi detectada em 1,3% dos pacientes cronicamente infectados pelo HBV estudados.

REFERÊNCIAS

AASLD Practice Guideline Update. Chronic hepatitis B: Update 2009. **Journal of Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 1-36, 2009.

ABE, K.; THUNG, S. N.; WU, H. C.; TRAN, T. T.; LE HOANG, P.; TRUONG, K. D.; INUI, A.; JANG, J. J.; SU, I. J. Pre-S2 deletion mutants of hepatitis B virus could have an important role in hepatocarcinogenesis in Asian children. **Cancer Science**, v. 100, n. 12, p. 2249-2254, 2009.

AGUIAR, J. I.; AGUIAR, E.; PANIAGO, A.; CUNHA, R.; GALVAO, L.; DAHER, R. Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen in blood donors in the middle West region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 185-187, 2001.

AKUTA, N.; SUZUKI, F.; KOBAYASHI, M.; TSUBOTA, A.; SUZUKI, Y.; HOSAKA, T.; SOMEYA, T.; SAITOH, S.; ARASE, Y.; IKEDA, K.; KUMADA, H. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. **Journal of Hepatology**, v. 38, n. 3, p. 315-321, 2003.

ALAVIAN, S. M.; MIRI, S. M.; HOLLINGER, F. B.; JAZAYERI, S. M. Occult Hepatitis B (OBH) in Clinical Settings. **Hepatitis Monthly**, v. 12, n. 8, p. e6126, 2012.

ALLAIN, J. P. Occult hepatitis B virus infection. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 11, n. 1, p. 18-25, 2004.

ALLAIN, J. P.; HEWITT, P. E.; TEDDER, R. S.; WILLIAMSON, L. M. Evidence that anti-HBc but not HBV DNA testing may prevent some HBV transmission by transfusion. **British Journal of Haematology**, v. 107, n. 1, p. 186-195, 1999.

ALLEN, M. I.; DESLAURIERS, M.; ANDREWS, C. W.; TIPPLES, G. A.; WALTERS, K. A.; TYRRELL, D. L.; BROWN, N.; CONDREAY, L. D. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. **Hepatology**, v. 27, n. 6, p. 1670-1677, 1998.

ALMEIDA NETO, C.; 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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 4, p. 203-208, 2001.

ALSHARKAWY, E.; MAHMOUD, A.; MOKAREB, H. A.; MOHAMAD, H. I. Detection of hepatitis B viraemia in HBsAg negative blood donors. **El-Minia Medical Bulletin**, v. 21, n. 1, p. 55-65, 2010.

ANJOS, G. R. L. C.; MARTINS, R. M. B.; CARNEIRO, M. A. S.; BRUNINI, S. M.; TELES, S. A. Epidemiology of hepatitis B virus infection in first-time blood donors in the southwestern region of Goiás, central Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 1, p. 38-42, 2011.

ARABABADI, M. K.; HASSANSHAHI, G.; POURFATHOLLAH, A. A.; ZARANDI, E. R.; KENNEDY, D. Post-transfusion occult hepatitis B (OBI): a global challenge for blood recipients and health authorities. **Hepatitis Monthly**, v. 11, n. 9, p. 714-718, 2011.

ARAUJO, N. M.; MELLO, F. C.; YOSHIDA, C. F.; NIEL, C.; GOMES, S. A. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. **Archives of Virology**, v. 149, n. 7, p. 1383-95, 2004.

ARAUZ-RUIZ, P.; NORDER, H.; ROBERTSON, B. H.; MAGNIUS, L. O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 8, p. 2059-2073, 2002.

ARRAES, L. C.; XIMENES, R.; ANDRIEU, J. M.; LU, W.; BARRETO, S.; PEREIRA, L. M.; CASTELO, A. The biological meaning of anti-HBc positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 3, p. 137-140, 2003.

ASIM, M.; ALI, R.; KHAN, L. A.; HUSAIN, S. A.; SINGLA, R.; KAR, P. Significance of anti-HBc screening of blood donors and its association with occult hepatitis B virus infection: Implications for blood transfusion. **Indian Journal of Medical Research**, v. 132, p. 312-317, 2010.

ATAALLAH, T. M.; HANAN, K. A.; MAYSOUN, K. S.; SADOON, A. A. Prevalence of hepatitis B and C among blood donors attending the National Blood Transfusion Center in Baghdad, Iraq from 2006-2009. **Saudi Medical Journal**, v. 32, n. 10, p. 1046-1050, 2011.

ATTIA, M. A. Prevalence of hepatitis B and C in Egypt and Africa. **Antiviral Therapy**, v. 3, n. 3, p. 1-9, 1998.

AUDSLEY, J.; ARRIFIN, N.; YUEN, L. K.; AYRES, A.; CROWE, S. M.; BARTHOLOMEUSZ, A.; LOCARNINI, S. A.; MIJCH, A.; LEWIN, S. R.; SASADEUSZ, J. Prolonged use of tenofovir in HIV/hepatitis B virus (HBV)-coinfected individuals does not lead to HBV polymerase mutations and is associated with persistence of lamivudine HBV polymerase mutations. **HIV Medicine**, v. 10, n. 4, p. 229-235, 2009.

BADUR, S.; AKGUN, A. Diagnosis of hepatitis B infections and monitoring of treatment. **Journal of Clinical Virology**, v. 21, n. 3, p. 229-237, 2001.

BANCROFT, W. H.; MUNDON, F. K.; RUSSELL, P. K. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. **Journal of Immunological**, v. 109, n. 4, p. 842-848, 1972.

BARROS JUNIOR, G. M.; BRAGA, W. S.; OLIVEIRA, C. M.; CASTILHO MDA, C.; ARAUJO JDE, R. [Occult hepatitis B: prevalence and clinical characteristics in a population with high endemicity of hepatitis B infection in the western Brazilian Amazon region]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 596-601, 2008.

BARTHOLOMEUSZ, A.; SCHAEFER, S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. **Reviews in Medical Virology**, v. 14, n. 1, p. 3-16, 2004.

BARTHOLOMEW, M. M.; JANSEN, R. W.; JEFFERS, L. J.; REDDY, K. R.; JOHNSON, L. C.; BUNZENDAHL, H.; CONDREAY, L. D.; TZAKIS, A. G.; SCHIFF, E. R.; BROWN,

N. A. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. **The Lancet**, v. 349, n. 9044, p. 20-22, 1997.

BECK, J.; NASSAL, M. Hepatitis B virus replication. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 48-64, 2007.

BELTRAN, M.; BERRIO-PEREZ, M.; BERMUDEZ, M. I.; REY-BENITO, G.; CAMACHO, B.; FORERO, P.; MOLINA, G. C.; FALS, O.; PISCIOTTI, I.; OLIVEROS, Y.; CORTES, A.; DE LA HOZ, F. Absence of occult hepatitis B in Colombian blood donors. **Biomedica**, v. 31, v. 4, p. 580-589, 2011.

BENHAMOU, Y.; BOCHET, M.; THIBAUT, V.; DI MARTINO, V.; CAUMES, E.; BRICAIRE, F.; OPOLON, P.; KATLAMA, C.; POYNARD, T. Long-term incidence of hepatitis B virus resistance to lamivudine in human immunodeficiency virus-infected patients. **Hepatology**, v. 30, n. 5, p. 1302-136, 1999.

BERASAIN, C.; BETES, M.; PANIZO, A.; RUIZ, J.; HERRERO, J. I.; CIVEIRA, M. P.; PRIETO, J. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown aetiology. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 429-435, 2000.

BHATTACHARYA, P.; CHANDRA, P. K.; DATTA, S.; BANERJEE, A.; CHAKRABORTY, S.; RAJENDRAN, K.; BASU, S. K.; BHATTACHARYA, S. K.; CHAKRAVARTY, R. Significant increase in HBV, HCV, HIV and syphilis infections among blood donors in West Bengal, Eastern India 2004-2005: exploratory screening reveals high frequency of occult HBV infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 27, p. 3730-3733, 2007.

BHATTI, F. A.; ULLAH, Z.; SALAMAT, N.; AYUB, M.; GHANI, E. Anti-hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. **Transfusion**, v. 47, n. 1, p. 74-79, 2007.

BLACKBERG, J.; KIDD-LJUNGGREN, K. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. **Journal of Hepatology**, v. 33, n. 6, p. 992-997, 2000.

BLOQUEL, B.; JEULIN, H.; BURTY, C.; LETRANCHANT, L.; RABAUD, C.; VENARD, V. Occult hepatitis B infection in patients infected with HIV: report of two cases of hepatitis B reactivation and prevalence in a hospital cohort. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 2, p. 206-212, 2010.

BLUMBERG, B. S.; ALTER, H. J.; VISNICH, S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. **Journal of the American Medical Association**, v. 191, p. 541-546, 1965.

BLUMBERG, B. S.; SUTNICK, A. I.; LONDON, W. T. Australia antigen and hepatitis. **Journal of the American Medical Association**, v. 207, n. 10, p. 1895-1896, 1969.

BODHIPHALA, P.; CHATURACHUMROENCHAI, S.; CHIEWSILP, P.; PRUKSANANONDA, P. Detection of HBV genome by gene amplification method in HBsAg negative blood donors. **Journal of the Medical Association Thailand**, v. 82, n. 5, p. 491-495, 1999.

BONINO, F.; CAPORASO, N.; DENTICO, P.; MARINUCCI, G.; VALERI, L.; CRAXI, A.; ASCIONE, A.; RAIMONDO, G.; PICCININO, F.; ROCCA, G. Familiar clustering and spreading of hepatitis delta virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 1, n. 3, p. 221-226, 1985.

BRAGA, W. S.; CASTILHO, M. D. A. C.; BORGES, F. G.; MARTINHO, A. C.; RODRIGUES, I. S.; AZEVEDO, E. P.; SCAZUFCA, M.; MENEZES, P. R. Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 13-17, 2012.

BRASIL.Ministério da Saúde.Secretaria da Vigilância em Saúde. Departamento de DST,Aids e Hepatites virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para tratamento da hepatite viral crônica B e coinfeções**: 2011.132 p.

BRECHOT, C.; THIERS, V.; KREMSDORF, D.; NALPAS, B.; POL, S.; PATERLINI-BRECHOT, P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? **Hepatology**, v. 34, n. 1, p. 194-203, 2001.

BRUNETTO, M. R.; BONINO, F. Treatment of chronic hepatitis B: from research to clinical practice via the consensus conferences. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 17, p. 2063-2075, 2004.

