MARIA LUIZA DA NOVA

Estudo epidemiológico, clínico e molecular do vírus da hepatite B na cidade de Chapecó, Oeste de Santa Catarina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa de Gastroenterologia Clínica

Orientadora: Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Da Nova, Maria Luiza
Estudo epidemiológico, clínico e molecular do vírus da hepatite B na cidade de Chapecó, Oeste de Santa Catarina / Maria Luiza da Nova. -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Gastroenterologia Clínica.
Orientadora: Suzane Kioko Ono-Nita.

Descritores: 1.Hepatite B 2.Epidemiologia 3.Biologia molecular 4.Genótipo

USP/FM/DBD-174/10

Dedicatória

À minha família,

obrigada pelo apoio e carinho.

Agradecimentos

A **DEUS**, sempre presente em todos os momentos de minha vida;

Aos meus pais, **Carlos Alberto da Nova** e **Elza Bonnassis da Nova**, meus primeiros e eternos professores, cujos ensinamentos guardarei por toda minha existência;

Ao meu esposo, **João Daniel May Serafin**, por entender a minha "loucura" pela medicina. Obrigada pelo seu apoio e compreensão durante o ano de 2007, quando, já casados, moramos em cidades distintas. Obrigada por ter respeitado a minha vontade de realizar um sonho aqui concretizado;

À minha orientadora, **Dra Suzane Kioko Ono-Nita**, por ter me apoiado na elaboração desse trabalho. Durante esse período de convivência soube compreender minhas limitações e ajudou sempre que precisei;

Às **Guerreiras de Chapecó**, pessoas que me abraçaram e acreditaram no meu sonho. Venho aqui confessar a minha admiração pelo trabalho realizado no Município, onde sem a garra de vocês, acredito que o Setor de Hepatites não seria o mesmo. Agradeço a toda equipe da Vigilância Epidemiológica, do Centro de Saúde Norte e do Laboratório Municipal. Um MUITO OBRIGADA especial àquelas que sem dúvida tornaram esse trabalho possível: **Maria Luiza**, **Eldônia** e **Edília**, não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim;

Ao **Prof. Dr Flair José Carrilho**, que como titular da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da FMUSP, sempre nos incentiva em direção à busca constante do aprendizado;

Ao **Prof. Dr. Luiz Caetano da Silva**, exemplo de dedicação e amor à medicina. Pessoa que sempre surpreende pela sua sabedoria e humildade. Agradeço por todo aprendizado, pelas tardes de discussão, pelo nosso artigo e em especial pelas sugestões no exame de qualificação;

À **Dra Esther Buzaglo Dantas-Corrêa**, grande amiga e companheira. Sempre presente durante minha trajetória acadêmica. Muito obrigada por sempre ter confiado em mim e pelo seu carinho;

Às grandes amigas que conheci e passaram a fazer parte de minha vida: **Aline Lopes Chagas**, **Andréia Silva Evangelista**, **Érika Rabelo Forte de Siqueira**, **Helena Scavone Paschoale** e **Luciana Oba Onishi Kikuchi**. Muito obrigada por todo apoio e carinho;

A todo grupo de trabalho da Dra Suzane, **Helena Scavone Paschoale**, **Fernanda Rocha Barbosa**, **Ana Maria Silva Souza**, **Paulo Dominguez Nasser**, **Camila da Silva Ferreira** e **Marcelo Moreira Tavares de Souza**, sem os quais nada disso teria sido possível. Em especial, agradeço ao amigo **Paulo Dominguez Nasser** que abraçou minha causa e foi o grande responsável pelo estudo molecular aqui realizado. Paulo, obrigada pela sua dedicação;

À **Eliane Pereira do Carmo**, que muito ajudou no início do trabalho, mas que infelizmente não pôde concluí-lo comigo;

À **Sueli Nakatami**, por ter sido tão prestativa em auxiliar na realização deste trabalho;

À **Dra Marta Mitiko Deguti**, pelo apoio, sabedoria e carinho no ambulatório de hepatites. Obrigada pelas sugestões tão adequadas na qualificação;

À **Dra Wanda Maria Caly**, sempre tão disponível e atenciosa nas orientações durante os ambulatórios. Obrigada também pelas importantes sugestões apresentadas durante o exame de qualificação;

À **Dra Denise C. Paranaguá-Vezozzo**, por todos os momentos que passamos juntas, pelas manhãs no ultrassom, pelos almoços, pelas tardes de estudo, enfim, por todo apoio e carinho;

Ao **Dr Alberto Queiroz Farias, Dra Claudia Megumi Tani, Dra Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira e Dr Eduardo Luiz Rachid Cançado,** pelas orientações nos ambulatórios;

À **Elaine Tritany**, coordenadora do Programa Estadual das Hepatites Virais, pelo apoio no fornecimento de dados referentes à Hepatite B no Estado de Santa Catarina;

Ao **Sr. Walter A. Reis Filho**, chefe da divisão de informações em saúde do Estado de Santa Catarina, pela ajuda em disponibilizar o acesso às informações do Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e DATASUS;

Às secretárias **Cláudia de Arruda, Fabiana Renata Soares Bispo e Fátima Gomes**, que sempre me auxiliaram e contribuíram para a finalização deste trabalho;

À **Profª Rute Maria Coelho**, pela sua cuidadosa correção ortográfica e gramatical;

Aos **pacientes**, principal motivação desta pesquisa.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Regras do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de janeiro de 2009.

Sumário

Lista de tabelas
Lista de figuras
Lista de abreviaturas e siglas
Resumo
Sumary
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Histórico 2
1.2 Epidemiologia da infecção pelo VHB 3
1.2.1 Infecção pelo VHB no Brasil 5
1.2.2 Infecção pelo VHB no Estado de Santa Catarina 6
1.2.2.1 O Estado de Santa Catarina 7
1.2.2.2 A Cidade de Chapecó 7
1.2.2.3 Panorama da infecção pelo VHB no Estado de Santa Catarina 8
1.3 Vias de transmissão 11
1.4 História natural e quadro clínico 13
1.5 Virologia 16
1.5.1 Genoma viral 18
1.5.2 Diversidade genética 19
1.5.3 Distribuição dos genótipos do VHB 20
1.6 Imunização contra o VHB 21
1.7 Notificação 23
1.8 Justificativa do estudo 25
2 OBJETIVOS 27
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS 29
3.1 Definições 30
3.2 Tipo de delineamento 30
3.3 Aspectos éticos 30
3.4 Local do estudo 31
3.5 Recrutamento dos pacientes 32
3.5.1 Departamento de Informática do SUS-DATASUS 33
3.5.1.1 Cartão Nacional de Saúde – CNS 33
3.5.1.2 Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM 34
3.5.2 Indivíduos em estudo 35
3.5.3 Critérios de seleção dos pacientes 36
3.6 Coleta 41

3.7 Transporte do material 42
3.8 Análise laboratorial 42
3.9 Detecção viral por meio de técnica de biologia molecular 44
3.9.1 Extração de DNA viral 44
3.9.2 Desenho dos iniciadores 46
3.9.3 Detecção do DNA do VHB nas amostras 48
3.9.4 Extração para quantificação 49
3.9.5 Quantificação absoluta em PCR por tempo real do VHB 49
3.9.6 Amplificação por PCR 50
3.9.7 Purificação de fragmentos de PCR 52
3.9.8 Eletroforese 52
3.9.9 Sequenciamento de DNA 53
3.9.10 Análise de sequências 54
3.9.10.1 Validação, montagem da sequência consenso e alinhamento 54
3.9.10.2 Genotipagem 55
3.10 Biossegurança 57
3.11 Análise estatística 58
3.12 Revisão bibliográfica 58
4 RESULTADOS 59
4.1 Casuística 60
4.2 Dados clínicos 62
4.3 Dados laboratoriais 67
5 DISCUSSÃO 78
6 CONCLUSÕES 97
7 ANEXOS 99
7.1 Aprovação Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq 100
7.2 Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina 101
7.3 Termo de Consentimento Livre Esclarecido 103
7.4 Questionário 107
8 REFERÊNCIAS 111

Listas

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Prevalência de AgHBs em doadores de sangue nas cidades de Florianópolis, Chapecó, Criciúma e Joinville nos anos de 1999, 2000 e 2001 10

Tabela 2 - Prevalência de anti-HBc em doadores de sangue nas cidades de Florianópolis, Chapecó, Criciúma e Joinville nos anos de 1999, 2000 e 2001 11

Tabela 3 - Casos notificados de Hepatites B, C e A no período de 1993 a 2008 no município de Chapecó/SC 24

Tabela 4 - Doadores de sangue com sorologia para anti-HBc total reagente no município de Chapecó no período de 1995 a 2006 25

Tabela 5 - Valores de referência (VR) dos exames de bioquímica conforme metodologia utilizada pelo Laboratório Municipal de Análises Clínicas do Município de Chapecó..... 43

Tabela 6 - Número de acesso e genótipo das sequências do G*enebank* utilizadas para genotipar na região S..... 55

Tabela 7 - Distribuição dos pacientes conforme a idade no momento da notificação 62

Tabela 8 - Análise comparativa da frequência de pacientes com idade menor ou igual a 19 anos nos dois grupos estudados 63

Tabela 9 - Distribuição dos pacientes conforme o sexo 63

Tabela 10 - Distribuição dos pacientes conforme a etnia 63

Tabela 11 - Distribuição dos pacientes conforme a forma de diagnóstico da hepatite B crônica 64

Tabela 12 - Distribuição dos pacientes conforme a naturalidade 65

Tabela 13 - Naturalidade dos pais (pai e mãe) dos casos em estudo 65

Tabela 14 - Naturalidade dos avós (avó materna, avô materno, avó paterna e avô paterno) dos casos em estudo 66

Tabela 15 - Distribuição dos pacientes conforme o tratamento para a hepatite B 67

Tabela 16 - Perfil evolutivo do AgHBe: época da notificação (1996 e 2006) e atual (2007 e 2008) 67

Tabela 17 - Quantificação por PCR em tempo real do VHB, portadores de VHB AgHBe +.....71

Tabela 18 - Quantificação por PCR em tempo real do VHB, portadores de VHB AgHBe - 71

Tabela 19 - Frequência de pacientes AgHBe negativos com baixa (<2.000 UI/mL) ou alta (≥2.000 UI/mL) carga viral com base nos limites de ALT (xLSN), conforme o Laboratório Municipal de Chapecó 72

Tabela 20 - Frequência de pacientes AgHBe negativos com baixa (<2.000 UI/mL) ou alta (≥2.000 UI/mL) carga viral com base nos limites de ALT (xLSN), conforme Prati *et al* (Prati, 2002).....72

Tabela 21 - Pacientes portadores de hepatite B crônica, onde foi possível a genotipagem do VHB 75

Tabela 22 - Tratamento para hepatite B dos portadores de VHB que foram genotipados.....77

Tabela 23 - Distribuição conforme o perfil do AgHBe dos pacientes que tiveram o VHB seqüenciado e genotipado 77

Lista de Figuras

Figura 1 - Mapa do Estado de Santa Catarina onde se evidenciam os limites do Estado, a sua capital Florianópolis e as cidades com 100.001 a 200.000 habitantes 7

Figura 2 - Distribuição geográfica da incidência de hepatite B crônica no Estado de Santa Catarina no ano de 2006 8

Figura 3 - História natural da hepatite B 13

Figura 4 - Seleção da casuística do Grupo A (casos notificados no ano de 1996) 38

Figura 5 - Seleção da casuística do Grupo B (casos notificados no ano de 2006) 39

Figura 6 - Esquema do DNA genômico do VHB. Localização dos iniciadores utilizados no gene S. *HBV_F_TR* iniciador direto do PCR em tempo real, *HBV_S_TR* sonda 5´FAM-MGB para o PCR em tempo real, *HBV_S_F* iniciador direto do PCR convencional e sequenciamento, *HBV_R_TR* iniciador reverso do PCR em tempo real, *HBV_S_R1/R2* iniciadores reversos do PCR convencional e sequenciamento. 47

Figura 7 - Valor da alanina aminotransferase (ALT) coletada no momento da entrevista, grupo A. Valores representados em número de vezes o limite superior da normalidade, conforme referência utilizada pelo Laboratório Municipal de Chapecó 68

Figura 8 - Valor da alanina aminotransferase (ALT) coletada no momento da entrevista, grupo A. Valores representados em número de vezes o limite superior da normalidade, conforme referência recomendada por Prati *et al* (Prati, 2002) 69

Figura 9 - Valor da alanina aminotransferase (ALT) coletada no momento da entrevista, grupo B. Valores representados em número de vezes o limite superior da normalidade, conforme referência utilizada pelo Laboratório Municipal de Chapecó 69

Figura 10 - Valor da alanina aminotransferase (ALT) coletada no momento da entrevista, grupo B. Valores representados em número de vezes o limite superior da normalidade, conforme referência recomendada por Prati *et al* (Prati, 2002) 70

Figura 11 - Média da ALT (conforme LSN sugerido por Prati *et al*) nos pacientes AgHBe negativos do grupo A, conforme alta ou baixa carga viral.....73

Figura 12 - Média da ALT (conforme LSN sugerido por Prati *et al*) nos pacientes AgHBe negativos do grupo B, conforme alta ou baixa carga viral.....74

Figura 13 - Árvore filogenética, não enraizada, de 145 sequências da região S com 305 nucleotideos (40 seqs controle do Genbank e 105 seqs deste estudo) gerada no programa PAUP* utilizando-se o método de distância com o modelo TVM+I+G e algoritmo de NJ para a reconstrução da topologia. Valores de bootstrap obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os bootstraps dos ramos com valores acima de 70. 76

Lista de Abreviaturas e Siglas

AgHBc	Antígeno core do Vírus da Hepatite B
AgHBe	Antígeno “e” do Vírus da Hepatite B
AgHBs	Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno core do Vírus da Hepatite B
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno “e” do Vírus da Hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B
Anti-HCV	Anticorpo contra o Vírus da Hepatite C
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cccDNA	*Covalently closed circular DNA*
CDC	*Centers for Disease Control*
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CIASC	Centro de Informática e Automação do Estado de SC
CIS	Centro Integrado de Saúde
cm	centrímetro
CNS	Cartão Nacional de Saúde
cols.	Colaboradores
CTA	Centro de Testagem e Aconselhamento
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
DeCS	Descritores em Ciências da Saúde
DIVE	Diretoria de Vigilância Epidemiológica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ed.	edição

ELISA	*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
et al.	e outros
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g/dL	grama por decilitro
HEMOSC	Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
km	quilômetro
Km^2	quilômetro quadrado
LIM	Laboratório de Investigação Médica
log	logaritmo
LSN	Limite Superior da Normalidade
MeSH	*Medical Subject Headings*
mg	miligrama
mg/dL	miligama por decilitro
min	minuto
mL	mililitro
ng	nanograma
ng/mL	nanograma por mL
nM	nanomol
µL	microlitro
µM	micromol
NOB-SUS	Norma Operacional Básica do SUS
^oC	graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde

pb	pares de bases
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
pmol	picomol
PR	Paraná
RNA	Ácido Ribonucléico
RNI	Relação Normatizada Internacional
rpm	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
TAP	Tempo de Atividade de Protrombina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UI	Unidades Internacionais
UI/L	Unidades Internacionais por litro
UI/mL	Unidades Internacionais por mL
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VHD	Vírus da Hepatite Delta
VR	Valor de Referência
vs	versus
v/v	razão entre o volume da solução para o volume total da solução
WHO	World Health Organization

Resumo

Da Nova ML. *Estudo epidemiológico, clínico e molecular do vírus da hepatite B na cidade de Chapecó, Oeste de Santa Catarina* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 124 p.

INTRODUÇÃO: Hepatite B é uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo, controlada em países onde a vacinação foi implantada, porém permanece alta em populações de risco e em países onde a transmissão vertical e horizontal intradomiciliar ainda persiste. O Estado de Santa Catarina é considerado hoje uma região de alta endemicidade para o VHB, tem uma prevalência estimada de AgHBs em doadores de sangue de 1,14%, o que é consideravelmente maior do que aquela estimada para o Brasil (0,61%). Em Chapecó, oeste de Santa Catarina, a prevalência do AgHBs em doadores de sangue foi de 3,2% em 1999, 1,63% em 2000 e 1,54% em 2001, significativamente maior do que em outras cidades do Estado. **OBJETIVOS:** Estudar os portadores de hepatite B crônica no município de Chapecó, possibilitando o conhecimento das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais do vírus nesta região de alta endemicidade. **MÉTODOS:** Estudou-se dois grupos de portadores de hepatite B crônica naquela região. O primeiro grupo (Grupo A) foi composto pelos casos notificados no ano de 1996 e o segundo grupo (Grupo B) foi composto pelos casos notificados no ano de 2006. **RESULTADOS:** Dos 352 pacientes notificados nos anos de 1996 e 2006 como portadores de hepatite B crônica no Município de Chapecó, 150 pacientes foram elegíveis após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. A média de idade na época da notificação do grupo A foi de 29,9 anos (± 10,3) e do grupo B foi de 34,9 anos (± 11,9). O principal meio de diagnóstico foi após doação de sangue, sendo 53,6% pacientes no grupo A e 34,8% pacientes no grupo B. A maioria nasceu na região Oeste de Santa Catarina, sendo a cidade de Chapecó a mais freqüente. Seus familiares são naturais, em sua maioria, do Estado do Rio Grande do Sul. 96,4% dos pacientes do grupo A e 86,4% do grupo B apresentam AgHBe negativo. A maioria dos pacientes nos dois períodos estudados apresentava valores de ALT até 2x o LSN. 60,2% dos pacientes AgHBe negativos do grupo A apresentava carga viral ≤ 2.000 UI/mL, enquanto no grupo B 78,3% apresentava carga viral > 2.000 UI/mL. Todos os 105 pacientes que tiveram o VHB genotipado, apresentaram VHB genótipo D. **CONCLUSÕES:** A maioria dos pacientes é natural do Oeste de Santa Catarina e seus familiares do Estado do Rio Grande do Sul e Região do Mediterrâneo. Aminotransferases próximas aos limites da normalidade, AgHBe negativo e VHB genótipo D caracterizam os portadores de hepatite B crônica nessa região. A maioria dos pacientes do grupo A apresentou carga viral ≤ 2.000 UI/mL e no grupo B carga viral > 2.000 UI/mL.

Descritores: 1.Hepatite B 2.Epidemiologia 3.Biologia molecular 4.Genótipo

Summary

Da Nova ML. *An epidemiological, clinical and molecular study of hepatitis B virus infection in Chapecó, western Santa Catarina province* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 124 p.

INTRODUCTION: Viral hepatitis B is one of the most prevalent infectious diseases in the world. It remains under control in countries where vaccination programs have been established; however, its prevalence is still high in at-risk populations and in countries where vertical and horizontal intra domestic transmission persists. Santa Catarina province is currently considered a region of high endemicity for hepatitis B virus (HBV), with an estimated prevalence of 1.14% HBsAg in blood donors, which is considerably higher than the estimated prevalence for the country (0.61%). In Chapecó, a city located in the western region of the province, HBsAg prevalence in blood donors was 3.2% in 1999, 1.63% in 2000 and 1.54% in 2001, values that were significantly higher than in other cities of the province. **OBJECTIVES:** To study the carriers of chronic hepatitis B in the city of Chapecó in order to determine the epidemiological, clinical, and laboratorial aspects of HBV infection in this high endemicity region. **METHODS:** Two groups of carriers in that region were studied. The first group, designated Group A, was composed of cases that had been notified in the year 1996; while the second group, designated Group B, comprised cases that had been notified in the year 2006. **RESULTS:** From the 352 patients that had been notified as chronic hepatitis B carriers in the years 1996 and 2006 in Chapecó, 150 were eligible for inclusion in the study according to the inclusion and exclusion criteria. The mean age at the time of notification for Group A was 29.9 years-old (±10.3) and for Group B was 34.9 years-old (± 11.9). The main reason leading to the diagnosis was routine screening of blood donors, which was responsible for 53.6% of diagnoses in Group A and 34.8% of diagnoses in Group B. The majority of patients were born in western Santa Catarina province, most frequently in the city of Chapecó. Their relatives were mostly from Rio Grande do Sul province. HBeAg was negative in 96.4% of Group A patients and 86.4% of Group B patients. The majority of patients from both periods studied had ALT values up to twice the upper normal limit (UNL). From HBeAg negative patients of Group A, 60.2% had a viral load ≤ 2.000 UI/mL; while from those of Group B, 78.3 % had viral loads > 2.000 UI/mL. All of the 105 cases in which the genotype of HBV has been determined were infected by genotype D HBV. **CONCLUSIONS:** The majority of patients were born in western Santa Catarina, and their relatives were from Rio Grande do Sul province or from Europe Mediterranean countries. Viral hepatitis B carriers from this region characteristically had aminotransferases close to the normal limits, negative HBeAg and were infected with genotype D HBV. Most of the patients from Group A had viral loads ≤ 2.000 UI/mL, while most of the patients from Group B had viral loads > 2.000 UI/mL.

Descriptors: 1.Hepatitis B 2.Epidemiology 3.Molecular biology 4.Genotype

1 Introdução

1.1 HISTÓRICO

A Hepatite B é uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo. Estima-se que 350 milhões de pessoas são cronicamente infectadas pelo vírus da hepatite B (VHB) e, aproximadamente, 1 milhão de mortes anualmente estão relacionadas à doença hepática crônica pelo VHB (Lee, 1997; Gayotto, 2001; McMahon; 2009a). A sua prevalência tem sido reduzida em países onde a vacinação foi implantada, porém permanece alta em populações de risco e em países onde a transmissão vertical e horizontal intradomiciliar não é controlada, o que torna a hepatite B crônica um relevante problema de saúde pública no Brasil e no mundo.

O VHB, descoberto em 1964, pertence à família dos Hepadnavírus, vírus DNA com aproximadamente 3200 pares de bases (Blumberg, 1997). Tem tropismo pelo tecido hepático, e necessita do hospedeiro para completar seu ciclo de vida. Pode ser detectado no sangue e derivados, saliva, sêmen, secreção vaginal e exsudatos serosos de úlceras cutâneas (Lee, 1997; Lok, 2001; Ganem, 2004). Tais possibilidades de propagação, aliadas ao fato de que o indivíduo infectado pode tornar-se portador crônico, explicam a alta prevalência na população geral e sua distribuição em diferentes regiões do mundo (Gayotto, 2001).

A transmissão do VHB pode resultar da contaminação com sangue e derivados, além da transmissão sexual e vertical. Os grupos de alto risco

incluem pessoas procedentes de áreas endêmicas, especialmente os que têm contato com portadores da infecção, profissionais da área da saúde, pacientes em hemodiálise, hemofílicos, homossexuais, profissionais do sexo, viciados em drogas e imunodeprimidos.

A contaminação pelo VHB estabelece-se, principalmente, no primeiro ano de vida e na fase adulta. A primeira situação é observada nas áreas de alta endemicidade (Ásia, África, Amazônia Ocidental), enquanto nas áreas de baixa endemicidade o contágio mais importante verifica-se nos grupos de alto risco.

