



**Cristina Maria Morais
de Carvalho**

**Estudo laboratorial do vírus da hepatite B numa
população de dadores de sangue**



**Cristina Maria Morais
de Carvalho**

**Estudo laboratorial do vírus da hepatite B numa
população de dadores de sangue**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Dra. Lucinda Queirós, médica, Chefe de Serviço de Imunohemoterapia, Laboratório de Agentes Transmissíveis, CRSP-IPS, e co-orientação da Dra. Isabel Henriques, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Dra. Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dra. Maria Lucinda de Magalhães Queirós Ribeiro
Chefe de Serviço de Imunohemoterapia do Centro Regional de Sangue do
Porto – Instituto Português do Sangue

Prof. Dra. Isabel da Silva Henriques
Professora Auxiliar convidada do Departamento de Biologia da Universidade
de Aveiro

Dr. Jorge Manuel Condeço Ribeiro
Assistente Graduado de Saúde Pública do Centro Regional de Sangue do
Porto – Instituto Português do Sangue

agradecimentos

À Dra. Lucinda Queirós, por mais uma vez me ter orientado e apoiado numa nova etapa do meu percurso académico.

À Dra. Isabel Henriques, pela orientação, críticas e sugestões que contribuíram para a melhoria desta dissertação.

A todos os técnicos do Laboratório de Agentes Transmissíveis do CRSP-IPS, pela compreensão, camaradagem e apoio demonstrado.

À Emília Santos, Carla Moreira, Sandra Neto, Alberto Moreira e Paulo Fonseca por toda a disponibilidade e apoio.

A todos aqueles que, de alguma forma, tenham contribuído para que este projecto se tornasse realidade.

palavras-chave

Marcadores serológicos, doadores sangue, hepatite B, AgHBs, ADN-VHB.

resumo

A evolução verificada no conhecimento do Vírus da Hepatite B (VHB), nos últimos anos, levou a avanços significativos nos meios de diagnóstico e na prevenção de uma das doenças infecciosas de distribuição mundial que mata anualmente cerca de meio milhão de pessoas. Portugal é tido como um país de prevalência intermédia e tem tomado medidas de controlo e prevenção da doença para que a sua redução seja uma realidade. A Hepatite B é uma doença de declaração obrigatória e a vacinação gratuita tem vindo a ser alargada a um maior número de pessoas desde 1990.

Tentar conhecer estas variações exige a realização de estudos em larga escala. Nesse sentido, e no âmbito deste trabalho, foi realizada uma análise dos marcadores do VHB numa população de doadores do Instituto Português do Sangue (IPS) - Centro Regional de Sangue do Porto (CRSP), no que – assim o entendemos – poderá ser um reflexo muito representativo da prevalência desta infecção na sociedade, uma vez que os doadores de sangue vêm de diferentes estratos sócio-económicos, faixas etárias, sexo e regiões demográficas.

Os dados utilizados neste estudo correspondem ao período compreendido entre 1 de Janeiro de 2000 a 31 de Dezembro de 2008.

Foi observado uma tendência decrescente na prevalência do AgHBs nos doadores de sangue do CRSP, 0,14% no primeiro ano do estudo e 0.03% no último ano de estudo. Foi constatado que 89,1% dos doadores com AgHBs e/ou ADN-VHB positivos não foram abrangidos pelo plano nacional de vacinação para o VHB.

keywords

Serological markers, blood donors, hepatitis B, HBsAg, HBV- DNA.

abstract

Developments in knowledge of Hepatitis B Virus (HBV) in recent years have led to significant advances in diagnostics and prevention of an infectious disease of worldwide distribution that kills half a million people. Portugal is considered a country of intermediate prevalence and has taken measures to control and disease prevention so that their reduction is a reality. Hepatitis B is a notifiable disease and free vaccination has been extended to a larger number of people since 1990.

Trying to know these variations requires the completion of large-scale studies. In this sense, and in the context of this work, was an analysis of HBV markers in the donor population of the Portuguese Blood Institute (IPS) - Centro Regional de Sangue do Porto (CRSP), in which - we believe - could be a reflects very representative of the prevalence of infection in society, since the blood donors come from different socio-economic, age, gender and demographic regions.

The data used in this study correspond to the period from 1 January 2000 to December 31, 2008.

We observed a decreasing trend in the prevalence of HBsAg in blood donors of CRSP, 0.14% in the first year of the study and 0.03% in the last year of study. It was found that 89.1% of donors with HBsAg and / or HBV DNA positive were not covered by the national vaccination for HBV.

“O acaso favorece apenas as mentes preparadas.”

Louis Pasteur

Índice

Índice

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

1 - Introdução	1
2 - O vírus da hepatite B (VHB)	3
2.1 - Dados históricos	3
2.2 - Dados epidemiológicos.....	5
2.3 - Transmissão	8
2.4 - Caracterização do VHB	10
2.4.1 - Replicação do VHB	13
2.4.2 - Variantes e mutantes do VHB.....	14
2.5 - Prevenção	19
2.6 - Aspectos clínicos da infecção por VHB	23
2.7 - Tratamento e terapêutica.....	25
2.8 - Serologia do VHB	26
2.9 - Diagnóstico Laboratorial do VHB.....	33
3 - Objectivo	34
4 - Material e Métodos	35
4.1 - Tipo de Estudo	35
4.2 - Identificação da População em estudo e da Amostra.....	35
4.3 - Metodologia	35
5 - Resultados	40

6 - Discussão	51
7 - Conclusão.....	55
8 - Perspectivas futuras.....	56
9 - Considerações finais	57
10 - Referências Bibliográficas	58

Lista de abreviaturas

AcHBc	– Anticorpo para o antigénio do <i>core</i>
AcHBc IgM	– Anticorpo do <i>core</i> fracção IgM
AcHBe	– Anticorpo HBe
AcHBs	– Anticorpo neutralizante para o antigénio de superfície VHB
ADN	– Ácido desoxirribonucleico
AgHBc	– Antigénio do <i>core</i>
AgHBe	– Antigénio HBe
AgHBs	– Antigénio de superfície do VHB
ARN	– Ácido ribonucleico
ARNm	– Ácido ribonucleico mensageiro
ChLIA	– Imunoensaio por quimioluminescência
IPS – CRSP	– Instituto Português do Sangue – Centro Regional de Sangue do Porto
DGS	– Direcção Geral da Saúde
EASL	– European Association for the Study of the Liver
EIA	– Ensaio imunoenzimático
HLA	– Human Leucocyte Antigen
IgHB	– Imunoglobulinas específicas contra o vírus da Hepatite B
IOB	– Infecção Oculta por vírus da hepatite B
OMS	– Organização Mundial de Saúde
ORF	– Open reading frames
PCR	– Reacção em Cadeia da Polimerase
PNV	– Plano Nacional de Vacinação
TAN	– Teste Ácidos Nucleicos
TN	– Teste de Neutralização do AgHBs
VHB	– Vírus da Hepatite B
VHC	– Vírus da Hepatite C
VIH	– Vírus da imunodeficiência Humana

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição geográfica da infecção por VHB	6
Figura 2 – Microscopia electrónica do VHB	10
Figura 3 – Esquema representativo da estrutura do VHB	13
Figura 4 – Ciclo viral do VHB	14
Figura 5 – Distribuição geográfica dos diferentes genótipos do VHB	16
Figura 6 – Países que introduziram a vacina da Hepatite B nos seus planos nacionais de vacinação	20
Figura 7 – Esquema representativo do desenvolvimento da infecção por VHB.....	24
Figura 8 – Esquema representativo da evolução da “hepatite aguda resolvida com seroconversão em AchBs”	27
Figura 9 – Esquema representativo da evolução de “hepatite crónica”	28
Figura 10 – Representação esquemática da IOB e IOB “falsa”.....	31
Figura 11 – Algoritmo do VHB do CRSP.....	39
Figura 12 – Representação esquemática do número de Dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivos em relação à idade e sexo	48
Figura 13 – Distribuição geográfica em Portugal Continental de dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivos do CRSP entre 2000-2008	50
Figura 14 – Distribuição geográfica em Portugal Continental de dádivas de dadores do CRSP entre 2000-2008.....	50

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Número de países que introduziram a vacina VHB no seu plano de vacinação e cobertura global da vacina VHB em recém-nascidos	20
Gráfico 2 – Distribuição dos níveis de carga viral dos dadores AgHBs e/ou ADN VHB positivo	43
Gráfico 3 – Distribuição dos dadores EIA positivos para o AchBc (isolado), AchBc com AchBe e AchBc com AchBs no perido em estudo	44
Gráfico 4 – Prevalência anual para o AgHBs em dadores de Sangue do CRSP.....	45
Gráfico 5 – Distribuição anual dos marcadores serológicos do VHB em dadores de Sangue do CRSP	46
Gráfico 6 – Prevalência anual dos marcadores serológicos do VHB em dadores de Sangue do CRSP	47
Gráfico 7 – Distribuição por faixa etária e sexo dos dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivo do CRSP, 2000-2008.....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Epidemiologia e formas de transmissão do VHB	9
Tabela 2 – Estado serológico para o VHB em mães e evolução por VHB em crianças	9
Tabela 3 – Distribuição geográfica dos genótipos e subtipos do VHB ;.....	16
Tabela 4 – Interpretação de resultados dos marcadores serológicos e moleculares para VHB	32
Tabela 5 – Distribuição dos doadores com AgHBs EIA positivo entre 2000 – 2008.	40
Tabela 6 – Resultados obtidos por PCR aos doadores AgHBs confirmadamente positivos.	41
Tabela 7 – Cargas virais e metodologias utilizadas em doadores com AgHBs positivo e/ou ADN-VHB positivo entre 2002 e 2008.	42
Tabela 8 – Distribuição dos doadores EIA positivo para AchBc (isolado), AchBc com AchBe e AchBc com AchBs para os anos 2000-2008	44
Tabela 9 – Prevalência anual para o AgHBs em doadores de sangue do CRSP	45
Tabela 10 – Prevalência anual de todos os marcadores serológicos do VHB em doadores de sangue do CRSP	46
Tabela 11 – Perfil serológico de doadores com positividade para o AgHBs e AchBs.	47
Tabela 12 – Distribuição dos doadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivo segundo faixa etária e sexo, 2000-2008	49

1 - Introdução

Qualquer vírus em circulação na corrente sanguínea humana pode, potencialmente ser transmitido a um receptor de uma dádiva de sangue por hemocomponentes (concentrado eritrocitário, concentrado de plaquetas, etc). Mas, graças a um sem número de factores, são poucos os casos em que inequivocamente se conseguiu demonstrar tal transmissão (Sanchez e Soler, 1999).

A gravidade e o prognóstico clínico de algumas doenças víricas de transmissão sanguínea, bem como o carácter aparentemente (e só aparentemente) aleatório do contágio, têm emprestado à temática um grande protagonismo médico-científico. Além disso, têm exponenciado a investigação de procedimentos destinados a evitar a referida propagação (Allain *et al.*, 2009).

Entre os vírus transmitidos por transfusão sanguínea, os que têm suscitado maior preocupação em termos de segurança transfusional, (daí ser legalmente obrigatório o seu rastreio, segundo a circular normativa n.º6, de 26/06/2008, da Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação) têm sido o vírus da imunodeficiência humana (VIH), o vírus linfotrópico humano de células T (HTLV-I e II) e os vírus das hepatites C (VHC) e B (VHB).

É este último a fornecer o mote para o estudo que se segue. Não sem antes replicarmos contextualmente as bases que permitem a compreensão da problemática específica em análise.

A infecção pelo VHB é um problema de saúde mundial. Estimativas recentes apontam que existam no planeta dois biliões de pessoas infectadas. Estima-se que aproximadamente, 350 milhões sejam doentes crónicos e cerca de 600 mil morram por ano de hepatite B aguda e de cirrose, ou carcinoma hepático (Organização Mundial de Saúde, *Fact Sheet* n.º 204).

Em Portugal, e segundo dados da Direcção Geral da Saúde (DGS), o número de casos notificados de infecção por VHB tem decrescido. (Relatórios Doenças de Declaração Obrigatória 1999-2003 e 2001-2005, DGS). A introdução da vacinação contra a hepatite B em pré-adolescentes e o rastreio sistemático do antigénio de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) em grávidas levaram à redução de novos casos (uma descida de 80% em indivíduos até aos 14 anos, comunicados à DGS entre 1995 e 1999), o que fez com que fosse introduzida a vacinação contra o VHB em recém-nascidos no Plano Nacional de Vacinação (Cotter, 2003).

Entre os inúmeros aspectos ainda não totalmente entendidos na história natural da hepatite B destaca-se a grande variação existente na distribuição dos seus marcadores em populações diversificadas, mas às vezes semelhantes entre si, no que diz respeito a características gerais (raça, idade, sexo etc.) (Passos *et al.*, 1992).

Tentar conhecer estas variações exige a realização de estudos em larga escala. Nesse sentido, e no âmbito deste trabalho, foi realizada uma análise dos marcadores do VHB numa população de dadores do Instituto Português do Sangue (IPS) - Centro Regional de Sangue do Porto (CRSP), no que – assim o entendemos – poderá ser um reflexo muito representativo da prevalência desta infecção na sociedade, uma vez que os dadores de sangue vêm de diferentes estratos sócio-económicos, faixas etárias, sexo e regiões demográficas.

2 - O vírus da hepatite B (VHB)

2.1 - Dados históricos

Acredita-se que a hepatite viral exista desde a antiguidade. O Talmude Babilónico (500 a.C.) faz-lhe referência. E terá sido Hipócrates o primeiro a descrevê-la como icterícia infecciosa ou epidémica, há mais de 2000 anos (Lok, 2000).

O reconhecimento da forma de transmissão da hepatite por inoculação directa de sangue (ou seus derivados) foi documentado por Ludman (Bremen, Alemanha), em 1883 (Mahoney,1999). Este conhecimento deveu-se à circunstância de, durante uma campanha de imunização, cerca de 15% das 1500 pessoas que receberam uma vacina preparada a partir de soro humano terem desenvolvido icterícia, entre algumas semanas a oito meses mais tarde. O relatório do estudo desta epidemia foi publicado por Ludman em 1885 e é até aos nossos dias considerado como um modelo de estudo epidemiológico da hepatite (Cotter, 2003).

Durante a II Guerra Mundial, estudos clínicos e epidemiológicos efectuados por MacCallum e Bauer, mais tarde (anos 60) confirmados por Krugman (*Willowbrook Institute*), conseguiram estabelecer a diferença entre dois tipos de hepatite: uma (vímica) de período de incubação curto, que se denominou infecciosa (hepatite A), e outra com um período de incubação mais longo, designada de hepatite sérica (posteriormente hepatite B) (Dodd, 1996; Cotter, 2003).

Nas décadas de 40/50 do séc. XX foram conseguidos progressos assinaláveis no sentido de esclarecer a etiologia das hepatites. Para isso muito contribuíram os estudos - eticamente controversos - realizados por Krugman e desenvolvidos com recurso a voluntários. Permitiram consolidar a convicção de que o responsável pela hepatite era um vírus. Mas faltava identificá-lo, numa tarefa que parecia difícil de conseguir (Cotter, 2003).

Um grande passo foi dado quando, em 1964, Baruch Blumberg, um geneticista do *National Institute of Health*, em Filadélfia (Estados Unidos da América), identificou um antígeno de superfície presente no soro de um aborígine australiano. Denominou-o de “antígeno Austrália” (Ganem e Prince, 2004). A descoberta teve, contudo, um carácter puramente accidental, pois o estudo em que este geneticista estava envolvido tinha um objectivo completamente diferente, incidindo sobre anticorpos contra lipoproteínas séricas em doentes transfundidos (Fonseca, 2006).