CACCIOLA, I.; POLLICINO, T.; SQUADRITO, G.; CERENZIA, G.; ORLANDO, M. E.; RAIMONDO, G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 1, p. 22-26, 1999.

CANDOTTI, D.; EL CHAAR, M.; ALLAIN, J. P. Transfusion transmission of hepatitis B virus: still learning more about it. **ISBT Science Series**, v. 6, p. 234-240, 2011.

CANDOTTI, D.; ALLAIN, J. P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 4, p. 798-809, 2009.

CAO, G. W. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 46, p. 5761-5769, 2009.

CAPEZZUTO, C.; FRANCHI, E.; URBANI, S.; ROMANO, L.; FRANCHINI, M. Occult hepatitis B in blood donors: a description of two cases. **Blood Transfusion**, v. 8, n. 4, p. 297-302, 2010.

CARMAN, W. F.; KORULA, J.; WALLACE, L.; MACPHEE, R.; MIMMS, L.; DECKER, R. Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. **The Lancet**, v. 345, n. 8962, p. 1406-1407, 1995.

CARMAN, W. F.; TRAUTWEIN, C.; VAN DEURSEN, F. J.; COLMAN, K.; DORNAN, E.; MCINTYRE, G.; WATERS, J.; KLIEM, V.; MULLER, R.; THOMAS, H. C.; MANNS, M. P. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. **Hepatology**, v. 24, n. 3, p. 489-493, 1996.

CARMAN, W. F.; ZANETTI, A. R.; KARAYIANNIS, P.; WATERS, J.; MANZILLO, G.; TANZI, E.; ZUCKERMAN, A. J.; THOMAS, H. C. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. **The Lancet**, v. 336, n. 8711, p. 325-329, 1990.

CHAYAMA, K.; SUZUKI, Y.; KOBAYASHI, M.; TSUBOTA, A.; HASHIMOTO, M.; MIYANO, Y.; KOIKE, H.; KOIDA, I.; ARASE, Y.; SAITOH, S.; MURASHIMA, N.; IKEDA, K.; KUMADA, H. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. **Hepatology**, v. 27, n. 6, p. 1711-1716, 1998.

CHEMIN, I.; ZOULIM, F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**, v. 286, n. 1, p. 52-59, 2009.

CHEMIN, I.; ZOULIM, F.; MERLE, P.; ARKHIS, A.; CHEVALLIER, M.; KAY, A.; COVA, L.; CHEVALLIER, P.; MANDRAND, B.; TREPO, C. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. **Journal of Hepatology**, v. 34, n. 3, p. 447-454, 2001.

CHENG, Y.; SEET, B. L.; ONG, C. S.; WASSER, S.; TAN, T. M.; PETER, F. J.; LIM, S. G. Are in vitro hepatitis B core promoter mutations important for clinical alterations in viral load? **Antiviral Research**, v. 69, n. 3, p. 142-51, 2006.

CHIMPARLEE, N.; OOTA, S.; PHIKULSOD, S.; TANGKIJVANICH, P.; POOVORAWAN, Y. Hepatitis B and hepatitis C virus in Thai blood donors. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 42, n. 3, p. 609-615, 2011.

CHIOU, H. L.; LEE, T. S.; KUO, J.; MAU, Y. C.; HO, M. S. Altered antigenicity of 'a' determinant variants of hepatitis B virus. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2639-2645, 1997.

CHOLONGITAS, E.; PAPATHEODORIDIS, G. V.; BURROUGHS, A. K. Liver grafts from anti-hepatitis B core positive donors: a systematic review. **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 2, p. 272-279, 2010.

CHU, C. J.; KEEFFE, E. B.; HAN, S. H.; PERRILLO, R. P.; MIN, A. D.; SOLDEVILA-PICO, C.; CAREY, W.; BROWN, R. S., JR.; LUKETIC, V. A.; TERRAULT, N.; LOK, A. S. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. **Hepatology**, v. 38, n. 3, p. 619-628, 2003.

CHU, C. M.; LIAW, Y. F. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: appreciably high rates during a long-term follow-up. **Hepatology**, v. 45, n. 5, p. 1187-1192, 2007.

COFFIN, C. S.; MICHALAK, T. I. Persistence of infectious hepadnavirus in the offspring of woodchuck mothers recovered from viral hepatitis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 2, p. 203-212, 1999.

CONJEEVARAM, H. S.; LOK, A. S. Occult hepatitis B virus infection: a hidden menace? **Hepatology**, v. 34, n. 1, p. 204-206, 2001.

CONTRERA-MORENO, L.; DE ANDRADE, S. M.; PONTES, E. R.; STIEF, A. C.; POMPILO, M. A.; MOTTA-CASTRO, A. R. Hepatitis B virus infection in a population

exposed to occupational hazards: firefighters of a metropolitan region in central Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 463-467, 2012.

COUROUCE-PAUTY, A. M.; PLANCON, A.; SOULIER, J. P. Distribution of HBsAg subtypes in the world. **Vox Sanguinis**, v. 44, n. 4, p. 197-211, 1983.

DA SILVA, L. C.; DA FONSECA, L. E.; CARRILHO, F. J.; ALVES, V. A.; SITNIK, R.; PINHO, J. R. Predictive factors for response to lamivudine in chronic hepatitis B. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 42, p. 189-196, 2000.

DANE, D. S.; CAMERON, C. H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. **The Lancet**, v. 1, n. 7649, p. 695-698, 1970.

DE LA FUENTE, R. A.; GUTIERREZ, M. L.; GARCIA-SAMANIEGO, J.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, C.; LLEDO, J. L.; CASTELLANO, G. Pathogenesis of occult chronic hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1543-1548, 2011.

DELAVARI, M.; SHAHABI-NEJAD, N.; RENZAHO, A. M. N.; ZAHEDI, M. J.; OWHADI, A. R. Frequency of Anti-HBc & HBV DNA detection in blood donors of Kerman province, Iran. **Journal of Blood Disorders and Transfusion**, v. 2, p. 105, 2011.

DEVESA, M.; LOUREIRO, C. L.; RIVAS, Y.; MONSALVE, F.; CARDONA, N.; DUARTE, M. C.; POBLETE, F.; GUTIERREZ, M. F.; BOTTO, C.; PUJOL, F. H. Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 1, p. 20-26, 2008.

DEVESA, M.; PUJOL, F. H. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. **Virus Research**, v. 127, n. 2, p. 177-184, 2007.

DEVESA, M.; RODRIGUEZ, C.; LEON, G.; LIPRANDI, F.; PUJOL, F. H. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. **Journal of Medical Virology**, v. 72, n. 3, p. 377-384, 2004.

DHRUVA, G. A.; AGRAVAT, A. H.; PUJARA, K. M. Seroprevalence of HIV, HBV, HCV and syphilis in blood donors in saurashtra region of Gujarat: declining trends over a period of 3½ years. **Online Journal of Health and Allied Sciences**, v.11, n. 1, p. 1-2, 2012.

DICKSON, R. C.; EVERHART, J. E.; LAKE, J. R.; WEI, Y.; SEABERG, E. C.; WIESNER, R. H.; ZETTERMAN, R. K.; PRUETT, T. L.; ISHITANI, M. B.; HOOFNAGLE, J. H. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. **Gastroenterology**, v. 113, n. 5, p. 1668-1674, 1997.

DIENSTAG, J. L.; GOLDIN, R. D.; HEATHCOTE, E. J.; HANN, H. W.; WOESSNER, M.; STEPHENSON, S. L.; GARDNER, S.; GRAY, D. F.; SCHIFF, E. R. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. **Gastroenterology**, v. 124, n. 1, p. 105-117, 2003.

DIENSTAG, J. L.; SCHIFF, E. R.; MITCHELL, M.; CASEY, D. E., JR.; GITLIN, N.; LISSOOS, T.; GELB, L. D.; CONDREAY, L.; CROWTHER, L.; RUBIN, M.; BROWN, N.

Extended lamivudine retreatment for chronic hepatitis B: maintenance of viral suppression after discontinuation of therapy. **Hepatology**, v. 30, n. 4, p. 1082-1087, 1999.

DOS ANJOS, G. R.; MARTINS, R. M.; CARNEIRO, M. A.; BRUNINI, S. M.; TELES, S. A. Epidemiology of hepatitis B virus infection in first-time blood donors in the southwestern region of Goiás, central Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 1, p. 38-42, 2011.

DURRO, V.; QYRA, S. Trends in prevalence of hepatitis B virus infection among Albanian blood donors, 1999-2009. **Virology Journal**, v. 8, p. 96, 2011.

DWYRE, D. M.; FERNANDO, L. P.; HOLLAND, P. V. Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. **Vox Sanguinis**, v. 100, n. 1, p. 92-98, 2011.

EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v. 50, n. 2, p. 227-242, 2009.

EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 1, p. 167-185, 2012.

EL-SHERIF, A. M.; ABOU-SHADY, M. A.; AL-HIATMY, M. A.; AL-BAHRAWY, A. M.; MOTAWEA, E. A. Screening for hepatitis B virus infection in Egyptian blood donors negative for hepatitis B surface antigen. **Hepatology International**, v. 1, n. 4, 469-470, 2007.

FANG, Y.; SHANG, Q. L.; LIU, J. Y.; LI, D.; XU, W. Z.; TENG, X.; ZHAO, H. W.; FU, L. J.; ZHANG, F. M.; GU, H. X. Prevalence of occult hepatitis B virus infection among hepatopathy patients and healthy people in China. **Journal of Infection**, v. 58, n. 5, p. 383-388, 2009.

FERREIRA, R. C.; RODRIGUES, F. P.; TELES, S. A.; LOPES, C. L.; MOTTA-CASTRO, A. R.; NOVAIS, A. C.; SOUTO, F. J.; MARTINS, R. M. Prevalence of hepatitis B virus and risk factors in Brazilian non-injecting drug users. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 4, p. 602-609, 2009.

FIGUEIRO-FILHO, E. A.; SENEFFONTE, F. R.; LOPES, A. H.; DE MORAIS, O. O.; SOUZA JUNIOR, V. G.; MAIA, T. L.; DUARTE, G. [Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 181-187, 2007.

FLINK, H. J.; VAN ZONNEVELD, M.; HANSEN, B. E.; DE MAN, R. A.; SCHALM, S. W.; JANSSEN, H. L. Treatment with Peg-interferon alpha-2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. **American Journal of Gastroenterology**, v. 101, n. 2, p. 297-303, 2006.