Portadores do VHB apresentam maior risco de desenvolver cirrose, descompensação hepática, carcinoma hepatocelular (CHC) e doenças extra-hepáticas, como a poliarterite nodosa, glomerulonefrite e vasculite leucocitoclástica (Villeneuve, 2005). Após infecção aguda, 3 a 5% dos adultos e mais de 95% das crianças falham em produzir resposta imune, tornando-se portadores crônicos do VHB (Keeffe, 2006). Embora muitos não desenvolvam complicações hepáticas da hepatite B crônica, 15 a 40% podem vir a desenvolver sérias complicações durante suas vidas (Lok, 2001). Aproximadamente 25% dos casos de crianças infectadas no período neonatal, evoluem prematuramente para cirrose ou CHC (Keeffe, 2006).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VHB

Hepatite B é uma doença de distribuição universal, que apresenta variações na sua distribuição geográfica. Conforme a prevalência sorológica

do antígeno de superfície (AgHBs) ou de marcadores de infecção pregressa resolvida (anti-HBc) em uma determinada população, o mundo pode ser classificado em três regiões endêmicas distintas (Lavanchy, 2004; Souto, 1999):

1- Regiões de baixa endemicidade: onde a prevalência de AgHBs é menor que 2% e a infecção pregressa ocorre em menos de 20% da população. As seguintes áreas caracterizam-se nessa faixa: América do Norte, Norte da Europa, América do Sul (em especial países do Cone Sul), Nova Zelândia e grande parte da Austrália.

2- Regiões de endemicidade intermediária ou moderada: onde a prevalência de AgHBs está entre 2 e 7% e a infecção pregressa ocorre entre 20 a 60% da população. Englobam nesse grupo: Norte da América do Sul, Europa Ocidental, Mediterrâneo, Rússia e Japão.

3- Regiões de alta endemicidade: a prevalência de AgHBs é maior que 8% e a infecção pregressa ocorre em mais de 60% da população. Tais regiões são constituídas pela Bacia Amazônica (Amazônia Ocidental), África Subsaariana, Sudeste Asiático, parte da Oceania, comunidades de aborígenes australianos, Círculo Polar Ártico (Alasca, Groelândia, norte do Canadá) e parte do Caribe.

1.2.1 Infecção pelo VHB no Brasil

No Brasil, a maioria dos dados obtidos é proveniente de inquéritos, baseados em levantamentos em bancos de sangue. Pereira *et al* realizaram o primeiro inquérito nacional para avaliar a prevalência de hepatite B em três regiões brasileiras (Nordeste, Centro-Oeste e Distrito Federal). O estudo incluiu 7881 pessoas, e evidenciou o AgHBs em menos de 1% dessa população (Pereira, 2009). No geral, nota-se um gradiente decrescente de endemicidade na região Norte-Sul. Do ponto de vista epidemiológico, a infecção costuma ser dinâmica, uma vez que sua prevalência sofre influência das condições socioeconômicas, hábitos de vida, movimentos migratórios e grau de exposição ao risco (Souto, 1999; Focaccia, 2007).

Desta forma, a região Norte do país é considerada hiperendêmica. Há grande heterogeneidade nas prevalências locais, mesmo em áreas consideradas próximas. Encontra-se alta frequência de marcadores sorológicos nas regiões dos afluentes da Bacia Amazônica - como é o caso dos rios Juruás, Purus e Médio Solimões -, em especial a cidade de Lábrea, notoriamente conhecida pelo grande número de casos agudos fatais decorrentes da co-infecção pelo vírus Delta (VHD). De fato, o VHD é muito prevalente nessa região brasileira, atuando como um fator complicador da infecção pelo VHB (Souto, 1999; Fonseca, 2007).

A região Sudeste configura área de baixa prevalência. A cidade de São Paulo foi mapeada em um estudo populacional na década de 90, cuja prevalência obtida de AgHBs foi de 1,04% (IC95% 0,43-1,65) e de anti-HBc de 4,9% (IC 3,6-6,2) (Focaccia, 2007).

1.2.2 Infecção pelo VHB no Estado de Santa Catarina

1.2.2.1 O Estado de Santa Catarina

O Estado de Santa Catarina está localizado na região Sul do país, limitado ao norte pelo Estado do Paraná, ao sul pelo Rio Grande do Sul, ao leste pelo Oceano Atlântico e ao oeste pela Argentina (Figura 1). Sua colonização foi efetuada por imigrantes europeus. Os portugueses açorianos colonizaram o litoral no século XVIII; os alemães colonizaram o Vale do Itajaí, parte da região sul e o norte catarinense em meados do século XIX; e os italianos colonizaram o sul do Estado no final do mesmo século. O oeste catarinense, na primeira metade do século XX, foi colonizado por gaúchos de origem italiana e alemã (Piazza, 1987).

Santa Catarina está separada tanto em subdivisões geográficas denominadas mesorregiões e microrregiões, quanto em subdivisões administrativas denominadas municípios. As mesorregiões compreendem as grandes regiões do Estado, unidas por laços geográficos, demográficos e culturais. Atualmente existem seis mesorregiões: Grande Florianópolis, Norte Catarinense, Oeste Catarinense (onde se localiza o município de Chapecó), Serrana, Sul Catarinense e Vale do Itajaí. As microrregiões são formadas pelo conjunto de cidades que se engloba a uma cidade pólo. O Estado conta, atualmente, com vinte microrregiões aqui destacadas: Araranguá, Blumenau, Campos de Lages, Canoinhas, Chapecó, Concórdia, Criciúma, Curitibanos, Florianópolis, Itajaí, Ituporanga, Joaçaba, Joinville,

Rio do Sul, São Bento do Sul, São Miguel do Oeste, Tabuleiro, Brusque, Tubarão e Xanxerê. Já os 293 municípios presentes no Estado, são divisões administrativas que possuem relativa autonomia e concentram poder político local (IBGE, 2009).

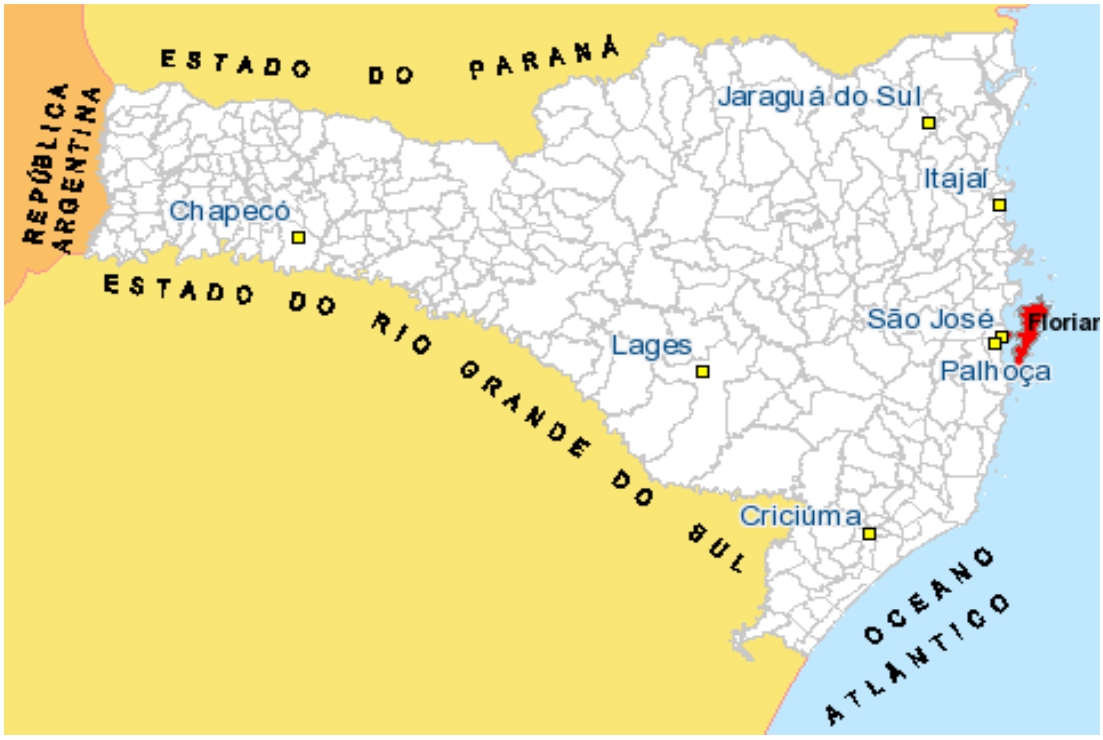


Figura 1 - Mapa do Estado de Santa Catarina onde se evidenciam os limites do Estado, a sua capital Florianópolis e as cidades com 100.001 a 200.000 habitantes

FONTE: CIASC

1.2.2.2 A Cidade de Chapecó

Em 25 de agosto de 1917, por meio da Lei No 1.147, o governo estadual criou o município de Chapecó (Piazza, 1983), que se localiza no oeste de Santa Catarina, a 630 km de Florianópolis (capital do Estado). Esse município exerce a função de capital do oeste Catarinense e pólo dessa

região, que conta com mais de 200 municípios e com mais de 1 milhão de habitantes; ali encontram-se as sedes das principais empresas processadoras e exportadoras de suínos, aves e derivados do Brasil. Estima-se que sua população atual seja composta por mais de 177 mil habitantes, dos quais 93% pertencem à zona urbana e 7% à rural.

Quando de sua criação, o município de Chapecó detinha 14 mil km²; hoje, em função dos desmembramentos municipais, possui uma área de 625,6 km², cuja sede urbana apresenta 113,24 km². Na antiga extensão territorial do Município de Chapecó, os limites iam desde o Município de Joaçaba até a fronteira com a República Argentina, cujo divisor era o Rio Peperi Guassu. A Região Oeste de Santa Catarina representa o último reduto de povoamento e colonização das terras catarinenses (IBGE, 2009).

Com base em uma retrospectiva histórica, a região oeste foi objeto de questões de domínio de sua área desde os tempos do Brasil Colônia: Questão de Missiones ou Questão de Palmas e Questão de Limites (Contestado) entre SC e PR, fatos que dificultaram o processo efetivo de povoamento (Piazza, 1983).

A região foi habitada apenas por índios até 1838, quando tanto tropeiros paulistas quanto imigrantes italianos e alemães vindos do Rio Grande do Sul, começaram a cruzar a região, rumo a São Paulo, para comercializar o gado. A partir das paradas de tropeiros e com a vinda das companhias colonizadoras, iniciou-se o processo de migração de outros Estados, principalmente do Rio Grande do Sul (Piazza, 1987).

1.2.2.3 Panorama da infecção pelo VHB no Estado de Santa Catarina

O Estado de Santa Catarina é considerado, hoje, uma região de alta endemicidade para o VHB, sendo as áreas endêmicas aquelas localizadas no oeste do Estado, região colonizada por descendentes de italianos e alemães (Figura 2) (Souto, 1999; Cabral, 1987).

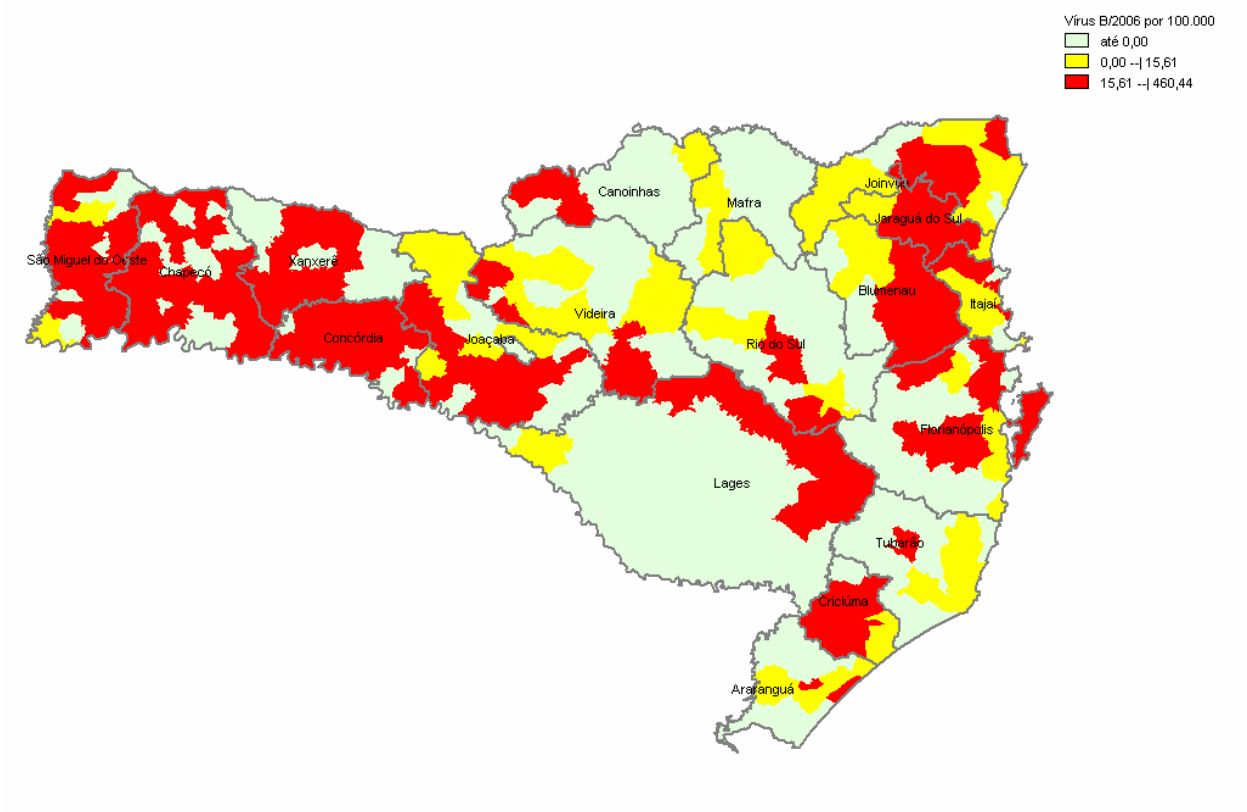


Figura 2- Distribuição geográfica da incidência de hepatite B crônica no Estado de Santa Catarina no ano de 2006

FONTE: DIVE/SES/SC

Santa Catarina tem uma prevalência estimada de AgHBs em doadores de sangue de 1,14%, o que é consideravelmente maior do que aquela estimada para o Brasil (0,61%) (Cruz, 2005). Em Chapecó, oeste de

Santa Catarina, a prevalência do AgHBs em doadores de sangue foi de 3,2% em 1999, 1,63% em 2000 e 1,54% em 2001, significativamente maior do que em outras cidades do Estado. Na Ilha de Santa Catarina a prevalência deste marcador foi de 0,71%, 1,15%, 0,58%; em Joinville, norte do estado, a prevalência foi de 0,58%, 0,45% e 0,53%; e em Criciúma, sul do estado, foi de 0,5%, 0,29% e 0,31% nos anos de 1999, 2000 e 2001 respectivamente. Quando se considera o marcador de contato prévio, o anti-HBc total, observa-se que a prevalência em Chapecó foi de 29,04%, 18,09% e 12,72% nos anos de 1999, 2000 e 2001 respectivamente, enquanto na Ilha de Santa Catarina foi de 5,3% em 1999, 4,52% em 2000 e 3,53% em 2001; em Criciúma foi de 6,52%, 3,83% e 2,95%; e em Joinville foi de 7,17%, 6,81% e 4,23% nos mesmos anos (Rosini, 2003) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Prevalência de AgHBs em doadores de sangue nas cidades de Florianópolis, Chapecó, Criciúma e Joinville nos anos de 1999, 2000 e 2001

Cidade/ Ano	1999	2000	2001
	N (%)	N (%)	N (%)
Florianópolis	176/24.570 (0,71)	280/24.274 (1,15)	159/27.396 (0,58)
Chapecó	375/11.713 (3,20)	149/9.132 (1,63)	122/7.909 (1,54)
Criciúma	36/7.193 (0,50)	20/6.858 (0,29)	23/7.493 (0,31)
Joinville	86/14.715 (0,58)	63/13.957 (0,45)	79/14.994 (0,53)

FONTE: Rosini N, et al. Seroprevalence of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in southern Brazil, 1999-2001. Braz J Infect Dis. 2003;7:262-7

Tabela 2 - Prevalência de anti-HBc em doadores de sangue nas cidades de Florianópolis, Chapecó, Criciúma e Joinville nos anos de 1999, 2000 e 2001

Cidade/ Ano	1999 N (%)	2000 N (%)	2001 N (%)
Florianópolis	1.303/24.570 (5,30)	1.097/24.274 (4,52)	968/27.396 (3,53)
Chapecó	3.401/11.713 (29,04)	1.632/9.132 (18,09)	1.066/7.909 (12,72)
Criciúma	469/7.193 (6,52)	263/6.858 (3,83)	221/7.493 (2,95)
Joinville	1055/14.715 (7,17)	951/13.957 (6,81)	635/14.994 (4,23)

FONTE: Rosini N, et al. Seroprevalence of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in southern Brazil, 1999-2001. Braz J Infect Dis. 2003;7:262-7

1.3 VIAS DE TRANSMISSÃO

O VHB é encontrado no sangue em altas concentrações. As vias parenteral e sexual são altamente efetivas para a transmissão. Sabe-se que o vírus é estável em superfícies inanimadas, e pode persistir viável no meio ambiente por cerca de sete dias, sem perder sua infectividade (Souto, 1999; de Araújo, 2007). O VHB é passível de infecção quando localizado em soro, sêmen, secreção vaginal, exsudatos, serosas e líquor. Porém, o risco de infecção é baixo através do contato com saliva, urina, fezes, lágrima, suor e bile, devido ao baixo inócuo viral (Guirrao, 2006). Apesar de ser detectado em leite materno, a transmissão pela amamentação não se mostra efetiva

(de Araújo, 2007). A via de transmissão pode não ser identificada em até 30-35% dos indivíduos infectados. Nesses casos, a aquisição viral, provavelmente, é consequente a formas menos evidentes de transmissão parenteral (Guirrao, 2006; Dehesa-Violante, 2007).

De acordo com a distribuição endêmica geográfica, é possível distinguir padrões típicos de transmissão (Guirrao, 2006; Alter, 2003). Nas regiões de alta endemicidade predomina a transmissão vertical, principalmente durante o parto, período neonatal e primeira infância (menores de cinco anos), provavelmente por contato íntimo interpessoal (Guirrao, 2006; de Araujo, 2007).

Nas regiões de moderada endemicidade, encontram-se padrões mistos de transmissão, tanto por via vertical como horizontal (contato interpessoal, sexual ou parenteral).

Nas regiões de baixa endemicidade, impera a transmissão horizontal, quando o vírus circula predominantemente por via sexual ou sanguínea em grupos com comportamento de risco. Entre eles destaca-se profissionais do sexo, usuários de drogas ilícitas intravenosas, homossexuais e heterossexuais promíscuos, bem como indivíduos com histórico de doenças sexualmente transmissíveis. Nesta situação, a grande parcela dos acometidos é constituída por adolescentes e adultos jovens (Guirrao, 2006; Fonseca, 2007).

1.4 HISTÓRIA NATURAL E QUADRO CLÍNICO

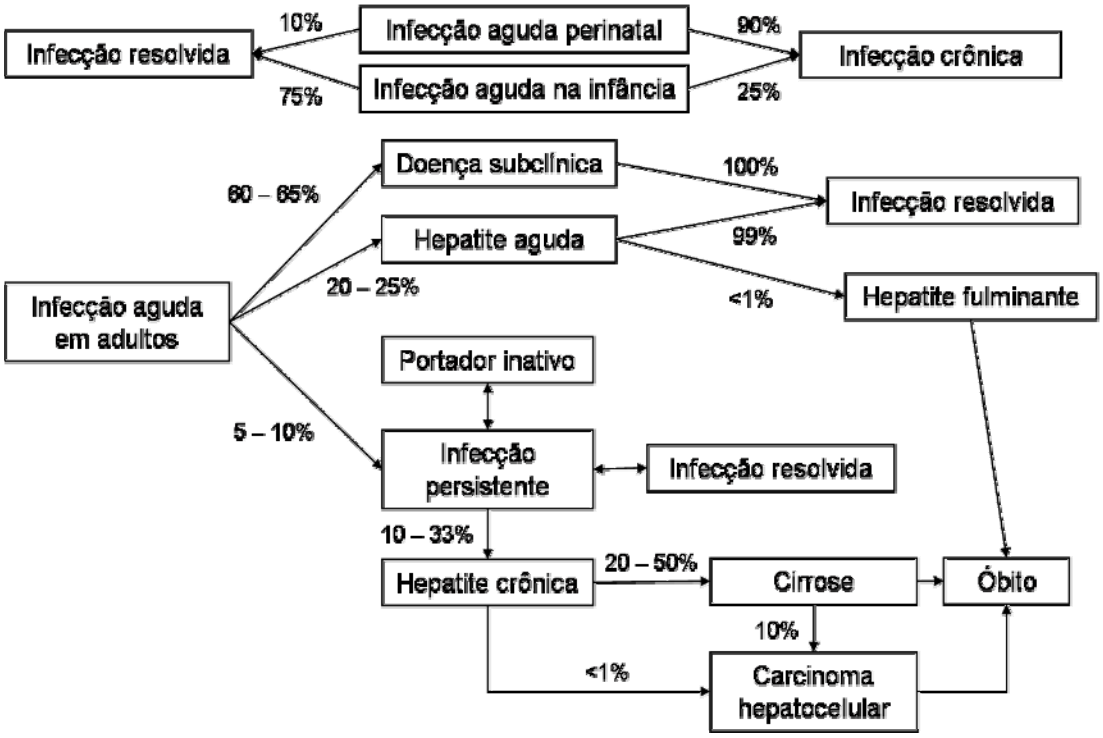


Figura 3 - História natural da hepatite B

FONTE: Adaptado de Lok, 2009; McMahon, 2009a

A hepatite B é uma doença necroinflamatória do fígado causada por infecção persistente pelo VHB (Figura 3). A história natural da hepatite B depende, principalmente, das respostas do hospedeiro em eliminar os hepatócitos infectados pelo VHB e pode ser dividida em 3 fases (Lok, 2009):

Fase de tolerância: geralmente ocorre na infância e no adulto jovem. Observa-se replicação intensa do VHB, elevada viremia e níveis séricos de DNA do VHB, expressão do AgHBe e limitada reatividade imunológica. As lesões hepáticas são discretas, assintomáticas e não há elevação das aminotransferases.

Fase de clareamento: “perda” da tolerância imunológica, com episódios de exacerbações semelhantes à hepatite aguda B. Caracteriza-se por resposta imune celular com eliminação dos hepatócitos infectados, queda dos niveis séricos do AgHBe e aumento do anti-HBe (seroconversão).

Fase de integração do DNA do VHB e tolerância: a replicação ativa do VHB cessa nos hepatócitos, mas as células contendo o DNA do VHB integrado continuam a expressar o AgHBs. O anti-HBe é detectado no soro.

Assim, devido às diferentes situações e formas de apresentação da hepatite viral pelo VHB, é importante conhecer-se as definições relacionadas a esta infecção (Lok, 2009):

Hepatite crônica B. É a doença necroinflamatória do fígado causada por infecção persistente pelo VHB. Pode ser classificada em: a) Hepatite crônica B AgHBe positivo e b) Hepatite crônica B AgHBe negativo. Critérios diagnósticos: AgHBs positivo por mais de 6 meses, DNA do VHB maior do que 20.000 UI/mL, elevações persistentes de transaminases e histologia compatível com hepatite crônica.

Portador crônico do AgHBs inativo. Infecção persistente pelo VHB sem doença necroinflamatória significativa. Critérios diagnósticos: AgHBs positivo por mais de 6 meses, AgHBe negativo/anti-HBe positivo, DNA do VHB menor do que 2.000 UI/mL, transaminases persistentemente normais e ausência de atividade necroinflamatória na histologia hepática.

Hepatite B resolvida. Infecção pelo VHB seguida de ausência de evidência sorológica, bioquímica ou histológica de doença ativa pelo VHB.

Exacerbação aguda (*Flare*). Elevações intermitentes das aminotransferases maiores do que 10 vezes o limite superior normal (LSN) ou duas vezes o valor basal.

Reativação. Reaparecimento da atividade necroinflamatória do fígado em paciente reconhecidamente portador crônico do AgHBs inativo ou hepatite B resolvida.

Clareamento do AgHBe. Desaparecimento do AgHBe em paciente previamente AgHBe positivo.