A associação entre o antígeno Austrália e a hepatite B foi estabelecida por Alfred Prince, do *New York Blood Center* (EUA), em 1968, ao realizar um trabalho prospectivo em doentes submetidos a cirurgia para determinar a incidência de hepatite pós-tranfusional (Gilles *et al.*, 1969). Não obstante este passo ter sido muito importante para a compreensão e o diagnóstico das hepatites víricas, a dúvida sobre se a partícula seria uma parte do vírus ou o próprio vírus permanecia.

A resposta foi providenciada por Dane (um australiano que trabalhava no *Middlesex Hospital*, em Londres), em 1970, que conseguiu visualizar o vírus (daí a sua designação de “partícula de Dane”) (Cotter, 2003).

No ano seguinte, June e colaboradores, recorrendo a microscopia electrónica, verificaram que a partícula de Dane (ou VHB) era constituída por um núcleo e um invólucro externo. Este último correspondia ao antígeno Austrália, que passou a designar-se por antígeno de superfície do vírus B (AgHBs) (Almeida *et al.*, 1971).

Em 1973, a designação hepatite B (introduzida por MacCallum em 1947) viria a ser adoptada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Lok, 2000).

Todas estas importantes descobertas deram enorme e renovado impulso à investigação do VHB e, poucos anos depois, o VHB foi estruturalmente caracterizado como vírus de ácido desoxirribonucleico (ADN), a sua complexa

constituição antigénica foi esclarecida e as suas características biológicas e patogénicas foram definidas (Blumberg, 1977).

2.2 - Dados epidemiológicos

Em cada ano registam-se no Mundo mais de 200 milhões de infecções por VHB e calcula-se que existam mais de dois biliões de pessoas infectadas. Mas, crê-se, tais números estarão aquém da realidade, pois cerca de 75 a 90% das infecções são assintomáticas e, para além disso, as que apresentam sintomas nem sempre são comunicadas às autoridades competentes (Liaw e Chu, 2009). Estima-se ainda que 350 milhões de pessoas sejam portadoras de infecção crónica e sensivelmente 600 mil morram a cada ano (50 mil de hepatite B aguda e 550 mil de cirrose ou carcinoma hepático) (Chevaliez e Pawlosky, 2008; EASL, 2009).

A prevalência da Hepatite B na população mundial é geograficamente desigual. Para a determinar é utilizado o marcador serológico AgHBs, que nos diz que áreas onde a prevalência do AgHBs varia entre 8 a 20% (como África, China ou sudoeste asiático) são consideradas de endemicidade alta e, contrariamente, zonas onde é inferior a 2% (como na Europa Ocidental ou na América do Norte) são consideradas de endemicidade baixa. A prevalência intermédia (2 a 7%), por seu lado, pode ser generalizadamente encontrada na América do Sul, Japão ou Sul da Europa. Zonas de endemicidade baixa, intermédia e alta (Lee, 1997; Abbott, 1994) – eis como se classificam as áreas de distribuição da hepatite B (Moreno *et al.*, 2004) (figura1).

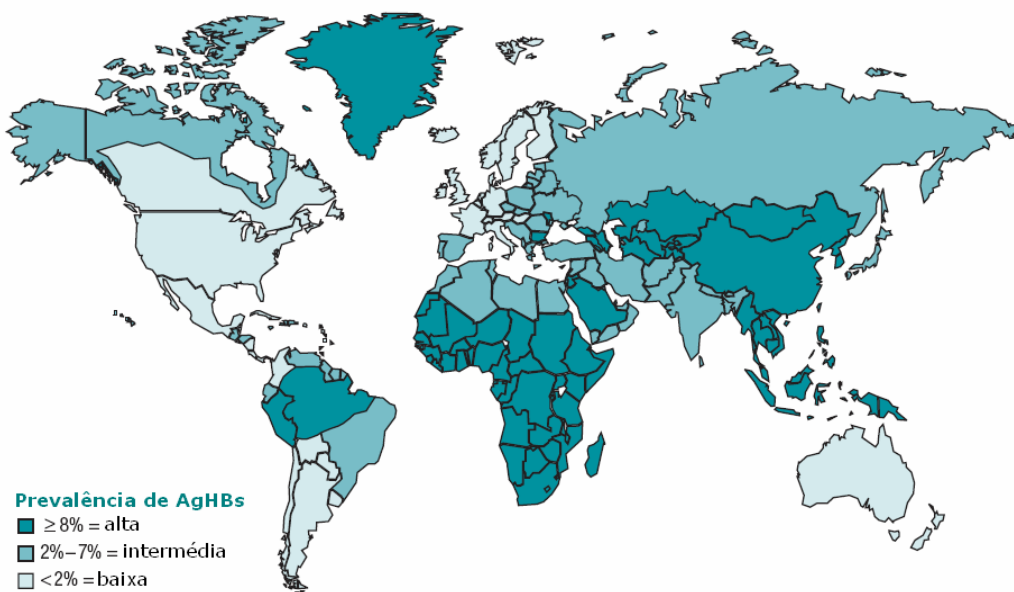


Figura 1: Distribuição geográfica da infecção por VHB (fonte: <http://www.cdc.gov>).

A incidência da hepatite B no Mundo tem, no entanto, vindo a diminuir. Não só graças à vacina (disponível desde 1981), como também devido a outras medidas de saúde pública que têm vindo a ser tomadas e, sobretudo, a alterações nos comportamentos de risco, que têm conduzido à diminuição da transmissão por via sexual.

Portugal é considerado um País de endemia baixa a intermédia. A prevalência de portadores crónicos de VHB é de 1 a 2%, aproximadamente, o que corresponde a uma amplitude de 100 a 200 mil portugueses (Carvalho *et al.*, 2006b). Dados da DGS mostram que desde 1993 se assiste a um decréscimo no número de casos notificados de hepatite B, o que vai de encontro ao que se passa no resto do Mundo (DGS- doenças de declaração obrigatória, relatórios 1993-1995, 1996-2000, 2001-2005. Disponíveis em www.dgs.pt).

Num estudo realizado na população portuguesa por Lecour, em 1979-80, a prevalência média do AgHBs era de cerca de 1,25% e a do anticorpo neutralizante para o AgHBs (AChBs) de 24,3% (Lecour, 1983). Uma década mais

tarde, num outro trabalho incidindo apenas sobre a região centro do País, a prevalência do AgHBs observada foi de 0,91%, sendo a prevalência global dos marcadores do VHB de 9,3% (positividade de pelo menos um dos marcadores pesquisados, excluindo os casos de AchBs) (Santos *et al.*, 2000).

O inquérito serológico nacional realizado em Portugal continental em 2001-2002, numa amostra representativa de 1095 indivíduos, detectou positividade para o AgHBs em 0,36% dos indivíduos, susceptibilidade para infecção em 51,6%, imunidade adquirida por infecção natural em 3,5% e imunidade por vacinação em 43,6%. Mais: 1,5% dos indivíduos teve possivelmente contacto com o vírus, mas não adquiriu imunidade (Ministerio da Saúde, Dezembro 2004). Este valor (de 0,36%) de prevalência do VHB na população portuguesa coloca-nos numa zona de baixa endemicidade.

No que concerne a alguns grupos específicos os valores são variáveis. Em grávidas foram descritas prevalências de AgHBs de 2,2 % (Sarmiento, 14-15 Novembro 2005) e 2,9% (Lima *et al.*, 2000), e na população prisional portuguesa estima-se que 9,7% dos reclusos sejam portadores de VHB (Direcção Geral da Saúde, 2004). Nos profissionais de saúde portugueses, a prevalência do AgHBs encontrada oscila entre 0,95% e 1,1 (Mota *et al.*, 1989; Marinho *et al.*, 1998).

Em dadores de sangue, por seu turno, um estudo realizado entre 2000 e 2005 no IPS-CRSP verificou que a prevalência para o AgHBs variou entre 0,13%, no primeiro ano, e 0,05%, no último ano analisado (Carvalho *et al.*, 2006b). Outro trabalho levado a cabo pelo Centro Regional de Sangue de Lisboa, entre 2003 e 2007, determinou uma prevalência para o AgHBs de 0,07% (Neves *et al.*, 2009).

2.3 - Transmissão

O VHB não atravessa pele ou mucosas, sendo necessária uma descontinuidade nestas barreiras (pequenas feridas, escoriações, etc.) para que se transmita. Apesar de ter sido identificado numa grande variedade de fluidos orgânicos corporais, somente sangue, sêmen, secreções vaginais e os líquidos cefaloraquidiano, sinovial, pleural, peritoneal, pericárdico e amniótico são considerados como potencialmente infectantes. Os fluidos não potencialmente infectantes compreendem fezes, urina, suor, lágrimas, leite materno, saliva, suco pancreático, bile ou vômito. Pese embora tenham sido isoladas grandes quantidades de partículas de AgHBs em todos estes, o que é certo é que foram encontradas poucas partículas víricas infecciosas, o que os torna pouco eficazes na transmissão da doença, para além de que, até ao momento, não foram relatados como meio de transmissão (Cotter, 2003). A possibilidade da transmissão por artrópodes que se alimentam de sangue tem sido discutida, mas nunca provada (Tengan e Araújo, 2006).

O VHB é muito resistente ao calor e a outros agentes físicos. Refira-se, por exemplo, que o plasma infectado só pode ser inativado pelo calor após cinco horas a 60° C (Khouri e Santos, 2004). O vírus pode resistir e viver fora do corpo humano à temperatura ambiente por mais de uma semana (Fonseca, 2007), admitindo-se que esta seja uma das causas para que seja altamente infeccioso (Macedo e Marinho, 2009) – cerca de 10 vezes mais do que o congénere da hepatite C (VHC) e 100 vezes mais do que o VIH (Ferreira, 2004).

A transmissão pode ser horizontal ou vertical (de mãe para filho). Dentro da via horizontal podemos encontrar a via parentérica ou percutânea (que atinge hemofílicos, hemodialisados, transfundidos, toxicodependentes, assim como profissionais que manipulem produtos biológicos), e a via não parentérica (relações sexuais), que em países de endemicidade intermédia ou baixa é responsável por cerca de 50% dos casos de hepatite B (Abbott, 1994; Dodd, 1996; Cotter, 2003; Valsamakis, 2007).

O padrão de transmissão do VHB está relacionado com a taxa de prevalência em cada região (tabela 1). Em áreas de alta endemicidade, a maioria das infecções ocorre por transmissão vertical (Figueiredo *et al.*, 2008). Nestes casos, o risco de transmissão relaciona-se com a capacidade replicativa do VHB na mãe. Em mulheres AgHBs positivo e antigénio HBe (AgHBe) negativo, o risco de contágio ao recém-nascido desce 32%, frente aos 85% a 90% das mães AgHBe positivo (Moreno *et al.*, 2004). E o risco destes desenvolverem infecção crónica pelo VHB pode ser superior a 90% (Tengan e Araújo, 2006; Marcellin, 2009) (tabela 2).

Tabela 1 – Epidemiologia e formas de transmissão do VHB (Moreno, *et al.*, 2004).

	Prevalência		
	Alta (8-20%)	Intermédia (2-7%)	Baixa (0,1-2%)
Distribuição Geográfica	África subsaariana Sudeste da Ásia China Ilhas do Pacífico	Área mediterrânea América do Sul Europa de Leste Ásia Central Médio Oriente Japão	Europa ocidental Estados Unidos Canadá Austrália Nova Zelândia
Idade de infecção	Perinatal e primeira infância	Primeira infância	Adultos
Forma de transmissão mais frequente	Materno-fetal e percutânea	Sexual e percutânea	Sexual e percutânea

Tabela 2 – Estado serológico para o VHB em mães e evolução por VHB em crianças (Chang, 2007).

Mãe	Criança	
	Sem vacinação	Com imunoprofilaxia
AgHBe (+), AgHBs (+)	>90% Crónica	Vacina + IgHB → 10 e 15% infecção crónica
AgHBe (-), AgHBs (+)	<5% Crónica, com risco de HF, HA	<1% Infecção crónica e risco de HF, HA Reduzido
AgHBe (-), AgHBs (-)	Infectado	Não infectado

Legenda:
HF - Hepatite fulminante; **HA** - Hepatite Aguda; **IgHB** - Imunoglobulinas específicas contra o vírus da hepatite B

2.4 - Caracterização do VHB

O VHB pertence à família dos *Hepadnavirus* (Lok, 2000; Coleman, 2006) e ao género *Orthohepadnavirus* (Khoury e Santos, 2004). O seu hospedeiro natural é o ser humano, mas vários vírus similares foram isolados em animais como esquilos, patos, gansos e outras aves (Fonseca, 2007). A partícula de Dane (ou virião) é considerada a partícula vírica infecciosa e é constituída por uma estrutura interna (*core*) e um invólucro externo (figura 3). O *core* tem 40 a 42 nm de diâmetro. Contém no seu interior o genoma do vírus e a enzima ADN polimerase, que tem actividade de transcriptase reversa, e é aqui que se localiza o antígeno do *core* (AgHBc) (Khoury e Santos, 2004). O invólucro externo (ou envelope) é composto por lípidos, proteínas e glicoproteínas, sendo também designado de antígeno de superfície (AgHBs) (Lee, 1997). O AgHBs pode ser encontrado no soro de indivíduos infectados sob a forma de partículas esféricas ou filamentosas, com 20 a 22 nm de diâmetro (Weber *et al.*, 2006). Estas partículas não são infecciosas por não conterem genoma viral. Curiosamente, estão em maior número que os viriões, numa proporção que, normalmente, varia entre 1000/1 e 10000/1000 (figura 2) (Moreno *et al.*, 2004).

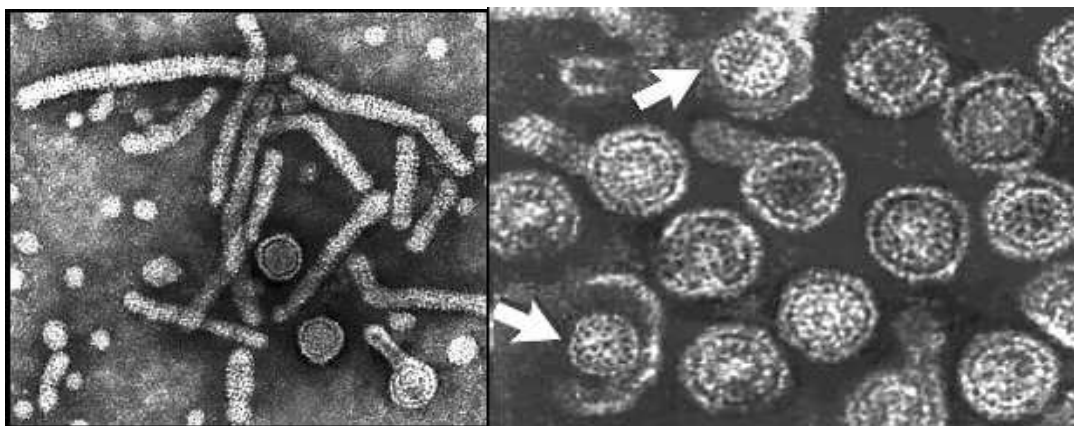


Figura 2 – Microscopia electrónica do VHB. À esquerda observam-se viriões completos e partículas de AgHBs filamentosas e esféricas. À direita é possível ver múltiplos viriões. As setas assinalam o core (Moreno *et al.*, 2004).