FONSECA, J. C. History of viral hepatitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 322-330, 2010.

FONSECA, J. C.; SIMONETTI, S. R.; SCHATZMAYR, H. G.; CASTEJÓN, M. J.; CESÁRIO, A. L.; SIMONETTI, J. P. Prevalence of infection with hepatitis delta virus (HDV)

among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 3, p. 469-471, 1988.

FRANCOIS, G.; KEW, M.; VAN DAMME, P.; MPHAHLELE, M. J.; MEHEUS, A. Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? **Vaccine**, v. 19, n. 28-29, p. 3799-3815, 2001.

FUKUDA, R.; ISHIMURA, N.; KUSHIYAMA, Y.; MORIYAMA, N.; ISHIHARA, S.; CHOWDHURY, A.; TOKUDA, A.; SAKAI, S.; AKAGI, S.; WATANABE, M.; FUKUMOTO, S. Hepatitis B virus with X gene mutation is associated with the majority of serologically "silent" non-b, non-c chronic hepatitis. **Microbiology and Immunology**, v. 40, n. 7, p. 481-488, 1996.

GADANO, A.; DARUICH, J.; CHEINQUER, H.; FAIMBOIN, H.; PESSOA, M.; TANNO, H.; MATTOS, A.; SILVA, M.; PARANA, R.; GALOPPO, C.; PORTA, G.; GARASSINI, M.; FERRANDIZ, J.; DAVALOS, M.; GALDAME, O.; MARCIANO, S.; BALLERGA, E. G.; BESSONE, F.; HERNANDEZ, N.; FASSIO, E.; PONIACHIK, J.; STRAUSS, E. Latin American guideline for the management of chronic hepatitis B. **Acta Gastroenterologica Latinoamericana**, v. 41, n. 4, p. 340-350, 2011.

GAETA, G. B.; STROFFOLINI, T.; CHIARAMONTE, M.; ASCIONE, T.; STORNAIUOLO, G.; LOBELLO, S.; SAGNELLI, E.; BRUNETTO, M. R.; RIZZETTO, M. Chronic hepatitis D: a vanishing Disease? An Italian multicenter study. **Hepatology**, v. 32, n. 4, p. 824-827, 2000.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 11, p. 1118-1129, 2004.

Garcia-Montalvo BM, Ventura-Zapata LP. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico. **Annals of Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 133-141, 2011.

GERLICH, W. H.; BREMER, C.; SANIEWSKI, M.; SCHUTTLER, C. G.; WEND, U. C.; WILLEMS, W. R.; GLEBE, D. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. **Digestive Disease**, v. 28, n. 1, p. 116-125, 2010.

GERLICH, W. H.; GLEBE, D.; SCHUTTLER, C. G. Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 14 Suppl 1, n. p. 16-21, 2007.

GERLICH, W. Hepatitis B surface proteins. **Journal of Hepatology**, v. 13, Suppl 4, p. S90-S92, 1991.

GERMAIN, M.; GOLDMAN, M. Blood donor selection and screening: strategies to reduce recipient risk. **American Journal of Therapeutics**, v. 9, n. 5, p. 406-410, 2002.

GLEBE, D.; URBAN, S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 22-38, 2007.

GOMES, S. A.; NIEL, C. M. G. Hepatites Virais. In: Introdução á VIROLOGIA HUMANA. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.11, p.331-356, 2008.

GUNTHER, S.; FISCHER, L.; PULT, I.; STERNECK, M.; WILL, H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. **Advances in Virus Research**, v. 52, p. 25-137, 1999.

GUTIERREZ-GARCIA, M. L.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. M.; LLEDO-NAVARRO, J. L.; BUHIGAS-GARCIA, I. Prevalence of occult hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1538-1542, 2011.

HADZIYANNIS, S. J.; VASSILOPOULOS, D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 34, n. 4, p. 617-624, 2001.

HARIA, M.; BENFIELD, P. Interferon-alpha-2a. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of viral hepatitis. **Drugs**, v. 50, n. 5, p. 873-896, 1995.

HARRISON, T. J. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. **Seminars in Liver Disease**, v. 26, n. 2, p. 87-96, 2006.

HENKLER, F. F.; KOSHY, R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 3, n. 3, p. 109-121, 1996.

HENNIG, H.; PUCHTA, I.; LUHM, J.; SCHLENKE, P.; GOERG, S.; KIRCHNER, H. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2637-2641, 2002.

HOLLINGER, F. B. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. **Transfusion**, v. 48, n. 5, p. 1001-1026, 2008.

HOLLINGER, F. B.; SOOD, G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2010.

HUANG, H. P.; HSU, H. Y.; CHEN, C. L.; NI, Y. H.; WANG, H. Y.; TSUEI, D. J.; CHIANG, C. L.; TSAI, Y. C.; CHEN, H. L.; CHANG, M. H. Pre-S2 deletions of hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma in children. **Pediatric Research**, v. 67, n. 1, p. 90-94, 2010.

HUI, C. K.; CHEUNG, W. W.; ZHANG, H. Y.; AU, W. Y.; YUENG, Y. H.; LEUNG, A. Y.; LEUNG, N.; LUK, J. M.; LIE, A. K.; KWONG, Y. L.; LIANG, R.; LAU, G. K. Kinetics and risk of de novo hepatitis B infection in HBsAg-negative patients undergoing cytotoxic chemotherapy. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 59-68, 2006.

HUI, C. K.; SUN, J.; AU, W. Y.; LIE, A. K.; YUENG, Y. H.; ZHANG, H. Y.; LEE, N. P.; HOU, J. L.; LIANG, R.; LAU, G. K. Occult hepatitis B virus infection in hematopoietic stem cell donors in a hepatitis B virus endemic area. **Journal of Hepatology**, v. 42, n. 6, p. 813-819, 2005.

HUNT, C. M.; MCGILL, J. M.; ALLEN, M. I.; CONDREAY, L. D. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. **Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 1037-1044, 2000.

HUO, T. I.; WU, J. C.; LEE, P. C.; CHAU, G. Y.; LUI, W. Y.; TSAY, S. H.; TING, L. T.; CHANG, F. Y.; LEE, S. D. Sero-clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. **Hepatology**, v. 28, n. 1, p. 231-236, 1998.

HUY, T. T.; USHIJIMA, H.; QUANG, V. X.; WIN, K. M.; LUENGROJANAKUL, P.; KIKUCHI, K.; SATA, T.; ABE, K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 2, p. 283-292, 2004.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division IUMS. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>>. Acesso em 11 dez. 2012.

ISER, D. M.; SASADEUSZ, J. J. Current treatment of HIV/hepatitis B virus coinfection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. 5, p. 699-706, 2008.

ISMAIL, A. M.; DEVAKUMAR, S.; ANANTHARAM, R.; FLETCHER, G. J.; SUBRAMANI, T.; JOHN, G. T.; DANIEL, D.; ABRAHAM, P. Low frequency of occult hepatitis B infection in anti-HBc seropositive blood donors: experience from a tertiary care centre in South India. **Blood Transfusion**, v. 10, n. 2, p. 230-232, 2012.

JAFARZADEH, A.; KAZEMI-ARABABADI, M.; MIRZAEI, M.; POURAZAR, A. Occult hepatitis B virus infection among blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. **Acta Medica Iranica**, v. 46, n. 1, p. 27-32, 2008.

JANSSEN, H. L.; BERK, L.; VERMEULEN, M.; SCHALM, S. W. Seizures associated with low-dose alpha-interferon. **The Lancet**, v. 336, n. 8730, p. 1580, 1990.

JAPHET, M. O.; ADESINA, O. A.; DONBRAYE, E.; ADEWUMI, M. O. Hepatitis B core IgM antibody (anti-HBcIgM) among hepatitis B surface antigen (HBsAg) negative blood donors in Nigeria. **Virology Journal**, v. 8, n. p. 513, 2011.

JARDIM, R. N.; GONCALES, N. S.; PEREIRA, J. S.; FAIS, V. C.; GONCALES JUNIOR, F. L. Occult hepatitis B virus infection in immunocompromised patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 300-305, 2008.

JONGERIUS, J. M.; WESTER, M.; CUYPERS, H. T.; VAN OOSTENDORP, W. R.; LELIE, P. N.; VAN DER POEL, C. L.; VAN LEEUWEN, E. F. New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays. **Transfusion**, v. 38, n. 1, p. 56-59, 1998.

KAFI-ABAD, S. A.; REZVAN, H.; ABOLGHASEMI, H. Trends in prevalence of hepatitis B virus infection among Iranian blood donors, 1998-2007. **Transfusion Medicine**, v. 19, n. 4, p. 189-194, 2009.

KANNANGAI, R.; VIVEKANANDAN, P.; NETSKI, D.; MEHTA, S.; KIRK, G. D.; THOMAS, D. L.; TORBENSON, M. Liver enzyme flares and occult hepatitis B in persons with chronic hepatitis C infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 2, p. 101-105, 2007.

KAO, J. H.; CHEN, D. S. Global control of hepatitis B virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 7, p. 395-403, 2002.

KAO, J. H.; CHEN, P. J.; LAI, M. Y.; CHEN, D. S. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. **Gastroenterology**, v. 124, n. 2, p. 327-334, 2003.

KAO, J. H.; WU, N. H.; CHEN, P. J.; LAI, M. Y.; CHEN, D. S. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. **Journal of Hepatology**, v. 33, n. 6, p. 998-1002, 2000.

KARKI, S.; GHIMIRE, P.; TIWARI, B. R.; MAHARJAN, A.; RAJKARNIKAR, M. Trends in hepatitis B and hepatitis C seroprevalence among Nepalese blood donors. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, n. 4, p. 324-326, 2008.

KATO, H.; ORITO, E.; GISH, R. G.; SUGAUCHI, F.; SUZUKI, S.; UEDA, R.; MIYAKAWA, Y.; MIZOKAMI, M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). **Journal of Virology**, v. 76, n. 12, p. 6131-6137, 2002.

KAVIANI, M. J.; BEHBAHANI, B.; MOSALLAI, M. J.; SARI-ASLANI, F.; TAGHAVI, S. A. Occult hepatitis B virus infection and cryptogenic chronic hepatitis in an area with intermediate prevalence of HBV infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 31, p. 5048-5050, 2006.

KEW, M. C.; KRAMVIS, A.; YU, M. C.; ARAKAWA, K.; HODKINSON, J. Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-saharan Africans. **Journal of Medical Virology**, v. 75, n. 4, p. 513-521, 2005.