Seroconversão do AgHBe. Desaparecimento do AgHBe e detecção do anti-HBe em paciente previamente AgHBe positivo e anti-HBe negativo, associado à diminuição do DNA do VHB sérico (menor do que 20.000 UI/mL).

Reversão do AgHBe. Reaparecimento do AgHBe em paciente previamente AgHBe negativo, anti-HBe positivo.

A hepatite crônica pelo VHB, geralmente, é assintomática até o aparecimento de sintomas e sinais de doença hepática avançada. Muitos pacientes descobrem a hepatite por meio de sorologias positivas ou elevações de aminotransferases ao realizarem uma doação de sangue ou durante a realização de exames de sangue de rotina ou na investigação de outras doenças. Quando questionados, a astenia é um dos sintomas mais relatados. Outras manifestações relatadas incluem artralgias, anorexia, dor vaga e persistente em hipocôndrio direito. Icterícia, aparecimento de hematomas e sangramento fácil, edema e ascite indicam desenvolvimento

de doença hepática avançada, como a evolução para a cirrose hepática e/ou desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (Nita, 2002).

1.5 VIROLOGIA

O vírus da hepatite B pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*. Infecta, além de humanos, aves e mamíferos (esquilos, marmotas e patos) (Locarnini, 2003). Apresenta tropismo por células hepáticas, porém seu genoma tem sido identificado em sítios extra-hepáticos, como rim, pâncreas, ductos biliares, músculo e células linfomononucleares (Rehermann, 2003).

As partículas virais completas, ou partículas de Dane, são partículas envelopadas com nucleocapsídeo icosaédrico, genoma composto por DNA com fita parcialmente dupla e replicação através de RNA intermediários por meio de uma DNA polimerase com atividade de transcriptase reversa (Lee, 1997). O genoma viral e outras proteínas estão dentro de uma cápsula (nucleocapsídeo), que é composta pelo antígeno da hepatite B (AgHBc). O núcleo viral (nucleocapsídeo e seu conteúdo) é envolvido por um envelope contendo AgHBs (Lin, 2004).

A etapa inicial da infecção celular pode ser dividida em três estágios: ligação, fusão e entrada viral (Locarnini, 2003). O vírus liga-se à membrana da célula hospedeira através da interação com receptores específicos; após, ocorre a fusão do envelope viral à membrana celular, que decorre de dois mecanismos: interação com os constituintes da membrana celular - o que

leva à liberação do nucleocapsídeo -, e pela formação de endossomos dirigidos para dentro do citoplasma (Ganem, 2004).

Após a fusão do envelope com a membrana e o desnudamento viral, as partículas do *core* migram para o interior do núcleo, onde o genoma viral é concluído, produzindo o "*covalently closed circular DNA*" (cccDNA) (Ganem, 2004). Isso funciona como um modelo para a produção de RNA mensageiro, que será encaminhado para o citoplasma da célula hospedeira e servirá a dois propósitos. Algumas moléculas são traduzidas em proteínas necessárias pelo vírus, tais como AgHBc, AgHBs, AgHBe e a enzima DNA polimerase. Outras moléculas de RNA mensageiro, denominadas de RNA pré-genômico, são empacotadas no nucleocapsídeo e servem como modelo para a transcrição reversa em novas moléculas de DNA-VHB.

A maioria das partículas são revestidas por um envelope (AgHBs) e são exportadas para fora da célula, prontas para infectar outros hepatócitos. Outras são recicladas de volta para o núcleo para produzir mais cccDNA. O grande reservatório de cccDNA leva à cronicidade da infecção (Ganem, 2004).

As manifestações clínicas e complicações da infecção pelo VHB, geralmente, refletem os danos à célula hepática. No entanto, o VHB não é um vírus diretamente citopático; os hepatócitos não são agredidos de forma direta pelos vírus, mas provavelmente pelo sistema imune do hospedeiro na tentativa de remover a infecção. Células citotóxicas e os linfócitos T (*natural killer-cells)* buscam combater o vírus, porém acabam eliminando as células infectadas. Por outro lado, o sistema imunológico também produz citocinas,

como os interferons, que apresentam atividade antiviral e inibem a replicação viral, a capacidade dos vírus em infectar novas células e também modulam a resposta imune à infecção (Ganem, 2004). Quando foram avaliados pacientes imunossuprimidos, percebeu-se a importância do sistema imunológico na patogênese da doença, pois muitas vezes apresentam apenas leves danos no fígado, apesar dos altos níveis de carga viral (Ganem, 2004). Da mesma forma, os pacientes infectados no início da vida, geralmente são assintomáticos e evoluem com pouca lesão hepática por décadas, apesar da alta carga viral; isso porque o sistema imune tolera a infecção inicialmente, sem causar danos. Infelizmente, isso pode mudar após alguns anos pela súbita ativação do processo, geralmente em consequência a mutações do VHB.

1.5.1 Genoma Viral

O genoma viral é constituído por, aproximadamente, 3200 nucleotídeos e apresenta 4 fases de leitura aberta (ORF): S, C, P e X.

A região S codifica proteínas de superfície do envelope (AgHBs) e é composta pelas regiões pré-S1 (grande), pré-S2 (média) e S (pequena). O gene C e a região pré-C codificam a proteína core e o AgHBc, que é encontrado no tecido hepático e, excepcionalmente, no soro. A região *pre-core* codifica a proteína AgHBe, presente no soro de pacientes com replicação do VHB (Locarnini, 2003). Em algumas situações podem ocorrer

mutações nesta região e o paciente pode apresentar replicação do VHB e sorologia para o AgHBe negativo.

O gene P codifica a polimerase, importante para a replicação do VHB e alvo de antivirais. É funcionalmente dividida em 3 regiões: proteína terminal, envolvida no processo de formação do capsídeo e síntese de fita negativa; enzima transcriptase reversa, envolvida no processo de transcrição reversa durante a replicação do VHB e RNAse H, que degrada o RNA pré-genômico durante a replicação. O gene X codifica HBX, que parece estar envolvido nos processos de carcinogênese, através da transativação de promotores celulares e virais (Mandel , 2005; Ganem, 2004; Ono-Nita, 2009).

1.5.2 Diversidade genética

Antes da definição dos genótipos, as cepas do VHB eram distinguidas por análise sorológica, baseada na imunorreatividade de um anticorpo a um número limitado de aminoácidos presentes no antígeno de superfície (AgHBs).

Ao utilizar-se anticorpos específicos contra o AgHBs, nove diferentes subtipos sorológicos foram definidos, fato que reflete a variedade genética do VHB: adw2, adw4, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adrq+ e adrq- (Couroucé-Pauty, 1983). Todos os subtipos conhecidos contem um determinante comum “a” (Ashton-Rickhardt, 1989), que é codificado entre os resíduos de aminoácidos 124 e 147. A diferença entre os subtipos

específicos, d/y e w/r, é gerada pela troca de aminoácidos de K para R nos resíduos 122 e 160, respectivamente (Peterson, 1984; Okamoto, 1987). Isso demonstra que cada um dos subtipos do AgHBs conhecido pode pertencer a um ou vários genótipos.

Genotipicamente, os genomas do VHB foram classificados em oito grupos, designados pelas letras A – H, com base em uma divergência de 8% na sequência de nucleotídeos do genoma completo entre os grupos (Okamoto, 1988), ou de 4%, quando se utiliza a sequência do gene S (Norder, 1992).

1.5.3 Distribuição dos Genótipos do VHB

Pode-se estabelecer uma distribuição geográfica específica para os diferentes genótipos do VHB. Sendo assim, a genotipagem viral constitui uma importante ferramenta para o entendimento da epidemiologia molecular.

O genótipo A está presente no Norte da Europa, África e América do Norte. Já os genótipos B e C predominam na China, Japão e Sudeste Asiático. O genótipo D apresenta distribuição mundial, e mostra-se mais prevalente em áreas do Mediterrâneo e Oriente Médio (Kramvis, 2005). O genótipo E parece derivar da África Ocidental (Kidd-Ljunggren, 2002). Os genótipos F e G já foram encontrados na América Central e do Sul (Arauz-Ruiz, 1997a). Genótipo H foi descrito no México e na América Central (Arauz-Ruiz, 2002).

A distribuição dos genótipos do VHB pode refletir os diferentes padrões de migração para as Américas (Kramvis, 2005; Norder, 1993). Na América Latina, em especial na Amazônia, o genótipo predominante é o F. Os genótipos A, B e D foram descritos na Argentina e nas Regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. A presença de genótipos A e D sugerem influências de descendentes Africanos e Europeus, com forte imigração italiana que ocorreu durante o século vinte (Paraná, 2005).

No Brasil, os genótipos predominantes são A, D e F (Mello, 2007; Tonetto, 2009). Estudo realizado por Carrilho *et al* (Carrilho, 2004) em um Centro de Hemodiálise em Santa Catarina, revelou que os genótipos prevalentes foram A (30,6%), D (57,1%) e F (12,2%). Lyra *et al*, ao avaliarem pacientes com hepatite B aguda na cidade de Salvador, também demonstraram que o genótipo prevalente foi o A (83,3%), seguido pelo D e F (Lyra, 2005).

Na cidade de São Paulo, Sitnik *et al* realizaram a genotipagem viral de portadores de hepatite B crônica e evidenciaram os genótipos A (49,5%), B (2,9%), C (13,6%), D (24,3%) e F (9,7%). Os genótipos B e C foram encontrados apenas em indivíduos asiáticos. Por outro lado, os genótipos A, D e F foram mais frequentes nos ocidentais (Sitnik, 2004).

1.6 IMUNIZAÇÃO CONTRA O VHB

A imunização é o mecanismo mais eficaz para prevenir a infecção pelo VHB. Oferece mais de 95% de proteção contra o desenvolvimento de

infecção crônica e determina redução da prevalência em países onde a vacinação é implantada (Lavanchy, 2004). A falha nos programas de vacinação para indivíduos com fatores de risco levou à recomendação e à implantação da vacina contra a hepatite B nos esquemas de rotina para as crianças (WHO, 2008). Desta forma, desde que a vacinação infantil universal foi introduzida nos Estados Unidos em 1991, a incidência de hepatite aguda B diminuiu 67% entre todos os grupos etários e, naqueles abaixo de 20 anos, a incidência reduziu 89% (CDC, 2004).

No Brasil, a vacinação iniciou-se em 1988 na Amazônia, área de alta endemicidade (Paraná, 2005). Fonseca, em 2002, descreveu os efeitos benéficos do programa de vacinação na região de Labrea, onde a prevalência do AgHBs reduziu de 20% para 3,5% em 12 anos (Fonseca, 2002).

Em 1993, foi implantada a vacinação para menores de 4 anos nos Estados de Santa Catarina, Espírito Santo e Paraná; a ação foi modificada em 1996 para atingir menores de 15 anos, e no mesmo ano, no restante do país para menores de 1 ano.

O programa de Vigilância Epidemiológica foi implantado no município de Chapecó no ano de 1991. A vacinação contra o vírus da hepatite B foi iniciada no Município no ano de 1992. Inicialmente, eram vacinados apenas os contatos de portadores do VHB e pessoas que tinham fatores de risco para a infecção. Nessa época, realizou-se muito a vacinação intradérmica. Em 1993, tornou-se oficial a vacinação para todas as pessoas que tinham fatores de risco para contrair a infecção. Em 1994, ampliou-se a vacinação

para adolescentes até os 15 anos de idade, além daqueles com fatores de risco; nessa época, já se realizava vacinação intramuscular. Finalmente, no ano de 1999, a vacinação contra o VHB entrou no calendário vacinal do município (dados fornecidos pela Vigilância Epidemiológica do Município de Chapecó).

1.7 NOTIFICAÇÃO

A notificação no Estado de Santa Catarina é dividida por Regionais de Saúde, sendo que na região Oeste, são as seguintes: São Miguel do Oeste, Maravilha, São Lourenço do Oeste, Palmitos, Chapecó, Xanxerê e Concórdia. Dentre elas, as de maior prevalência para a infecção pelo VHB são: São Miguel do Oeste, Chapecó, Concórdia e Xanxerê (Dados fornecidos pela DIVE/SES/SC).

No período de 1994 – 2007 foram notificados 17.256 casos novos de hepatite B em Santa Catarina. Somente em 2005 foram notificados 1278 e em 2007 foram 1032 novos casos de hepatite B no Estado de Santa Catarina (dados fornecidos pela DIVE/SES/SC). A cidade de Chapecó, que possui aproximadamente 177 mil habitantes, iniciou a notificação de casos de hepatite B no ano de 1993, e foi responsável pela notificação de 2843 casos de hepatite B no período de 1993 a 2008. Neste mesmo período, foram notificados 190 casos de hepatite C e 537 casos de hepatite A nesta mesma cidade, como observado na Tabela 3 (dados fornecidos pela Vigilância Epidemiológica do Município de Chapecó).

Tabela 3 - Casos notificados de Hepatites B, C e A no período de 1993 a 2008 no município de Chapecó/SC

Etiologia/Ano	VHB	VHC	VHA
1993	177	----	----
1994	204	07	76
1995	153	11	07
1996	224	----	26
1997	208	03	24
1998	192	02	30
1999	278	14	06
2000	215	18	41
2001	215	12	43
2002	172	13	24
2003	133	12	11
2004	130	18	144
2005	153	20	20
2006	128	16	15
2007	113	24	27
2008	148	20	43
TOTAL	**2843**	**190**	**537**

FONTE: Vigilância Epidemiológica do Município de Chapecó

O Município de Chapecó demonstra sua alta prevalência da infecção pelo VHB, quando se analisa o número de pessoas que apresentam sorologia positiva para o anti-HBc total. No período de 1995 a 2006,

aproximadamente 11537 doadores de sangue eram portadores de anti-HBc total reagente, como pode ser verificado na Tabela 4.

Tabela 4 - Doadores de sangue com sorologia para anti-HBc total reagente no município de Chapecó no período de 1995 a 2006

Ano	anti-HBc total +
1995	421
1996	1896
1997	2270
1998	757
1999	957
2000	832
2001	1149
2002	1237
2003	617
2004	459
2005	504
2006	438
TOTAL	**11537**

FONTE: Vigilância Epidemiológica do Município de Chapecó

1.8 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Considera-se que: 1) novos antivirais para o tratamento da hepatite B têm sido disponibilizados; 2) estas medicações são de alto custo e preditores de resposta ao tratamento têm sido investigados, sendo o genótipo um possível preditor; 3) apesar da alta incidência/prevalência do VHB no Oeste de Santa Catarina, pouco se sabe sobre as características da infecção pelo VHB nessa população. Dessa forma, propõe-se um estudo para avaliar as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais desses pacientes.

2 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi estudar os portadores de hepatite B crônica no município de Chapecó - SC, possibilitando o conhecimento das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais do vírus nesta região de alta endemicidade.

3 Casuística e Métodos

3.1 DEFINIÇÕES

Definiu-se infecção crônica pelo vírus B como aquela de ocorrência em indivíduos com AgHBs positivo, por um período maior ou igual a seis meses.

3.2 TIPO DE DELINEAMENTO

O estudo realizado foi do tipo coorte, observacional, prospectivo.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação pela Comissão Ética Científica do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP e pelo Comitê de Ética Institucional (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq nº: 616/07) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (nº: 015-07) (Anexos 1 e 2).

Todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3), que foi lido, compreendido e assinado por eles antes da coleta de dados.

Ao mesmo tempo, os pacientes foram orientados no sentido de que tinham liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento.

3.4 LOCAL DO ESTUDO

No primeiro momento, o estudo foi realizado no Município de Chapecó, junto ao Setor de Hepatite que fica localizado no Centro Integrado de Saúde Norte (CIS Norte). Após a coleta das amostras naquele Município, o material foi encaminhado ao LIM 07 na FMUSP, onde o material foi armazenado para posterior estudo molecular.

O CIS Norte abrange os bairros que o compõem, como por exemplo, o bairro Passo dos Fortes. Por outro lado, o Setor de Hepatite abrange todo o município de Chapecó, que compreende mais de 170 mil habitantes.

Em sua estrutura de atendimento, o CIS Norte comporta: Hospital Dia, Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA), Setor de Hepatite, Setor de Tuberculose e Hanseníase, Saúde da Criança, Saúde da Mulher, Odontologia, Setor de Coleta de Exames, Grupo de Hipertensos e Diabéticos, Sala de Vacinas, Farmácia, Agentes Comunitárias de Saúde, além das atividades básicas de um centro de saúde - sala de curativos, aplicação de medicação e esterilização de material.

O Setor de Hepatite foi iniciado em 1991 e funciona vinculado à Vigilância Epidemiológica. Este setor atende, em média, 3509 pessoas ao ano, e está voltado ao atendimento primário de portadores de hepatites virais. A equipe de atendimento é composta por 5 funcionários: uma enfermeira que trabalha em regime de 24 horas semanais, duas auxiliares de enfermagem (40 horas semanais cada uma), uma médica infectologista (8 horas semanais) e 1 clínico geral (8 horas semanais).

As notificações são de responsabilidade de todos os setores, incluindo o laboratório Municipal e o HEMOSC, mas a investigação fica sob a responsabilidade do Setor de Hepatite. Os pacientes são encaminhados com o resultado do exame para o setor, que investiga o paciente e seus contatos - com solicitação de exames e cartão vacinal.

3.5 RECRUTAMENTO DOS PACIENTES

Para recrutamento dos pacientes, contou-se com o apoio da equipe da Vigilância Epidemiológica e do Setor de Hepatite do Município de Chapecó, que buscaram os nomes, endereços e telefones de todos os pacientes selecionados.

Após levantamento das informações, o contato para marcação da entrevista foi realizado por meio telefônico. No caso dos pacientes que não possuíam telefone, ou que não foram localizados, foi solicitado às agentes comunitárias de saúde que realizassem busca ativa nas residências. Diante do fato de que muitos deles não foram encontrados, buscou-se investigar por quais motivos não foram localizados, se por mudança de endereço ou por óbito. Assim, para afastar o óbito, recorreu-se ao SIM (Sistema de Informação de Mortalidade), programa do DATASUS, que tem a finalidade de registrar as certidões de óbito no território nacional. Acessou-se também, pelo DATASUS, o cartão Nacional de Saúde, pois assim, pode-se verificar se esses pacientes estavam utilizando o SUS.

3.5.1 Departamento de Informática do SUS - DATASUS

Nas últimas décadas, diferentes tipos de bancos de dados tornaram-se disponíveis para pesquisa (Nita, 2009). No presente trabalho, buscou-se informações no DATASUS (Departamento de Informática do SUS) para melhor investigação daqueles pacientes que não foram localizados.

Os pacientes não localizados tiveram seus dados pessoais (nome completo, data de nascimento e nome da mãe) inseridos na pesquisa do DATASUS; para isso, foram utilizados os recursos do Cartão Nacional de Saúde e do Sistema de Informação de Mortalidade. Dessa forma, pode-se obter informações a respeito de visitas a sistemas de saúde (pelo uso do cartão) e também detectar se esses pacientes foram ou não a óbito (pelo SIM).

3.5.1.1 Cartão Nacional de Saúde – CNS

O Cartão Nacional de Saúde foi proposto pelo DATASUS para atender a antigas recomendações contidas especialmente na NOB-SUS 01/96.

Para acesso ao sistema do CNS, contou-se com a colaboração da equipe da Divisão de Informações em Saúde do Estado de Santa Catarina.

Os dados foram obtidos a partir de acesso à base, pelo seguinte endereço eletrônico: http://cartaonet.datasus.gov.br/. Após acesso ao endereço acima, os dados foram pesquisados na Base Nacional Leve e na

Base Federal. Assim, conseguiu-se saber se esses pacientes possuíam CNS e estavam ativos no SUS.

Com o número do CNS também foi possível pesquisar junto ao setor de liberação de medicações de alto custo, e observar se esses pacientes estavam fazendo uso de antivirais para o tratamento do VHB.

3.5.1.2 Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM

O SIM é administrado pelo DATASUS, e foi criado em 1976, com sua primeira base de dados disseminada em 1979.

É um sistema de vigilância epidemiológica, cujo objetivo é captar dados sobre os óbitos do país, a fim de fornecer as informações para todas as instâncias do sistema de saúde. O documento de entrada do sistema é a declaração de óbito, padronizada em todo o território nacional (Manual Ministério da Saúde, 2001).

Os dados são coletados pelas secretarias municipais de saúde por meio de busca ativa nas unidades notificadoras. Depois de devidamente processados, são consolidados em bases de dados estaduais, pelas secretarias estaduais de saúde. Essas bases são remetidas às centrais, que as consolida, constituindo uma base de dados de abrangência nacional (Manual Ministério da Saúde, 2001).

No presente estudo, teve-se acesso aos dados do SIM mediante a colaboração da Divisão de Informações em Saúde do Estado de Santa Catarina. Após levantamento de todos os casos notificados nos períodos

propostos, não se conseguiu contato com alguns pacientes, os quais foram classificados como não localizados. A identificação desses pacientes (nome completo, data de nascimento e nome da mãe) foi inserida na base de dados do SIM e, assim, verificou-se aqueles que não foram localizados em virtude de óbito. Para a avaliação da sensibilidade do sistema, verificou-se 10 casos que sabidamente foram a óbito e localizou-se todos. Outro ponto importante em relação aos dados do SIM, é que no sistema pesquisado, da Secretaria de Saúde de SC, consegue-se acessar os óbitos das pessoas naturais do Estado, independente do local onde foi registrado o óbito (mesmo quando ocorrido fora do Estado).

3.5.2 Indivíduos em estudo

Após contato com a Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina, teve-se acesso ao número de notificações de Hepatite B em todo Estado, especificado por região. Dessa forma, pode-se verificar que a região Oeste de Santa Catarina é a área de maior endemicidade para o VHB no Estado.

Optou-se por estudar dois grupos. O primeiro deles (Grupo A) foi composto pelos casos notificados no ano de 1996. O segundo (Grupo B) foi composto pelos casos notificados no ano de 2006. Em ambos, foram incluídos apenas os pacientes que mantinham sorologia positiva para AgHBs até o momento.

A razão que levou ao estudo dos pacientes com tempos diferentes de seguimento, foi avaliar se houve diferença na detecção de diferentes

genótipos do VHB em virtude do tempo de infecção ou da idade do paciente. Livingston *et al*, estudando portadores de hepatite B crônica no Alaska, puderam observar que a idade média de seroconversão do AgHBe variou de acordo com os diferentes genótipos. Constataram que 50% dos portadores de AgHBe + apresentam clareamento do AgHBe com menos de 20 anos de idade quando infectados pelo VHB genótipos A2, B6, D e F1 e, aproximadamente, 3 décadas depois naqueles infectados com VHB genótipo C (Livingston, 2007).

Sendo assim, 224 casos que foram notificados em 1996, e 128 casos notificados em 2006, foram recrutados para o estudo.

3.5.3 Critérios de seleção dos pacientes

Critérios de inclusão

Idade superior a 18 anos;

Infecção crônica pelo vírus da hepatite B (definida como a persistência do AgHBs + por um período maior ou igual a 6 meses).

Critérios de exclusão

Infecção associada ao vírus da hepatite C e/ou HIV;

Idade inferior a 18 anos;

Não comparecimento à entrevista e coleta de sangue.

Nos períodos estudados, foram notificados 352 portadores de hepatite B crônica. Porém, após a aplicação dos critérios de seleção, finalizou-se com 84 casos incluídos no grupo A e 66 casos no grupo B (Figuras 4 e 5).