O genoma do VHB é constituído por ADN de cadeia dupla, com aproximadamente 3200 pares de bases e com peso molecular de 3,2 Kb (Hatzakis *et al.*, 2006). A cadeia mais longa (negativa) é completa, tendo cerca de 3.200 nucleótidos. A

cadeia curta (positiva) é incompleta, variando entre 50 a 70% da longa. A configuração da molécula é circular devido à sobreposição das duas cadeias complementares na região coesiva. Flanqueando esta região, existem duas sequências repetidas de onze bases, designadas “direct repeats” 1 e 2 (DR1 e DR2), fundamentais para a replicação do genoma do VHB (Ganem e Prince, 2004; Chang, 2007).

No genoma do VHB, existem quatro regiões (“open reading frames” - ORF) (Datta, 2008) que codificam as proteínas virais: região pré-S/S, pré C/C, P e X (Wei e Tiollais, 1999).

- Região pré-S/S

Pode iniciar-se em três codões de iniciação diferentes, dando origem a três proteínas: a região S codifica a maior (e mais abundante) proteína (com 24 Kd e 226 aminoácidos) do invólucro do vírus (AgHBs) (Moreno *et al.*, 2004; Coleman, 2006); a região pré-S2 codifica um polipeptídeo que se associa à proteína maior e forma a proteína média – AgHBs + Ag pré-S2; a região pré-S1 codifica um polipeptídeo que se associa aos dois anteriores, dando origem à proteína – Ag pré-S1 + Ag pré-S2 + AgHBs) (Gunther *et al.*, 1999). Esta proteína está implicada na ligação do vírus ao hepatócito e na sua libertação da célula infectada (Moreno, *et al.*, 2004).

A resposta serológica a diferenças *minor* nas proteínas codificadas por esta região permite classificar o VHB em quatro subtipos serológicos: adw, ayw, adr, ayr. O determinante “a” é comum a todos estes subtipos e é o alvo para o anticorpo neutralizante – AchBs. Estes subtipos têm diferentes distribuições geográficas, sendo úteis como marcadores epidemiológicos (Cotter, 2003).

- Região pré-C/C

Possui dois codões de iniciação – a região pré-core (pré-C) e a do core (região C) –, sendo possível a tradução a partir de qualquer um deles. A região C codifica a proteína do core ou nucleocápside – AgHBc. A partir da região pré-C é traduzido

durante a replicação viral AgHBe (Khouri e Santos, 2004). Não se sabe, todavia, qual a função do AgHBe, já que não faz parte da estrutura do vírus e não parece necessário à replicação viral, como se demonstrou em culturas laboratoriais de mutantes que não produzem AgHBe (Moreno *et al.*, 2004).

Os antígenos HBc e HBe contêm praticamente os mesmos aminoácidos, contudo, um acréscimo de 29 aminoácidos na região terminal do AgHBe resulta numa molécula com estrutura e antigenicidade diferente. A proteína AgHBc forma monómeros que constituem uma nucleocápside, não permitindo a sua circulação no soro. Já a proteína AgHBe é solúvel e secretada pelos hepatócitos infectados (Gonçalves *et al.*, 2006b).

- Região P

Codifica a ADN polimerase com actividade de transcriptase reversa, sendo esta região a mais extensa (Lee, 1997; Kao e Chen, 2002).

- Região X

De extrema importância para a replicação *in vivo*, já que codifica duas proteínas que funcionam como activadores da transcriptase reversa (Lee, 1997). Como principal activador transcripcional de muitos promotores (entre eles incluem-se diversos oncogenes) (Moreno *et al.*, 2004), é a chave no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (Khouri e Santos, 2004;Zheng *et al.*, 2009).

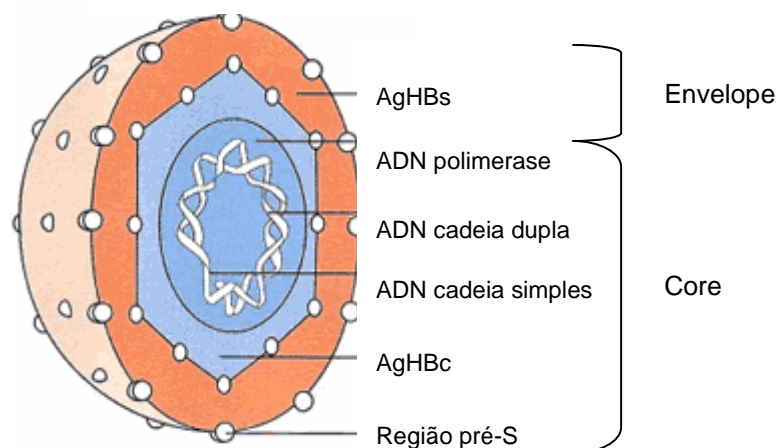


Figura 3 – Esquema representativo da estrutura do VHB (partícula de Dane) (Moreno *et al.*, 2004).

2.4.1 - Replicação do VHB

O fígado desempenha um papel fundamental no armazenamento e conversão de energia, na hemostase do sangue, na desintoxicação química e na imunidade para infecções microbianas. É composto por diferentes tipos de células, mas a maior actividade funcional está localizada nos hepatócitos (que constituem 70% do fígado) (Seeger e Mason, 2000). Logo, é de esperar que estas células sejam o alvo preferencial de infecções virais, como é o caso da hepatite B. Embora já se tenha detectado o VHB nos rins e pâncreas (Moreno *et al.*, 2004), os hepatócitos são, para já, o único local confirmado onde existe replicação viral por parte dos *Orthohepadnavirus* (Seeger e Mason, 2000).

Como hepatotrópico (Viso e Barone, 2006) que é, o ciclo de replicação do VHB inicia-se quando o virião se liga a um receptor do hepatócito, através de uma ligação mediada pela glicoproteína de superfície pré-S1 (Figura 4) (Moreno *et al.*, 2004). Já no interior do hepatócito, o genoma do VHB é libertado para o interior do núcleo, onde se completa a síntese da cadeia positiva (incompleta) do ADN. A ADN polimerase converte o genoma numa cadeia circular fechada de ADN com ligações covalentes, cccADN (Lok, 2000). Esta funciona como modelo quer para o ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) que leva à síntese das proteínas víricas

quer para o ARN pré-genômico que leva à síntese do genoma vírico. O ARN pré-genômico é transportado para o citoplasma onde é incorporado na nucleocápside e convertido na cadeia negativa do ADN pela transcriptase reversa (Valsamakis, 2007). É então iniciada a síntese da cadeia positiva e as partículas do *core* são então envolvidas por AgHBs e excretadas para fora do hepatócito, ou transportadas para o núcleo (Lee, 1997; Ganem e Prince, 2004).

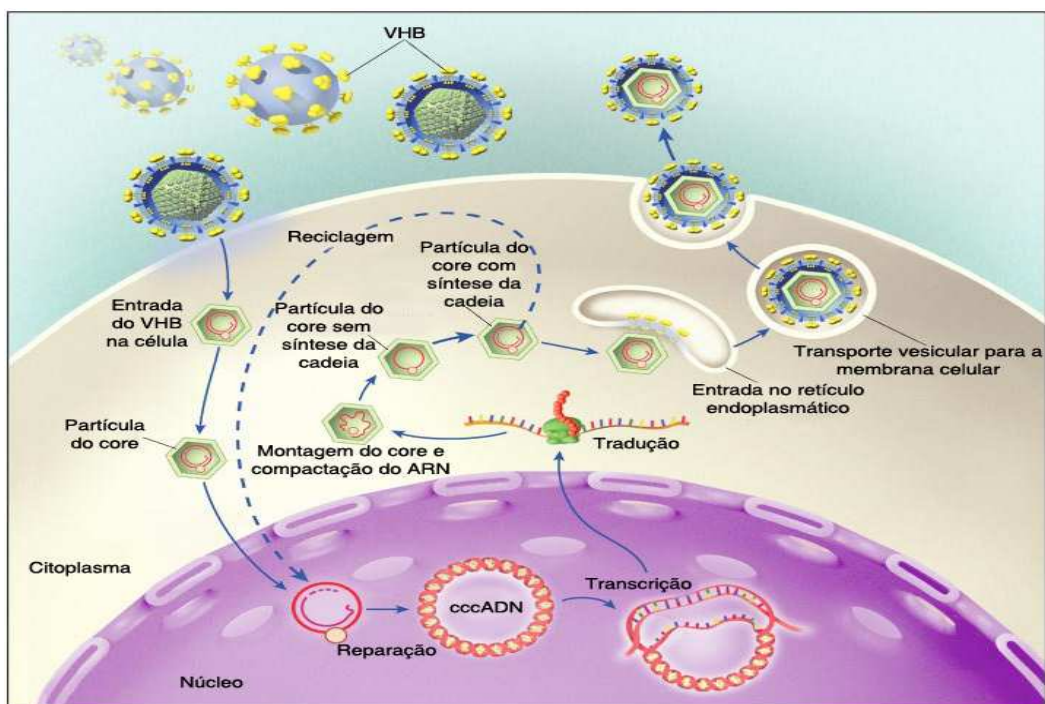


Figura 4 – Ciclo viral do VHB. Adaptado (Ganem e Prince, 2004).

2.4.2 - Variantes e mutantes do VHB

Nos anos 70 foi descrita (por métodos serológicos) a existência de quatro subtipos da glicoproteína do envelope (AgHBs), segundo a expressão constante do determinante antigénico “a” e a expressão variável de dois epítopes (“d” ou “y” e “w” ou “r”), dando origem a quatro subtipos designados por: adw, adr, ayw, ayr (Fonseca, 2007).

Anos mais tarde identificaram-se quatro subdeterminantes de “w” (1, 2, 3 e 4), ao que, posteriormente, foi adicionado o “q”- dividindo-se em “q” positivos e “q” negativos. Assim se estabeleceu a variabilidade serológica ao nível do AgHBs e

se classificaram nove subtipos diferentes para o determinante antigénico comum “a”: adw2, adw4, adr, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayrq+, ayrq-. (Méndez *et al.*, 2007).

Esta classificação serológica prevaleceu durante anos, até que, na década de 80, com a implementação de técnicas de biologia molecular, foi possível obter a sequência genómica vírial completa. Conseguiram-se assim análises filogenéticas que deram origem a genótipos e subgenótipos do VHB (Datta, 2008).

A relação entre os genótipos do VHB e os subtipos tem sido estabelecida. No entanto, como a genotipagem é baseada na sequência completa do genoma, ela traduz melhor a diferença entre as variantes do VHB do que o subtipo, uma vez que existem os mesmos subtipos em distintos genótipos (Goncalves *et al.*, 2006a).

Apesar da actividade da polimerase/transcriptase reversa ser, na maior parte dos casos, bastante eficiente e fiável, é possível detectar variações nas sequências do VHB em quase todas as regiões do genoma, dando origem a oito genótipos diferentes (A, B, C, D, E, F, G e H) (Ciorlia e Zanetta, 2005; Méndez *et al.*, 2007). Esta classificação é baseada na diferença superior ou igual a 8% na sequência nucleotídica do genoma viral (Moreno *et al.*, 2004; Palumbo *et al.*, 2007).

A prevalência mundial relativa dos genótipos é variável (figura 5). Em Portugal, estudos de Norte a Sul revelam predomínio para o genótipo D (Macedo e Marinho, 2009; Neves *et al.*, 2009; Sarmiento *et al.*, 2009).



Figura 5 – Distribuição geográfica dos diferentes genótipos do VHB. O tamanho das letras indica a prevalência relativa dessas regiões. As letras indicam os subtipos de genótipos do VHB (Valsamakis, 2007).

Tabela 3 – Distribuição geográfica dos genótipos e subtipos do VHB (Kao e Chen, 2002; Allain, 2006a).

Genótipo	Subtipo	Áreas de predominância
A	<i>adw2, ayw1</i>	Noroeste da Europa, EUA, África central
B	<i>adw2, ayw1</i>	Taiwan, Japão, Indonésia, China, Vietname
C	<i>adw2, adrq+, adrq-, ayr</i>	Ásia oriental, Taiwan, Coreia, China, Japão, Polinésia, Vietname
D	<i>ayw2, ayw3</i>	Mediterrâneo, Índia, Médio Oriente
E	<i>ayw4 West</i>	África
F	<i>adw4q-, adw2, ayw4</i>	América Central e do Sul, Polinésia
G	<i>adw2</i>	França, USA
?	<i>ayr</i>	Bornéu

Alguns estudos apontam para evoluções clínicas diversificadas exibidas pelo portador de VHB em função do genótipo, e também, desiguais sensibilidades e resposta a terapêuticas (Palumbo *et al.*, 2007).

O VHB existe, geralmente, na sua forma “selvagem” (também designado de VHB *wild type*), mas subsistem ainda mutantes do VHB, com variações nucleotídicas que têm consequências directas tanto na clínica como na medicina transfusional (Cotter, 2003).

A frequência de mutações do VHB tem sido estimada em aproximadamente 1,4 a $3,2 \times 10^5$ substituições de nucleotídeos/sítio/ano, sendo esta taxa 10 vezes superior à encontrada em outros vírus de ADN (Goncalves *et al.*, 2006a; Datta, 2008). Embora tenham sido detectadas mutações em todas as regiões do genoma do VHB, as mais estudadas e de interesse clínico são as mutações das regiões pré-S, pré-core/core e da polimerase (Lok, 2000; Goncalves *et al.*, 2006a).

As mutações que ocorrem na região pré-S – em que a substituição no codão 145 de glicina por arginina do determinante “a” - têm como consequência uma infecção por VHB sem expressão de antigénio circulante (AgHBs), apesar de o vírus continuar a replicar-se. Consequentemente, indivíduos sem AgHBs detectável são potencialmente infecciosos, não sendo, no entanto, observáveis no rastreio analítico serológico (Cotter, 2003; Goncalves *et al.*, 2006a).

Esta mutação tem particular importância para casos de vacinação falhada, ou seja, a imunidade protectora conferida pela vacinação contra o VHB está associada a um anticorpo neutralizante específico (AcHBs) contra o grupo de antigénios do determinante “a”. Logo, se existe uma mutação nesta zona, não vai permitir o reconhecimento do anticorpo neutralizante (AcHBs), sendo então considerada uma mutação por escape imune (Goncalves *et al.*, 2006a; Zanetti *et al.*, 2008).

Casos que apresentem esta mutação podem ser chamados de “falsas” infecções por hepatite B oculta (sem AgHBs detectável) uma vez que apresentam níveis ADN do VHB nos testes virológicos muito superiores às infecções por hepatite B oculta (ADN VHB inferior a 200 UI/ML) (Raimondo *et al.*, 2008).

Nas regiões pré-C e promotor do *core* ocorrem duas mutações importantes: A primeira, e a mais comum, ocorre ao nível do promotor do núcleo e apresenta duas substituições de nucleotídeos (A1762, para T1762 e G1764 para A1764) (Fang *et al.*, 2009), que provocam uma diminuição do ARN mensageiro do pré-C e, conseqüentemente uma queda na regulação da produção de AgHBe (Chen *et al.*, 2005); a segunda dá-se quando o aminoácido glicina é substituído pelo aminoácido arginina no nucleotídeo 1896, originando um codão *stop* prematuro, que previne a tradução do polipeptídeo do pré-C, eliminando assim a produção de AgHBe (Cotter, 2003; Khouri e Santos, 2004; Goncalves *et al.*, 2006a).

Estas duas mutações têm especial importância ao nível clínico, dado que estão associadas a quadros de hepatite fulminante e a exacerbações de hepatites crónicas, produzindo maiores graus de morbidade e mortalidade do que os observados nas infeções por VHB *wild type* (Goncalves *et al.*, 2006a; Shouval *et al.*, 2009).