KHEDMAT, H.; ALAVIAN, S. M.; MIRI, S. M.; AMINI, M.; ABOLGHASEMI, H.; HAJIBEIGI, B.; ALAEDDINI, F.; FALLAHIAN, F.; Trends in seroprevalence of hepatitis B, hepatitis C, HIV, and syphilis infections in Iranian blood donors from 2003 to 2005. **Hepatitis Monthly**, v. 9, n. 1, p. 24-28, 2009.

KIDD-LJUNGGREN, K.; HOLMBERG, A.; BLACKBERG, J.; LINDQVIST, B. High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 4, p. 352-357, 2006.

KIDD-LJUNGGREN, K.; MIYAKAWA, Y.; KIDD, A. H. Genetic variability in hepatitis B viruses. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 6, p. 1267-1280, 2002.

KIM, S. M.; LEE, K. S.; PARK, C. J.; LEE, J. Y.; KIM, K. H.; PARK, J. Y.; LEE, J. H.; KIM, H. Y.; YOO, J. Y.; JANG, M. K. Prevalence of occult HBV infection among subjects with normal serum ALT levels in Korea. **Journal of Infection**, v. 54, n. 2, p. 185-191, 2007.

KIRSCHBERG, O.; SCHUTTLER, C.; REPP, R.; SCHAEFER, S. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus--enotypes A-F. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, n. 1, p. 39-43, 2004.

KIRSCHBERG, O.; SCHUTTLER, C.; REPP, R.; SCHAEFER, S. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus—e no types A-F. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, n. 1, p. 39-43, 2004.

KOBAYASHI, S.; IDE, T.; SATA, M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. **Journal of Hepatology**, v. 34, p. 584-586, 2003.

KONOPNICKI, D.; MOCROFT, A.; DE WIT, S.; ANTUNES, F.; LEDERGERBER, B.; KATLAMA, C.; ZILMER, K.; VELLA, S.; KIRK, O.; LUNDGREN, J. D. Hepatitis B and

HIV: prevalence, AIDS progression, response to highly active antiretroviral therapy and increased mortality in the EuroSIDA cohort. **AIDS**, v. 19, n. 6, p. 593-601, 2005.

KRAMVIS, A.; BUKOFZER, S.; KEW, M. C.; SONG, E. Nucleic acid sequence analysis of the precore region of hepatitis B virus from sera of southern African black adult carriers of the virus. **Hepatology**, v. 25, n. 1, p. 235-240, 1997.

KRAMVIS, A.; KEW, M. C. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 12, n. 5, p. 456-464, 2005.

KRAMVIS, A.; KEW, M. C. The core promoter of hepatitis B virus. **Journal of Viral Hepatology**, v. 6, n. 6, p. 415-427, 1999.

KREUTZ, C. Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 6, n. 1, p. 113-143, 2002.

KUSAKABE, A.; TANAKA, Y.; MOCHIDA, S.; NAKAYAMA, N.; INOUE, K.; SATA, M.; ISODA, N.; KANG, J. H.; SUMINO, Y.; YATSUHASHI, H.; TAKIKAWA, Y.; KANEKO, S.; YAMADA, G.; KARINO, Y.; TANAKA, E.; KATO, J.; SAKAIDA, I.; IZUMI, N.; SUGAUCHI, F.; NOJIRI, S.; JOH, T.; MIYAKAWA, Y.; MIZOKAMI, M. Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. **Hepatology Research**, v. 39, n. 7, p. 648-656, 2009.

KWON, S. Y.; LEE, C. H. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. **Korean Journal of Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 87-95, 2011.

LAI, C. L.; DIENSTAG, J.; SCHIFF, E.; LEUNG, N. W.; ATKINS, M.; HUNT, C.; BROWN, N.; WOESSNER, M.; BOEHME, R.; CONDREAY, L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 6, p. 687-696, 2003.

LARRUBIA, J. R. Occult hepatitis B virus infection: a complex entity with relevant clinical implications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1529-1530, 2011.

LARSEN, J.; HETLAND, G.; SKAUG, K. Posttransfusion hepatitis B transmitted by blood from a hepatitis B surface antigen-negative hepatitis B virus carrier. **Transfusion**, v. 30, n. 5, p. 431-432, 1990.

LE BOUVIER, G. L. The heterogeneity of Australia antigen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 123, n. 6, p. 671-5, 1971.

LEVAST, M.; LARRAT, S.; THELU, M. A.; NICOD, S.; PLAGES, A.; CHEVEAU, A.; ZARSKI, J. P.; SEIGNEURIN, J. M.; MORAND, P.; LEROY, V. Prevalence and impact of occult hepatitis B infection in chronic hepatitis C patients treated with pegylated interferon and ribavirin. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 5, p. 747-754, 2010.

LI, Y. H.; HE, Y. F.; JIANG, W. Q.; WANG, F. H.; LIN, X. B.; ZHANG, L.; XIA, Z. J.; SUN, X. F.; HUANG, H. Q.; LIN, T. Y.; HE, Y. J.; GUAN, Z. Z. Lamivudine prophylaxis reduces the incidence and severity of hepatitis in hepatitis B virus carriers who receive chemotherapy for lymphoma. **Cancer**, v. 106, n. 6, p. 1320-1325, 2006.

LIANG, T. J. Hepatitis B: the virus and disease. **Hepatology**, v. 49, n. 5 Suppl, p. S13-21, 2009.

LIAW, Y. F.; CHIEN, R. N.; YEH, C. T.; TSAI, S. L.; CHU, C. M. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. **Hepatology**, v. 30, n. 2, p. 567-572, 1999.

LIAW, Y. F.; CHIU, K. W.; CHU, C. M.; SHEEN, I. S.; HUANG, M. J. Heterosexual transmission of hepatitis delta virus in the general population of an area endemic for hepatitis B virus infection: a prospective study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 5, p. 1170-1172, 1990.

LIAW, Y. F.; LEUNG, N. W.; CHANG, T. T.; GUAN, R.; TAI, D. I.; NG, K. Y.; CHIEN, R. N.; DENT, J.; ROMAN, L.; EDMUNDSON, S.; LAI, C. L. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. **Gastroenterology**, v. 119, n. 1, p. 172-180, 2000.

LIU, Y.; LI, P.; LI, C.; ZHOU, J.; WU, C.; ZHOU, Y. H. Detection of hepatitis B virus DNA among accepted blood donors in Nanjing, China. **Virology Journal**, v. 7, p. 193, 2010.

LLEDO, J. L.; FERNANDEZ, C.; GUTIERREZ, M. L.; OCANA, S. Management of occult hepatitis B virus infection: an update for the clinician. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1563-1568, 2011.

LOCARNINI, S. Molecular virology of hepatitis B virus. **Seminars in Liver Diseases**, v. 24 Suppl 1, p. 3-10, 2004.

LOCARNINI, S.; MCMILLAN, J.; BARTHOLOMEUSZ, A. The hepatitis B virus and common mutants. **Seminars in Liver Diseases**, v. 23, n. 1, p. 5-20, 2003.

LOCARNINI, S.; ZOULIM, F. Molecular genetics of HBV infection. **Antiviral Therapy**, v. 15, Suppl 3, p. 3-14, 2010.

LOK, A. S.; McMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 34, n. 6, p. 1225-1241, 2001.

LOK, A. S.; McMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 507-539, 2007.

LOK, A. S.; McMAHON, B. J. Chronic hepatitis B: update 2009. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 661-662, 2009.

LORIOT, M. A.; MARCELLIN, P.; WALKER, F.; BOYER, N.; DEGOTT, C.; RANDRIANATOAVINA, I.; BENHAMOU, J. P.; ERLINGER, S. Persistence of hepatitis B virus DNA in serum and liver from patients with chronic hepatitis B after loss of HBsAg. **Journal of Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 251-258, 1997.

MA, J. C.; WANG, L. W.; LI, X. J.; LIAO, Y. F.; HU, X. Y.; GONG, Z. J. Relationship between HBV genotypes and anti-viral therapeutic efficacy of interferon-alpha. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases Internacional**, v. 6, n. 2, p. 166-171, 2007.

Maheswari KS, Arun R, Arumugam P. The Prevalence of the Hepatitis B Core Antibody and the Occult Hepatitis B Infection Among Voluntary Blood Donors in Chennai, India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 6, n. 10, p. 1710-1712, 2012.

MAHONEY, F. J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 351-366, 1999.

MAKROO, R. N.; CHOWDHRY, M.; BHATIA, A.; ARORA, B.; ROSAMMA, N. L. Hepatitis B core antibody testing in Indian blood donors: A double-edged sword! **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 6, n. 1, p. 10-13, 2012.

MANZINI, P.; GIROTTI, M.; BORSOTTI, R.; GIACHINO, O.; GUASCHINO, R.; LANTERI, M.; TESTA, D.; GHIAZZA, P.; VACCHINI, M.; DANIELLE, F.; PIZZI, A.; VALPREDA, C.; CASTAGNO, F.; CURTI, F.; MAGISTRONI, P.; ABATE, M. L.; MEDILE, A.; RIZZETTO, M.. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. **Haematologica**, v. 92, n. 12, p. 1664-1670, 2007.

MATOS, M. A.; REIS, N. R.; KOZLOWSKI, A. G.; TELES, S. A.; MOTTA-CASTRO, A. R.; MELLO, F. C.; GOMES, S. A.; MARTINS, R. M. Epidemiological study of hepatitis A, B and C in the largest Afro-Brazilian isolated community. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 9, p. 899-905, 2009.

McMAHON, B. J. Natural history of chronic hepatitis B. **Clinical in Liver Diseases**, v. 14, n. 3, p. 381-396, 2010.

McMAHON, B. J. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. **Hepatology International**, v. 3, n. 2, p. 334-342, 2009.

MELEGARI, M.; SCAGLIONI, P. P.; WANDS, J. R. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. **Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 628-633, 1998.

MELLO, F. C.; LAGO, B. V.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; FERNANDES, C. A.; GOMES, S. A. Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and chronically infected patients. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 96, 2012.

MELLO, F. C.; SOUTO, F. J.; NABUCO, L. C.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; COELHO, H. S.; FRANZ, H. C.; SARAIVA, J. C.; VIRGOLINO, H. A.; MOTTA-CASTRO, A. R.; MELO, M. M.; MARTINS, R. M.; GOMES, S. A. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiology**, v. 7, n. p. 103, 2007.