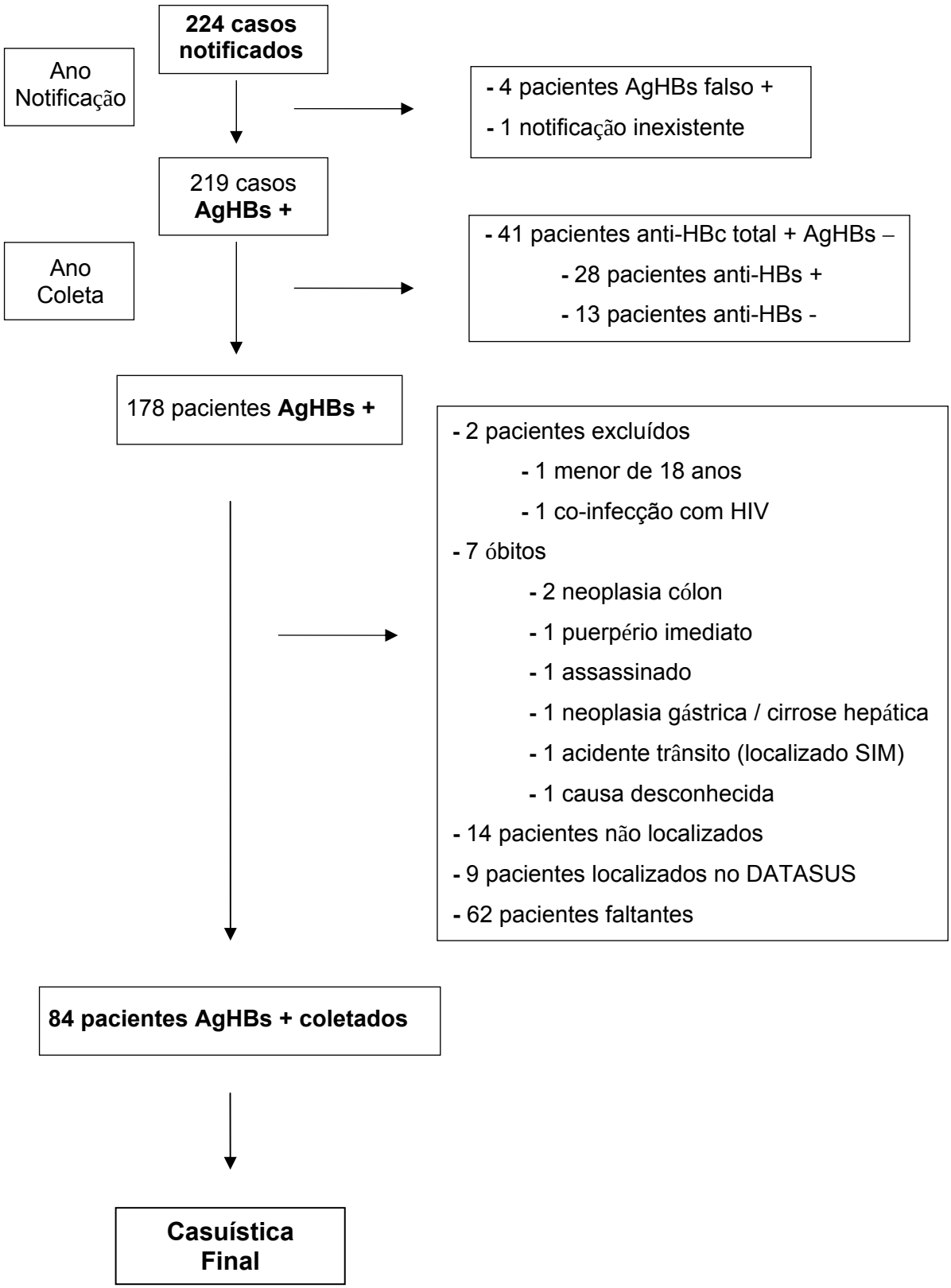


Figura 4 – Seleção da casuística do Grupo A (casos notificados no ano de 1996)

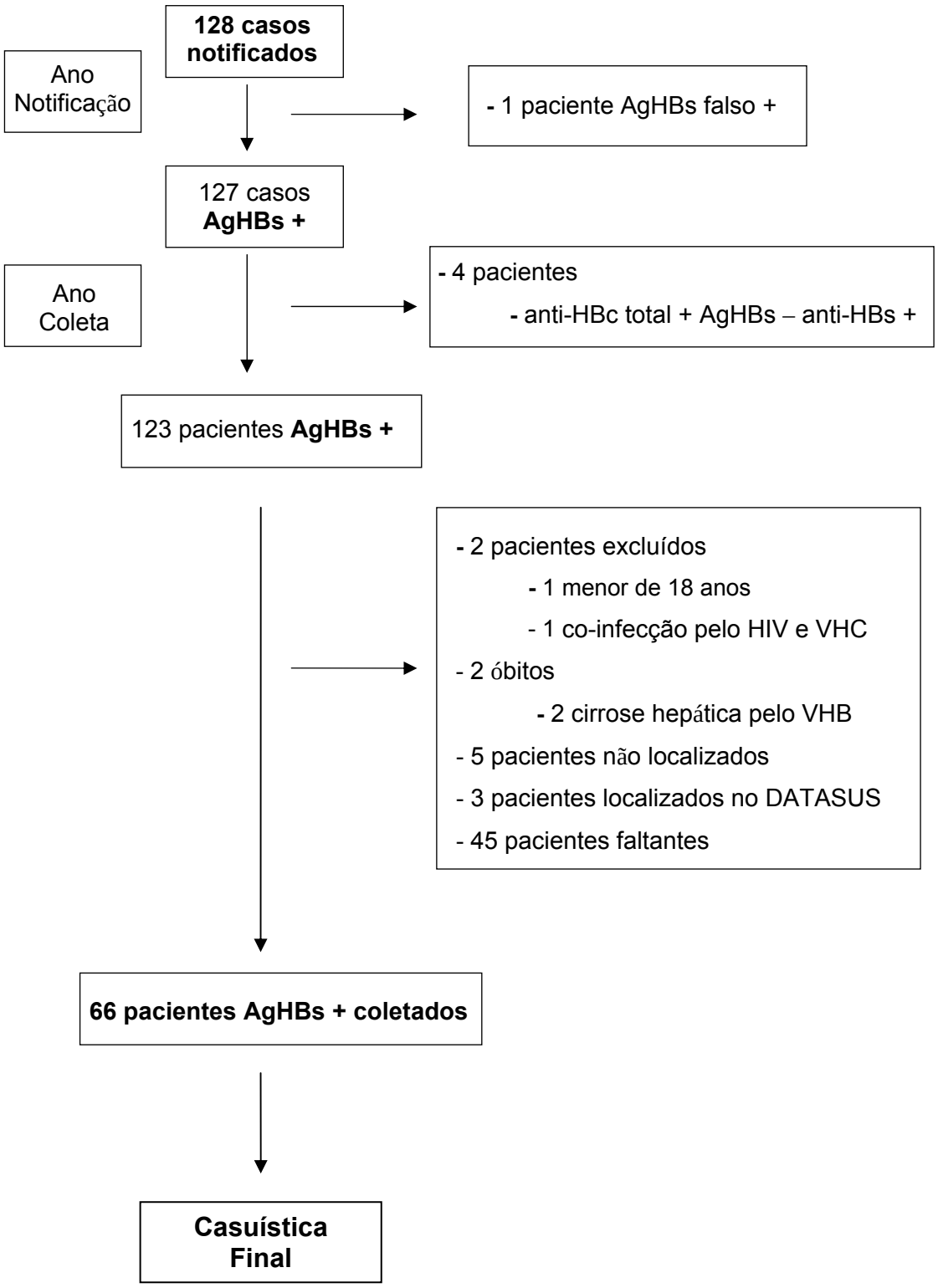


Figura 5 – Seleção da casuística do Grupo B (casos notificados no ano de 2006)

No grupo A, cento e quarenta pacientes não foram incluídos. Dois pacientes não preenchiam os critérios de inclusão (uma paciente tinha 16 anos de idade e a outra era co-infectada com HIV); 41 pacientes apresentavam clareamento viral (13 com AgHBs negativo e 28 com AgHBs negativo e anti-HBs +); quatro tiveram resultados falso positivo na época da notificação (os quatro pacientes haviam realizado sorologia no mesmo laboratório e quando foram submetidos a exames de confirmação em laboratório de referência, observou-se que apresentavam todos os marcadores para infecção pelo vírus da hepatite B negativos), uma notificação foi inexistente (ocorreu um erro no momento da notificação, quando se "pulou" um número, fato que resultou em uma lacuna); sete pacientes foram a óbito, 14 não foram localizados, 62 falataram à entrevista e nove foram localizados apenas no DATASUS. Por outro lado, dos 128 casos do grupo B, apenas cinco pacientes não foram localizados. Dois pacientes precisaram ser excluídos - uma por apresentar idade inferior a 18 anos e ou outro por ser co-infectado com HIV e VHC -, quatro apresentaram clareamento viral (todos os quatro apresentaram seroconversão com anti-HBs positivo), um caso foi falso positivo (esse paciente repetiu as sorologias em laboratório de referência, sendo confirmado que apresentava todos os marcadores para hepatite B negativos), dois pacientes foram a óbito, 45 falataram à entrevista e três foram localizados apenas no DATASUS.

Importante salientar que todos os pacientes classificados como faltantes à entrevista foram localizados e reconvocados pelo menos por três vezes, e não compareceram em todos os chamados. Teve-se a informação,

por contato telefônico, que estavam vivos e sem comorbidades relacionadas à infecção pelo vírus da hepatite B. Aqueles pacientes que não foram localizados pela equipe da Vigilância Epidemiológica tiveram seus dados pesquisados no SIM e na Base de Dados do Cartão Nacional de Saúde. Com o número do CNS, verificou-se junto ao setor de liberação de medicação de alto custo da SES de SC que esses pacientes não estão recebendo medicação antiviral para o tratamento do VHB.

Dessa forma, de um total de 352 pacientes notificados nos períodos estudados, foram excluídos 202 casos, resultando em 150 pacientes a casuística final desse estudo.

3.6 COLETA

Após a localização dos pacientes, foi agendada a data para entrevista e coleta dos dados e de amostras de sangue desses pacientes.

Para a entrevista e coleta dos dados, além da presença da pesquisadora principal, contou-se com o apoio da equipe do Setor de Hepatite, do Laboratório Municipal, além de duas biólogas da FMUSP. A pesquisadora deslocou-se da cidade de São Paulo até Chapecó para todas as coletas.

No dia agendado, os pacientes primeiro leram e assinaram o TCLE, depois responderam ao questionário (Anexo 4); por último, foram coletadas as amostras de sangue.

Após a coleta, o material foi centrifugado a 3300 g por 20 min em temperatura ambiente para separação do soro que foi armazenado em tubos criogênicos de 2,0 mL (Techno Plastic Products AG, Suíça) em *freezer* -20°C. O material congelado ficou armazenado em *freezer* do HEMOSC da Cidade de Chapecó e, após a finalização da coleta, foi transportado para a cidade de São Paulo.

3.7 TRANSPORTE DO MATERIAL

Para o transporte do material biológico, foram realizadas duas viagens entre as cidades de Chapecó e São Paulo. A primeira viagem ocorreu após o término da coleta dos casos notificados em 1996, e a segunda após o término da coleta dos casos notificados em 2006.

O material foi acondicionado em caixa de isopor com gelo seco em quantidade suficiente para manter o material congelado e, então, transportado por via terrestre (14 horas de viagem) da cidade de Chapecó a São Paulo. Em São Paulo, o material foi imediatamente conduzido até o LIM 07 (FMUSP) e mantido em *freezer* a -20 ^{o}C.

3.8 ANÁLISE LABORATORIAL

Os exames laboratoriais de bioquímica sanguínea, bem como as sorologias para doenças infecciosas e exames hematológicos, foram realizados pelo Laboratório Municipal de Análises Clínicas do Município de Chapecó. O Laboratório Municipal utiliza, para análise de bioquímica

sanguínea, a metodologia automatizada por Química Seca através do equipamento VITROS 250 (Johnson & Johnson, EUA). Os valores considerados de referência estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de referência (VR) dos exames de bioquímica conforme metodologia utilizada pelo Laboratório Municipal de Análises Clínicas do Município de Chapecó

Marcador Bioquímico	VR homens	VR mulheres
Creatinina (mg/dL)	0,8 – 1,5	0,7 – 1,2
Bilirrubina total (mg/dL)	0,2 – 1,3	0,2 – 1,3
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,0 – 0,4	0,0 – 0,4
AST (UI/L)	17 – 59	14 – 36
ALT (UI/L)	21 – 72	9 – 52
Albumina (g/dL)	3,5 – 5,0	3,5 – 5,0
Alfa-fetoproteína (ng/mL)	< 10,9	< 10,9

Os marcadores sorológicos foram verificados através de kits da marca Abbott (Brasil) compatíveis com o equipamento AxSYM (imunoanalisador), disponível no Laboratório Municipal de Análises Clínicas. Em virtude do equipamento, o método utilizado para a mensuração foi o enzimaimunoensaio (ELISA).

Cada marcador necessitou de kit de análise distinto:

- anti-HCV: AxSYM HCV 3.0; Abbott Laboratórios do Brasil Ltda®

- anti-HBs: AxSYM AUSAB; Abbott Laboratórios do Brasil Ltda®

- anti-HBc: AxSYM CORE; Abbott Laboratórios do Brasil Ltda®

- AgHBs: AxSYM AgHBs (V2); Abbott Laboratórios do Brasil Ltda®

3.9 DETECÇÃO VIRAL POR MEIO DE TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.9.1 Extração de DNA viral

O DNA viral foi extraído com o kit *QIAmp® DNA Blood mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Em resumo, adicionou-se 200 μL de soro equilibrado em temperatura ambiente a um microtubo *(Axygen)* de 1,5 mL contendo 20 μL de proteinase K. A seguir, adicionou-se 200 μL de buffer AL e misturou-se por agitação em vórtex (Vortexgene, Bohemia, EUA) por 15". Incubou-se a 56 ºC por 10 min e após breve centrifugação, adicionou-se 200 μL de etanol 100% (v/v) à amostra, misturando-se por agitação. Novamente, após breve centrifugação, transferiu-se a mistura à coluna de centrifugação e centrifugou-se por 1 min a 5900 g (centrífuga *Eppendorf* modelo 5415R, Hamburgo, Alemanha). Transferiu-se a coluna para novo tubo coletor de 2 mL, adicionou-se 500 μL de *buffer* AW1 e centrifugou-se a 5900 g por 1 min. Adicionou-se 500 μL de *buffer* AW2 e, então, centrifugou-se a 16000 g rpm por 3 min. Transferiu-se a coluna para um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 100 μL de *buffer* AE. Por fim, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 5 min e centrifugada a 5900 g por 1 min.

Alternativamente, o DNA viral foi extraído de acordo com o ®*RTP DNA/RNA Vírus Supersense Kit* (Invitek, Berlim, Alemanha). Em resumo, partiu-se de 1000 μL adicionados a um microtubo *(Axygen)* de 2 mL. A seguir, adicionou-se 265 μL de *buffer* de precipitação e misturou-se por agitação em vórtex (Vortexgene, Bohemia, EUA) por 15". Incubou-se o tubo por 30 min a 4 °C e após a centrifugação de 5 min a 1500 g (centrífuga *Eppendorf* modelo 5415R, Hamburgo, Alemanha) descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o precipitado com o *buffer* de ressuspensão em 400 μL e transferiu-se todo o volume para o tubo de extração do kit. Homogeneizou-se em vórtex e incubou-se no termociclador com vórtex por 15 min a 65 °C. Adicionou-se no mesmo tubo 400 μL de solução *binding*; novamente, misturou-se no vórtex, transferiu-se o volume para RTA *Spin Filter Set* e centrifugou-se por 1 min a 9300 g. Descartou-se o tubo coletor e, assim, recolocou-se um novo. Adicionou-se 500 μL de *buffer Wash R1,* centrifugou-se por 30" a 9300 g e descartou-se o filtrado. Recolocou-se novamente um tubo coletor. Centrifugou-se por 4 min em velocidade máxima, descartou-se o tubo e transferiu-se a coluna para o tubo de eluição. Adicionou-se 60 μL de *buffer* de eluição R previamente aquecido e incubou-se por 3 min em temperatura ambiente. Centrifugou-se por 1 min a 5900 g.

3.9.2 Desenho dos iniciadores

Foi utilizado um conjunto de iniciadores que amplificam seletivamente a região do gene S do vírus da hepatite B (Figura 6).

Para amplificação por técnica de PCR em tempo real de um segmento de 183 pares de base (pb) no gene S, foram utilizados os seguintes iniciadores e a sonda:

F_Primer_HBV-RT - 5'-TTT ACA GGC GGG TTT TTC-3

(Fujihira E, manuscrito em submissão).

R_Primer_HBV-RT - 5'-GTG TCT GCG GCG TTT TTA TCA-3'

(Fujihira E, manuscrito em submissão).

HB Sonda - 5´FAM-TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTCT-3'

(Fujihira E, manuscrito em submissão).

Para amplificação de um segmento de 418 pb no gene S, foram utilizados os seguintes iniciadores:

VHBgeneS – *sense*D: 5' TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTCT 3'

VHBgeneS – AS1 R1: 5' AGT GGG CCT CAG TCC GTT TCT 3´;

VHBgeneS – AS2 R2: 5` AGT GGG CCT CAG CCC GTT TCT 3´.

Dois iniciadores reversos foram necessários em virtude de a região codificadora do gene S ser muito variável para a genotipagem.

A sequência completa da proteína S encontra-se no geneBank (National Center of Biothecnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) sob o código AF363961.

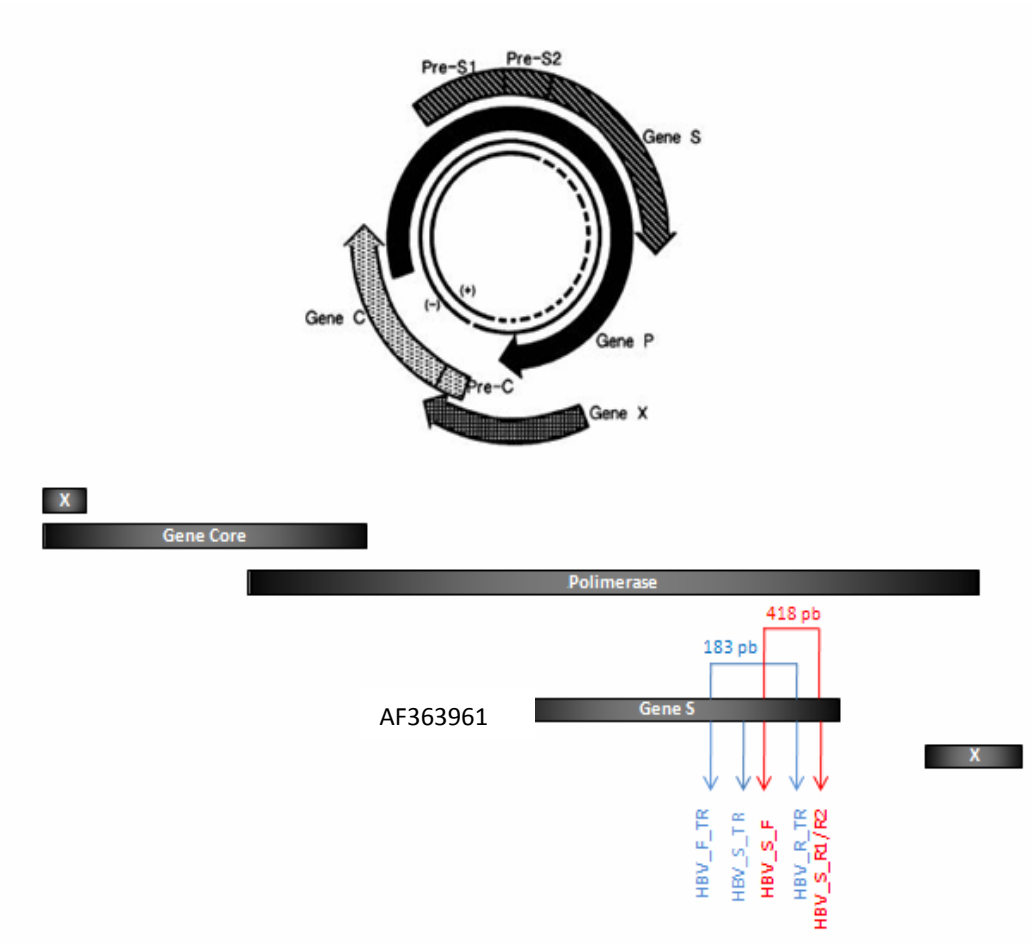


Figura 6 - Esquema do DNA genômico do VHB. Localização dos iniciadores utilizados no gene S. *HBV_F_TR* iniciador direto do PCR em tempo real, *HBV_S_TR* sonda 5´FAM- MGB para o PCR em tempo real, *HBV_S_F* iniciador direto do PCR convencional e sequenciamento, *HBV_R_TR* iniciador reverso do PCR em tempo real, *HBV_S_R1/R2* iniciadores reversos do PCR convencional e sequenciamento

3.9.3 Detecção do DNA do VHB nas amostras

O DNA extraído do soro foi submetido a um ensaio de PCR em Tempo Real, para avaliar qualitativamente a presença de DNA do VHB.

Para esse ensaio utilizou-se iniciadores e sondas da região da proteína S do vírus; esses oligonucleotídeos são específicos para os genótipos A, B, C, D, E e F .

Para a reação foi utilizado 25 µL de DNA, conjunto de iniciadores a 0,1 µM e Sonda MGB (Minor Groove Binder) 5´FAM a 0,05 µM. Foram homogenizados com 1x TaqMan Mastermix (AppliedBiosystems, Foster City, EUA) para um volume final de 50 µL.

A reação foi feita no termociclador em tempo real SDS 7300 (AppliedBiosystems, Foster City, EUA), com os seguintes parâmetros de ciclagem:

50 °C – 2´

95 °C – 10´

95 °C – 15´´ } 40x

60 °C – 1´ }

Para estabelecer o limite de detecção do ensaio utilizando PCR em tempo real, foi realizada uma diluição de uma solução de pSM2 (plasmídeo que contém todo o genoma do VHB) (Gunther, 1995). Esta solução foi diluída seriadamente em razão de 10 para observar qual seria a quantidade

mínima detectável pelo ensaio, cujo limite de detecção é de 40 UI/mL por reação.

3.9.4 Extração para quantificação

O Kit Nuclisens Easy-Mag (Biomerieux, Boxtel, Netherlands) foi utilizado para extração total do DNA viral a partir de 200 µL de plasma. O protocolo seguido foi baseado no método de sílica magnetizada, e o procedimento realizado em plataforma automatizada pelo modelo Easy-Mag (Biomerieux, Boxtel, Netherlands). Todas as amostras foram eluídas em 60 µL e armazenadas a -20 °C.

3.9.5 Quantificação Absoluta em PCR por tempo real do VHB

Iniciadores e sonda foram selecionados por alinhamento na região S do VHB. Foram designados nessa região por conter conservadas sequências. Os iniciadores direto e reverso foram 5' CACCAACCTCTTGTCCTCCAA 3' e 5' GATAAAACGCCGCAGCACATC 3' respectivamente. A sonda utilizada foi 5'- FAM – CTTGTCCTGGCTATCGCT – MGB – 3' (sintetizada por AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Os iniciadores e a sonda tiveram uma concentração final de 100 nM e 50 nM, respectivamente. A reação de PCR foi homogeneizada com 1x Taqman Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) em volume final de 25 µL.