Segundo vários estudos a prevalência da hepatite por VHB AgHBe negativo varia geograficamente com a dominância dos genótipos. Assim, nas zonas do Mediterrâneo onde predomina o genótipo D, tem sido evidenciada a alta prevalência de infeção crónica por VHB AgHBe negativa, associada a mutantes na região pré-C (Datta, 2008).

Mutações ao nível do gene da polimerase ocorrem no decurso da terapêutica com lamivudina, adefovir dipivoxil, telbivudine e entecavir (fármacos antivíricos), tornando-se indivíduos com esta mutação resistentes a estes medicamentos (Goncalves *et al.*, 2006a; Kao, 2008).

Por último, estão ainda descritas mutações ao nível da região X com uma prevalência e significado incertos (Cotter, 2003).

Em Portugal, a mutação mais frequente é pré-*core*, que origina a hepatite B AgHBe negativa (Relatório de Consenso e recomendações para o diagnóstico e

tratamento das hepatites B e C, 2004). Um estudo envolvendo 170 doentes com hepatite B crónica da região centro do país confirmou isso mesmo: 57,1% eram AgHBe negativo (Vaio *et al.*, 2004).

2.5 - Prevenção

As vacinas (quando disponíveis) constituem a medida de saúde mais eficiente e com melhor relação custo/benefício na prevenção de doenças infecciosas. A maioria delas é produzida por recombinação genética, com vantagens sobre as plasmáticas de primeira geração: não transmitem agentes infecciosos e a cadeia de produção é mais rápida, o que a torna mais económica.

A vacina para a hepatite B representa, sem sombra de dúvida, uma das maiores conquistas da medicina na actualidade, aclamada como a primeira imunização capaz de prevenir um tipo de carcinoma – o hepatocarcinoma (Ferraz, 2007).

Foi em 1991 que a OMS recomendou pela primeira vez a inclusão da vacina para o VHB em todos os programas de vacinação (Lavanchy, 2004). Em 2007, 171 dos 193 membros da OMS tinham implementado esta recomendação (relatório OMS Janeiro 2009 – *Global Immunization data*, <http://www.who.int/immunization>) (gráfico 1). Todos os países, independentemente da prevalência do VHB, conseguiram reduzir a incidência de hepatite aguda por VHB nos adultos e de hepatocarcinoma nas crianças, assim como uma diminuição da prevalência de crianças e adolescentes portadores do vírus (EASL, 2003; Gonçalves *et al.*, 2006b; Mackie *et al.*, 2009).

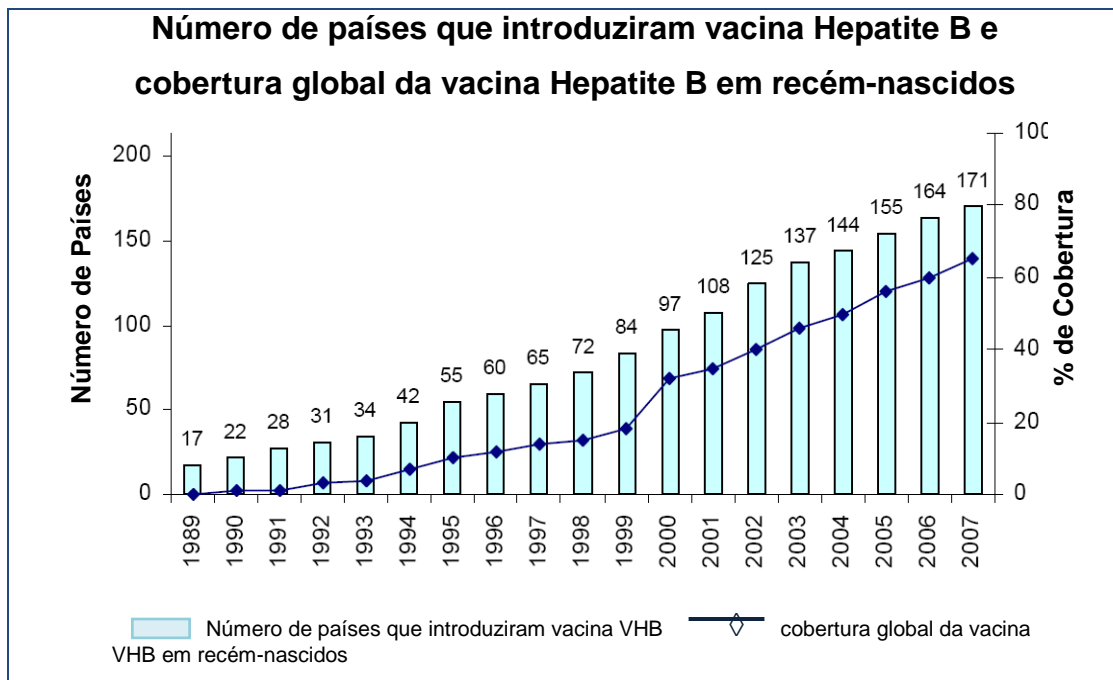


Gráfico 1 - Número de países que introduziram a vacina VHB no seu plano de vacinação e cobertura global da vacina VHB em recém-nascidos. (Adaptado de “OMS Progress Towards Global Immunization Goals – 2007”, Setembro 2008).

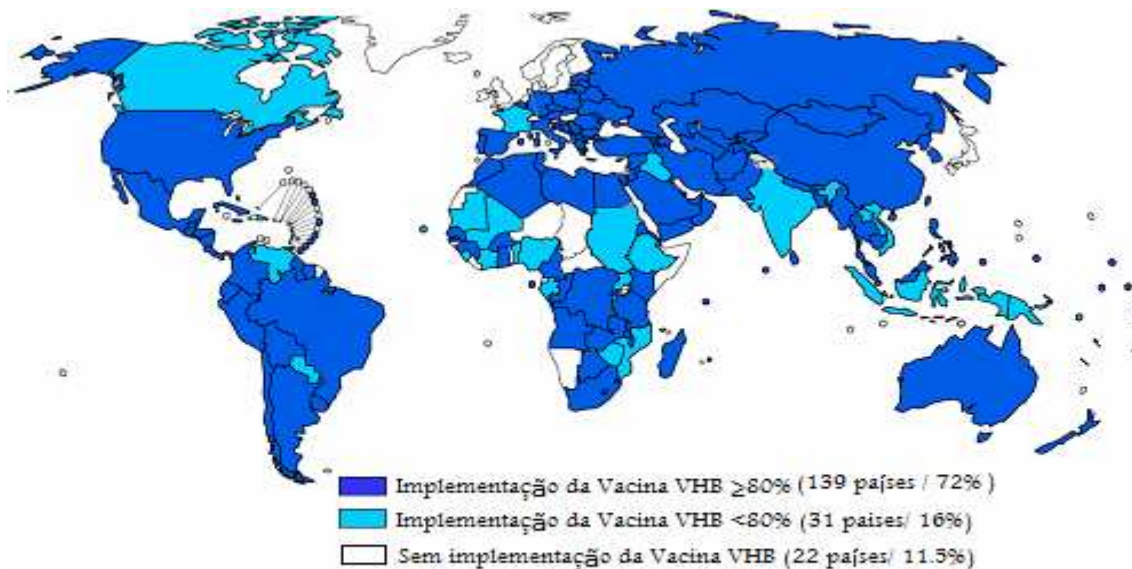


Figura 6 – Países que introduziram a vacina da Hepatite B nos seus planos nacionais de vacinação (Adaptado de “OMS Progress Towards Global Immunization Goals – 2007”, Setembro 2008).

A vacinação para o VHB é efectuada numa série de três doses por via intramuscular (Pungpapong *et al.*, 2007). Mais de 95% das crianças e adolescentes, e mais de 90% dos adultos, desenvolvem o anticorpo respectivo – AchHBs –. Para todos os indivíduos é internacionalmente aceite para protecção a longo termo títulos de AchHBs iguais ou superiores a 10 Unidades Internacionais por litro (UI/L), um a três meses após vacinação (Boot *et al.*, 2009). No entanto, a eficácia diminui com a idade e é menor em maiores de 40 anos (40 a 60%). Outros factores, tais como tabagismo, obesidade e factores genéticos ligados a determinados haplotipos de HLA (*human leucocyte antigen*), são associados a uma resposta inadequada à vacinação contra infecção pelo vírus da hepatite B (Lopes, 2006). Cerca de 10% dos adultos vacinados respondem com títulos baixos (inferior a 10 UI/L), ou não respondem (títulos inferiores 1 UI/L). Para os primeiros, uma segunda vacinação com três doses adicionais é seguida de títulos de AchHBs superiores a 10 UI/L em 30 a 50% dos casos (*Imunization Action Coalition*, 2009). Indivíduos que inicialmente respondem com títulos altos de AchHBs à vacinação, mas que mais tarde não tem AchHBs detectável, aquando de uma exposição ao VHB, são considerados imunes (Boot *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostraram entretanto que certos genótipos podem favorecer o aparecimento de mutantes de “escape” para a vacina VHB. Por essa razão, a eficácia da vacinação está relacionada com os genótipos das populações a quem é administrada a vacina (Datta, 2008).

Em Portugal, em 1990, a vacinação começou a ser efectuada apenas em indivíduos pertencentes a alguns grupos de risco:

- Profissionais de saúde;
- Doentes hemodialisados, hemofílicos e politransfundidos;
- Recém-nascidos filhos de mães AgHBs positivo;
- Familiares dos portadores (cônjuge ou parceiro sexual).

Em 1993, e face aos objectivos traçados pela OMS, foram integrados na vacinação gratuita para o VHB os adolescentes entre os 11e 13 anos (Despacho

n.º 17/93, Diário da Republica, II Série, n.º 302, de 29 de Dezembro), tendo em conta o elevado risco de infecção que ocorre nestas idades.

A partir de Janeiro de 2000, a vacinação contra o VHB passou a estar incluída no Plano Nacional de Vacinação (PNV), o que a tornou extensiva a todos os recém-nascidos (Despacho n.º 8707/99, Diário da Republica, II Série, n.º 102 de 3 de Maio).

Em 2001 foram actualizados os grupos de risco com acréscimo da vacinação gratuita toxicodependentes, prostitutas (os) e outros grupos devidamente justificados (Circular Normativa 15/DT de 15/10/2001).

Em Agosto de 2002 foram emitidas indicações para estender a idade de vacinação até aos 15 anos, a partir de 2003.

Actualmente, o PNV contempla todas as anteriores e estende a idade de vacinação universal até aos 18 anos.

Em estudos realizados verificou-se, que 2 a 16% dos indivíduos que receberam a vacina VHB há menos de um mês, apresentam AgHBs positivo, com ADN-VHB negativo (Candotti e Allain, 2009).

Em situações clínicas determinadas, para prevenção do VHB pode ainda ser considerado o uso de imunoglobulinas específicas contra o vírus da hepatite B (IgHB), designadamente na exposição acidental sem vacinação prévia e recém-nascidos filhos de mães infectadas pelo VHB (Ferreira, 2004; Moreno *et al.*, 2004; Lopes, 2006).

A IgHB é um derivado do plasma e, como tal, é preparado a partir de plasma de dadores com altas concentrações de AchBs. A IgHB possibilita a aquisição de anticorpos conseguidos passivamente e exhibe uma protecção temporária que pode ir de três a seis meses (Carvalho *et al.*, 2006a). Medidas higiénico-

sanitárias, como a educação para a saúde e a informação à população dos factores de risco e respectivas medidas de protecção, devem constituir uma preocupação e a sua divulgação deve continuar a ser feita.

No âmbito da medicina transfusional foram dois os contributos notáveis para a prevenção da transmissão da hepatite B pós-transfusional:

- A saída do regulamento sobre Transfusão de Sangue (Despacho 19/91, Diário da Republica, II Série, de 12 de Setembro), que determinava a pesquisa sistemática de AgHBs e AchBc em todas as unidades de sangue colhidas e destinadas a administração terapêutica.
- Circular Normativa N.º6/GDG, de 23/06/2008, da Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação (ASST), que, revogando o despacho 19/91, determina a pesquisa sistemática do AgHBs, AchBc e ADN do VHB a todas as unidades de sangue.

2.6 - Aspectos clínicos da infecção por VHB

O período de incubação é bastante longo, podendo variar entre 40 e 180 dias (Liaw e Chu, 2009). O período de janela (que vai desde a infecção até ao aparecimento de níveis detectáveis de marcadores serológicos ou virológicos) tradicional era de 59 dias (Widmann *et al.*, 2007; Barbara *et al.*, 2008), mas, com a implementação de teste de ácidos nucleicos, esse número baixou para um número médio de 30 dias (Kleinman e Busch, 2006).

Quando um indivíduo é infectado pelo VHB não é possível prever qual a evolução da infecção, já que esta pode apresentar-se clinicamente variável, desde uma hepatite sub-clínica a uma hepatite fulminante (Figura 7) (Abbott, 1994).

A patogenicidade do VHB varia em função do estado imunitário do hospedeiro, sendo a hepatite aguda ou crónica o resultado dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o VHB, que resulta na morte das células que expressam proteínas do VHB e na neutralização do vírus circulante. Doentes

imunologicamente deprimidos não desenvolvem hepatite aguda, mas podem tornar-se portadores crónicos do vírus, continuando este a replicar-se nos hepatócitos (Liaw e Chu, 2009).

Assim, as manifestações clínicas e o prognóstico da infecção pelo VHB dependem da idade, do nível de replicação do vírus e do estado imune do hospedeiro (Ferreira, 2004).

Cerca de 30% das crianças infectadas com idades compreendidas entre um e cinco anos, e 90% dos doentes com infecção perinatal, desenvolvem infecção crónica, que é geralmente assintomática. Na vida adulta é geralmente sintomática (em 20-40% dos casos), mas com baixo risco de cronicidade (5-10%). Em 90% dos casos sintomáticos (icterícia, febre, náuseas, astenia, dores abdominais, cefaleias, etc.) há recuperação completa. Uma hepatite fulminante pode surgir em cerca de 0,5 a 1% dos casos sintomáticos, e tem de 70 a 90% de mortalidade (Schiff e Schiff, 1999; Alexander e Kowdley, 2006).

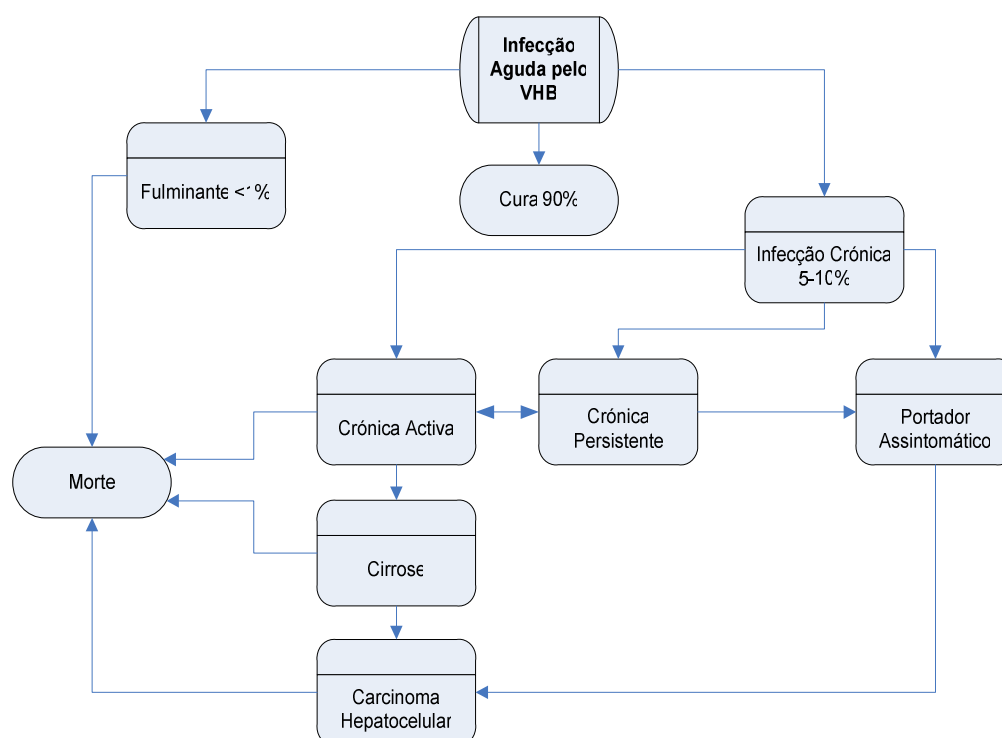


Figura 7 – Esquema representativo do desenvolvimento da infecção por VHB. Adaptado (Abbott 1994).