MENDES-CORREA, M. C.; BARONE, A. A.; CAVALHEIRO, N.; TENGAN, F. M.; GUASTINI, C. Prevalence of hepatitis B and C in the sera of patients with HIV infection in Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 42, n. 2, p. 81-85, 2000.

MENDES-CORREA, M. C.; PINHO, J. R.; GOMES-GOUVEA, M. S.; DA SILVA, A. C.; GUASTINI, C. F.; MARTINS, L. G.; LEITE, A. G.; SILVA, M. H.; GIANINI, R. J.; UIP, D. E. Predictors of HBeAg status and hepatitis B viraemia in HIV-infected patients with chronic hepatitis B in the HAART era in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. p. 247, 2011.

MENDES-CORREA, M. C.; PINHO, J. R.; LOCARNINI, S.; YUEN, L.; SITNIK, R.; SANTANA, R. A.; GOMES-GOUVEA, M. S.; LEITE, O. M.; MARTINS, L. G.; SILVA, M. H.; GIANINI, R. J.; UIP, D. E. High frequency of lamivudine resistance mutations in Brazilian patients co-infected with HIV and hepatitis B. **J Med Virol**, v. 82, n. 9, p. 1481-1488, 2010.

MICHALAK, T. I.; PASQUINELLI, C.; GUILHOT, S.; CHISARI, F. V. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 2, p. 907, 1994.

MINUK, G. Y.; SUN, D. F.; UHANOVA, J.; ZHANG, M.; CAOUETTE, S.; NICOLLE, L. E.; GUTKIN, A.; DOUCETTE, K.; MARTIN, B.; GIULIVI, A. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. **Journal of Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 480-485, 2005.

MIYAKAWA, Y.; MIZOKAMI, M. Classifying hepatitis B virus genotypes. **Intervirology**, v. 46, n. 6, p. 329-338, 2003.

MONTEIRO, M. R.; DO NASCIMENTO, M. M.; PASSOS, A. D.; FIGUEIREDO, J. F. Seroepidemiological survey of hepatitis B virus among HIV/AIDS patients in Belem, Para-Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, Suppl 2, p. 27-32, 2004.

MOSKOVITZ, D. N.; OSIOWY, C.; GILES, E.; TOMLINSON, G.; HEATHCOTE, E. J. Response to long-term lamivudine treatment (up to 5 years) in patients with severe chronic hepatitis B, role of genotype and drug resistance. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 12, n. 4, p. 398-404, 2005.

MOTTA-CASTRO, A. R. C.; YOSHIDA, C. F. T.; LEMOS, E. R. S.; OLIVEIRA, J. M.; CUNHA, R. V.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; CABELLO, P. H.; LIMA, K. M. B.; MARTINS, R. M. B. Seroprevalence of Hepatitis B virus infection among an Afro-descendant community in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 13-17, 2003.

MOTTA-CASTRO, A. R.; MARTINS, R. M.; ARAUJO, N. M.; NIEL, C.; FACHOLI, G. B.; LAGO, B. V.; MELLO, F. C.; GOMES, S. A. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. **Archives of Virology**, v. 153, n. 12, p. 2197-2205, 2008.

MULDERS, M. N.; VENARD, V.; NJAYOU, M.; EDORH, A. P.; BOLA OYEFOLO, A. O.; KEHINDE, M. O.; MUYEMBE TAMFUM, J. J.; NEBIE, Y. K.; MAIGA, I.; AMMERLAAN, W.; FACK, F.; OMILABU, S. A.; LE FAOU, A.; MULLER, C. P. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 2, p. 400-408, 2004.

NAGASAKI, F.; NIITSUMA, H.; UENO, Y.; INOUE, J.; KOGURE, T.; FUKUSHIMA, K.; SHIMOSEGAWA, T. The high incidence of the emergence of entecavir-resistant mutants among patients infected with lamivudine-resistant hepatitis B virus. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 2, p. 181-186, 2007.

NAITO, H.; HAYASHI, S.; ABE, K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.1, p. 362-364, 2001.

NASCIMENTO, M. C.; MAYAUD, P.; SABINO, E. C.; TORRES, K. L.; FRANCESCHI, S. Prevalence of hepatitis B and C serological markers among first-time blood donors in Brazil: a multi-center serosurvey. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 1, p. 53-57, 2008.

NAUMANN, H.; SCHAEFER, S.; YOSHIDA, C. F.; GASPAR, A. M.; REPP, R.; GERLICH, W. H. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1627-1632, 1993.

NIEDERHAUSER, C. Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. **Journal of Blood Medicine**, v. 2, n. p. 91-102, 2011.

NIEDERHAUSER, C.; MANSOURI TALEGHANI, B.; GRAZIANI, M.; STOLZ, M.; TINGUELY, C.; SCHNEIDER, P. Blood donor screening: how to decrease the risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus? **Swiss Medical Weekly**, v. 138, n. 9-10, p. 134-141, 2008.

NKRUMAH, B.; OWUSU, M.; AVERU, P. Hepatitis B and C viral infections among blood donors. A retrospective study from a rural community of Ghana. **BMC Research Notes**, v. 4, p. 529, 2011.

NORDER, H.; HAMMAS, B.; LOFDAHL, S.; COUROUCE, A. M.; MAGNIUS, L. O. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1201-1208, 1992.

NUNEZ, M.; RIOS, P.; PEREZ-OLMEDA, M.; SORIANO, V. Lack of 'occult' hepatitis B virus infection in HIV-infected patients. **AIDS**, v. 16, n. 15, p. 2099-2101, 2002.

O'BRIEN, S. F.; FEARON, M. A.; YI, Q. L.; FAN, W.; SCALIA, V.; MUNTZ, I. R.; VAMVAKAS, E. C. Hepatitis B virus DNA-positive, hepatitis B surface antigen-negative blood donations intercepted by anti-hepatitis B core antigen testing: the Canadian Blood Services experience. **Transfusion**, v. 47, n. 10, p. 1809-1815, 2007.

O'BRIEN, S. F.; XI, G.; FAN, W.; YI, Q. L.; FEARON, M. A.; SCALIA, V.; GOLDMAN, M. Epidemiology of hepatitis B in Canadian blood donors. **Transfusion**, v. 48, n. 11, p. 2323-2330, 2008.

OCANA, S.; CASAS, M. L.; BUHIGAS, I.; LLEDO, J. L. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1553-1557, 2011.

OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; SAKUGAWA, H.; SASTROSOEWIGNJO, R. I.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 2575-2583, 1988.

OLIVEIRA, L. H.; SILVA, I. R.; XAVIER, B. L.; CAVALCANTI, S. M. Hepatitis B infection among patients attending a sexually transmitted diseases clinic in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 635-640, 2001.

ONO-NITA, S. K.; KATO, N.; SHIRATORI, Y.; MASAKI, T.; LAN, K. H.; CARRILHO, F. J.; OMATA, M. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: A study by in vitro full-length viral DNA transfection. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 939-945, 1999.

OON, C. J.; CHEN, W. N.; GOO, K. S.; GOH, K. T. Intra-familial evidence of horizontal transmission of hepatitis B virus surface antigen mutant G145R. **Journal of Infection**, v. 41, n. 3, p. 260-264, 2000.

ORLANDO, R.; TOSONE, G.; PORTELLA, G.; VEROPALUMBO, E.; D'ONOFRIO, M.; PIAZZA, M. Prolonged persistence of lamivudine-resistant mutant and emergence of new lamivudine-resistant mutants two years after lamivudine withdrawal in HBsAg-positive chronic hepatitis patient: a case report. **Infection**, v. 36, n. 5, p. 472-474, 2008.

OTT, J. J.; STEVENS, G. A.; GROEGER, J.; WIERSMA, S. T. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2212-2219, 2012.

PANIGRAHI, R.; BISWAS, A.; DATTA, S.; BANERJEE, A.; CHANDRA, P. K.; MAHAPATRA, P. K.; PATNAIK, B.; CHAKRABARTI, S.; CHAKRAVARTY, R. Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for transfusion. **Virology Journal**, v. 7, p. 204, 2010.

PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. **Journal of Hepatology**, v. 39, Suppl 1, p. S31-35, 2003.

PENG, X. M.; HUANG, G. M.; LI, J. G.; HUANG, Y. S.; MEI, Y. Y.; GAO, Z. L. High level of hepatitis B virus DNA after HBeAg-to-anti-HBe seroconversion is related to coexistence of mutations in its precore and basal core promoter. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 20, p. 3131-3134, 2005.

PEREIRA, A. Health and economic impact of posttransfusion hepatitis B and cost-effectiveness analysis of expanded HBV testing protocols of blood donors: a study focused on the European Union. **Transfusion**, v. 43, n. 2, p. 192-201, 2003.

PEREIRA, L. M.; MARTELLI, C. M.; MERCHAN-HAMANN, E.; MONTARROYOS, U. R.; BRAGA, M. C.; DE LIMA, M. L.; CARDOSO, M. R.; TURCHI, M. D.; COSTA, M. A.; DE ALENCAR, L. C.; MOREIRA, R. C.; FIGUEIREDO, G. M.; XIMENES, R. A. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 2, p. 240-247, 2009.

PORTELINHA FILHO, A. M.; NASCIMENTO, C. U.; TANNOURI, T. N.; TROIANI, C.; ASCENCIO, E. L.; BONFIM, R.; D'ANDREA, L. A.; PRESTES-CARNEIRO, L. E. Seroprevalence of HBV, HCV and HIV co-infection in selected individuals from state of Sao Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 960-963, 2009.

PUOTI, M.; TORTI, C.; BRUNO, R.; FILICE, G.; CAROSI, G. Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 1, p. S65-70, 2006.

QIN, Y.; ZHANG, J.; MAO, R.; GUO, H.; YIN, Y.; WU, X.; WENG, X.; WANDS, J.; TONG, S. Prevalence of basal core promoter and precore mutations in Chinese chronic hepatitis B patients and correlation with serum HBeAG titers. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 5, p. 807-814, 2009.

RAIMONDO, G.; ALLAIN, J. P.; BRUNETTO, M. R.; BUENDIA, M. A.; CHEN, D. S.; COLOMBO, M.; CRAXI, A.; DONATO, F.; FERRARI, C.; GAETA, G. B.; GERLICH, W. H.; LEVRERO, M.; LOCARNINI, S.; MICHALAK, T.; MONDELLI, M. U.; PAWLOTSKY, J. M.; POLLICINO, T.; PRATI, D.; PUOTI, M.; SAMUEL, D.; SHOUVAL, D.; SMEDILE, A.; SQUADRITO, G.; TREPO, C.; VILLA, E.; WILL, H.; ZANETTI, A. R.; ZOULIM, F. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 652-657, 2008.