A reação foi feita no termociclador em tempo real SDS 7300 (AppliedBiosystems, Foster City, EUA), com os seguintes parâmetros de ciclagem:

50°C – 2’

95°C – 10’

95°C – 15’’ } 45x

60°C – 1’

O painel OptiQuant® *HBV DNA Quantification* (Acrometrix, CA, EUA) foi estabelecido como padrão do controle de quantificação. Para validar o controle, foi realizada a curva de calibração seriadamente em triplicata com todos os parâmetros adequados. Amostra sabidamente de carga viral alta, foi diluída em uma amostra já pré-estabelecida negativa e, posteriormente, seriada em razão de 10 para confirmação da curva de calibração com o controle. Assim, para todas as placas, as amostras dos pacientes foram realizadas em duplicata e, além do controle positivo validado, foi utilizado também em duplicata o controle negativo (NTC). Foi possível observar o limite mínimo de 40 UI/mL por reação e máximo de 400.000.000 UI/mL.

De acordo com a metodologia, foram extraídas e quantificadas 150 amostras.

3.9.6 Amplificação por PCR

Foi realizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e, pra isso, utilizou-se como fita molde o DNA viral extraído anteriormente. Foram

utilizados iniciadores (Invitrogen, Carlsbad, CA) correspondentes à região do gene S do vírus (descritos acima). As reações de PCR foram feitas no termociclador Mastercycler E*ppendorf*.

Condições do PCR suficiente para uma reação:

5 μl de *template;*

1,2 U de *Taq platinum* (invitrogen, Carlsbad, Califórnia);

10 pmolar de iniciadores direto e reverso;

10 pmolar de dNTP;

1,5 mM de $MgCl_2$;

Tampão 1X;

água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para 50μL.

Condições de ciclagem:

95 °C - 5 min *hot start* da enzima;

95 ºC - 1 min
62 ºC - 1 min } 35 ciclos
72 ºC - 2 min

Após o fim dos 35 ciclos, os produtos de PCR foram estocados a -20 °C.

De acordo com o desenho do experimento, foi amplificado um fragmento de 418 pb que compreende uma fração da região do gene S do vírus.

Os resultados das amplificações de PCR foram identificados em gel de agarose 1,5%, utilizou-se como marcador 100bp DNA *mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e corou-se com brometo de etídio.

3.9.7 Purificação de fragmentos de PCR

Para purificar os fragmentos de PCR, foi utilizado o *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Resumidamente, foi adicionado ao produto de PCR, 5 volumes da solução PBI para cada volume de reação de PCR e colocada em uma coluna à base de sílica. Centrifugada por 1 min a 16000 g em temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e a coluna novamente colocada no tubo coletor. Em seguida, foram aplicados 750 µl da solução PE no centro da coluna e essa mistura foi centrifugada a 16000 g por 1 min. O filtrado foi novamente descartado e a coluna foi colocada em um microtubo de 1,5 mL estéril. Foi adicionado na coluna, 50 µl de solução EB (*Elution Buffer*, 10mM Tris-Cl, pH 8.5). Essa mistura foi incubada por 1 min à temperatura ambiente e centrifugada a 16000 g por 1 min. A solução EB desloca o fragmento de PCR que está na coluna de sílica. A amostra purificada foi armazenada em *freezer* a -20 ºC até o momento da reação de sequenciamento.

3.9.8 Eletroforese

Eletroforese foi usada tanto para quantificação de DNA viral após a purificação, quanto para visualizar os fragmentos amplificados. Foi utilizada cuba de eletroforese horizontal Labnet e gel de agarose 1.5 % (p/v) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 12,5 cm X 12 cm em tampão TEB 10 X (tris 108 g; 40 mL de EDTA 0,5 M e ácido bórico 55 g e H_2O em quantidade suficiente para 1000 mL). As corridas foram realizadas sob uma tensão de 10 V/cm. O

gel de agarose foi corado com brometo de etídeo e fotografado através de câmera Olympus C 4000 (Olympus, Japão) sob luz Ultra Violeta. Foi utilizado marcador de peso molecular *Low DNA mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA) para a avaliação e quantificação de DNA viral. Para a análise do fragmento de PCR, foi utilizado 100 bp DNA *mass ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.9.9 Sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento dos fragmentos amplificados por PCR, utilizou-se o *kit DYEnamic* ^{Tm}*ET Terminator (*GE-Healthcare, UK limited) em sequenciador MegaBace 1000 GE-Healthcare. A reação de sequenciamento foi feita no termociclador *Mastercycler Eppendorf*, e utilizou-se 40 ng a 60 ng de fragmento de PCR purificado, 10 pmol de iniciador Direto e Reverso, 4 µl de *DYEnamic ET terminator premix* e água *MilliQ* autoclavada, em quantidade suficiente para 10 µl. As reações de sequenciamento aconteceram nas seguintes condições:

95 ºC - 20”
50 ºC - 15” } 25 ciclos
60 ºC - 1 min

Após o término dos ciclos, as reações foram precipitadas com 20 µL de isopropanol 80% (v/v), e submetidas à centrifugação por 1500 g por 60 min à temperatura ambiente na centrífuga *Eppendorf* modelo 5804R. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado foi lavado com

200 µL de etanol 70% (v/v) e centrifugado novamente nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o precipitado seco a 55 °C por, aproximadamente, 40 min no termociclador Mastercycler *Eppendorf*. Após a precipitação, as reações de sequenciamento devidamente secas foram ressuspendidas em 10 µL de *loading solution buffer for* ™*MEGABACE (*formamida*)* e levadas para sequenciar no LIM 56 no Instituto de Medicina Tropical (IMT).

3.9.10 Análise de Sequências

3.9.10.1 Validação, montagem da sequência consenso e alinhamento

As sequências obtidas foram analisadas inicialmente e, para isso, utilizou-se o programa Codoncode (Codoncode *Corporation, versão 1.6.3*), que contém Phred-Phrap-Consed (Ewing, 1998a; Ewing, 1998b; Gordon, 1998).

O programa *Phred* mensurou a qualidade dos dados, e foi atribuído um escore de 0 a 50 para cada base do cromatograma. Posteriormente, o programa *Phrap* montou uma sequência consenso a partir do alinhamento das várias sequências sobrepostas validadas pelo *Phrep*. Foram consideradas para a construção da sequência consenso bases que apresentaram um escore igual ou > 20. A sequência consenso foi visualizada, analizada e editada no programa *Consed*.

Em seguida, as sequências consenso de cada paciente foram alinhadas no programa *Clustal X* (Thompson, 1997) e editadas no programa *Bioedit Sequence Aligment Editor* (Hall, 1999).

3.9.10.2 Genotipagem

A genotipagem foi realizada pela região do gene de superfície (S) para a qual utilizou-se análise filogenética das sequências consenso de cada paciente. Para tal, foi montado um banco de dados com as sequências geradas neste estudo e sequências disponíveis no *GeneBank* dos diferentes genótipos de VHB (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de acesso e genótipo das sequências do G*enebank* utilizadas para genotipar na região S

Genótipo	nº de acesso	Genótipo	nº de acesso
A	V00866	E	X75657
A	X02768	E	X75664
A	AM282986	E	AB205192
A	AB116093	E	AB205191
A	AB116094	E	AB205188
B	D00329	F	X69798
B	D00330	F	AF223964
B	DQ993711	F	AF223965
B	DQ993710	F	AF223963
B	DQ993709	F	AB116654
C	V00867	G	AF160501
C	X75665	G	EF634481
C	AB288026	G	EF634480
C	AB112063	G	AF405706
C	DQ478901	H	AY090454
D	X68292	H	AB275308
D	Z35716	H	EF157291
D	L27106	H	AY090457
D	M32138	H	AY090460
D	X02496		
D	X59795		

As sequências foram alinhadas com o programa Clustal X e, para a realização da análise filogenética, foi utilizado o programa PAUP* (Swofford, 2002). A análise foi realizada por intermédio do método de distância. O modelo de substituição foi estimado pelo teste de razão de verossimilhança, com o auxilio do programa Modeltest versão 3.06 (Posada, 1998). O modelo estimado foi o *Transversion Model* com proporção de sítios invariantes (I) e distribuição gama para variação de taxa de substituição entre os sítios (G) (*TVM+I+G*). Para a reconstrução de topologias foi utilizado o algoritmo de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining, NJ*).

Foram calculados os valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas para a verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas (Felsenstein, 1985; Zharkikh, 1995). Foram considerados valores de *bootstrap* significativos acima de 70 (McCormack, 2002).

3.10 BIOSSEGURANÇA

Todos os experimentos foram executados em Laboratório de Biologia Molecular com as condições de biossegurança necessárias para a manipulação de todo o material utilizado neste trabalho. O descarte de material biológico e químico seguiu todas as normas de biossegurança já empregadas no Instituto.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados colhidos foram codificados e digitados em banco de dados, e tiveram sua consistência averiguada.

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnova para testar a normalidade dos dados. Nos casos em que o teste rejeitou a normalidade, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Caso contrário, utilizou-se o teste *t-Student* ou o teste exato de Fisher. O nível de significância estabelecido para a análise foi de 0,05.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3.12 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para pesquisa bibliográfica de periódicos foram utilizados os principais bancos de dados disponíveis eletronicamente, além de literatura corrente disponibilizada em livros texto. Visando uma maior eficiência na obtenção dos resultados, além do uso de palavras-chave relevantes ao assunto abordado, foram utilizados descritores MeSH e DeCS indexados respectivamente pelas bases MEDLINE e LILACS. Também foram revistas algumas publicações citadas por autores em suas referências. A estrutura dos elementos textuais contidos nessa dissertação respeitou os preceitos contidos no Guia Oficial do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Cunha, 2005).

4 Resultados

4.1 CASUÍSTICA

Dos 352 pacientes notificados nos anos de 1996 e 2006 como portadores de hepatite B crônica no Município de Chapecó, 150 deles foram elegíveis após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Foram excluídos 202 pacientes do estudo pelos seguintes motivos: AgHBs falso positivo, notificação inexistente, negativação do AgHBs (com ou sem seroconversão para anti-HBs), idade menor de 18 anos, co-infecção com VHC e/ou HIV, óbito, não comparecimento à entrevista e impossibilidade de localizar o paciente (Figuras 4 e 5).

A principal causa de exclusão foi o não comparecimento dos pacientes para a entrevista e coleta de dados, correspondendo a 53,0% das exclusões (N= 107). A segunda causa mais freqüente foi o clareamento viral com negativação do AgHBs, o que correspondeu a 22,3% das exclusões (N= 45).

Em relação aos óbitos, totalizou-se nove casos, sendo sete do grupo A e dois do grupoB.

Dos sete pacientes que foram a óbito no grupo A, apenas um recebeu o diagnóstico de cirrose hepática pelo VHB; porém, apesar de ser portador de hepatopatia crônica, esse paciente faleceu aos 60 anos de idade, no pós operatório tardio de gastrectomia por neoplasia gástrica. Seu caso foi notificado em 1996 e no mesmo ano, em 23/12/1996 ocorreu o óbito. Os

outros seis pacientes faleceram por: neoplasia de cólon (dois pacientes), complicações do puerpério imediato (uma paciente), assassinato (um paciente), causa desconhecida (um paciente) e um caso por acidente de trânsito (localizado no SIM).

Por outro lado, apenas dois pacientes foram a óbito no grupo B. Ambos eram portadores de cirrose hepática pelo VHB. Um dos pacientes, masculino, 50 anos, foi diagnosticado como portador de hepatite crônica B em 2006. Na época, já apresentava sinais de hepatopatia crônica com hipertensão portal (varizes de esôfago e esplenomegalia). Foi solicitado tratamento com lamivudina em novembro de 2006, mas o paciente recebeu a medicação apenas em agosto de 2007. Em fevereiro de 2008 iniciou com ascite, apresentou episódio de hemorragia digestiva alta secundária à ruptura de varizes de esôfago, o que culminou com o óbito em 21/03/2008. Os exames de imagem aos quais o paciente foi submetido não evidenciavam imagens sugestivas de carcinoma hepatocelular; porém apresentava alfa-fetoproteína com valor acima de 300 ng/mL. O outro paciente também era do sexo masculino, tinha 48 anos quando foi a óbito, teve diagnóstico de hepatite B em novembro de 2006 e no mês seguinte, em dezembro, foi a óbito. Quando foi avaliado pela primeira vez, já apresentava icterícia, realizou ultrassonografia de abdome, que evidenciou múltiplos nódulos no parênquima hepático sugestivos de carcinoma hepatocelular; sua alfa-fetoproteína era maior que 3000 ng/mL. Nunca recebeu tratamento para a infecção pelo VHB. Na sua história familiar consta que um irmão foi transplantado de fígado por cirrose pelo VHB.

Dessa forma, a casuística foi composta por 150 pacientes com diagnóstico de hepatite B crônica notificados à Vigilância Epidemiológica de Chapecó, 84 casos foram notificados no ano de 1996 (Grupo A) e 66 casos no ano de 2006 (Grupo B) (Figuras 4 e 5).

4.2 DADOS CLÍNICOS

Em relação à distribuição de acordo com a idade na época da notificação e com o sexo, os dados estão demonstrados nas Tabelas 7, 8 e 9. A média de idade do grupo A foi de 29,9 anos (± 10,3) e do grupo B foi de 34,9 anos (± 11,9).

Tabela 7 – Distribuição dos pacientes conforme a idade no momento da notificação

Idade no momento da notificação	**Grupo A** **N (%)**	**Grupo B** **N (%)**
≤ 19 anos	13 (15,5)	04 (6,1)
20 – 39 anos	59 (70,2)	42 (63,6)
40 – 59 anos	11 (13,1)	18 (27,3)
≥ 60 anos	01 (1,2)	02 (3,0)
Total	**84 (100)**	**66 (100)**

Tabela 8 – Análise comparativa da frequência de pacientes com idade menor ou igual a 19 anos nos dois grupos estudados

	Grupo A	**Grupo B**
Idade ≤ 19 anos	13	04
Idade > 19 anos	71	62
TOTAL	**84**	**66**

Teste exato de Fischer p=0,01

Tabela 9 – Distribuição dos pacientes conforme o sexo

Sexo	**Grupo A** N (%)	**Grupo B** N (%)
Feminino	37 (44)	30 (45,5)
Masculino	47 (56)	36 (54,5)
Total	**84 (100)**	**66 (100)**

Em relação à etnia, predominou a cor branca, conforme demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Distribuição dos pacientes conforme a etnia

Etnia	**Grupo A** N (%)	**Grupo B** N (%)
Branco	77 (91,7)	63 (95,4)
Negro	04 (4,8)	03 (4,5)
Pardo	02 (2,4)	00 (0)
Amarelo	01 (1,2)	00 (0)
Total	**84 (100)**	**66 (100)**

A maioria dos pacientes fez o diagnóstico de hepatite B após doação de sangue: 45 (53,6%) pacientes no grupo A e 23 (34,8%) no grupo B. As outras duas formas mais freqüentes de diagnóstico foram após triagem por diagnóstico de familiares com hepatite B, ou então em exames de rotina. Sendo assim, a maioria dos pacientes encontrava-se assintomática na época do diagnóstico (Tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição dos pacientes conforme a forma de diagnóstico da hepatite B crônica

Forma diagnóstico	**Grupo A**	**Grupo B**
	N (%)	**N (%)**
Doação de sangue	45 (53,6)	23 (34,8)
Após diagnóstico familiar	23 (27,4)	12 (18,2)
Exames de rotina	08 (9,5)	18 (27,3)
Pré natal	05 (6,0)	11 (16,7)
Após episódio de icterícia	01 (1,2)	01 (1,5)
Contato sexual	02 (2,4)	01 (1,5)
Total	**84 (100)**	**66 (100)**

Em relação à naturalidade, a maioria dos pacientes nasceu na região Oeste de Santa Catarina, e a cidade de Chapecó foi a mais frequente (Tabela 12). Seus familiares, em sua maioria, são naturais do Estado do Rio Grande do Sul, como demonstrado nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 12 – Distribuição dos pacientes conforme a naturalidade

Naturalidade	**Grupo A** N (%)	**Grupo B** N (%)
Estado de Santa Catarina	60 (71,4)	50 (75,8)
Cidade de Chapecó	33 (39,3)	17 (25,8)
Outras cidades do Oeste de SC	27 (32,1)	33 (50,0)
Estado do Rio Grande do Sul	21 (25,0)	13 (19,7)
Estado do Paraná	03 (3,6)	03 (4,5)
Total	**84 (100)**	**66 (100)**

Tabela 13 – Naturalidade dos pais (pai e mãe) dos casos em estudo

Naturalidade	**Grupo A** N (%)	**Grupo B** N (%)
Estado de Santa Catarina	51 (30,4)	37 (28,0)
Cidade de Chapecó	23 (13,7)	12 (9,1)
Outras cidades do Oeste de SC	26 (15,5)	25 (18,9)
Itajaí	02 (1,2)	00 (0,0)
Estado do Rio Grande do Sul	112 (66,7)	92 (69,7)
Estado do Paraná	02 (1,2)	02 (1,5)
Itália	00 (0,0)	01 (0,8)
Desconhece	03 (1,8)	00 (0,0)
Total	**168 (100)**	**132 (100)**

Tabela 14 – Naturalidade dos avós (avó materna, avô materno, avó paterna e avô paterno) dos casos em estudo

Naturalidade	**Grupo A** N (%)	**Grupo B** N (%)
Estado de Santa Catarina	49 (14,6)	29 (11,0)
Cidade de Chapecó	10 (3,0)	10 (3,8)
Outras cidades do Oeste de SC	39 (11,6)	17 (6,4)
Florianópolis	00 (0,0)	02 (0,8)
Estado do Rio Grande do Sul	223 (66,4)	199 (75,4)
Estado do Paraná	02 (0,6)	00 (0,0)
Itália	29 (8,6)	23 (8,7)
Alemanha	02 (0,6)	01 (0,4)
Espanha	02 (0,6)	00 (0,0)
Desconhece	29 (8,6)	12 (4,5)
Total	**336 (100)**	**264 (100)**

Em relação ao uso de medicação antiviral, apenas dois (2,4%) pacientes grupo A, e um (1,5%) paciente do grupo B recebiam terapia antiviral (Tabela 15).

Tabela 15 – Distribuição dos pacientes conforme o tratamento para a hepatite B

Tratamento	Grupo A N (%)	Grupo B N (%)
Tratamento atual	02 (2,4)	01 (1,5)
Tratamento prévio	00 (0,0)	00 (0,0)
Nunca recebeu tratamento	82 (97,6)	65 (98,5)
Total	**84 (100)**	**66 (100)**

4.3 DADOS LABORATORIAIS

O perfil sorológico do AgHBe tanto na época da notificação quanto o atual (2007) estão representados na Tabela 16.

Tabela 16 – Perfil evolutivo do AgHBe: época da notificação (1996 e 2006) e atual (2007 e 2008)

AgHBe	Grupo A				Grupo B			
	1996		2007		2006		2008	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Positivo	03	(3,6)	01	(1,2)	09	(13,6)	06	(9,0)
Negativo	81	(96,4)	83	(98,8)	57	(86,4)	60	(91,0)
Total	**84**	**(100)**	**84**	**(100)**	**66**	**(100)**	**66**	**(100)**

Os níveis de alanina aminotransferases foram avaliados em relação ao número de vezes que ultrapassavam o limite superior da normalidade (Figuras 7, 8, 9 e 10). Como valor normal, tomou-se como referência duas fontes distintas. Os valores foram avaliados de acordo com os níveis de referência adotados pelo Laboratório Municipal de Chapecó (ALT para homens: normal até 72 UI/L e para mulheres: até 52 UI/L) e também foram avaliados de acordo com os níveis de ALT para indivíduos saudáveis sugeridos na literatura (Prati, 2002) (ALT para homens: normal até 30 UI/L e para mulheres: até 19 UI/L).

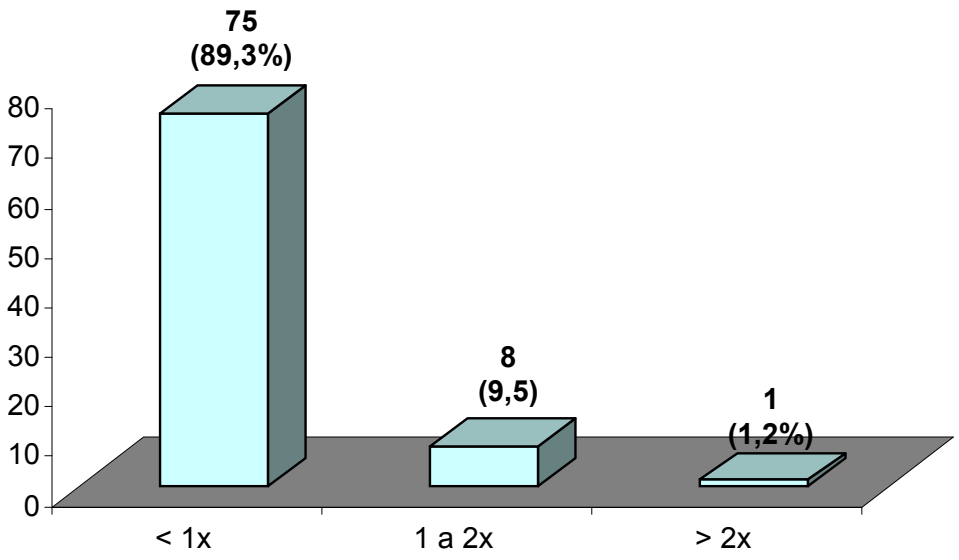


Figura 7 – Valor da alanina aminotransferase (ALT) coletada no momento da entrevista, grupo A. Valores representados em número de vezes o limite superior da normalidade, conforme referência utilizada pelo Laboratório Municipal de Chapecó

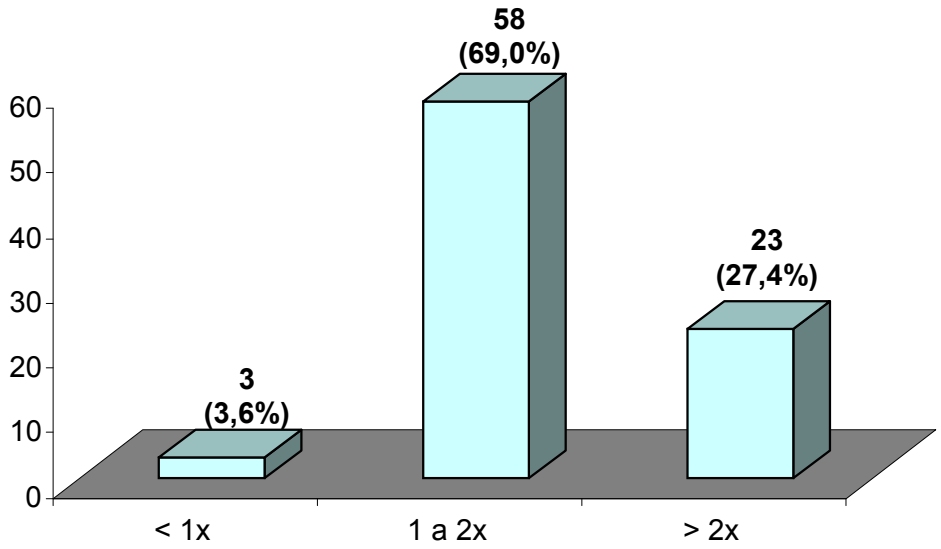


Figura 8 – Valor da alanina aminotransferase (ALT) coletada no momento da entrevista, grupo A. Valores representados em número de vezes o limite superior da normalidade, conforme referência recomendada por Prati *et al* (Prati, 2002)

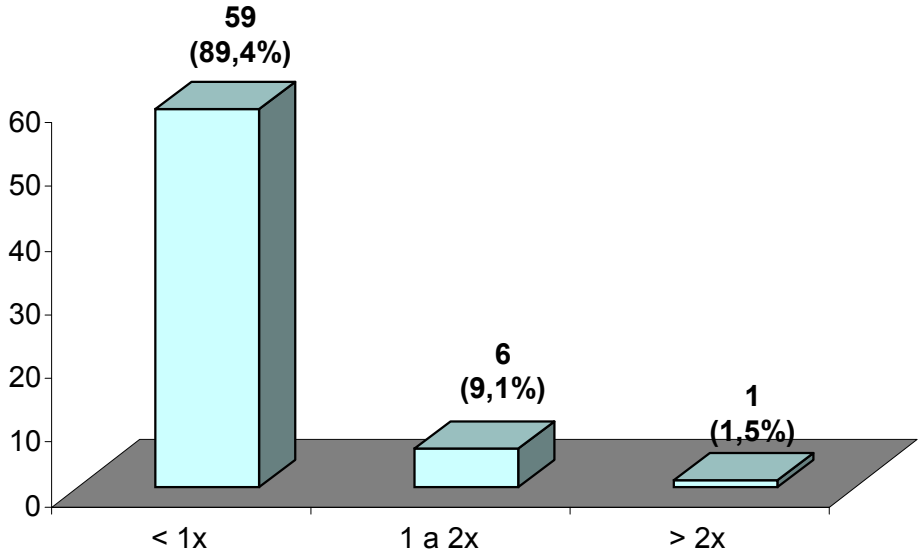


Figura 9 – Valor da alanina aminotransferase (ALT) coletada no momento da entrevista, grupo B. Valores representados em número de vezes o limite superior da normalidade, conforme referência utilizada pelo Laboratório Municipal de Chapecó

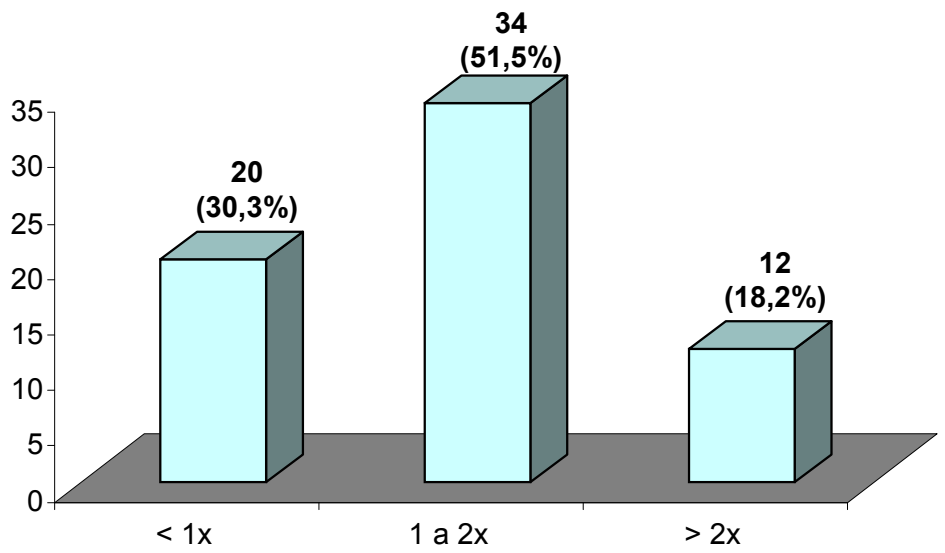


Figura 10 – Valor da alanina aminotransferase (ALT) coletada no momento da entrevista, grupo B. Valores representados em número de vezes o limite superior da normalidade, conforme referência recomendada por Prati *et al* (Prati, 2002)

A quantificação do VHB por PCR em tempo real evidenciou valores que oscilaram de indetectável (< 40 UI/mL) até 223.000.000 UI/mL. O limite máximo observado no grupo A foi de 223.000.000 UI/mL, enquanto no grupo B foi de 66.400.000 UI/mL.