2.7 - Tratamento e terapêutica

O tratamento de qualquer agente infeccioso tem como objectivo a sua eliminação do organismo e o caso do VHB não é diferente. No entanto, a impossibilidade de qualquer terapêutica utilizada nos dias de hoje levar consistentemente ao desaparecimento do VHB com seroconversão em AchBs torna as ambições terapêuticas mais limitadas (Macedo e Marinho, 2009).

Na fase aguda não existe tratamento específico, sendo este essencialmente de suporte. O caso de hepatite fulminante constitui indicação formal para transplante hepático. Tratando-se de infecção crónica pelo VHB, o objectivo ideal do tratamento seria o desaparecimento não só dos marcadores séricos de multiplicação vírica (AgHBe e ADN- VHB), mas igualmente do AgHBs, impedindo assim a evolução da doença hepática.

Deve-se então compreender que os objectivos actuais mais realistas do tratamento não são a cura, mas a supressão continuada da replicação vírica, para prevenir a progressão do dano hepático, evitar a cirrose, o transplante, o hepatocarcinoma ou mesmo a morte do doente (Chevaliez e Pawlosky, 2008; Macedo e Marinho, 2009).

Actualmente, os fármacos utilizados para infecção crónica por VHB estão divididos em dois tipos: interferão alfa e nucleosídeos. Estes últimos podem ser divididos em três classes: L-nucleosídeos (lamivudina, telviduvina e emtricitabina), análogos de dexygunosine (entecavir) e fosfonatos nucleosídeos acíclicos (adefovir e tenofovir) (Chaves, 2007; Keeffe *et al.*, 2008; Sorrel *et al.*, 2009).

Lamivudina, adefovir, entecavir, telbivudina e tenofovir estão aprovados na Europa para o tratamento do VHB. (Jardi *et al.*, 2008; EASL, 2009; Liaw e Chu, 2009). A sua administração obedece a um algoritmo de decisão onde estão envolvidos vários factores que devem ser considerados de forma individual por um médico especialista. Entre os vários factores a considerar estão a idade do

doente, o genótipo e o nível de carga viral do VHB, o nível de transaminases se o doente é ou não AgHBe positivo, etc (Keeffe *et al.*, 2008).

2.8 - Serologia do VHB

Os diferentes antigénios e anticorpos detectáveis no sangue ou no fígado de um portador são vulgarmente designados por marcadores.

Os marcadores virais são um elemento essencial para os diagnósticos etiológicos, estudos epidemiológicos, imunoprofilaxia, monitorização de doença bem como de tratamentos e rastreio nos serviços de sangue para prevenir hepatite pós-transfusional.

São de três os marcadores antigénicos – AgHB_s, AgHB_c e AgHB_e – aos quais o sistema imunitário humoral do hospedeiro responde com a produção de 3 anticorpos – AcHB_s (para o AgHB_s), AcHB_c (para o AgHB_c) e AcHB_e (para o AgHB_e). São então três pares de sistemas “s”, “c” e “e”, com a exclusão do AgHB_c (que não pode ser detectado a nível sérico) constituem um painel de 5 marcadores serológicos (Liaw e Chu, 2009).

Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial da infecção por VHB é realizado através de testes imunoenzimáticos (EIA), geralmente caracterizados por uma excelente especificidade e sensibilidade. Hoje em dia podemos ainda detectar a presença de ADN do VHB por *transcription mediated amplification* (TMA) e *polymerase chain reaction* (PCR) sendo o resultado um marcador de replicação genómica e de infecciosidade (Ocama *et al.*, 2005; Liaw e Chu, 2009) devido à sua alta sensibilidade permite reduzir o período de janela em relação aos testes enzimáticos em uso. Para além disso é o único marcador que permite identificar a chamada Infecção Oculta por VHB (IOB) (Candotti e Allain, 2009).

É necessário testar a presença dos marcadores serológicos no sangue para determinar o estadió de evolução da infecção (desde a fase aguda até a cura) ou imunização.

Com efeito, estes antigénios e os anticorpos correspondentes obedecem a uma cinética diferente consoante o carácter evolutivo da hepatite (Figuras 6 e 7).

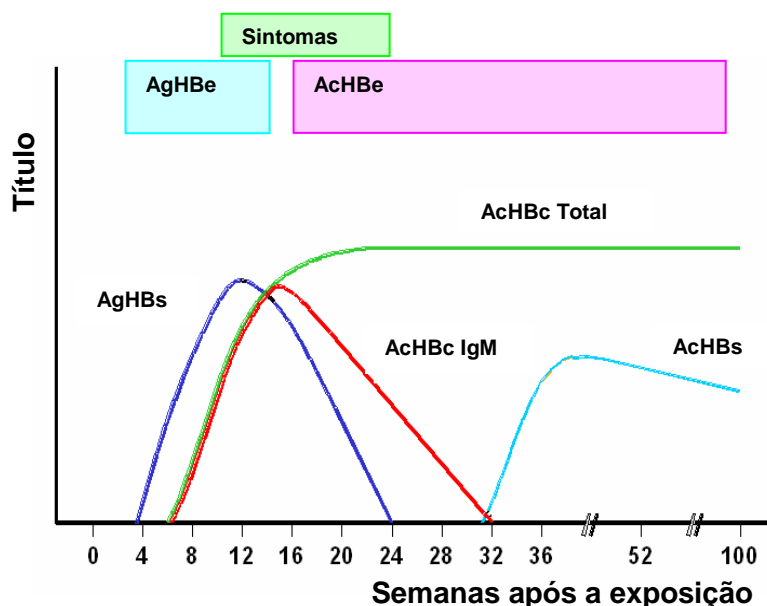


Figura 8 – Esquema representativo da evolução da “hepatite aguda resolvida com seroconversão em AcHBs” (Kao, 2008).

O marcador inicial de infecção é o antigénio de superfície – AgHBs – que é detectável aproximadamente seis semanas após exposição ao vírus sem manifestações clínicas (Liaw e Chu, 2009) e persiste durante quatro a 14 semanas. Durante esta fase os níveis de ADN-VHB são geralmente muito altos atingindo 20 milhões a 20 bilhões unidades internacionais por mililitro (UI/ml) (fase aguda).

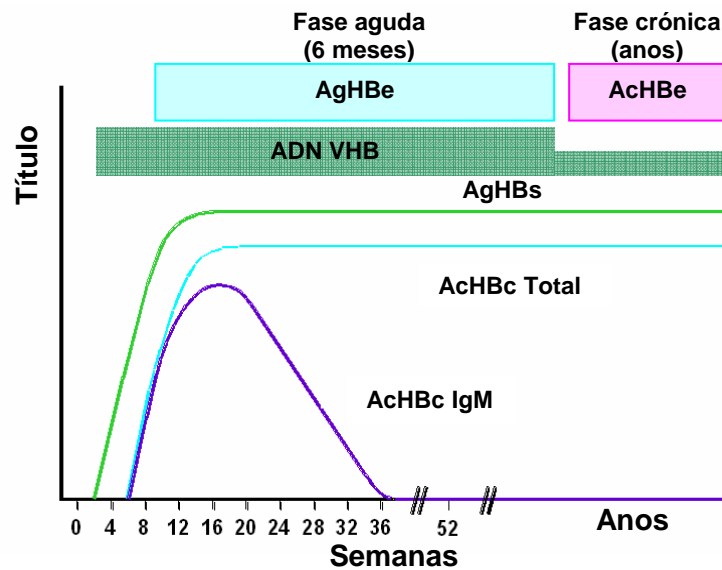


Figura 9 – Esquema representativo da evolução de “hepatite crónica” adaptado (Kao J.-H. 2008).

A presença de AgHBs para além de seis meses indica infecção crónica. O segundo marcador detectável é o AgHBe que tem a particularidade de desaparecer antes do desaparecimento do AgHBs. A presença simultânea destes dois marcadores é sinónimo de elevada infecciosidade, logo, o seu desaparecimento é indicativo de recuperação de uma crise aguda de hepatite B (Gonçalves, 2006b).

O AcHBe é o primeiro anticorpo a aparecer revelando o primeiro sinal de resposta imunológica do hospedeiro à infecção viral. É habitualmente doseado na fase aguda da doença (fracção IgM) persistindo após recuperação (fracção IgG). O segundo anticorpo a aparecer em circulação é o AcHBc que é dirigido contra o AgHBe (traduz diminuição de infecciosidade). Este pode persistir por um ou mais anos após a cura da infecção. O AcHBs é o último marcador a aparecer e só se produz em casos de recuperação da infecção, persistindo durante anos. Tem um efeito neutralizante no AgHBs, sendo o único marcador detectável em pessoas vacinadas (Liaw e Chu, 2009).

Até 2006 a infecção crónica por VHB era essencialmente caracterizada pela presença de AgHBs no soro para além de 6 meses. Com a introdução dos testes baseados na análise de ácidos nucleicos (TAN) para o VHB, novas formas de infecção crónica por VHB foram encontradas, levando em 2008 a *European Association for the Study of the Liver* (EASL) a reunir e a publicar em 2009, normas para a identificação e tratamento da Hepatite B crónica (EASL, 2009).

Assim segundo a EASL a infecção crónica por VHB é um processo dinâmico que pode ser dividido em 5 fases distintas não necessariamente sequenciais:

1. **Fase imuno-tolerante ou imunotolerância** é caracterizada por AgHBs e AgHBe positivo e altos níveis de ADN-VHB no soro (20 milhões a 20 bilhões UI/ml). Durante esta fase a perda espontânea de AgHBe é muito baixa. Frequente e prolongada em indivíduos infectados por via perinatal ou nos primeiros anos de vida, esta fase pode perdurar por 15 a 35 anos (Mendonça e Vigani, 2006).
Devido aos altos níveis de virémia, estes indivíduos são altamente infecciosos e usualmente assintomáticos (Chang, 2007; Fattovich *et al.*, 2008; Lisotti *et al.*, 2008).
2. **Fase imuno-reactiva**, é caracterizada por positividade AgHBs e AgHBe e baixos níveis de replicação do VHB que se reflectem em baixos níveis de ADN-VHB no soro (20000 UI/ml) (Fattovich *et al.*, 2008). Aumenta a taxa de perda espontânea AgHBe. Esta fase pode ocorrer depois de vários anos de imunotolerância e pode durar de algumas semanas a vários anos. É mais frequente em indivíduos infectados durante a fase adulta (Fonseca, 2007).
3. **Fase residual** ou Portador inactivo VHB, caracteriza-se por AgHBs e AchBe positivo e níveis muito baixos e por vezes indetectáveis no soro de ADN-VHB (<2000 UI/ml) (Yuen, 2007). A seroconversão do AgHBs para AchBs pode ocorrer espontaneamente em 1-3% de casos por ano, depois

de vários anos com ADN-VHB indetectável (Moreira e San Roman, 2005; Lisotti *et al.*, 2008; EASL, 2009).

4. **Infecção crónica por VHB - AgHBe negativa** – caracteriza-se por uma persistente replicação do VHB (2000 – 20 milhões UI/ml) (Fattovich *et al.*, 2008) mas em níveis inferiores àqueles da doença AgHBe positiva e presença do AchBe e AgHBs. A replicação viral é mantida por variantes do VHB, decorrentes de mutações nas regiões pré-core ou promotor do core do genoma do vírus que impedem ou reduzem a produção do AgHBe. Estas mutações podem ocorrer espontaneamente na fase inicial da infecção crónica por VHB ou em decorrência da reactivação da replicação viral. Remissão espontânea da doença AgHBe negativa é rara (Mendonça e Vigani, 2006).

5. **Fase AgHBs negativa** – após perda de AgHBs - baixos níveis de replicação do VHB pode persistir com ADN-VHB no fígado. Geralmente o ADN-VHB não é detectável no soro enquanto o AchBc (com ou sem AchBs positivo) se encontra detectável no soro.

O significado clínico da Infecção Oculta por VHB (IOB) (que se caracteriza por baixos níveis de ADN-VHB no fígado ou soro normalmente inferiores a 200 UI/ml e AgHBs negativo fora do período de janela) é incerta (Hemert *et al.*, 2008; EASL, 2009). IOB com base no perfil de anticorpos pode ser classificada em função da presença de anticorpos:

- IOB seropositiva – se AchBc positivo com ou sem AchBs positivo.
- IOB seronegativa – se AchBc e AchBs negativo.

Nos indivíduos IOB seropositivos, o AgHBs pode tornar-se negativo depois da resolução da hepatite B aguda, ou após alguns de infecção crónica. Os níveis de AgHBs parecem diminuir ao longo do tempo até a um nível sub-detectável pelos testes imunoenzimáticos em uso. Este tipo de IOB é encontrado maioritariamente em doadores mais velhos (idade superior a 45

anos). Perto de 100% tem AchBc positivo e aproximadamente 50% também é acompanhada de AchBs positiva, sugerindo assim que esta infecção apresenta-se em indivíduos que estão a recuperar de uma infecção mas incapazes de ter um controlo imune efectivo na replicação viral (Candotti e Allain, 2009).

Nos indivíduos IOB seronegativos parece haver uma perda de anticorpos progressiva ao longo do tempo, ou mesmo não existir produção por parte do indivíduo desde o início da infecção (Raimondo *et al.*, 2008).

- IOB “Falsa”- Casos com AgHBs negativo e níveis de ADN-VHB no soro comparáveis com aqueles que usualmente se detectam numa infecção aguda, são considerados de IOB falsa. Esta infecção é usualmente originada por infecção de mutantes do VHB. Mutações afectando a replicação viral no gene S (mutantes de escape) produzem AgHBs que não é reconhecido por testes serológicos imunoenzimáticos comerciais disponíveis (Raimondo *et al.*, 2008).

A representação esquemática da IOB e IOB falsa pode ser visualizada na figura 10.