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. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 743-746, 2008.

RAIMONDO, G.; POLLICINO, T.; CACCIOLA, I.; SQUADRITO, G. Occult hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 160-170, 2007.

RAMEZANI, A.; BANIFAZL, M.; MOHRAZ, M.; RASOOLINEJAD, M.; AGHAKHANI, A. Occult hepatitis B virus infection: A major concern in HIV-infected patients: Occult HBV in HIV. **Hepatitis Monthly**, v. 11, n. 1, p. 7-10, 2011.

REGAN, F. A.; HEWITT, P.; BARBARA, J. A.; CONTRERAS, M. Prospective investigation of transfusion transmitted infection in recipients of over 20 000 units of blood. TTI Study Group. **BMJ**, v. 320, n. 7232, p. 403-406, 2000.

REZENDE, R. E.; FONSECA, B. A.; RAMALHO, L. N.; ZUCOLOTO, S.; PINHO, J. R.; BERTOLINI, D. A.; MARTINELLI, A. L. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. **Journal Clinical of Virology**, v. 32, n. 1, p. 53-59, 2005.

RIZZETTO, M.; TASSOPOULOS, N. C.; GOLDIN, R. D.; ESTEBAN, R.; SANTANTONIO, T.; HEATHCOTE, E. J.; LAGGET, M.; TAAK, N. K.; WOESSNER, M. A.; GARDNER, S. D. Extended lamivudine treatment in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v. 42, n. 2, p. 173-179, 2005.

RODRIGUEZ-TORRES, M.; GONZALEZ-GARCIA, J.; BRAU, N.; SOLA, R.; MORENO, S.; ROCKSTROH, J.; SMAILL, F.; MENDES-CORREA, M. C.; DEPAMPHILIS, J.; TORRIANI, F. J. Occult hepatitis B virus infection in the setting of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) co-infection: clinically relevant or a diagnostic problem? **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 6, p. 694-700, 2007.

ROMERO, M.; MADEJON, A.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, C.; GARCIA-SAMANIEGO, J. Clinical significance of occult hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1549-1552, 2011.

RONCATO, M.; BALLARDIN, P. A. Z.; LUNGE, V. R. Influence on its genotypes of the treatment for type B hepatitis: review. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre &**

Faculdade de Medicina da Universidade. Federal do Rio Grande do Sul, v. 28, n. 3, p. 188-193, 2008.

SAID, Z. N. An overview of occult hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 15, p. 1927-1938, 2011.

SALLAM, T. A.; TONG, C. Y. Two distinct types of hepatitis B virus core promoter variants in Yemeni blood donors. **Journal of Medical Virology**, v. 68, n. 3, p. 328-334, 2002.

SAMUEL, D.; FORNS, X.; BERENGUER, M.; TRAUTWEIN, C.; BURROUGHS, A.; RIZZETTO, M.; TREPO, C. Report of the monothematic EASL conference on liver transplantation for viral hepatitis (Paris, France, January 12-14, 2006). **Journal of Hepatology**, v. 45, n. 1, p. 127-143, 2006.

SANCHEZ, L. V.; TANAKA, Y.; MALDONADO, M.; MIZOKAMI, M.; PANDURO, A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. **Intervirology**, v. 50, n. 1, p. 9-15, 2007.

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**, v. 47, n. 7, p. 1197-1205, 2007.

SCHAEFER, S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 12, n. 2, p. 111-124, 2005.

SEDDIGH-TONEKABONI, S.; WATERS, J. A.; JEFFERS, S.; GEHRKE, R.; OFENLOCH, B.; HORSCH, A.; HESS, G.; THOMAS, H. C.; KARAYIANNIS, P. Effect of variation in the common "a" determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen. **Journal of Medical Virology**, v. 60, n. 2, p. 113-121, 2000.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B virus biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 51-68, 2000.

SEO, D. H.; WHANG, D. H.; SONG, E. Y.; KIM, H. S.; PARK, Q. Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen and occult hepatitis B virus infections in Korean blood donors. **Transfusion**, v. 51, n. 8, p. 1840-1846, 2011.

SHELDON, J.; CAMINO, N.; RODES, B.; BARTHOLOMEUSZ, A.; KUIPER, M.; TACKE, F.; NUNEZ, M.; MAUSS, S.; LUTZ, T.; KLAUSEN, G.; LOCARNINI, S.; SORIANO, V. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. **Antiviral Therapy**, v. 10, n. 6, p. 727-734, 2005.

SHEPARD, C. W.; SIMARD, E. P.; FINELLI, L.; FIORE, A. E.; BELL, B. P. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. **Epidemiologic Reviews**, v. 28, p. 112-125, 2006.

SILVA, C. M.; COSTI, C.; COSTA, C.; MICHELON, C.; ORAVEC, R.; RAMOS, A. B.; NIEL, C.; ROSSETTI, M. L. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. **Journal of Infection**, v. 51, n. 1, p. 24-29, 2005.

SILVEIRA, L.; SCHIAVON, L. L.; SILVA, K. P.; LOPES, T. B.; ZACCARON M. R.; NARCISO-SCHIAVON, J. L. Clinical and epidemiological profile of blood donors with positive serology for viral hepatitis in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 269-273, 2011.

SITNIK, R.; SETTE, H. JR.; SANTANA, R. A.; MENEZES, L. C.; GRACA, C. H.; DASTOLI, G. T.; SILBERT, S.; PINHO, J. R. Hepatitis B virus genotype E detected in Brazil in an African patient who is a frequent traveler. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 12, p. 1689-1692, 2007.

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. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. e308-310, 2010.

SONG, M. N.; HONG, M. Z.; LUO, D. Q.; HUANG, W. Q.; MIN, F.; FAN, R. H.; WU, W. B.; ZHANG, L. Efficacy of 3 years of adefovir monotherapy in chronic hepatitis B patients with lamivudine resistance. **World Journal of Hepatology**, v. 4, n. 12, p. 389-393, 2012.

SORIANO, V.; VISPO, E.; LABARGA, P.; MEDRANO, J.; BARREIRO, P. Viral hepatitis and HIV co-infection. **Antiviral Research**, v. 85, n. 1, p. 303-315, 2010.

SOUTO, F. J.; FONTES, C. J.; MARTELLI, C. M.; TURCHI, M. D.; MARTINS, R. M.; ANDRADE, A. L. Hepatitis C virus prevalence among an immigrant community to the southern Amazon, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 6, p. 719-723, 1999.

SOUTO, F. J. D. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. **Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva**, v. 18, n.4, p. 143-150, 1999.

SOUZA, M. G.; PASSOS, A. D.; MACHADO, A. A.; FIGUEIREDO, J. F.; ESMERALDINO, L. E. [HIV and hepatitis B virus co-infection: prevalence and risk factors]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 391-395, 2004.

STIEF, A. C.; MARTINS, R. M.; ANDRADE, S. M.; POMPILIO, M. A.; FERNANDES, S. M.; MURAT, P. G.; MOUSQUER, G. J.; TELES, S. A.; CAMOLEZ, G. R.; FRANCISCO, R. B.; MOTTA-CASTRO, A. R. Seroprevalence of hepatitis B virus infection and associated factors among prison inmates in state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 512-515, 2010.

STRASSER, S. I.; MCDONALD, G. B. Hepatitis viruses and hematopoietic cell transplantation: A guide to patient and donor management. **Blood**, v. 93, n. 4, p. 1127-1136, 1999.

STUYVER, L.; DE GENDT, S.; VAN GEYT, C.; ZOULIM, F.; FRIED, M.; SCHINAZI, R. F.; ROSSAU, R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 1, p. 67-74, 2000.

SUGAUCHI, F.; KUMADA, H.; ACHARYA, S. A.; SHRESTHA, S. M.; GAMUTAN, M. T.; KHAN, M.; GISH, R. G.; TANAKA, Y.; KATO, T.; ORITO, E.; UEDA, R.;

MIYAKAWA, Y.; MIZOKAMI, M. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 4, p. 811-820, 2004.

SULKOWSKI, M. S. Viral hepatitis and HIV coinfection. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 353-367, 2008.

TABOR, E.; HOOFNAGLE, J. H.; SMALLWOOD, L. A.; DRUCKER, J. A.; PINEDA-TAMONDONG, G. C.; NI, L. Y.; GREENWALT, T. J.; BARKER, L. F.; GERETY, R. J. Studies of donors who transmit posttransfusion hepatitis. **Transfusion**, v. 19, n. 6, p. 725-731, 1979.

TACKE, F.; GEHRKE, C.; LUEDDE, T.; HEIM, A.; MANNS, M. P.; TRAUTWEIN, C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of Lamivudine-resistant mutants. **Journal of Virology**, v. 78, n. 16, p. 8524-8535, 2004.

TAGHAVI, S. A.; TABIBI, M.; ESHRAGHIAN, A.; KEYVANI, H.; ESHRAGHIAN, H. Prevalence and clinical significance of hepatitis B Basal core promoter and precore gene mutations in southern Iranian patients. **Hepatitis Monthly**, v. 10, n. 4, p. 294-297, 2010.

TAIRA, R.; SATAKE, M.; MOMOSE, S.; HINO, S.; SUZUKI, Y.; MUROKAWA, H.; UCHIDA, S.; TADOKORO, K. Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection caused by blood components derived from donors with occult HBV infection in Japan. **Transfusion**, 2012.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TAN, Y.; DING, K.; SU, J.; TRINH, X.; PENG, Z.; GONG, Y.; CHEN, L.; CUI, Q.; LEI, N.; CHEN, X.; YU, R. The naturally occurring YMDD mutation among patients chronically infected HBV and untreated with lamivudine: a systematic review and meta-analysis. **PLOS One**, v. 7, n. 3, p. e32789, 2012.

TESSEMA, B.; YISMAW, G.; KASSU, A.; AMSALU, A.; MULU, A.; EMMRICH, F.; SACK, U. Seroprevalence of HIV, HBV, HCV and syphilis infections among blood donors at Gondar University Teaching Hospital, Northwest Ethiopia: declining trends over a period of five years. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 111, 2010.

THEDJA, M. D.; RONI, M.; HARAHAHAP, A. R.; SIREGAR, N. C.; IE, S. I.; MULJONO, D. H. Occult hepatitis B in blood donors in Indonesia: altered antigenicity of the hepatitis B virus surface protein. **Hepatology International**, v. 4, n. 3, p. 608-614, 2010.