De acordo com os consensos para manejo e tratamento do VHB publicados nos últimos anos (EASL, 2009; Ministério Saúde, 2009), vem sendo considerada a carga viral > 2.000 UI/mL como valor determinante no manejo desses pacientes (indicação de biópsia hepática e/ou tratamento antiviral). Dessa forma, utilizou-se esse valor para separar-se os casos em grupos, conforme elucidado nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17 – Quantificação por PCR em tempo real do VHB, portadores de VHB AgHBe +

Quantificação por PCR tempo real	Grupo A N (%)	Grupo B N (%)
Indetectável (< 40 UI/mL)	00 (0,0)	01 (16,7)
40 – 2.000 UI/mL	01(100)	00 (0,0)
> 2.000 UI/mL	00 (0,0)	05 (83,3)
TOTAL	01 (100)	06 (100)

Tabela 18 – Quantificação por PCR em tempo real do VHB, portadores de VHB AgHBe –

Quantificação por PCR tempo real	Grupo A N (%)	Grupo B N (%)
Indetectável (< 40 UI/mL)	20 (24,1)	10 (16,7)
40 – 2.000 UI/mL	30 (36,1)	03 (5,0)
> 2.000 UI/mL	33 (39,8)	47 (78,3)
TOTAL	83 (100)	60 (100)

Nas tabelas 19 e 20, pode-se verificar a distribuição dos pacientes com VHB AgHBe negativo em subgrupos de acordo com os níveis de carga viral e ALT. Na tabela 18, foram considerados os valores de ALT, conforme o limite superior da normalidade adotado pelo Laboratório Municipal de Chapecó (LSN mulheres = 52 UI/L, LSN homens = 72 UI/L); por outro lado, na tabela 19, foi considerado o valor adotado na literatura (LSN mulheres = 19 UI/L, LSN homens = 30 UI/L) (Prati, 2002).

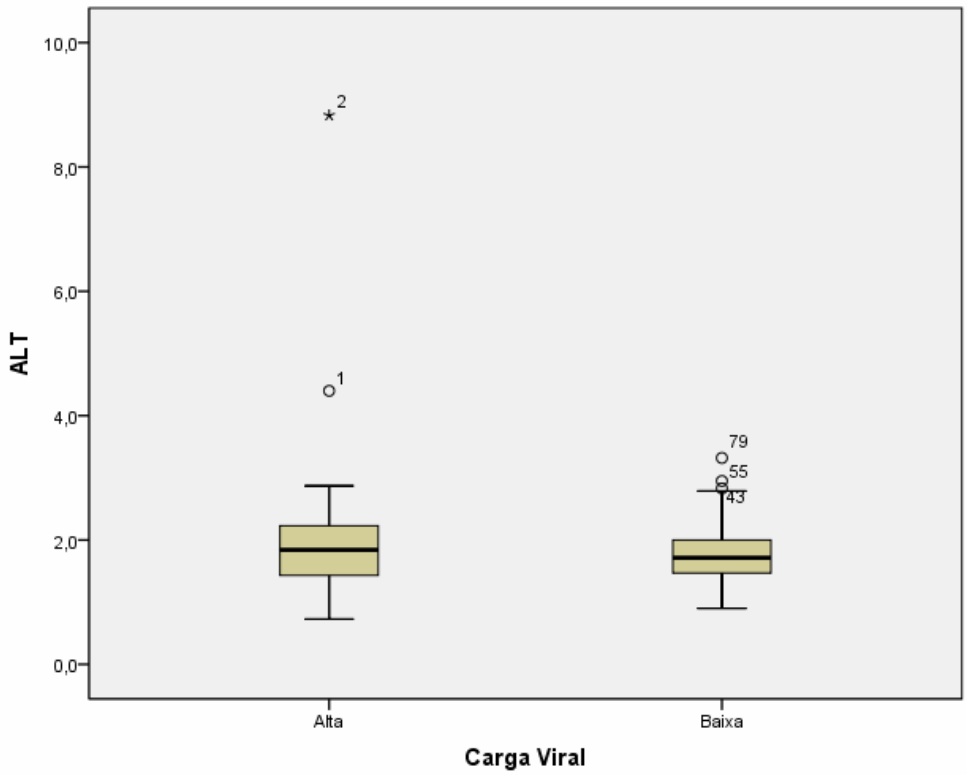
Tabela 19 – Frequência de pacientes AgHBe negativos com baixa (<2.000 UI/mL) ou alta (≥2.000 UI/mL) carga viral com base nos limites de ALT (xLSN), conforme o Laboratório Municipal de Chapecó

ALT (xLSN)	Grupo A				Grupo B			
	Baixa		Alta		Baixa		Alta	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
≤ 2x	50	(60,2)	32	(38,6)	13	(21,7)	46	(76,7)
> 2	00	(0,0)	01	(1,2)	00	(0,0)	01	(1,6)
TOTAL	**50**	**(60,2)**	**33**	**(39,8)**	**13**	**(21,7)**	**47**	**(78,3)**

Tabela 20 – Frequência de pacientes AgHBe negativos com baixa (<2.000 UI/mL) ou alta (≥2.000 UI/mL) carga viral com base nos limites de ALT (xLSN), conforme Prati *et al* (Prati, 2002)

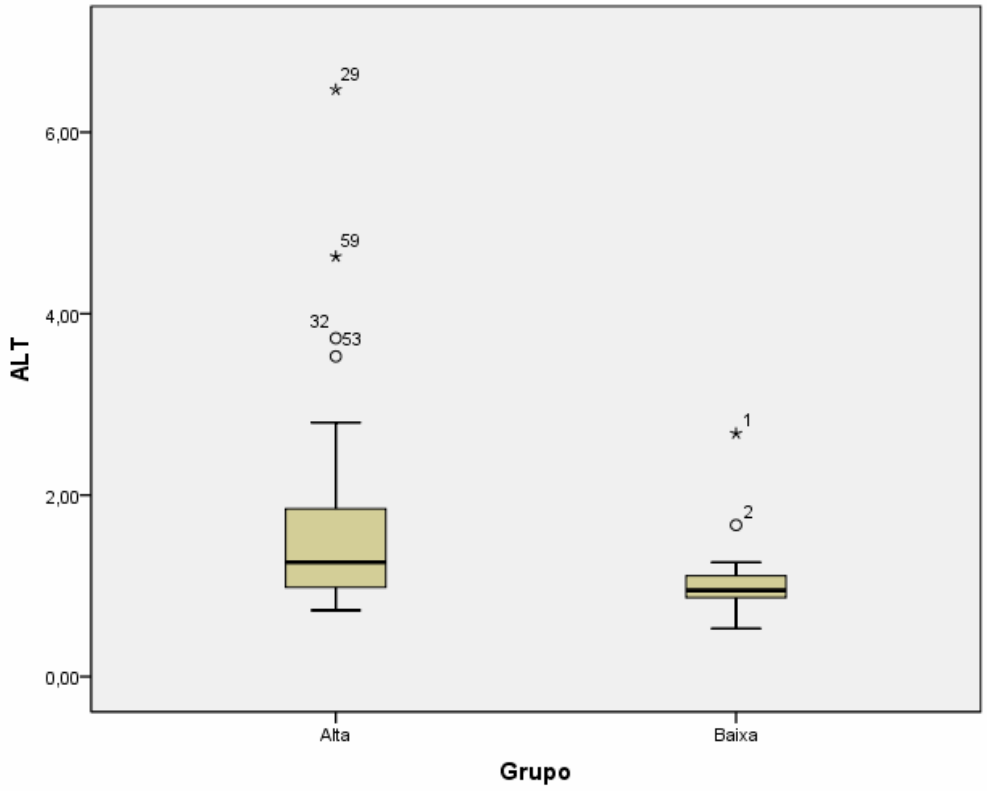
ALT (xLSN)	Grupo A				Grupo B			
	Baixa		Alta		Baixa		Alta	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
≤ 2x	39	(47,0)	19	(22,9)	12	(20,0)	39	(65,0)
> 2	11	(13,2)	14	(16,9)	01	(1,7)	08	(13,3)
TOTAL	**50**	**(60,2)**	**33**	**(39,8)**	**13**	**(21,7)**	**47**	**(78,3)**

Outro dado avaliado foi a média dos valores de ALT (avaliada de acordo com o número de vezes acima do LSN conforme Prati *et al*) em relação aos níveis de carga viral (alta ou baixa) nos pacientes AgHBe negativos (considerando-se como *cut off* para baixa a alta carga viral o valor de 2000 UI/mL). No grupo B, encontrou-se significância estatística (p= 0,03) (Figuras 11 e 12).



p=0,43

Figura 11 - Média da ALT (conforme LSN sugerido por Prati *et al*) nos pacientes AgHBe negativos do grupo A, conforme alta ou baixa carga viral



p=0,03

Figura 12 - Média da ALT (conforme LSN sugerido por Prati *et al*) nos pacientes AgHBe negativos do grupo B, conforme alta ou baixa carga viral

Outras variáveis avaliadas foram: níveis de bilirrubinas, albumina sérica e tempo de atividade da protrombina (TAP) (representado pelo RNI). Todos os casos (100%) dos grupos A e B apresentavam níveis de bilirrubinas e albumina sérica normais (< 2 e ≥ 3,5, respectivamente). Em relação ao TAP, apenas um (1,2%) paciente do grupo A apresentava valor de RNI igual 1,3; todos os outros casos apresentavam valores dentro dos limites da normalidade.

Dos 150 pacientes incluídos no estudo, conseguiu-se realizar o sequenciamento para genotipagem em 105 (70%) pacientes, sendo 58 pertencentes ao grupo A e 47 pacientes do grupo B (Tabela 21). Todos os pacientes apresentaram VHB genótipo D, como ilustrado na árvore filogenética (Figura 13).

Tabela 21 – Pacientes portadores de hepatite B crônica, onde foi possível a genotipagem do VHB

Genotipagem	**Grupo A**	**Grupo B**
	N (%)	**N (%)**
Sim	58 (69)	47 (71,2)
Não	26 (31)	19 (28,8)
Total	**84 (100)**	**66 (100)**

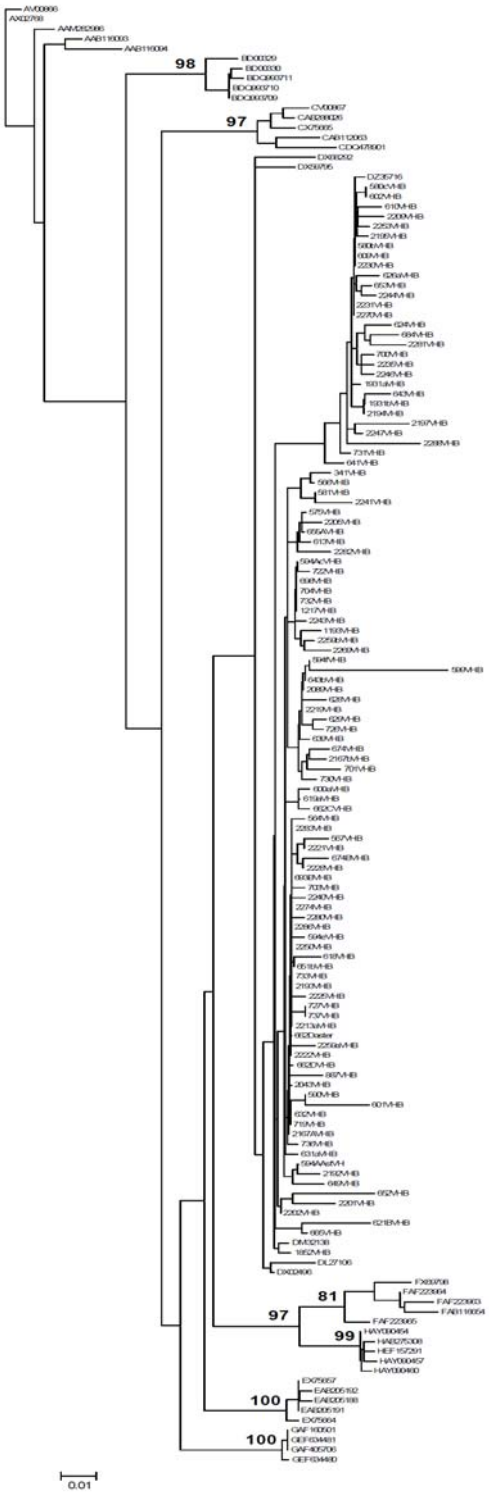


Figura 13 – Árvore filogenética, não enraizada, de 145 sequências da região S com 305 nucleotideos (40 seqs controle do Genbank e 105 seqs deste estudo) gerada no programa PAUP* utilizando-se o método de distância com o modelo TVM+I+G e algoritmo de NJ para a reconstrução da topologia. Valores de bootstrap obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os bootstraps dos ramos com valores acima de 70

O tratamento antiviral recebido e o perfil sorológico atual do AgHBe dos pacientes que foram genotipados estão representados nas Tabela 22 e 23, respectivamente.

Tabela 22 - Tratamento para hepatite B dos portadores de VHB que foram genotipados

Tratamento	**Grupo A**	**Grupo B**
	N (%)	**N (%)**
Tratamento atual	01 (1,7)	01 (2,1)
Tratamento prévio	00 (0,0)	00 (0,0)
Nenhum tratamento	57 (98,3)	46 (97,9)
Total	**58 (100)**	**47 (100)**

Tabela 23 – Distribuição conforme o perfil do AgHBe dos pacientes que tiveram o VHB seqüenciado e genotipado

Perfil AgHBe	**Grupo A**	**Grupo B**
	N (%)	**N (%)**
AgHBe +	01 (1,7)	04 (8,5)
AgHBe -	57 (98,3)	43 (91,5)
TOTAL	**58 (100)**	**47 (100)**

5 Discussão

A seguinte dissertação teve como interesse o estudo das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais de pacientes infectados pelo vírus da hepatite B em uma área de alta prevalência para tal infecção. Trata-se de tema relevante, uma vez que o levantamento destas informações, além de contribuir com estudos disponíveis sobre este tema, permite maior embasamento científico dos conceitos atualmente estabelecidos, respeitando as condições epidemiológicas dessa região.

Considera-se relevante destacar, que durante a elaboração desse trabalho, encontrou-se algumas dificuldades. Algumas já eram esperadas - como a realização da genotipagem viral -, mas talvez a mais difícil tenha sido buscar os pacientes até então não localizados. A utilização de bancos de dados públicos dos sistemas de informação em saúde foi crucial para se conseguir as informações. Observou-se que muitas pessoas desconhecem a existência desses sistemas. O acesso ao SIM possibilitou informações sobre aqueles pacientes que foram a óbito. A tarefa não foi fácil, porém, depois de estabelecido o contato com a equipe responsável, a busca tornou-se simples e objetiva.

É pertinente, outrossim, considerar que esses bancos de dados ainda apresentam muitas limitações. Muitas vezes relativas ao mau preenchimento de certidões de óbito e dados pessoais dos pacientes, outras referentes às deficiências nos municípios em repassarem as informações aos

responsáveis pelas atualizações no sistema. Dessa forma, acredita-se que alguns pacientes não localizados possam ter ido a óbito e tais dados não terem sido registrados no sistema.

Quando se avalia o número de notificações relacionadas à hepatite B crônica ao longo dos anos no município de Chapecó, observa-se queda do número de casos relacionados a tal infecção. A queda observada é atribuída, principalmente, às medidas de prevenção, como o programa de vacinação contra o vírus da hepatite B - que foi implantado no município no ano de 1992 -, e também a educação da população, no que diz respeito às formas de transmissão.

No ano de 1999 houve aumento no número de casos, fato atribuído ao fechamento do banco de sangue no período de agosto a dezembro de 1998, tendo em vista que esta sempre foi uma importante fonte notificadora. Em janeiro de 1999, quando o hemocentro reabriu, muitos portadores foram, então, notificados.

Quando se analisou os períodos estudados, observou-se que foram notificados 224 casos de hepatite B (18,6 pacientes/mês) no ano de 1996, e 128 casos (10,6 pacientes/mês) em 2006. É muito provável que esse fato se deva às ações de saúde pública implantadas com sucesso nesta região, uma delas a vacinação.

Porém, apesar dessas medidas, em 2006 ainda foram notificados 128 novos casos, número considerável para uma região que iniciou o programa de vacinação no ano de 1992. Por outro lado, quando se analisou as duas

coortes, observou-se que no grupo A havia maior número de crianças e adolescentes notificados, quando comparados ao grupo B (p=0,01). Tal dado reflete a eficácia das medidas de imunização em crianças e adolescentes, implantadas na região a partir de 1994. Entretanto, ainda se observa quatro casos de adolescentes notificados no grupo B que, provavelmente, nasceram antes da implantação da imunização ou não foram cobertos pelo programa; isso porque, quando esse foi implantado, abrangia apenas as pessoas com fatores de risco para a infecção. Apenas em 1994 a vacinação foi ampliada para os adolescentes até 15 anos de idade, e em 1999 entrou no calendário vacinal a imunização contra o VHB.

A partir de 1982, quando a vacinação tornou-se disponível comercialmente, foi reconhecida como o método mais eficaz para a prevenção contra a infecção pelo VHB (Kao, 2005). A implantação de programas de vacinação em massa, recomendados pela OMS desde 1991, reduziu drasticamente a incidência da infecção pelo VHB em recém nascidos, crianças e adolescentes (WHO, 2008).

O Estado do Alaska, região de alta prevalência para a infecção pelo VHB, iniciou a vacinação em massa no ano de 1983, conseguindo reduzir a zero a incidência de casos novos da infecção pelo VHB na população vacinada (Harpaz, 2000). Da mesma forma, na Itália foi implantada a vacinação de crianças e adolescentes no ano de 1991, com controle da infecção (Zanetti, 2005). Sendo assim, não resta dúvida de que a imunização é o melhor método para o controle da infecção e, por isso,

precisa ser amplamente divulgada para a população, em especial nas áreas endêmicas.

Apesar da imunização, sabe-se que 5 a 10% dos adultos saudáveis submetidos ao esquema preconizado (3 doses) falham em produzir níveis suficientes de anticorpos (anti-HBs), os quais são considerados não respondedores (Harpaz, 2000). Por outro lado, naqueles pacientes onde houve a produção de anticorpos, o desaparecimento do anti-HBs não traduz perda de proteção. Estudos *in vitro*, de linfócitos de sangue periférico de pessoas que perderam o anti-HBs, demonstraram que a memória imunológica persiste, havendo resposta após o contato com o antígeno (Banatvala, 2004). Zanetti e cols realizaram um estudo multicêntrico com 1658 italianos que haviam sido vacinados quando crianças ou adolescentes, e observaram que 10 anos após a imunização a maioria deles apresentava memória imunológica (Zanetti, 2005). Dessa forma, doses de reforço não estariam indicadas em pessoas previamente imunizadas.

Quando se analisou os casos que apresentaram clareamento viral, observou-se que 41 (18,3%) pacientes dos 224 notificados no ano de 1996 apresentaram perda do AgHBs, sendo que 28/41 (68,3%) pacientes seroconverteram para anti-HBs. Já no ano de 2006, dos 128 casos notificados, apenas quatro (3,1%) apresentaram clareamento viral até o momento, todos com seroconversão para anti-HBs. Esse resultado, provavelmente, reflete o menor tempo de seguimento pós notificação desses pacientes. Os resultados obtidos naqueles casos notificados no ano de 1996 são próximos daqueles observados na literatura. Da Silva e cols, em estudo

realizado com 184 pacientes portadores de hepatite B crônica, puderam observar clareamento do AgHBs em 10,8% dos casos e seroconversão para anti-HBs em 70% daqueles que clarearam o AgHBs (Da Silva, 1996). Por outro lado, estudo italiano realizado por Franchis e cols demonstrou que apenas 1/3 dos pacientes que apresentaram clareamento viral evoluíram com seroconversão para anti-HBs + (Franchis, 1993).