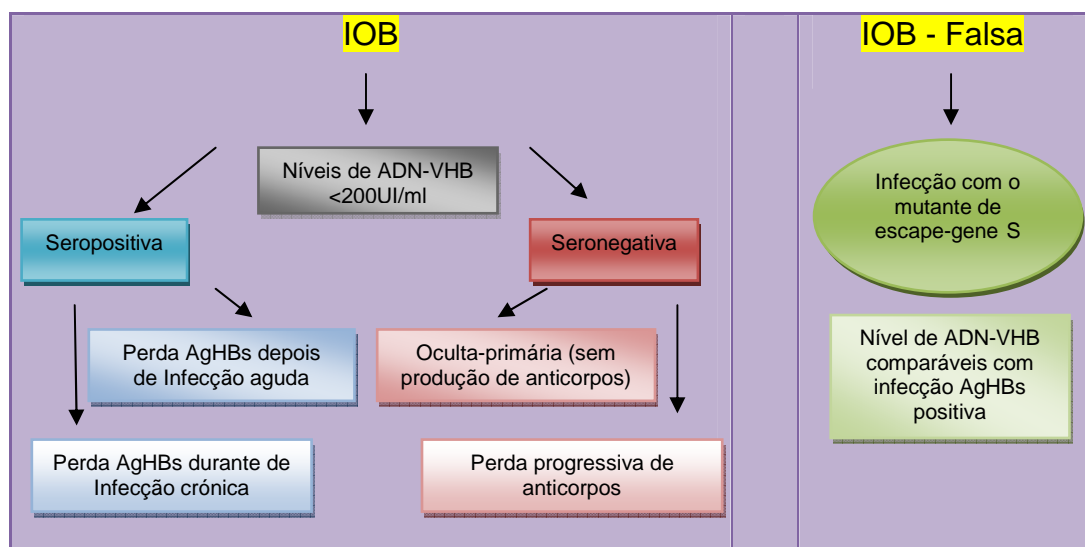


Figura 10 – Representação esquemática da IOB e IOB “falsa”. Adaptado (Raimondo, *et al.*, 2008).

Na tabela 4 estão representados todas as interpretações de resultados de marcadores serológicos e moleculares (ou virológicos) para o VHB.

Tabela 4 – Interpretação de resultados dos marcadores serológicos e moleculares para o VHB (Carretero e Herráiz, 2004; Ocama *et al.*, 2005; Fonseca, 2007; Valsamakis, 2007; Fattovich *et al.*, 2008; Kao, 2008).

Interpretação		Marcadores serológicos						Marcador molecular	
		Ag HBs	Ag HBe	Ac HBe	Ac HBc IgM	Ac HBc IgG	Ac HBs	TN	DNA- VHB
Infecção aguda	Muito recente	+	+	-	-	-	-	+	+
	Recente	+	+	-	+	-	-	+	+
	Final	+	+	-	-	+	-	+	+
	Resolução da infecção aguda	-	-	+	+/-	+	+		-
Infecção crónica	Fase imuno-tolerante	+	+	-	-	-	-	+	20 milhões a 20 biliões UI /ml
	Fase imuno-reactiva	+	+	-	-	-	-	+	20000 UI/ml
	Portador inactivo do VHB	+	-	+		+	-	+	< 2000UI/ml
	Infecção crónica por VHB - AgHBe negativa	+	-	+		+	-	+	2000 a 20 milhões UI/ml
	IOB -Seropositiva	-	-	-		+	+/-	-	< 200UI/ml
	IOB -Seronegativa	-	-	-		-	-	-	< 200UI/ml
	IOB -Falsa	-					+/-	-	20 milhões a 20 biliões UI /ml
Infecção passada		-	-	+/-	+	+/-	+/-		-
Vacinação		-	-	-	-	-	+		-
Reactividade inespecífica, Infecção resolvida com AchBs não detectável		-	-	-	-	+	-		-
Sem infecção		-	-	-	-	-	-		-

Legenda: + positivo, - negativo, +/- positivo ou negativo; TN – teste de neutralização para AgHBs

2.9 - Diagnóstico laboratorial do VHB

O diagnóstico de qualquer das formas clínicas da hepatite B realiza-se através de técnicas serológicas e moleculares, que se revelam fundamentais não só no diagnóstico, mas também para o acompanhamento da infecção viral, na avaliação do estado clínico do portador de VHB e na monitorização da terapêutica específica.

Em Portugal os ensaios imunoenzimáticos (EIA) mais utilizados actualmente para a detecção do AgHBs são os testes EIA em microplaca e ChLIA (Imunoensaio por quimioluminescência).

A sensibilidade dos testes de rastreio para o AgHBs tem melhorado significativamente desde a sua implementação em 1972 (Allain, 2006b) chegando ao nível de detecção de 0.1UI/ml. No entanto estes testes são incapazes de detectar um período de janela de pré-seroconversão ou amostras com níveis de virémia muito baixos, após décadas de cronicidade ou recuperação clínica por VHB (IOB) (Candotti e Allain, 2009).

A procura pública de padrões mais elevados de rastreio de agentes infecciosos em produtos de transfusões impulsionou o avanço da tecnologia de testes baseados na análise de ácidos nucleicos (TAN). Estudos mostraram que estes testes contribuíram para uma redução do risco de transfusão do VHB nas dádivas de sangue feitas durante o período de janela ou com IOB (Kleinman e Busch, 2006; Candotti e Allain, 2009; EASL, 2009).

Nos últimos cinco anos foram desenvolvidos TAN para a detecção simultânea do ADN-VHB, ARN do vírus da imunodeficiência humana, ARN do vírus da hepatite C, e a sua automatização facilitou a sua implementação em 2006 no rastreio sistemático do VHB no CRSP.

3 - Objectivo

Efectuar a análise dos marcadores serológicos e moleculares do VHB na população de dadores de sangue do Centro Regional do Sangue do Porto (CRSP) num período de nove anos (2000 - 2008) com vista a conhecer a prevalência dos marcadores do VHB.

A finalidade é conhecer a prevalência desta patologia na população de dadores do CRSP.

4 - Material e Métodos

4.1 - Tipo de Estudo

Foi realizado um estudo observacional, transversal, descritivo por consulta de registos.

- Transversal, porque traduz um fenómeno (infecção por VHB) nos dadores de sangue do CRSP num determinado período de tempo (2000-2008).
- Por registo porque a recolha de dados foi feita através da consulta à base de dados dos dadores CRSP.

4.2 - Identificação da População em estudo e da Amostra

A população em estudo engloba todos os 223 479 dadores de sangue registados na base de dados de dadores do CRSP à altura da finalização do período de estudo.

A amostra foi retirada da população de dadores do CRSP, de ambos os sexos e com idades compreendidas entre os 18 e os 65 anos, que durante o período compreendido entre 1 de Janeiro de 2000 e 31 de Dezembro de 2008 tiveram registo de colheita(s) com positividade para qualquer um dos marcadores do VHB.

4.3 - Metodologia

Para os anos 2000 a 2008 foram avaliados os marcadores serológicos do VHB (AgHBs e AchBc) com resultado EIA positivo efectuado por rotina aos dadores de sangue. A avaliação do marcador virológico (ou molecular) para o ADN-VHB efectuado por rotina a partir de Agosto de 2006 foi também objecto de avaliação. A recolha de dados foi feita através da consulta à base de dados dos dadores. Foram consultados todos os registos positivos dos marcadores de rastreio do

VHB (AcHBc e AgHBs e ADN-VHB) efectuados como rotina, assim, como os resultados de outros marcadores serológicos (AcHBs, AgHBe, AchBe), do teste confirmatório (teste de neutralização AgHBs) e quantificação da carga viral do VHB por PCR.

Os resultados para o AgHBs, AcHBc, AgHBe, AchBe e ADN-VHB qualitativo, foram expressos qualitativamente como Negativos e Positivos. O resultado do AcHBs foi considerado negativo para valores inferiores a 10 Unidades Internacionais por litro (UI/l).

A quantificação da carga vírica do ADN-VHB expresso em cópias por mililitro (c/ml) até 2003 e a partir de 2004 expresso em Unidades Internacionais por mililitro (UI/ml). 1 UI – é equivalente a 5 cópias (Allain, 2006a).

Considera-se seroconversão quando um dador regular (com registo de várias dádivas) apresenta uma colheita não reactiva, seguida de uma colheita reactiva para AgHBs confirmadamente positiva pelo teste de neutralização.

Os testes e metodologias utilizadas pelo CRSP durante o período de estudos estão descritos seguidamente:

No CRSP, foram três os marcadores VHB que se determinaram sistematicamente por rastreio a todas as unidades de sangue no CRSP:

- AgHBs, AcHBc (por EIA)
- ADN-VHB qualitativo (por TAN) efectuado em pool de seis amostras efectuado a partir de Agosto de 2006.

Outros marcadores de confirmação para determinar o estadio de evolução da hepatite B, foram executados, após positividade de um (ou mais) dos três marcadores descritos na alínea anterior. Foram eles:

- AcHBs, AgHBe, AchBe (por EIA).
- ADN-VHB quantitativo (por PCR quantitativo).

Os ensaios EIA, utilizados por rotina no CRSP, foram os testes EIA em microplaca e ChLIA.

Os testes EIA em microplaca utilizam o princípio de que os antígenos ou anticorpos que se fixam à fase sólida (placas de poliestireno) podem ser detectados por anticorpos ou antígenos complementares marcados com uma enzima capaz de actuar sobre um substrato cromogénico. Quando o substrato enzimático é adicionado, a presença dos antígenos ou anticorpos pode ser revelada mediante o desenvolvimento de uma reacção colorimétrica (Specter *et al.*, 2000).

Foram efectuados por este método os seguintes marcadores serológicos:

- AgHBs, de acordo com as instruções da casa comercial Bio-Rad (bula Monolisa[®] HBsAg).
- AchBc, de acordo com as instruções da casa comercial Ortho-Clinical Diagnostics (bula Ortho[®] HBc ELISA Test System).

Os testes ChLIA permitem determinar a presença de antígenos e anticorpos numa amostra, através da presença de anticorpos ou antígenos complementares ligados a micropartículas de látex. Estas micropartículas são capturadas por uma matriz de fibra de vidro, é adicionado um conjugado marcado com acridínio quimioluminescente que possibilita a detecção da mistura de reacção na matriz de fibra de vidro. É então adicionado uma solução de activador, o que produz uma reacção de quimioluminescência, lida por uma unidade de leitura óptica que detecta fótons produzidos em consequência da reacção.

Esta metodologia foi utilizada na detecção dos seguintes marcadores serológicos segundo as instruções da casa comercial Abbott:

- AgHBs (Bula ABBOTT PRISM[®] HBsAg).
- AchBc (Bula ABBOTT PRISM[®] HBcore).
- AgHBe (Bula ARCHITECT[®] HBeAg).
- AchBe (Bula ARCHITECT[®] Anti-HBe).

- AcHBs (Bula ARCHITECT® AUSAB).
- AgHBs confirmatório (Bula HBsAg Qualitative Confirmatory).

A determinação do ADN-VHB qualitativo e quantitativo foi efectuada por reacção em cadeia da polimerase (PCR), uma técnica de biologia molecular que tem por base a amplificação específica do ADN do VHB.

Para a determinação do ADN-VHB qualitativo, foram utilizados testes baseados na análise dos ácidos nucleicos (TAN). Foi usado um teste multiplex qualitativo (em pool de seis amostras), que permite o rastreio e detecção simultânea de ARN do VIH, ARN do VHC e ADN do VHB, que depois de amplificados são detectados através de PCR em tempo real. Esta determinação é efectuada segundo a casa comercial Roche Diagnostics (Bula cobas TaqScreen MPX test).

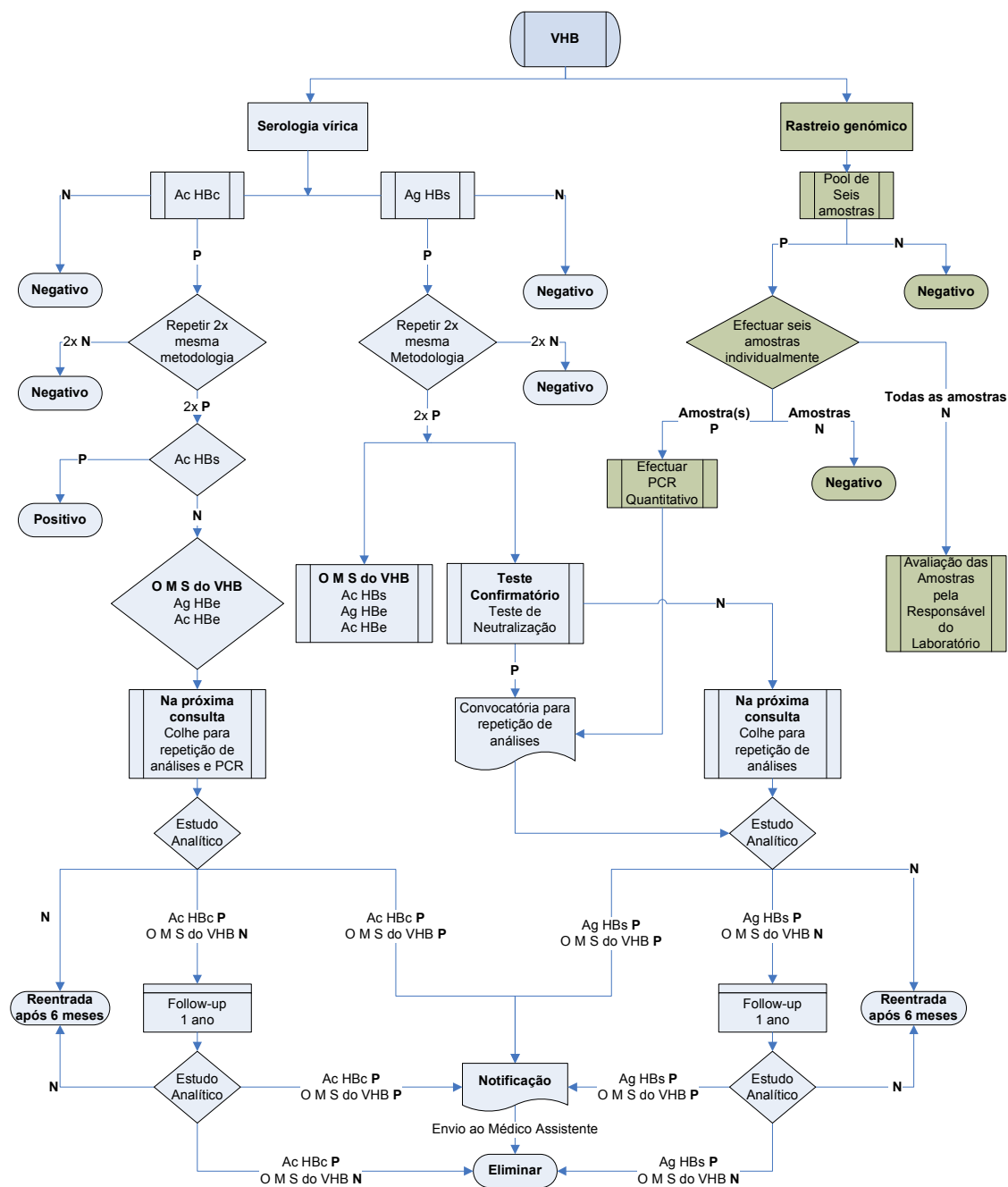
Para a determinação do ADN-VHB quantitativo foi usado nos anos de 2002 e 2003, a técnica de PCR, segundo a casa comercial Roche Diagnostics (Bula Cobas Amplicor HBV Monitor™ Test).

Nos anos 2004 a 2008 a quantificação do ADN-VHB foi efectuada por técnica de PCR em tempo real, segundo instruções da casa comercial Roche Diagnostics (Bula COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Teste).

Durante o período em estudo não se registaram alterações significativas na especificidade e sensibilidade dos testes EIA e TAN utilizados para o rastreio ou confirmação do VHB. O mesmo não se poderá dizer dos testes para determinação do ADN-VHB quantitativo: se, por um lado, não existiram alterações durante o período em estudo na especificidade dos mesmos, já na sensibilidade registou-se evolução ao nível dos limites máximo e mínimo de detecção, passando estes de 4×10^4 UI/ml a 1×10^8 UI/ml e 40 UI/ml a 12 UI/ml respectivamente.