THIO, C. L. Hepatitis B and human immunodeficiency virus coinfection. **Hepatology**, v. 49, n. 5 Suppl, p. S138-145, 2009.

TIPPLES, G. A.; MA, M. M.; FISCHER, K. P.; BAIN, V. G.; KNETEMAN, N. M.; TYRRELL, D. L. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. **Hepatology**, v. 24, n. 3, p. 714-717, 1996.

TONG, S.; KIM, K. H.; CHANTE, C.; WANDS, J.; LI, J. Hepatitis B Virus e Antigen Variants. **International Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 2-7, 2005.

TORBENSON, M.; THOMAS, D. L. Occult hepatitis B. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 479-486, 2002.

TORRES, J. R. Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America. **Gut**, v. 38, n. 2, p. 48-55, 1996.

TORRESI, J.; EARNEST-SILVEIRA, L.; CIVITICO, G.; WALTERS, T. E.; LEWIN, S. R.; FYFE, J.; LOCARNINI, S. A.; MANNS, M.; TRAUTWEIN, C.; BOCK, T. C. Restoration of replication phenotype of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by compensatory changes in the "fingers" subdomain of the viral polymerase selected as a consequence of mutations in the overlapping S gene. **Virology**, v. 299, n. 1, p. 88-99, 2002.

TOVO, C. V.; DOS SANTOS, D. E.; DE MATTOS, A. Z.; DE ALMEIDA, P. R.; DE MATTOS, A. A.; SANTOS, B. R. [Ambulatorial prevalence of hepatitis B and C markers in patients with human immunodeficiency virus infection in a general hospital]. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 43, n. 2, p. 73-76, 2006.

TSUBOTA, A. How do naturally occurring YMDD-motif mutants influence the clinical course of lamivudine-naïve patients with chronic hepatitis B virus infection? **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 12, p. 1769-1771, 2006.

UCHIDA, T.; SHIMOJIMA, S.; GOTOH, K.; SHIKATA, T.; MIMA, S. Pathology of livers infected with "silent" hepatitis B virus mutant. **Liver**, v. 14, n. 5, p. 251-256, 1994.

USUDA, S.; OKAMOTO, H.; TANAKA, T.; KIDD-LJUNGGREN, K.; HOLLAND, P. V.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Differentiation of hepatitis B virus genotypes D and E by ELISA using monoclonal antibodies to epitopes on the preS2-region product. **Journal of Virology Methods**, v. 87, n. 1-2, p. 81-89, 2000.

UTAMA, A.; SIBURIAN, M. D.; FANANY, I.; INTAN, M. D.; DHENNI, R.; KURNIASIH, T. S.; LELOSUTAN, S. A.; ACHWAN, W. A.; ARNELIS; LUKITO, B.; YUSUF, I.; LESMANA, L. A.; SULAIMAN, A.; TAI, S. Low prevalence of hepatitis B virus pre-S deletion mutation in Indonesia. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 10, p. 1717-1726, 2011.

UY, A.; WUNDERLICH, G.; OLSEN, D. B.; HEERMANN, K. H.; GERLICH, W. H.; THOMSEN, R. Genomic variability in the preS1 region and determination of routes of transmission of hepatitis B virus. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 3005-3009, 1992.

VAN BOMMEL, F.; DE MAN, R. A.; WEDEMEYER, H.; DETERDING, K.; PETERSEN, J.; BUGGISCH, P.; ERHARDT, A.; HUPPE, D.; STEIN, K.; TROJAN, J.; SARRAZIN, C.; BOCHER, W. O.; SPENGLER, U.; WASMUTH, H. E.; REINDERS, J. G.; MOLLER, B.; RHODE, P.; FEUCHT, H. H.; WIEDENMANN, B.; BERG, T. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 73-80, 2010.

WEBER, B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 2, p. 102-112, 2005.

WEISS, J.; WU, H.; FARRENKOPF, B.; SCHULTZ, T.; SONG, G.; SHAH, S.; SIEGEL, J. Real time TaqMan PCR detection and quantitation of HBV genotypes A-G with the use of an internal quantitation standard. **Journal of Clinical and Virology**, v. 30, n. 1, p. 86-93, 2004.

WENDEL, S. Prevalência em Bancos de Sangue. In FOCACCIA, R. Tratado de Hepatites Virais. 1 ed. São Paulo: Atheneu, p. 33-53, 2003.

WOLFF, F. H.; FUCHS, S. C.; BRANDAO, A. B. Absence of occult hepatitis B among blood donors in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 159-162, 2011.

WOLTERS, L. M.; NIESTERS, H. G.; HANSEN, B. E.; VAN der ENDE, M. E.; KROON, F. P.; RICHTER, C.; BRINKMAN, K.; MEENHORST, P. L.; de MAN, R. A. Development of hepatitis B virus resistance for lamivudine in chronic hepatitis B patients co-infected with the human immunodeficiency virus in a Dutch cohort. **Journal of Clinical and Virology**, v. 24, n. 3, p. 173-181, 2002.

YAN, M. H.; ZHANG, C.; LING, Q.; ZHOU, R. F. Detection of YMDD motif mutations in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B. **Zhonghua Ganzangbing Zazhi**, v. 11, p. 430-431, 2003.

YE, X. G.; WANG, R. L.; GUO, H. B. Detection and analysis of YMDD mutate genes in patients of chronic hepatitis B before being treated. **Zhonghua Jianyan Yixue Zazhi**, v. 25, p. 248, 2002.

YILDIZ, O.; AYGEN, B.; DEMIRTURK, N.; DEMIRDAL, T.; INAN, D.; YILDIRMAK, T.; KANTURK, A.; TUTUNCU, E. Lamivudine resistance mutations in patients infected with hepatitis B virus genotype D. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 45, p. 4987-4992, 2011.

YOTSUYANAGI, H.; HINO, K.; TOMITA, E.; TOYODA, J.; YASUDA, K.; IINO, S. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 355-363, 2002.

YU, M. W.; YEH, S. H.; CHEN, P. J.; LIAW, Y. F.; LIN, C. L.; LIU, C. J.; SHIH, W. L.; KAO, J. H.; CHEN, D. S.; CHEN, C. J. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 4, p. 265-272, 2005.

YUAN, Q.; OU, S. H.; CHEN, C. R.; GE, S. X.; PEI, B.; CHEN, Q. R.; YAN, Q.; LIN, Y. C.; NI, H. Y.; HUANG, C. H.; YEO, A. E.; SHIH, J. W.; ZHANG, J.; XIA, N. S. Molecular characteristics of occult hepatitis B virus from blood donors in southeast China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 357-362, 2010.

YUEN, M. F.; WONG, D. K.; LEE, C. K.; TANAKA, Y.; ALLAIN, J. P.; FUNG, J.; LEUNG, J.; LIN, C. K.; SUGIYAMA, M.; SUGAUCHI, F.; MIZOKAMI, M.; LAI, C. L. Transmissibility of hepatitis B virus (HBV) infection through blood transfusion from blood donors with occult HBV infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 5, p. 624-632, 2011.

ZAGO, A. M.; MACHADO, T. F.; CAZARIM, F. L.; MIRANDA, A. E. Prevalence and risk factors for chronic hepatitis B in HIV patients attended at a sexually-transmitted disease clinic in Vitoria, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 475-478, 2007.

ZAIDI, G.; IDREES, M.; MALIK, F. A.; AMIN, I.; SHAHID, M.; YOUNAS, S.; HUSSAIN, R.; AWAN, Z.; TARIQ, A.; PARVEEN, K. Prevalence of hepatitis delta virus infection among hepatitis B virus surface antigen positive patients circulating in the largest province of Pakistan. **Virology Journal**, v. 7, p. 283, 2010.

ZERVOU, E. K.; DALEKOS, G. N.; BOUMBA, D. S.; TSIANOS, E. V. Value of anti-HBc screening of blood donors for prevention of HBV infection: results of a 3-year prospective study in Northwestern Greece. **Transfusion**, v. 41, n. 5, p. 652-658, 2001.

ZHENG, X.; YE, X.; ZHANG, L.; WANG, W.; SHUAI, L.; WANG, A.; ZENG, J.; CANDOTTI, D.; ALLAIN, J. P.; LI, C. Characterization of occult hepatitis B virus infection from blood donors in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1730-1737, 2011.

ZHENG, M.; CAI, W.; WENG, H.; LIU, R. Determination of serum fibrosis indexes in patients with chronic hepatitis and its significance. **Chinese Medical Journal**, v. 116, n. 3, p. 346-349, 2003.

ZHENG, P. Y.; ZHANG, D. Y.; LU, G. F.; YANG, P. C.; QI, Y. M.; WANG, B. S. Effects of lamivudine on the function of dendritic cells derived from patients with chronic hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 34, p. 4641-4645, 2007.

ZHUANG, H. Updates of EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 20, n. 6, p. 427-429, 2012.

ZOLLNER, B.; FEUCHT, H. H.; STERNECK, M.; SCHAFER, H.; ROGIERS, X.; FISCHER, L. Clinical reactivation after liver transplantation with an unusual minor strain of hepatitis B virus in an occult carrier. **Liver Transplantation**, v. 12, n. 8, p. 1283-1289, 2006.

ZOULIM, F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. **Journal of Hepatology**, v. 42, n. 3, p. 302-308, 2005.

ZUCKERMAN, A. J.; HARRISON, T. J.; OON, C. J. Mutations in S region of hepatitis B virus. **The Lancet**, v. 343, n. 8899, p. 737-738, 1994.

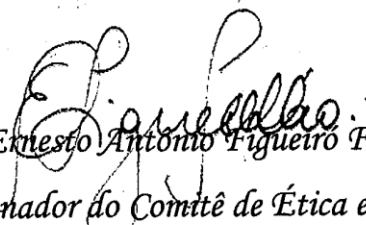
ANEXO A – PROTOCOLO CEP



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

O protocolo nº 1721 da Pesquisadora *Andréa de Siqueira Campos Lindenberg* intitulado “Estudo epidemiológico e molecular da infecção pelo vírus da hepatite B em doadores de sangue e pacientes infectados atendidos nos centros de referência de Campo Grande-MS”, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 20 de maio de 2010, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.