Vale a pena relatar a história de uma família notificada em 1996, representada pela mãe e três filhas. A mãe, no momento da notificação, tinha 36 anos, e as filhas 5, 11 e 14 anos. A filha caçula precisou ser excluída do estudo, pois tinha 16 anos na época da coleta. Por solicitação da mãe e da paciente, coletou-se sua amostra para estudo molecular, apesar de excluída da casuística. Curiosamente, no material coletado da mãe e das duas filhas mais velhas, não foi possível amplificar o PCR; já da menina de 16 anos, conseguiu-se amplificar e genotipar a amostra: seu genótipo foi D. Hoje, a matriarca da família, nos seus exames mais recentes (ano 2007), apresenta em duas amostras repetidas, a seroconversão do AgHBs para antiHBs +, embora nunca tenha recebido tratamento antiviral.

Em todo o período estudado, encontrou-se nove óbitos. É interessante salientar que apenas três casos apresentavam estigmas de hepatopatia crônica. O paciente portador de cirrose hepática, que havia sido notificado no ano de 1996, foi a óbito no pós operatório de neoplasia gástrica. Já os dois casos notificados em 2006, evoluíram para o óbito em consequência de complicações diretas da doença hepática crônica. Quando se avalia a literatura, observa-se que a história natural da hepatite B crônica

é muito individual e complexa, variando do estado de portador crônico assintomático (sem doença ativa) até o óbito decorrente de complicações da hepatite crônica, da cirrose hepática ou do carcinoma hepatocelular (McMahon, 2009a). Estatisticamente, sabe-se que a chance de portadores de hepatite B crônica desenvolverem cirrose é de 2 a 3% ao ano (Di Marco, 1999). Por outro lado, aqueles que adquiriram a infecção no período neonatal apresentam o risco de desenvolver carcinoma hepatocelular, numa taxa de 5% por década (chance 100 vezes maior que as pessoas não infectadas) (Sorrell, 2009). Na presente casuística, encontrou-se poucos casos que apresentaram complicações da doença. Interessante observar que os pacientes com mais tempo de infecção (casos notificados em 1996) foram justamente os que evoluíram de forma mais favorável. Não se pode esquecer que não se teve acesso a todos os casos, fato que poderia estar ocultando a existência de portadores de doença mais agressiva.

Os dois grupos estudados eram constituídos por proporções equivalentes de homens e mulheres. Blumberg, em recente publicação, ilustra algumas diferenças entre os sexos em relação à evolução da infecção, demonstrando que homens evoluem mais frequentemente para doença crônica, enquanto as mulheres apresentam maiores taxas de clareamento viral (Blumberg, 2006). Trata-se de um dado que não foi observado no presente estudo.

A média de idade foi de 29,9 anos no grupo A, e 34,9 anos no grupo B. Foi possível observar que houve redução significativa de casos em crianças e adolescentes no grupo B, um dado que provavelmente, reflete os

resultados do programa de vacinação implantado na região. Na literatura, encontra-se maior frequência de infecção em adultos jovens provenientes de áreas de alta prevalência, que foram infectados por transmissão vertical, em épocas em que o programa de vacinação ainda não havia sido implantado (Yu, 2000).

A etnia dos casos não se mostrou diferente quando avaliados os dois grupos. Observou-se que um paciente do grupo A era amarelo. Esse paciente era natural de Chapecó e seus familiares (pais e avós) naturais do RS, tinha histórico de familiares provenientes da Itália. Seu PCR não pôde ser amplificado, provavelmente por baixa carga viral. Dessa forma, não foi possível genotipá-lo.

Quando analisada a forma de diagnóstico entre os dois grupos, percebe-se que essa varia, há maior número de diagnóstico em exames de rotina e pré-natal no grupo B, quando comparados ao grupo A. Houve também diminuição de casos após diagnóstico familiar, o que sugere, indiretamente, aumento da transmissão horizontal do VHB no ano de 2006. Esses dados fortalecem a importância da implantação do programa de vacinação nessa região, demonstrando diminuição progressiva de casos em crianças e adultos jovens, assim como a menor frequência da transmissão vertical do VHB.

A maioria dos casos estudados é natural da região Oeste de Santa Catarina, em especial, da cidade de Chapecó. Por outro lado, seus pais e avôs eram originários do Estado do Rio Grande do Sul e da região do Mediterrâneo (sul da Europa). Esses dados são compatíveis com a rota de

imigração, pois Europeus (principalmente italianos) colonizaram a região Sul do Brasil (em especial o Estado do Rio Grande do Sul) e após migraram para a região oeste de Santa Catarina (Piazza, 1983).

A alanina aminotransferase (ALT), enzima encontrada no citoplasma celular, é um indicador utilizado na prática clínica para avaliar injúria hepatocelular. Sabe-se que é mais específica que a aspartato aminotransferase (AST), pois essa última encontra-se não apenas no citoplasma, mas também nas mitocôndrias; pode também ser detectada em outros tecidos além do fígado, como musculatura estriada, miocárdio, cérebro e rins (Giannini, 2005). Os níveis considerados como normais para a ALT, na maioria dos laboratórios, varia de 10 a 40 UI/L, sendo que esse valor difere muito entre as diferentes metodologias empregadas. No presente estudo, por exemplo, os exames foram realizados no Laboratório Municipal de Chapecó, que utiliza a metodologia de química seca pelo aparelho VITROS 250® e tem como valor de referência até 72 UI/L para homens, e até 52 UI/L para mulheres. Prati *et al* demonstraram que os valores até então considerados como normais da ALT foram obtidos de estudos em “indivíduos saudáveis”, previamente ao reconhecimento da hepatite C e da doença gordurosa do fígado. Por esse motivo, sugerem a redução destes valores e distinção entre os sexos, para 30 UI/L no homem e 19 UI/L na mulher (Prati, 2002). Na prática clínica, quando se menciona os níveis de ALT, geralmente menciona-se como o número de vezes que se encontram em relação ao limite superior da normalidade (LSN). Na população estudada, observa-se que quando considerados os valores de

referência empregados pelo laboratório do município, a maioria dos pacientes do grupo A, e também do grupo B, apresenta níveis até 1x o LSN, 89,3% e 89,4% respectivamente. Por outro lado, quando utilizados os valores de referência sugeridos na literatura (Prati, 2002), a maioria apresenta níveis em torno de 1 a 2x o LSN, sendo 69% dos casos do grupo A, e 51,5% do grupo B. De qualquer forma, observa-se que, independente da referência utilizada, a maioria dos pacientes nos dois períodos estudados apresenta valores de ALT até 2x o LSN. Conforme revisão sobre o tratamento da hepatite B crônica (Lok, 2009), os níveis de ALT possuem importância, junto com a avaliação da carga viral, para a indicação de biópsia hepática e conduta no manejo clínico terapêutico desses pacientes. Assim, com valores de referência mais baixos, aumentaria a indicação de biópsia hepática e também os custos em saúde. O decréscimo do valor de referência da ALT afetaria também, em muito, o número de doadores de sangue, pois os bancos de sangue costumam rejeitar doadores com níveis alterados de ALT, e muitos deles, provavelmente, apresentariam alterações decorrentes de esteatose hepática em frequência muito maior do que decorrente de hepatite viral (Kaplan, 2002).

Ao avaliar-se a carga viral do VHB encontrada no presente estudo, observou-se que a maioria (60,2%) dos pacientes do grupo A apresenta carga viral ≤ 2.000 UI/mL, enquanto no grupo B a maioria (78,3%) apresenta carga viral > 2.000 UI/mL. Essa diferença entre os grupos poderia ser explicada pelo tempo de seguimento em cada *coorte*. Pode-se estar diante de grupos distintos: um poderia estar em fase de portador crônico inativo

(baixa carga viral e baixos níveis de ALT) (grupo A), enquanto o grupo B poderia estar passando por um período de doença em atividade, quando se evidencia maiores níveis de carga viral e ALT. Estudo realizado por Antaki *et al* (Antaki, 2010), em portadores de hepatite B crônica na Síria, revelou que 97% dos infectados nessa região apresentavam VHB genótipo D, sendo 72% AgHBe negativos. O mesmo estudo evidenciou também que os portadores de VHB AgHBe negativos eram mais velhos, apresentavam níveis mais baixos de carga viral e maior incidência de cirrose hepática. Porém, deixa bem claro que essas características oscilam durante o curso da doença. Para análise, dividiu a população em estudo em quatro grupos, de acordo com características clínicas, bioquímicas, virológicas e histológicas, e assim, pôde demonstrar as diferenças encontradas de acordo com a fase da infecção.

Mota *et al* (Mota, 2009) estudando 340 pacientes com infecção pelo VHB provenientes do Norte de Portugal, evidenciou que 60,3% dos casos apresentavam VHB genótipo D, seguido pelo genótipo A (31,5%). Pôde concluir, também, que a infecção pelo genótipo D estava associada aos níveis mais elevados de carga viral.

No presente estudo, no grupo de pacientes AgHBe negativos que foram seguidos por mais de 10 anos (grupo A), excluiu-se, pela história natural, aqueles que apresentaram seroconversão do AgHBs. Nesse grupo de pacientes, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos de alta e baixa carga viral. Por outro lado, no grupo B, que foram recentemente diagnosticados, permanecem os pacientes com potencial de

seroconversão do AgHBs espontâneo. Sendo assim, neste grupo observou-se que os pacientes com alta carga viral apresentam maior nível de média de ALT, quando comparados com o grupo de baixa carga viral (p=0,03).

Os níveis de bilirrubinas das amostras analisadas, assim como os marcadores sorológicos de função hepática - como a albumina e o tempo de atividade de protrombina -, apresentaram valores dentro da faixa de normalidade. Isso denota que a população, em média, foi constituída por indivíduos na sua grande maioria com doença hepática estável e compensada.

Dos 150 casos estudados, apenas três (2%) estão recebendo tratamento antiviral: dois pacientes do grupo A e um paciente do grupo B. Fica difícil avaliar a resposta ao tratamento, em virtude do pequeno número de pacientes sob medicação.

De qualquer forma, vale a pena discutir os três casos que estão em tratamento:

Caso 1: Paciente de 39 anos de idade, sexo masculino, notificado como portador de hepatite B em 1996. A biópsia hepática de 13/10/2005, evidenciou os seguintes achados: alterações estruturais grau 1; infiltrado inflamatório portal septal grau 2; atividade peri-portal peri-septal grau 3; e atividade parenquimatosa grau 2. Conclusão: hepatite crônica em atividade moderada associada ao VHB. Iniciou tratamento com lamivudina 150 mg/dia em 01/02/2006, mantendo o uso até os dias de hoje. Na época em que iniciou o tratamento, apresentava ALT 6x o LSN, AgHBe não reagente;

atualmente, sua ALT é 1,5 x o LSN e sua carga viral 39.600.000 UI/mL. O genoma viral pôde ser amplificado, evidenciando-se genótipo D.

Caso 2: Paciente de 38 anos, sexo masculino, notificado em 1996. Foi submetido à biópsia hepática em 30/09/2003, apresentando as seguintes alterações: alteração estrutural grau 1; inflamação portal grau 1; atividade peri-portal grau 2; e atividade parenquimatosa grau 1. Conclusão: hepatite crônica discretamente ativa associada ao VHB. Na época em que realizou a biópsia hepática, suas transaminases chegaram a 10 x o LSN (conforme referência do laboratório municipal de Chapecó), sempre apresentou AgHBe não reagente. Dessa forma, iniciou tratamento com lamivudina em 12/03/2004. Em fevereiro de 2006, o paciente voltou a apresentar aumento dos níveis de aminotransferases, sendo solicitada a carga viral que evidenciou VHB DNA > 38.000 UI/mL (log 5,81). Sendo assim, a equipe assistente optou em suspender a lamivudina e iniciar entecavir 1 mg/dia (iniciou em 18/06/2006). Nos exames realizados para o presente estudo, o paciente apresenta aminotransferases dentro dos limites da normalidade (< 1x LSN), carga viral 142 UI/mL. Não foi possível realizar a genotipagem (provavelmente pela baixa carga viral).

Caso 3: Paciente de 23 anos, sexo masculino, notificado em 2006. Apresentava ALT em torno de 2x o LSN e AgHBe reagente desde a época da notificação. Fez uso de lamivudina e interferon convencional de 2006 até o final do ano de 2007, quando realizou PCR quantitativo, que evidenciou VHB DNA > 38.000 UI/mL (log 7,65). Nessa época, optou-se por trocar a

lamivudina por adefovir, medicação que o paciente mantém uso até hoje. A carga viral atual é de 14.100.000 UI/mL e o genótipo é D.

Durante o manejo clínico desses pacientes, a equipe assistente não tinha acesso fácil à realização de carga viral do VHB para todos os pacientes. Além disso, os valores de referência considerados como normais para as aminotransferases era muito alto, fato que levou muitos pacientes a não receberem tratamento antiviral.

De acordo com o protocolo clínico para o tratamento da infecção pelo VHB do Ministério da Saúde, lançado no ano de 2009 (Ministério da Saúde, 2009), aqueles pacientes portadores de hepatite B crônica com AgHBe negativo, devem receber tratamento antiviral quando apresentam carga viral ≥ 2000 UI/mL, ou com níveis menores de carga viral quando as aminotransferases estão alteradas. Dessa forma, ao avaliar-se os resultados conforme os valores de referência para ALT segundo o Laboratório Municipal, tratar-se-ia apenas dois pacientes (um em cada grupo); por outro lado, ao consider-se os valores de referência conforme proposto na literatura, tratar-se-ia 14 pacientes do grupo A, e 8 pacientes do grupo B. Esse dado fortalece a necessidade de discutir-se o nível de *cut off* para selecionar os pacientes com hepatite crônica ativa. Idealmente, esses pacientes deveriam ser submetidos à estudo histopatológico, mas tal análise não foi realizada por não ser o objetivo do presente trabalho. Porém, como a maioria dos pacientes não recebeu tratamento medicamentoso, foi possível observar a história natural da infecção pelo VHB nesta população.

Foi possível realizar o seqüenciamento e genotipagem viral de 105 pacientes (70% casos). Sabe-se que a detecção do VHB DNA é diretamente influenciada pela sensibilidade da metodologia utilizada e também pelo sítio onde é feito a sua procura (soro ou tecido hepático). No presente estudo, primeiramente, as amostras de DNA foram extraídas pelo Kit Quiagen, que parte de volume inicial de 200 μl. Com o objetivo de concentrar mais as amostras, utilizou-se naquelas fracamente positivas, o Kit *Supersense*. Esse kit faz extrações de volume inicial de 1000 μl, ou seja, torna possível concentrar pelo menos 5 vezes a amostra quando comparado com o Kit Quiagen. Dessa forma, com o *Supersense* conseguiu-se amplificar aquelas amostras com baixíssima viremia, e transformou-se as amostras fracamente positivas em positivas. Assim, tornou-se possível o sequenciamento e a genotipagem viral.

Em 1988, Okamoto e cols descreveram quatro genótipos do VHB (A, B, C e D) baseado numa divergência na sequência completa de nucleotídeos igual ou superior a 8% (Okamoto, 1988). Posteriormente, os genótipos E, F, G e H foram reconhecidos (Norder, 1993; Stuyver, 2000; Arauz-Ruiz, 2002).

No presente estudo, em todos os 105 casos em que foi possível realizar a genotipagem viral, evidenciou-se o genótipo tipo D. Foi interessante observar a naturalidade dos casos e de seus ascendentes, pois a rota de imigração demonstra que a maioria descende da região Sul do Brasil, Estado do Rio Grande do Sul (região colonizada por italianos), e de europeus provenientes da região do Mediterrâneo. Na literatura, fica muito

claro o efeito da migração populacional na distribuição mundial dos genótipos do VHB. O genótipo D tem distribuição universal, com maior prevalência no Sul da Europa (região do Mediterrâneo), América do Norte, Índia e África (Teles, 2002). Estudo realizado em uma coorte de 67 portadores de hepatite B crônica na cidade de Porto Alegre (RS) conseguiu realizar a genotipagem viral em 53 pacientes, sendo o genótipo D o mais freqüente (60,4% dos casos), seguido pelos genótipos A (34%) e F (5,4%) (Becker, 2009).

A região estudada, considerada área de alta prevalência para o VHB, demonstrou parcela importante de pacientes que fizeram diagnóstico da doença após o diagnóstico de familiares, ou seja, pacientes assintomáticos com história familiar positiva para a hepatite B (27,4% dos casos em 1996 e 18,2% dos casos em 2006), o que sugere a transmissão intrafamiliar da doença. Estudos recentes demonstram que a distribuição dos genótipos pode variar de acordo com a via de transmissão. Os genótipos B e C são mais prevalentes em áreas de alta endemicidade, onde a transmissão vertical é a principal via de transmissão. Já os genótipos A, D, E, F e G são encontrados em regiões onde a transmissão horizontal do VHB, predominatemente sexual, é mais comum. Entretanto, quando se avalia a possível causa para a diferença encontrada, observa-se que nossos resultados traduzem muito mais a origem da população local, do que a via de transmissão.

O conhecimento do genótipo viral é ferramenta importante para o conhecimento da evolução da doença hepática (McMahon, 2009b). Sabe-se

que o genótipo C é o mais relacionado com evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular. Já o genótipo D apresenta maior parcela de mutantes pré-core (Rodriguez-Frias, 1995), relação com casos de hepatite fulminante nos EUA (Wai, 2005) e maior chance de desenvolver vasculite (Hurlburt, 2007), quando comparado com os genótipos A, B, C e F.

Em relação à etnia, encontrou-se o predomínio de brancos. Apenas um paciente notificado no de 1996 era amarelo; porém, nesse paciente não foi possível realizar a genotipagem, pois não houve amplificação do PCR. Na literatura, dados obtidos a partir da distribuição dos genótipos do VHB em ensaios clínicos multicêntricos terapêuticos demonstraram diferenças marcantes na prevalência, conforme a origem étnica dos pacientes. Noventa e três por cento dos asiáticos apresentaram os genótipos B e C, enquanto a mesma proporção de caucasianos apresentou os genótipos A ou D (Westland, 2003).

Os pacientes genotipados, assim como a maioria da população estudada, apresentaram AgHBe negativo, totalizando 98,3% dos casos genotipados do grupo A, e 91,5% daqueles do grupo B. Observa-se que os dados da presente pesquisa estão de acordo com a literatura. Sabe-se que o desenvolvimento da mutação 1896 depende da presença ou ausência de um C, ou um T na posição 1858. Essa mutação impede a síntese do AgHBe. Os genótipos B, D e E apresentam T1858, enquanto A e H possuem C1858 (Stinik, 2004; Gish, 2007). Genótipos C e F isoladamente podem ter tanto C1858 ou T1858. O genótipo F da América Central tem T1858 (Arauz-Ruiz, 1997) e o genótipo C japonês exibe T1858 exclusivamente, enquanto C1858

é restrito aos pacientes com genótipo C do sudeste asiático. Rodriguez-Frias e cols. demonstraram que a mutação 1896 é a mais frequentemente encontrada em pacientes AgHBe negativos infectados com os genótipos D e E, sendo rara nos genótipos A e H, e encontrada em uma minoria dos pacientes com genótipos C e F (Rodriguez-Frias, 1995). Isso explica a elevada prevalência de mutante pré core em algumas populações, como na região do mediterrâneo, onde predomina o genótipo D.

Com base nos dados aqui estudados, dentre os pacientes genotipados, apenas um paciente do grupo A, e um do grupo B estavam em tratamento antiviral. O paciente do grupo A é um homem, hoje com 39 anos e recebe tratamento com lamivudina desde 01/02/2006, nunca havia recebido tratamento previamente. Já o paciente do grupo B, hoje tem 23 anos, também do sexo masculino e, atualmente, recebe tratamento com adefovir. Já recebeu tratamento prévio, na época da notificação, com interferon convencional associado à lamivudina. No presente estudo, fica difícil avaliar a resposta ao tratamento antiviral, em virtude do pequeno número de pacientes em tratamento. Porém, dados recentes da literatura apontam a influência do genótipo viral na resposta à terapêutica. Pacientes portadores de hepatite B AgHBe positivo, tratados com interferon alfa, foram avaliados em dois estudos que encontraram taxa de seroconversão do AgHBe maior entre os pacientes com genótipo A, do que com D (37% vs 6%, p=0,03) (41% vs 15%, p=0,045) (Erhardt, 2000; Kao, 2000). Já na hepatite B crônica AgHBe negativo, houve uma resposta sustentada pior

naqueles pacientes infectados com genótipo D, ao comparar com a obtida naqueles com o genótipo A (40 vs 70%) (Zhang, 1996).

No tratamento de pacientes AgHBe positivos com interferon peguilado alfa-2a, a resposta foi melhor naqueles com genótipo A, quando comparada com genótipos B, C e D (52% vs 30% vs 31% vs 22%) (Lau, 2005).

Em relação aos análogos nucleotídeos, estudo com a lamivudina demonstrou que aqueles com genótipo D apresentaram DNA VHB sérico e níveis de ALT no 12º mês menores do que aqueles com genótipo A. A resistência à lamivudina foi observada menos frequentemente em pacientes com genótipo D do que naqueles com o A (46% vs 92%, p=0,03) (Zollner, 2002). Ao comparar pacientes com genótipos A e D do VHB, Buti e cols encontraram maior risco de desenvolvimento de resistência à lamivudina no primeiro ano de tratamento, nos pacientes com genótipo A. Entretanto, essa diferença desapareceu quando o tempo foi prolongado por dois ou três anos (Buti, 2002). Esses resultados sugerem que a resistência ao tratamento apenas demore mais tempo para surgir no genótipo D.

Esses dados sugerem que o genótipo do VHB possa ser importante fator preditivo de resposta ao tratamento, e pode vir a auxiliar no planejamento de medidas de controle em saúde.

6 Conclusões

1. A maioria dos pacientes em estudo é natural do Oeste de Santa Catarina, sendo seus pais e avós naturais, em sua maioria, do Estado do Rio Grande do Sul e Região do Mediterrâneo – Europa.

2. Aminotransferases em limites próximos à normalidade, função hepática preservada e VHB AgHBe negativo caracterizaram os portadores de hepatite B crônica em Chapecó.

3. A maioria dos pacientes do grupo A apresentou carga viral ≤ 2.000 UI/mL, por outro lado, no grupo B a maioria apresentou carga viral > 2.000 UI/mL.

4. Evidenciou-se genótipo D em todos os casos genotipados.

7 Anexos

7.1 APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA – CAPPesq

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/08/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0616/07**, intitulado: **"ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE B NA REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA"** apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita**

Pesquisador (a) Executante: **Dra. Maria Luiza da Nova**

CAPPesq, 08 de Agosto de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br - fe

7.2 APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

I – Identificação:

- Título do Projeto: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DOVÍRUS DA HEPATITE B NA REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA
- Pesquisadores Responsáveis: Esther Buzaglo Dantas-Corrêa, Drª.
- Pesquisador Principal: Maria Luiz da Nova
- Data Coleta dados: 01/04/2007 a 31/03/2008
- Local onde a pesquisa será conduzida: Hospital Universitário – UFSC
Hospital das Clínicas – USP

II - Objetivos:

Traçar um perfil epidemiológico,clínico e laboratorial (com ênfase no genótipo viral) dos portadores de Hepatite B Crônica na região Oeste de Santa Catarina.

III - Sumário do Projeto

"A Hepatite tipo B é uma das mais prevalentes doenças infecciosas do mundo" . O projeto de pesquisa da especialização em residência médica visa levantar informações sobre pacientes portadores de doença na região oeste do estado de Santa Catarina para traçar um perfil dos mesmos.
O levantamento de informações será feito através de questionário sobre dados demográficos, sintomatologia clínica, presença de comorbidades, tratamentos realizados e fatores de risco para exposição ao VHB.
Após o questionário será coletada, com livre consentimento, amostra sangüínea, através da punção de veia periférica. As amostras serão utilizadas para genotipagem viral.
Utilizando as tecnologias disponíveis no Laboratório de Investigação Medica da USP serão obtidos os dados para uma análise estatística que será analisada e estruturado relatório.
A confidencialidade está garantida de acordo com os procedimentos apresentados no projeto.