Todas as bulas podem ser consultadas em www.abbottdiagnostics.com; www.orthoclinical.com; www.biorad.com; www.roche.com.

O algoritmo de decisão utilizado no CRSP para o VHB encontra-se esquematizado na figura 11.



Legenda: P – Positivo; N – Negativo; 2x – duas vezes; O M S – Outros Marcadores Serológicos.

□ - Algoritmo usado até Julho de 2006.

■ - Rastreamento genómico introduzido a partir de 2006.

Figura 11 – Algoritmo do VHB do CRSP.

5 - Resultados

No período em estudo foram consultados registos referentes a 357 147 dádivas de dadores dos quais 443 foram positivos para o AgHBs e 14529 para o AchBc no rastreio com os testes imunoenzimáticos em uso na rotina (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição dos dadores com AgHBs EIA positivo entre 2000 – 2008.

Ano	Número de dadores	EIA Positivo AgHBs	Frequência Relativa (%)
2000	23462	57	0.24
2001	25351	40	0.16
2002	29713	47	0.16
2003	31063	61	0.20
2004	33566	51	0.15
2005	39151	32	0.08
2006	50848	51	0.10
2007	54878	51	0.09
2008	69115	53	0.08
Total	357147	443	

Aos 443 AgHBs positivos foi realizado o teste de Neutralização do AgHBs (teste confirmatório), obtiveram-se 219 AgHBs confirmadamente positivos. A estes foi realizada a pesquisa do ADN-VHB por PCR (até Julho de 2006 aos Dadores notificados e que compareceram no CRSP e a partir de Agosto de 2006 a todos os Dadores, já que esta pesquisa passou a ser feita como rotina) (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados obtidos por PCR aos dadores AgHBs confirmadamente positivos.

Ano	AgHBs Confirmadamente Positivo	ADN-VHB realizado por PCR- Qualitativo		
		Positivo	Negativo	Não realizado (dador não compareceu à notificação)
2000	32	7	13	12
2001	22	5	9	8
2002	27	13	5	9
2003	30	13	5	12
2004	30	10	12	8
2005	19	7	4	8
2006	19	9	2	8
2007	20	18	2	
2008	20	19	1*	
Total	219	101	53	65

Legenda: * Uma Amostra AgHBs positivo com ADN-VHB qualitativo negativo, na pesquisa de ADN-VHB quantitativo o resultado foi de carga viral detectável.

No ano 2007 uma amostra positiva para ADN-VHB, apresentava resultado negativo para AgHBs.

As cargas virais obtidas pelas metodologias quantitativas (PCR e PCR em tempo real), realizadas aos dadores AgHBs positivo e/ou ADN-VHB qualitativo positivo, dos anos 2002-2008 estão representadas na tabela 7.

Nota: Nos anos 2000 e 2001 não se procedeu à determinação quantitativa do ADN-VHB.

Tabela 7 – Cargas virais e metodologias utilizadas em dadores com AgHBs positivo e/ou ADN-VHB positivo entre 2002 e 2008.

Anos	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Métodos	PCR clássico (cópias/ml)		PCR em tempo real (UI/ml)				
Limite mínimo de detecção	200 cópias/ml		12 UI/ml				
Limite máximo de detecção	200000 cópias/ml		1x10 ⁸ UI/ml				
Nº dadores	13	13	10	7	9	19	19
Cargas víricas	19900	6410	242	1109	2.27x10 ⁷	340	386
	4010	29000	18600	144	30	976	Detecta-se
	3550	16900	26	152x10 ⁵	22	230	430
	866	3030	19	16	240	Detecta-se	32
	3200	27000	167	1450	94	5000	2570
	1410	3580	75	11500	Detecta-se	Detecta-se	1830
	14800	>200000	37	Detecta-se	17	586	4640
	4010	>200000	323		498	105	504
	1430	7280	452		Detecta-se	48	479
	4860	650	Detecta-se			Detecta-se	455
	3110	653				77	5666
	Detecta-se	32400				3570	44
	Detecta-se	6220				510	6640
						97800	3630
						2340	5361
					Detecta-se	2030	
					4.43x10 ⁸	1060	
					9480	903	
					13*	Detecta-se**	

Legenda: Em cada coluna estão apresentados os valores obtidos para a carga vírica por dador

Detecta-se – Carga viral detectável mas não quantificável, valor abaixo do valor mínimo de detecção da metodologia.

* – Carga viral do Dador AgHBs Negativo, ADN-VHB Positivo qualitativo.

** – Carga viral do Dador AgHBs Positivo, ADN-VHB Negativo em pool.

Nota: Considera-se carga viral baixa: valores inferiores a 10⁵ cópias/ml ou inferiores a 20000 UI/ml (Fattovich *et al.*, 2008; EASL, 2009).

A distribuição dos níveis de carga viral (dos dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivo), segundo a classificação alta, muito baixa (detecta-se), baixa e negativa, realizada por PCR quantitativo está representada no gráfico 2.

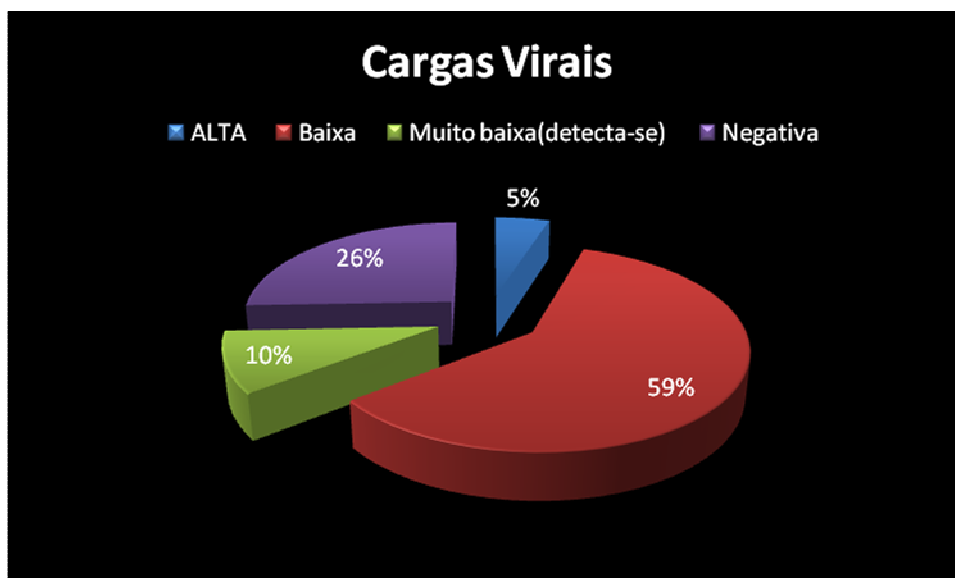


Gráfico 2 – Distribuição dos níveis de carga viral dos dadores AgHBs e/ou ADN VHB positivo.

Legenda: Carga viral muito baixa: valores inferiores ao limite mínimo de detecção (200 cópias/ml ou 12 UI/ml)

Carga viral baixa: valores inferiores a 10^5 cópias/ml ou inferiores a 20000 UI/ml.

Carga viral alta: valores superiores a 10^5 cópias/ml ou superiores a 20000 UI/ml.

A distribuição dos dados EIA positivo para: AcHBc (isolado), AcHBc com AcHBe e AcHBc com AcHBs no período em estudo, está representado na tabela 8 e gráfico 3.

Tabela 8 – Distribuição dos dados EIA positivo para AcHBc (isolado), AcHBc com AcHBe e AcHBc com AcHBs para os anos 2000-2008.

Ano	Número de dados	EIA positivo AcHBc (isolado)	Frequência relativa (%)	EIA positivo AcHBc e AcHBe	Frequência relativa (%)	EIA positivo AcHBc e AcHBs	Frequência relativa (%)
2000	23462	124	0.53	76	0.32	1149	4.90
2001	25351	68	0.27	50	0.20	1139	4.49
2002	29713	38	0.13	28	0.09	1246	4.19
2003	31063	60	0.19	20	0.06	1242	4.00
2004	33566	102	0.30	18	0.05	1171	3.49
2005	39151	66	0.17	15	0.04	1267	3.24
2006	50848	121	0.24	9	0.02	1743	3.43
2007	54878	130	0.24	10	0.02	2025	3.69
2008	69115	32	0.04	10	0.01	2570	3.71
Total		741		236		13552	

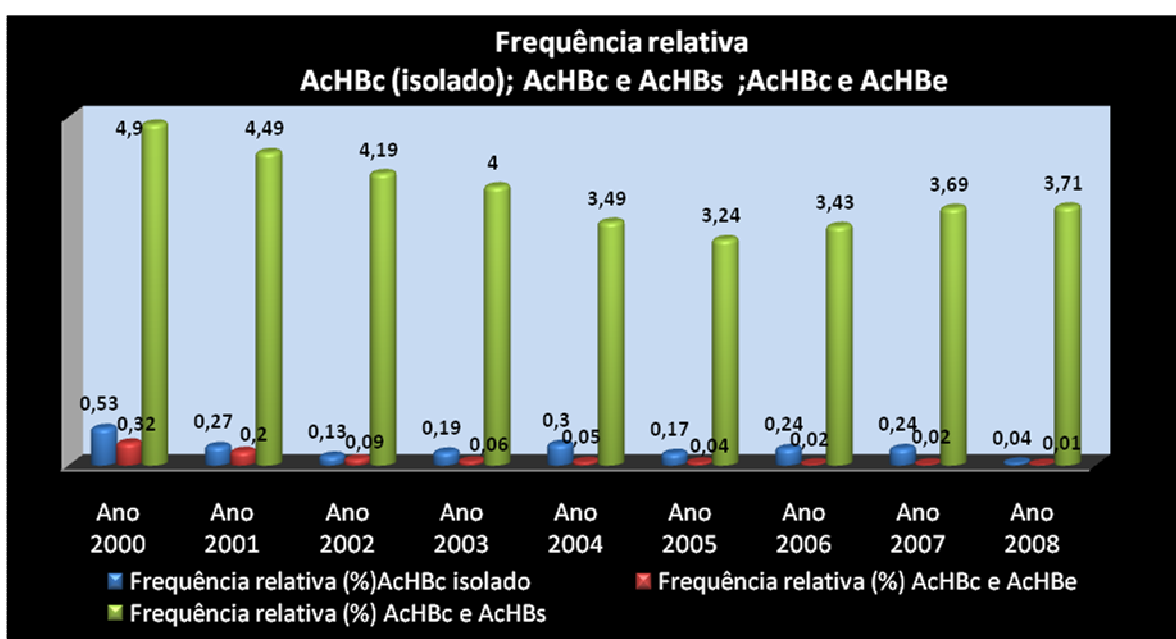


Gráfico 3 – Distribuição dos dados EIA positivos para o AcHBc (isolado), AcHBc com AcHBe e AcHBc com AcHBs no período em estudo.

O cálculo da prevalência anual para o AgHBs durante o período de estudo está representado na tabela 9 e gráfico 4.

Tabela 9 – Prevalência anual para o AgHBs em doadores de sangue do CRSP.

Ano	Número de doadores	AgHBs	Prevalência AgHBs (%)
2000	23462	32	0.14
2001	25351	22	0.09
2002	29713	27	0.09
2003	31063	30	0.10
2004	33566	30	0.10
2005	39151	19	0.05
2006	50848	19	0.04
2007	54878	20	0.04
2008	69115	20	0.03

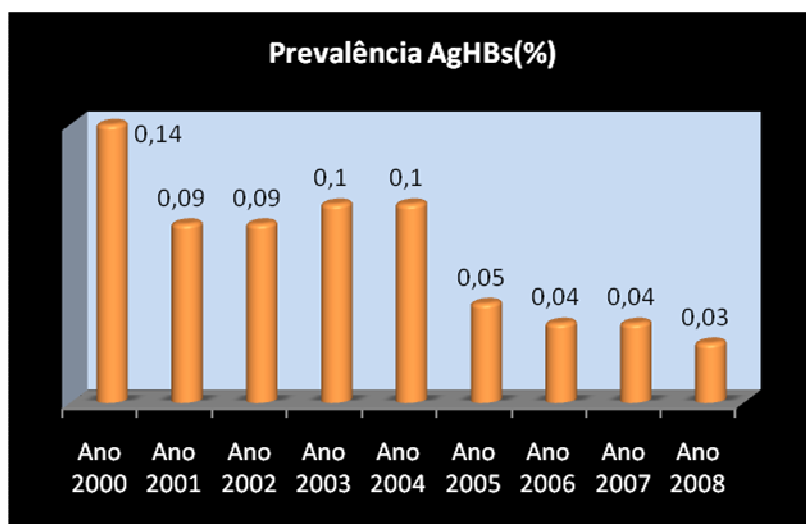


Gráfico 4 – Prevalência anual para o AgHBs em doadores de Sangue do CRSP.

A prevalência anual para todos os marcadores serológicos do VHB dos doadores de sangue do CRSP, durante o período em estudo encontra-se representada na tabela 10 e gráfico 5 e 6.

Tabela 10 – Prevalência anual de todos os marcadores serológicos do VHB em doadores de sangue do CRSP.

Ano	Número de doadores	AgHBs	EIA Positivo AchBc (isolado)	EIA Positivo AchBc e AchBe	EIA Positivo AchBc e AchBs	Total	Prevalência Marcadores VHB (%)
2000	23462	32	124	76	1149	1381	5.89
2001	25351	22	68	50	1139	1279	5.04
2002	29713	27	38	28	1246	1339	4.51
2003	31063	30	60	20	1242	1352	4.35
2004	33566	30	102	18	1171	1321	3.93
2005	39151	19	66	15	1267	1367	3.49
2006	50848	19	121	9	1743	1892	3.72
2007	54878	20	130	10	2025	2185	3.98
2008	69115	20	32	10	2570	2632	3.80

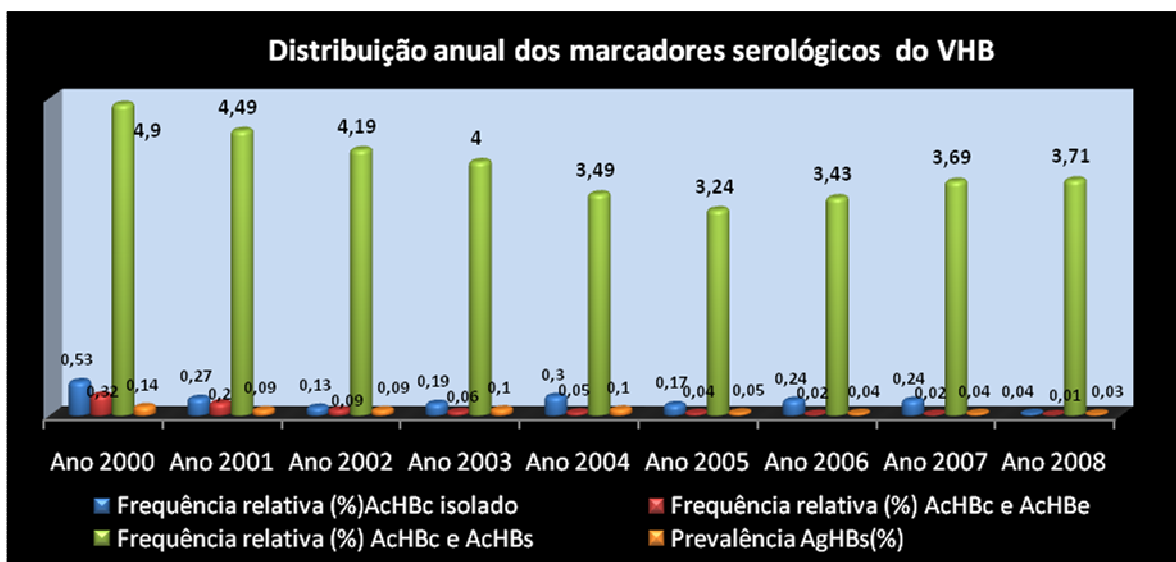


Gráfico 5 – Distribuição anual dos marcadores serológicos do VHB em doadores de Sangue do CRSP.