Prof. Ernesto Antonio Figueiro Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 21 de maio de 2010.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO

|_|_|_| PROJETO: HEPATITE B DOADOR/PORTADOR CRÔNICO/HIV

QUESTIONÁRIO

ID: HEPB _ _ _

Data da entrevista:___/___/___

Revisado pelo supervisor de campo: Assinatura _____

Data _/___/___

SEÇÃO I - DADOS PESSOAIS

Nome:

_____ (nome e sobrenome)

1- **Sexo:** Masc. (2) Fem. (1)

SEXO|_|_|

2- **Data de nascimento:** ___/___/___ **Idade:** _____ **IDADE**

3- **Você estudou até que série?** _____ (anos de estudo) **ES**

COL

4- **Aonde você nasceu?** _____ **NA**

T

5- **Há quanto tempo você vive em Campo Grande?** _____ **TE**

MPOCG

6- **Você tem religião?** **RE**

1- Sem religião (); 2- Católica (); 3- Evangélica (); 4- Espírita (); 5- Budista ();

TIP

6- Judaísmo (); 7- Outra (): especificar: _____ **REL**

7- **Em relação à cor de sua pele, como você a classifica:** **CO**

1- Branca (); 2- Negra (); 3- Parda (); 4- Outra () especificar: _____ **R**

8- **Qual o seu estado civil?** **ES**

1- casada/união consensual (); 2- Solteira (); 3- Separada (); 4- viúva ()

9-	Quantas pessoas moram com você na sua casa? _____	TCIV NC ASA
10-	Qual a sua renda familiar? Não possui renda (1) < 1 salário (2) 1 a 3 salários (3) > 4 salários (4)	RE NDA

11-	Nas ultimas 4 semanas você tomou alguma bebida alcoólica? 1 – Não bebo (); 2- bebo todos os dias pouco (); 3- bebo/bebia todos os dias muito (); 4 – bebo pelo menos uma vez na semana (); 5- bebo menos de uma vez por mês ()	AL COO
-----	--	-----------

SEÇÃO II-FATORES DE RISCO

12-	Você já fez cirurgia? 1 – Não (); 2- Sim ()	CI RUR
13-	Você já fez hemodiálise? 1 – Não (); 2- Sim ()	HE MOD
14-	Você já fez acupuntura? 1 – Não (); 2- Sim ()	AC UP
15-	Você já foi preso? 1 – Não (); 2- Sim ()	PR ESO
16-	Você já teve hepatite/icterícia? 1 – Não (); 2- Sim ()	HE P/ICT
17-	Alguém da sua família já teve hepatite? 1 – Não (); 2- Sim ()	HE PFAM
18-	Alguém da sua família já teve câncer hepático? 1 – Não (); 2- Sim () Quem? _____	CA NCFAM
19-	Você já usou algum tipo de droga? Q23 ← 1- Nunca (1); Injetável (3) Não Injetável (2)	US ODROG
20-	Qual o tipo de droga? 1- Maconha (); 2 – Cocaína (); 3 – Maconha e Cocaína (); 4 – crack/zuca () 5 – outras ()	TIP ODROG

especificar:

- 21- **Você já compartilhou algum utensílio para uso de droga (agulha, canudo, recipiente)?** CO
MPDROG
1 – Não (); 2- Sim ()
- 22- **Você já compartilhou objetos de uso pessoal?** UD
I
1 – Não (); 2- Sim ()
- 23- **Quais?** CO
MPOBJ
Lâmina (1) alicate(2) escova(3)
outros(4)_____
- 24- **Você tem alguma tatuagem/piercing no corpo?** TA
TOO
1 – Não (); 2- Sim ()
Caso afirmativo: Nº de tatuagens/piercing | _____ |
- NT
ATOO
- 25- **Você já foi hemotransfundido?** TR
ANSF
1 – Não (); 2- Sim ()
Caso afirmativo, antes de 1994: 1- não (); 2- sim (); 3 – não lembra ()
- 26- **Que tipo de trabalho você faz? Profissão** TT
RAB
1- Doméstico (); 2- Comércio (); 3- Outros: Especificar

SEÇÃO III–VIDA SEXUAL

- 27- **Qual a sua orientação sexual?** OR
IENSEX
heterossexual (1) Bissexual(2) Homossexual(3)
- 28- **Quanto parceiros sexuais você teve nos últimos 12 meses?** NP
ARC

- 29- **Você já recebeu dinheiro por sexo alguma vez?** SEXPAG
O
1 – Não (); 2- Sim ()
- 30- **Na ultima vez que você teve sexo com um parceiro, vocês usaram preservativo?** PR

1- Não (); 2 – Sim (); 3 – Não se lembra ()	V
Quem sugeriu o uso do preservativo?	
1- você (); 2 – o parceiro (); 3 – ambos (); 4 – não se lembra	SU
	GPRV
31- Com que frequência você e todos os seus parceiros (marido/namorado) usaram preservativos nos últimos 12 meses?	
1- Sempre (); 2- Quase sempre (); 3- Algumas vezes (); 4- Nunca ()	FP
	RVPAR
32- Por que você e seu parceiro não usaram preservativo?	
1- Não disponível (); 2 –Muito caro (); 3 – Cliente recusou ();	
4- Não gosta de usar; 5- Usa outra forma de anticoncepção (); 6- Não acha necessário ();	NP
7- Não pensa sobre isto (); 8 – Outra:_____ ()	RV
33- Com que frequência você e seu parceiro usaram preservativos nos últimos 30 dias?	
1- Sempre (); 2- Quase sempre (); 3- Algumas vezes (); 4- Nunca ()	FP
	RV
34- Práticas sexuais mais freqüentes:	
1- Oral (); 2- Vaginal (); 3- Anal () 4- Todas ()	
SEÇÃO IV – DST	
35- Você teve algum corrimento/DST nos últimos 12 meses?	
1- não (); 2- sim (); 3- não se lembra () Qual?	CO
_____	RR12
36- Você teve alguma ferida/ulcera na genitália nos últimos 12 meses?	
1- não (); 2- sim (); 3- não se lembra ()	FE
	RI12
37- Você procurou tratamento em alguma unidade de saúde	
1- não (); 2- sim ()	TR
	ATULC
SEÇÃO V – CONHECIMENTO E OPINIÃO	
38- De 0 a 10, qual é a nota que você se dá para os seus conhecimento quanto à DST/HIV, sendo que 0 você não sabe nada e 10 você sabe tudo:_____	
39- Você já foi vacinado contra hepatite B?	VA
1- não (); 2- sim (); 3 – Não sabe informar ()	CB

Caso afirmativo, quantas doses da vacina você recebeu?

1 dose (); 2 doses (); 3 doses (); não sabe informar ()

VA

Caso negativo, você aceita receber a vacina neste momento?

CDOSE

1- não (); 2- sim ()

Caso negativo, porque você não quer receber a vacina?

VA

1- medo da injeção (); 2- medo de pegar alguma doença; (); 3- acha desnecessária ()

CADES

MO

TNAD

40- Quais destas outras vacinas você já recebeu depois de adulto?**Anti-tetânica:** 1- não (); 2- sim (); 3 – Não sabe ()

VA

Anti-rubeóla: 1- não (); 2- sim (); 3 – Não sabe ()

CTET

Anti-febre amarela: 1- não (); 2- sim (); 3 – Não sabe ()

VA

CRUB

VA

CFA

SEÇÃO VI – COINFECÇÕES E TRATAMENTO**43- Estágio da doença por HBV**

1- cirrose (); 2- HCC () 3- Hepatite crônica ativa ()

DO

3- Hepatite crônica inativa () 4- Hepatite aguda () 5- outra ()

ENÇA

)_____

44- Tem alguma outra doença?

1- não (); 2- HCV () 3- HIV () 3- HBV () 4-HDV ()

DO

5 – outra: (diabete, HAI, doença metabólica, esteatose):

ENÇA

45- Faz uso de alguma medicação?

ME

1- não (); 2- sim ()

DIC

46- Faz uso de anti-retroviral?

AR

1- não (); 2- sim ()

ETROV**47- Usa ou já usou 3TC? Tempo uso:****3T**

1- não (); 2- sim ()

C**48- Usa ou já usou Tenofovir? Tempo uso :****TE**

1- não (); 2- sim ()

NOF**49- Usa ou usou algum tratamento para hepatite B? Tempo uso:****3T**

1- não (); 2- sim ()

C**50 Adefovir ? 1- não (); 2- sim () Tempo uso :****AD****EFOVIR****51- Entecavir ? 1- não (); 2- sim () Tempo uso :****EN****TECAV****52- Interferon convencional ? 1- não (); 2- sim () Tempo uso :****INF****CONV****53- Interferon peguilado ? 1- não (); 2- sim () Tempo uso :****INF****PEG****54- Peso: _____ Altura: _____****PE****IMC: _____****SO****AL****Tabagismo: 1- não (); 2- fuma atualmente (); 3- ex-fumante ()****TURA****Café: 1-não (); 2- sim () quanto ao dia****IM****? _____****C****Amendoim :1-Não(); 2-sim () quanto / semana?****TA****BAG****CA****FÉ****AF****LATOX**

SEÇÃO VII – RESULTADOS SOROLOGIAS E CONTROLE VACINAÇÃO

ANTI-HIV:	BLOT:	PCR:	HIV:	GENÓTIPO:
HTLV:	BLOT:	PCR:	HTLV:	GENÓTIPO
HCV	HCV	PCR:	HCV:	GENÓTIPO:
ELISA:	LIA:			
HBSAG:	HBSAG	ANTI-	ANTI-HBC	ANTI-HBS:
	QT	HBC TOTAL:	IGM:	
HBEAG:	ANTI-	HBV/PCR	GENÓTIPO	GENÓTIPO SEQ
	HBE:	QL:	RFLP	
ANTI-	ANTI-	ALT:	AST:	ALFAFETOPRO
HDV IGM:	HDV IGG:			TEINA
FOSF	BILIRRU	ALBUMI	TAP	CD4
ALC	BINA	NA		
	CARGA	CARGA	CARGA	BIÓPSIA
	VIRAL HBV	VIRAL HIV	VIRAL HCV	HEPÁTICA

ESQUEMA VACINA CONTRA HBV

1ª	DATA:_____	ANOTAR RELATO DE ALGUMA REAÇÃO APÓS AS
DOSE	/____/____	DOSES DA VACINA:
2º	DATA: _____	
DOSE	____/____/____	
3ª	DATA: _____	
DOSE	____/____/____	
ANTIHBBS	APÓS A 2ª	ANTIHBBS2: _____UI/L
DOSE :	____/____	

ANTIHB3 APÓS A 3ª _____/_____
DOSE : _____/_____ ANTIHB3: _____ UI/L

Nome do entrevistador: _____

Assinatura do entrevistador: _____