IV - Comentário

A pesquisa apresenta tema atual e relevante, o projeto está bem redigido e fundamentado, os pesquisadores envolvidos estão capacitados ao seu desenvolvimento, os locais da amostra são relevantes para o resultado esperado e o protocolo contém todos os documentos necessários para a análise. Além disso, o projeto já foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da USP.
Apesar das qualidades do projeto devem-se ressaltar alguns detalhes:
- Mesmo com notoriedade em pesquisas as pesquisadoras responsáveis pelo projeto não apresentaram currículo na Plataforma Lattes – exigência de nosso conselho
- Não fica claro, no projeto, como será a utilização do laboratório da Faculdade de Medicina da USP pela acadêmica de residência médica da UFSC.

A confidencialidade das informações está garantida e, apesar das considerações (facilmente resolvidas) a estrutura contempla todas as necessidade para a aprovação de um projeto nesse conselho.

V – Parecer CEP:
(x) com pendência (especificar mais claramente como será a utilização dos laboratórios da USP e como o material vai chegar e voltar de lá)*

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por unanimidade, em reunião deste Comitê na data de 26 de março de 2007.

Pendência: tendo em vista o atendimento das pendências, somos de parecer favorável a aprovação deste projeto.

VI – Parecer Final:
(x) Aprovado.

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por unanimidade, em reunião deste Comitê na data de 07 de maio de 2007.

Prof. Washington Portela de Souza
Coordenador CEP

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.

7.3 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo Epidemiológico Molecular do Vírus da Hepatite B na Região Oeste de Santa Catarina

PESQUISADOR: Dra. Suzane Kioko Ono-Nita, Maria Luiza da Nova

CARGO/FUNÇÃO: Professora Doutora do Departamento de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, coordenadora de pesquisa

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CRM/SP 68066, CRM/SC 10429

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Gastroenterologia Clínica – Instituto Central

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais
3. desconfortos e riscos esperados
4. benefícios que poderão ser obtidos
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Estamos realizando um estudo sobre a infecção pelo vírus da hepatite B na Região Oeste do Estado de Santa Catarina. O contato com esse vírus é muito frequente nessa região, assim várias pessoas que nasceram ou que moram nesse local já tiveram contato com esse vírus. Sabemos que ele pode ser transmitido pelo sangue (por exemplo: pessoas que usam drogas injetáveis, que receberam transfusão de sangue há anos atrás ou que de alguma forma entraram em contato com sangue de outra pessoa que tinha a infecção), pelo sexo ou também de mãe para filho durante a gravidez.

O objetivo da atual pesquisa será estudar as características dessa doença no Oeste de Santa Catarina, região do Estado onde essa doença é muito frequente. Para isso, entrevistaremos várias pessoas, que assim como o (a) senhor (a), possuem o vírus da hepatite e em algum momento da vida moraram nesse local.

Entraremos em contato com o (a) senhor (a) para marcarmos uma entrevista onde será feito um questionário para conhecê-lo (a) melhor. Nesse dia, perguntaremos sobre o local onde você, seus pais e seus avós nasceram, além de outras perguntas para tentarmos saber como foi que você adquiriu o vírus (essas perguntas são chamadas de fatores de risco, por exemplo, se você tem algum parente que tem o vírus, se já usou droga, se já recebeu transfusão de sangue), também perguntaremos se você já usou remédio para hepatite. Além disso, nesse dia, examinaremos o senhor (a) e coletaremos quatro tubinhos de sangue para estudarmos o seu vírus da hepatite.

Algumas pessoas podem se sentir constrangidas em responder às perguntas, mas o senhor (a) pode ficar tranquilo que tudo o que for conversado nesse dia será mantido em segredo, só terá acesso a seu questionário as pessoas responsáveis pelo trabalho (Dra Maria Luiza, Dra Esther e Dra Suzane). Em relação à retirada de sangue, fique tranquilo, pois será realizada por pessoas experientes. O (a) senhor (a) pode sentir um pouco de dor ou apresentar um pequeno hematoma no local, que em poucos dias desaparecerá.

Você não é obrigado a participar deste estudo.

Você não gastará nada nem receberá qualquer contribuição em dinheiro por ter participado desta pesquisa.

O hospital garante tratamento para o (a) senhor (a) de qualquer problema que possa ser causado pela coleta de sangue (único exame ao qual o (a) senhor (a) será submetido), porém não dá indenização em dinheiro por algum problema causado por tal procedimento.

Quando o resultado da pesquisa ficar pronto, só irá aparecer um número de identificação. O seu nome será segredo. Somente os médicos que participarão do estudo saberão o seu problema.

Esse estudo possibilitará conhecer melhor as características das pessoas que adquirem o vírus, além das características do próprio vírus, o que será importante para obtermos avanços no tratamento dessa doença e conseguirmos manejar melhor essa infecção.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Em qualquer etapa o senhor (a) terá acesso às pesquisadoras responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

O senhor terá acesso a qualquer dado gerado pela entrevista.

O senhor tem liberdade de retirar seu consentimento e deixar de participar da pesquisa a qualquer momento.

Todos os dados serão conservados sob sigilo, sendo a identidade do entrevistado preservada. Os dados obtidos estarão a sua disposição e/ou do representante legal devidamente credenciado, de acordo com as normas vigentes.

A pesquisa proposta é baseada no preenchimento de um questionário e na coleta de sangue periférico dos participantes. Não tem por objetivo realizar medidas que possam interferir na saúde dos participantes, dessa forma, não acarretará danos que possam colocar a vida em risco.

Não está previsto indenização, pois a sua participação é voluntária.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita

Dra. Maria Luiza da Nova

Secretaria da Disciplina de Gastroenterologia Clínica

Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 9ª andar , sala 9159 – CEP: 05403-900, São Paulo- SP – telef: 11-30697830 ou 30631559.

Dra . Esther Buzaglo Dantas-Correa
Ambulatório de Hepatologia Hospital Universitário – Universidade Federal de Santa Catarina
R: Prof Maria Flora Pausewang, 100 – Área A - Hospital Universitário – CEP: 88036-800, Florianópolis SC – telef: 48-33319133

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200_.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

7.4 QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO HEPATITES

Número: _____ Registro: _____ Data: _____/_____/_____

Nome: _____ RG: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: ____ Sexo: ( ) feminino ( ) masculino

Raça: ( ) branca ( ) negra ( ) amarela ( ) parda ( ) outra Profissão: _____

Estado Civil: ( ) solteiro ( ) casado ( ) amigado ( ) divorciado ( ) viúvo

Cidade nascimento: _____ Cidade onde reside:_____

Cidade nasceu pai: _____ Cidade nasceu mãe: _____

Cidade nasceu avó paterna: _____ Cidade nasceu avô paterno: _____

Cidade nasceu avó materna: _____ Cidade nasceu avô materno: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Estado: _____ CEP: _____

Telefone 1: ( ) _____ Telefone 2: ( ) _____

Como ficou sabendo que estava infectado pelo vírus B:

_____ Ano: _____

Sintomas: ( ) assintomático ( ) astenia ( ) icterícia ( ) hemorragia digestiva

( ) ascite ( ) encefalopatia

( ) outros: _____

Já teve icterícia ou hepatite: ( ) sim ( ) não Ano: _____

Tem familiares com hepatite B? ( ) sim ( ) não Quantos: _____

Parentesco: ( ) pai ( ) mãe ( ) irmãos ( ) cônjuge/parceiro sexual ( ) filhos

( ) avó/avô ( ) primos

Familiares com outras doenças no fígado: ( ) sim ( ) não

Parentesco: ( ) pai ( ) mãe ( ) irmãos ( ) cônjuge/parceiro sexual ( ) filhos

( ) avó/avô ( ) primos

Tipo doença: ( ) icterícia ( ) hepatite ( ) cirrose ( ) câncer fígado

( ) outras: _____

Doenças associadas: ( ) Hep C ( ) HIV ( ) Insuficiência Renal

( ) Diabetes ( ) HAS ( ) outras: _____

Fumo : ( ) sim ( ) não Quantos cigarros dia: ____ Quantos anos: _____

Etilismo: ( ) sim ( ) não

Quanto dia (copo/garrafa): _____ Tipo: _____

Quanto tempo: _____ ( ) mantém uso ( ) usou no passado

Drogas: ( ) sim ( ) não

( ) inalada ( ) injetável Ano em que usou: _____

Tatuagem: ( ) sim ( ) não

Ano realizou: _____ Ag estéril: ( ) sim ( ) não

Acupuntura: ( ) sim ( ) não

Ano realizou: _____ Ag estéril: ( ) sim ( ) não

Atividade sexual: ( ) homossexual ( ) heterossexual ( ) promiscuidade ( )

Profissional Saúde: ( ) sim ( ) não

Qual: _____

Acidente Agulha: ( ) sim ( ) não Ano: _____

Hemotransfusão: ( ) sim ( ) não Ano: _____

Uso comum lâmina barbear ou escova dentes: ( ) sim ( ) não

Cirurgia prévia: ( ) sim ( ) não Qual: _____

Ano: _____

Endoscopia prévia: ( ) sim ( ) não

Cidade onde fez: _____ Ano: _____

Doador de sangue: ( ) sim ( ) não

Ano doação: _____ Ano recusa: _____

Uso de medicamentos: _____

Trata ou já tratou hepatite B? ( ) sim ( ) não

( ) lamivudina período uso: _____ a _____, mantém uso ( ) sim ( ) não

( ) adefovir período uso: _____ a _____, mantém uso ( ) sim ( ) não

( ) entecavir período uso: _____ a _____, mantém uso ( ) sim ( ) não

( ) interferon período uso: _____ a _____, mantém uso ( ) sim ( ) não

Exame físico:

Peso: _____ Altura: _____

Presença de :

( ) ascite ( ) varizes esôfago na endoscopia ( ) aranhas vasculares ( ) encefalopatia hepática

Exames Laboratoriais:

Data				
Hb				
VCM				
Leucócitos				
Plaquetas				
RNI				
AST (TGO)				
ALT (TGP)				
BT/BD				
FA				
GGT				
Creatinina				
Albumina				
Alfa-feto				

Exames laboratoriais – Sorologias:

Data				
AgHBs				
Anti-HBs				
Anti-HBc IgM				
Anti-HBc IgG				
AgHBe				
Anti-HBe				
Anti-HCV				
RNA VHC				
Anti-HIV				
Genótipo VHB				
PCR quanti VHB				

Biópsia Hepática – ( ) sim ( ) não Data: _____/_____/_____

=> ANEXAR CÓPIA

Grau Alteração estrutural: _____

Grau Infiltrado inflamatório portal-septal: _____

Grau Atividade periportal: _____

Grau Atividade parenquimatosa: _____

8 Referências

1. Alter MJ. Epidemiology and prevention of hepatitis B. *Semin Liver Dis*. 2003;23:39-46.

2. Antaki N, Haffar S, Ali Deeb S, Assaad F, Abou Harb R, Zeibane N, Nassereldddine M, Ibrahim N, Alhaj N, Jabbour E, Aaraj R, Antaki F, Kebbewar K. High prevalence of HBV genotype D in Syria and the clinical characteristics of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Epidemiol Infect*. 2010;138:40-44.

3. de Araújo ESA, Barone AA, Junior FLG, Ferreira JSMMS, Focaccia R. I consensus for the Management and treatment of hepatitis B carried out by the Brazilian society of infectious diseases. *Braz J Infect Dis*. 2007;11:2-5.

4. Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *J Infect Dis*. 1997a;176:851-8.

5. Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnius LO. Genotype F prevails in HBV infected patients of hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. *J Med Virol.* 1997;51: 305-12.

6. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*. 2002;83:2059-73.

7. Ashton-Rickhardt PG, Murray K. Mutations that change the immunological subtype of hepatitis B virus surface antigen and distinguish between antigenic and immunogenic determination. *J Med Virol.* 1989;29:204-14.

8. Banatvala J, Van Damme P, Oehen S. Lifelong protection against hepatitis B: the role of vaccine immunigenicity in immune memory. *Vaccine*. 2001;19:877-85.

9. Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Stinik R, Schiefelbein CS. Genotipagem do vírus da hepatite B emu ma coorte de pacientes avaliados em um hospital geral. *Revista da AMRIGS*. 2009;53(Supl):ID08. (Apresentado no XX Congresso Brasileiro de Hepatologia; 30 de setembro a 3 de outubro de 2009; Gramado, Brasil. Abstracts).

10. Blumberg BS. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:7121-5.

11. Blumberg BS. The Curiosities of Hepatitis B Virus: Prevention, Sex Ratio, and Demography. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:14-20.

12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite viral crônica B e coinfecções. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

13. Buti M, Cotrina M, Valdes A, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Esteban R. Is hepatitis B virus subtype testing useful in predicting virological response and resistence to lamivudine? *J Hepatol*. 2002;36:445-6.

14. Cabral OR. *História de Santa Catarina*. 3 ed. Florianópolis: Lunardelli; 1987.

15. Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Mello IMVGC, Bertolini DA, Lemos MF, Moreira RC, Bassit LC, Cardoso RA, Ribeiro-dos-Santos G, Da Silva LC. Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centers from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health*. 2004;4:13.

16. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Incidence of acute hepatitis B – United States, 1990-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004;52:1252-4.

17. CIASC (Centro de Informática e Automação do Estado de Santa Catarina) - http://www.mapainterativo.ciasc.gov.br/

18. Couroucé-Pauty A-M, Plançon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang*. 1983;44:197-211.

19. Cruz JR, Pérez-Rosales MD. Availability, safety and quality of blood for transfusion in the Americas. *World Hosp Health Serv*. 2005;41:27-31.

20. Cunha AC, Freddi MJAL, Crestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* 2.ed. São Paulo: SBD-FMUSP; 2005.

21. Da Silva LC, Madruga CLA, Carrilho FJ, Pinho JRR, Saéz-Alquezar A, Santos C, et al. Spontaneous hepatitis B surface antigen clearance in a long-term follow-up study of patients with chronic type B hepatitis. Lack of correlation with hepatitis C and D virus superinfection. *J Gastroenterol*. 1996;31:696-701.

22. Dehesa-Violante M, Nuñez-Nateras R. Epidemiology of Hepatitis Virus B and C. *Arch Med Res*. 2007;38:606-11.

23. Di Marco V, Lo Iacono O, Cammà C, Vaccaro A, Giunta M, Martorana G, et al. The long-term course of chronic hepatitis B. *Hepatology*. 1999;30:257-64.

24. DIVE/SES/SC (Diretoria de Vigilância Epidemiológica/Secretaria de Estado da Saúde/ Santa Catarina) - http://www.dive.sc.gov.br/

25. Erhardt A, Reineke U, Blondin D, Gerlich WH, Adams O, Heintges T, et al. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology*. 2000;31:716-25.

26. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2009;50(2):227-42.

27. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998a;8(3):186-94.

28. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998b;8(3):175-85.

29. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Evolution*. 1985;39:783-91.

30. Focaccia R. *Tratado de Hepatites Virais*. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2007.

31. Fonseca JCF. HDV in Latin America. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;25:52-4.

32. Fonseca JCF. Natural history of chronic hepatitis B. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40:672-7.

33. Franchis R, Meucci G, Vecchi M, Tatarella M, Colombo M, Del Ninno E, et al. The Natural History of Asymptomatic Hepatitis B Surface Antigen Carriers. *Ann Intern Med*. 1993;118:191-4.

34. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B Virus Infection – Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med*. 2004;350:1118-29.

35. Gayotto LCC, Alves VAF, Da Silva, LC, Strauss E, Carrilho FJ, Porta G. *Doenças do Fígado e Vias Biliares*. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

36. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2005;172:367-79. Review.

37. Gish RG, Locarnini S. Genotyping and genomic sequencing in clinical practice. *Clin Liver Dis*. 2007;11:761-95

38. Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res*. 1998;8(3):195-202.

39. Guirao AA, Yuste SR, Regueiro BJ. Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(4):264-76.

40. Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DV, Meisel H, Will H. A Novel Method for Efficient Amplification of Whole Hepatitis B Virus Genomes Permits Rapid Functional Analysis and Reveals Deletion Mutants in Immunosuppressed Patients. *J Virol*. 1995; 69:5437-44.

41. Harpaz R, McMahon BJ, Margolis HS, Shapiro CN, Havron D, Carpenter G, et al. Elimination of new chronic hepatitis B virus infections: results of the Alaska immunization program. *J Infect Dis*. 2000; 181:413-8.

42. Hurlburt KJ, McMahon BJ, Simonetti JP, Livingston SE, Bulkow LR, Snowball MM, et al. Hepatitis B-associated vasculitis in Alaska Natives: viral genotype, clinical and serologic outcome. *Liver Int*. 2007;27:627-32.

43. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística): http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm

44. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol*. 2000;33:998-1002.

45. Kao JH, Chen DS. Hepatitis B vaccination: To boost or not to boost? *Lancet*. 2005; 366:1337-8.

46. Kaplan MM. Alanine Aminotransferase Levels: What's Normal? *Ann of Intern Med.* 2002;137:49-51.

47. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SHB, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, et al. A Treatment Algorithm for the Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection in the United States: An Update. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:936-62.

48. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol.* 2002;83:1267-80.

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

50. Lau GKK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, et al. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 2005;352:2682-95.

51. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004;11:97-107.

52. Lee MW. Hepatitis B Virus Infection. *N Eng J Med*. 1997;337:1733-45.

53. Lin KW, Kirchner JT. Hepatitis B. *Am Fam Physician*. 2004;69(1):75-82.

54. Livingston SE, Simonetti JP, Bulkow LR, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH, et al. Clearance of Hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D and F. *Gastroenterology*. 2007;133:1452-7.

55. Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis.* 2003;23:5-20.

56. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. *Hepatology*. 2001;34:1225-41

57. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B: Update 2009. *Hepatology*. 2009;50:1-36.

58. Lyra AC, Pinho JRR, Mello IMVGC, Malta FM, Gomes MMS, Di Bisceglie AM, Lyra LCG, Carrilho FJ, Da Silva LC. Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among patients with acute viral hepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(1):81-2.

59. Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett`s *Principles and Practice of Infectious Disease.* New York: Churchill Livingstone; 2005.

60. Manual de procedimentos do sistema de informações sobre mortalidade. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001.

61. McMahon BJ. The Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology*. 2009a;49:S45-S55.

62. McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int.* 2009b;3:334-42.

63. McCormack GP, Clewley JP. The application of molecular phylogenetics to the analysis of viral genome diversity and evolution. *Rev Med Virol*. 2002;12(4):221-38. Review.

64. Mello FCA, Souto FJD, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HSM, Franz HCF, Saraiva JCP, Virgolino HA, Motta-Castro ARC, Melo MMM, Martins RMB, Gomes SA. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol*. 2007;7:103.

65. Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. Epidemiological study of genotypes of hepatitis B virus in northern Portugal. *J Med Virol.* 2009;81:1170-6.

66. Nita ME, Alves VAF, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, Mello ES, Gama-Rodrigues JJ. Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44:39-48.

67. Nita ME, Secolli SR, Nobre MRC, Ono-Nita SK, Campino ACC, Sarti FM, et al. *Avaliação de tecnologias em saúde.* Porto Alegre: Artmed; 2009.

68. Norder H, Hammas B, Lofdal S, Löfdahl S, Courouce AM, Magnius LO. 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. *J Virol*. 1992;73:1201-08.

69. Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Couroucé AM, Mushahwar IK, et al. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol*. 1993;74:1341-8.

70. Okamoto H, Imal M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakama Y, Mayumi H. Point mutation in the s gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adry or adwr. *J Virol.* 1987;61:3030-34.

71. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis b virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Viro*. 1988;69:2575-83.

72. Ono-Nita SK, Alves VAF, Carrilho FJ. Hepatites Crônicas. In: Milton AM, Carrilho FJ, Alves VAF, Catilho EA, Cerri GG, Wen CL. Clínica Médica, volume 4: *Doenças do aparelho digestivo, nutrição e doenças nutricionais*. 1 ed. São Paulo: Manole; 2009. p.291-313.

73. Parana R, Almeida D. HBV epidemiology in Latin America. *J Clin Virol*. 2005;34:S130-3.

74. Pereira LMMB, Martelli CMT, Merchán-Hamann E, Montarroyos UR, Braga MC, Lima MLC, et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:240-7.

75. Peterson DL, Paul DA, Lam L, Tribby II, Achord DT. Antigen structure of hepatitis B surface antigen: identification of the subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. *J Immnol.* 1984; 132:920-7.

76. Piazza W F. *Santa Catarina: Sua História.* Florianópolis: Lunardelli; 1983.

77. Piazza W.F. *A Colonização de Santa Catarina.* Florianópolis: Lunardelli; 1987.

78. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998;14(9):817-8.

79. Prati D, Taioli E, Zanella A, Torre ED, Butelli S, Del Vecchio E, et al. Updated Definitions of Healthy Ranges for Serum Alanine Aminotransferase Levels. *Ann Intern Med*. 2002;137:1-9.

80. Rehermann B. Immune responses in hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis.* 2003;23:21-38.

81. Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, et al. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology*. 1995;22:1641-7.

82. Rosini N, Mousse D, Spada C, Treitinger A. Seroprevalence of HBsAg, anti HBc and anti HCV in southern Brazil, 1999-2001. *Braz J Infect Dis.* 2003;7:262-7.

83. Souto FJD. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva.* 1999;18:143-50.

84. Sorrell MF, Belongia EA, Costa J, Gareen IF, Grem JL, Inadomi JM, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis B. *Hepatology*. 2009;49:S4-S12.

85. Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, Da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B Virus Genotypes and Precore and Core Mutants in Brazilian Patients. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2455-60.

86. Stuyver LJ, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatits B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000;81: 67-74.

87. Swofford DL. PAUP* *Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (*and Other Methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates 2002.

88. Teles SA, Martins RMB, Gomes SA, Gaspar AMC, Araujo NM, Souza KP, et al. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. *J Med Virol*. 2002;68:41-9.

89. Thompson JD, GibsonTJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(24):4876-82.

90. Tonetto PA, Gonçales NSL, Fais VC, Vigani AG, Gonçales ESL, Feltrin A, Gonçales FL Jr. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. *BMC Infec Dis*. 2009;9:149.

91. Villeneuve, JP. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol*. 2005; 34:S139-42.

92. Wai CT, Fontana RJ, Polson J, Hussain M, Shakil AO, Han SH, et al. Clinical outcome and virological characteristics of hepatitis B-related acute liver failure in the United States. *J Viral Hepat*. 2005;12:192-8.

93. Westland CE, Delaney W, Yang H, Chen SS, Marcellin P, Hadziyannis S, et al. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology*. 2003;125:107-16.

94. World Health Organization (WHO). Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet no 2004. Avaiable at: http//who.int/mediacentre/factshets/fs204/en (accessed June 12, 2008).

95. Yu MC, Yuan JM, Govindarajan S, Ross RK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Can J Gastroenterol.* 2000;14:703-9.

96. Zanetti AR, Mariano A, Romanò L, D'Amelio R, Chironna M, Coppola RC, et al. Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination and policy for booster: an Italian multicentre study. *Lancet*. 2005;366:1379-84.

97. Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, Terpo C. Analysis of hepatitis B virus genotype and pre-core region cariability during interferon treatment of Hbe antigen negative chronic hepatitis B. *J Med Virol.* 1996;48: 8-16.

98. Zharkikh A, Li WH. Estimation of confidence in phylogeny: the complete-and-partial bootstrap technique. *Mol Phylogenet Evol.* 1995;4(1):44-63.

99. Zöllner B, Petersen J, Schäfer P, Schröter M, Laufs R, Sterneck M, et al. Subtype-dependent response of hepatitis B virus during the early phase of lamivudine treatment. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1273-7.