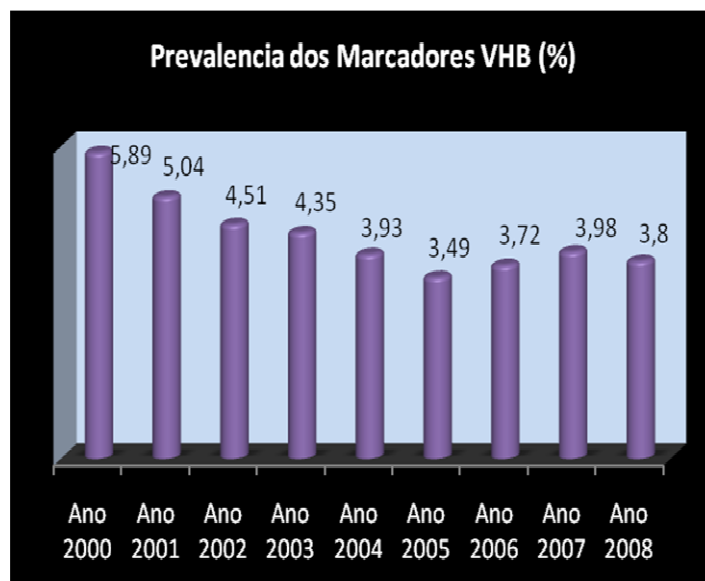


Gráfico 6 – Prevalência anual dos marcadores serológicos do VHB em doadores de Sangue do CRSP.

Durante o período em estudo foram ainda encontrados dois doadores que apresentavam positividade simultânea para o AgHBs/AcHBc/AcHBs (Tabela 11).

Tabela 11 – Perfil serológico de doadores com positividade para o AgHBs e AcHBs.

Dador/Ano	AgHBs	TN	AcHBc	AcHBs	AgHBe	AcHBe	PCR
A/ 2000	+	+	+	+	-	+	NE
B/ 2001	+	+	+	+	+	-	+

Legenda: + -Positivo; - Negativo; **TN**- teste neutralização do AgHBs; **NE**- Não efectuado

Durante os nove anos de estudo, registaram-se duas seroconversões referentes a doadores regulares:

- A primeira seroconversão ocorreu no ano 2002 (o dador não fez qualquer dádiva durante o ano precedente).
- A segunda ocorreu no ano 2004 (dador cuja última dádiva tinha ocorrido há mais de seis meses).

De realçar ainda o registo, em 2007 de um período de janela (ou pré-seroconversão), referente a um dador regular desde 2001, e cuja última dádiva tinha ocorrido há 4 meses.

O número de dadores que no período de estudo apresentaram positividade para AgHBs e/ou ADN-VHB, e que em 1993 (data da implementação da vacinação gratuita para o VHB, em adolescentes) tinham entre 11 a 13 anos de idade, foi de 24. A sua distribuição encontra-se representada na figura 12.

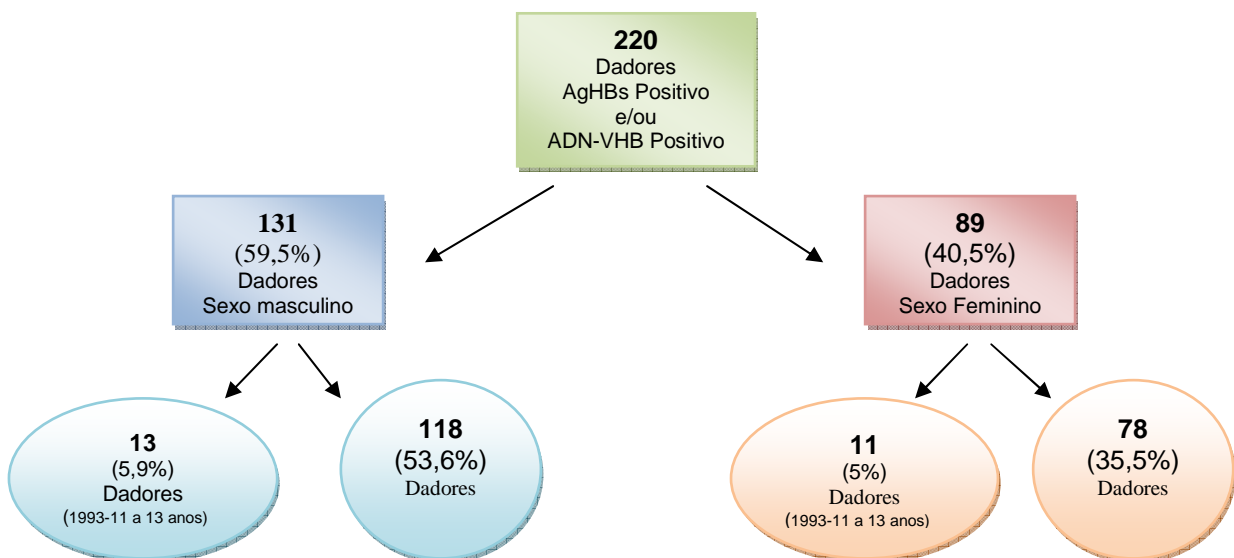


Figura 12 – Representação esquemática do número de Dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivos em relação a idade e sexo.

A distribuição dos dadores AgHBs positivo e/ou ADN-VHB positivo segundo faixa etária e sexo encontra-se na tabela 12 e gráfico 6.

Tabela 12 – Distribuição dos dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivo segundo faixa etária e sexo, 2000-2008.

Faixa etária	Sexo masculino	Sexo feminino
18-28	27	17
29-39	40	19
40-50	42	40
51-65	22	13

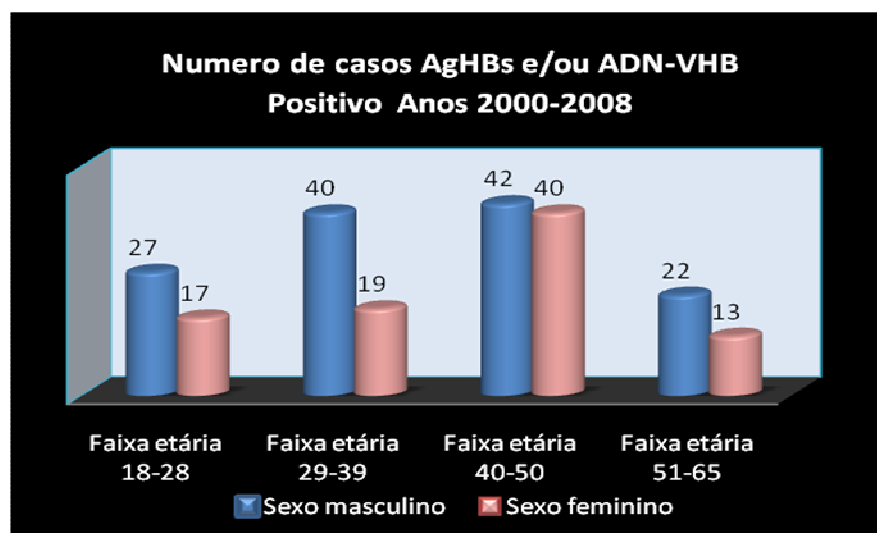


Gráfico 7 – Distribuição por faixa etária e sexo dos dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivo do CRSP, 2000-2008.

O CRSP, durante o período em estudo efectuou colheitas de dádivas de sangue, em nove distritos do Norte e Centro de Portugal: Viana do Castelo, Braga, Porto, Vila Real, Bragança, Guarda, Viseu, Aveiro e Coimbra.

Na figura 13 está representada a distribuição geográfica dos dadores do CRSP, AgHBs positivo e/ou ADN-VHB positivo, a figura 14 apresenta a distribuição geográfica de todas as dádivas realizadas pelos dadores do CRSP entre 2000-2008.



Figura 13 – Distribuição geográfica em Portugal Continental de dadores AgHBs e/ou ADNVHB positivo do CRSP entre os anos 2000-2008.



Figura 14 – Distribuição geográfica em Portugal Continental de dávidas de dadores do CRSP entre 2000- 2008.

6 - Discussão

O vírus da hepatite B, continua a ser a infecção com maior risco de transmissão por transfusão sanguínea. Para tal, contribui o seu período de janela (ou de pré-seroconversão), as imunovariantes e o estado de portador de infecção oculta do VHB (IOB). Segundo um estudo realizado a doadores de sangue de seis países europeus (França, Alemanha, Itália, Espanha, Suíça e Reino Unido), o risco residual de transmissão por milhão de doações foi estimado entre 0,6 (França) e 2,48 (Espanha), para o VHC; entre 0,18 (Alemanha) e 1,1 (Itália), para o VIH; entre 10 (Espanha) e 1,6 (França e Alemanha), para o VHB (Laperche, 2005).

No presente estudo foi observada uma tendência decrescente na prevalência do AgHBs, que vai de encontro ao que se passa no País. Isto porque, segundo dados da Direcção Geral da Saúde, o número de casos notificados tem vindo a decrescer desde 1999 (Relatórios de Doenças de Declaração Obrigatória 1999-2003, 2001-2005 e 2002-2006) em Portugal e no mundo (Alexander e Kowdley, 2006).

Esta diminuição poderá estar associada sobretudo a medidas efectivas de prevenção, designadamente, uma rigorosa entrevista médica prévia à dádiva de sangue, uma maior atenção à educação do dador (tendo em conta a sensibilização do mesmo para os riscos de transmissão do vírus), a auto-exclusão com consentimento informado em caso de comportamento de risco e a introdução da vacina para o VHB no plano nacional de vacinação.

No nosso estudo, 89,1% dos doadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivos, não foram abrangidos pelo PNV em 1993 (vacinação gratuita para adolescentes entre os 11-13 anos). Este facto poderá traduzir a eficácia da vacina para o VHB. Entre as possíveis razões para que 10,9% dos doadores apresentassem AgHBs e/ou ADN-VHB positivo podem estar a não vacinação ou a não resposta imunológica a vacinação (escape imunológico).

Constatamos ainda, que a maioria dos doadores detectados com AgHBs e/ou ADN positivo eram portadores saudáveis, já que, dos 121 doadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivo - aos quais foi efectuado a quantificação do ADN-VHB por PCR quantitativo - 95% apresentavam níveis de carga viral baixa, muito baixa ou mesmo negativos, o que poderá explicar a sua ausência de sintomatologia de doença (daí não serem detectados na triagem médica pré-dádiva).

Facto de salientar foi a presença simultânea de AgHBs e ADN-VHB em 74 % dos doadores estudados, valor muito próximo de outros estudos já efectuados em que o valor encontrado foi de 80% (Allain, 2006a).

Relativamente ao marcador serológico AchBc, verificou-se positividade em 14529 doadores. Destes 13552 apresentavam também positividade para o AchBs o que pressupõem uma infecção no passado por VHB mas resolvida com imunização. Refira-se também que 236 doadores foram positivos para os marcadores AchBc e AchBe, pressuposto de uma infecção por VHB em resolução ou infecção passada com perda de AchBs detectável (perda de imunidade).

Foram ainda detectados 741 doadores com positividade só para o marcador AchBc. Uma circunstância para a qual vários estudos apresentam múltiplas interpretações, desde infecção por VHB resolvida mas com perda de AchBs detectável, infecção por variantes do VHB (AgHBs não detectado no testes serológicos de rastreio), resposta á vacinação com aparecimento tardio de AchBs (Boot *et al.*, 2009) e por último (mas não menos importante) reactividade inespecífica (Jongerius *et al.*, 1998; Allain, 2004; Souto *et al.*, 2006).

A prevalência para todos os marcadores do VHB apresentou também uma tendência decrescente ao longo dos anos considerados. Variou entre 5,89% no primeiro ano de estudo e 3,8% no último ano. Para este valor muito contribuíram os casos de doadores com imunidade adquirida por infecção natural (AchBc e AchBs), cuja frequência relativa variou entre 4.9%, no primeiro ano, e 3.71%, no

último ano. Esta constatação vai ao encontro dos valores (3,5%) do inquérito serológico nacional realizado pela DGS entre 2001-2002.

O nosso estudo detectou a coexistência de AgHBs e AchBs. Esta coexistência foi encontrada em dois dadores. Embora não se encontre a associação destes dois marcadores na evolução natural da infecção da hepatite B, casos semelhantes já foram descritos e, segundo Alegre e colaboradores (em 2004), a coexistência destes dois marcadores foi descrita em 24% de infectados pelo VHB AgHBs positivos, na sua maior parte associado a estado de portador assintomático.

O facto de um dador AgHBs positivo só ter sido detectado pelos TAN – quando realizado individualmente – poderá ter a ver com a variabilidade da amostra ou com a baixa carga vírica do dador, já que no teste de PCR quantitativo a carga víral era muito baixa (detecta-se).

A rotina seguida permitiu também evidenciar um dador que, não obstante ter em 2007 como único marcador detectável o ADN-VHB, com um nível baixo de carga viral (13 UI/ml), nas análises subsequentes, o AgHBs deu positivo ao 24.º dia, o que o define como um período de janela imunológica do VHB (ou de pré-seroconversão) (Barbara *et al.*, 2008).

Embora na população de dadores do CRSP o sexo predominante seja o sexo feminino (representa 54%), o trabalho que ora se apresenta registou uma incidência maior de portadores de AgHBs e/ou ADN-VHB no sexo masculino (em 59,5%), uma maior prevalência neste sexo pode também ser observada no relatório de doenças declaração obrigatória 2001-2005 em que o valor chega aos 71,1%, não se tendo encontrado evidências bibliográficas que comprovem uma maior susceptibilidade deste sexo a esta infecção viral em análise, tal resultado poderá estar associado a factores comportamentais que levam a uma maior exposição ao VHB e conseqüentemente a infecção.

As faixas etárias (em ambos os sexos) onde se verificou uma maior prevalência (64%) de dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivo, foram as faixas entre 29-39 e 40-50, faixas estas que correspondem também ao maior número de dadas do CRSP (60%). Apesar do maior número de casos notificados da DGS no relatório de doenças de declaração obrigatória de 2001-2005, corresponder também a estas faixas etárias, a sua prevalência foi no entanto inferior (50,4%) ao observado neste estudo.

Na observação da distribuição geográfica dos dadores positivos para o AgHBs e/ou o ADN-VHB extrai-se uma maior prevalência no litoral norte e centro do País.

Os distritos situados no litoral apresentaram um maior número casos: Aveiro, Braga e Porto apresentaram 16, 56 e 109 casos respectivamente, o que corresponde a 82,27% do total de dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivos. Como justificação estará certamente o facto de estes três distritos (Aveiro com 20347 dadas, Braga com 39204 dadas e Porto com 432760 dadas) serem responsáveis por 77,62% do total de dadas de dadores, efectuadas no período em estudo. Facto que também não será alheio a esta distribuição é a densidade populacional continental portuguesa, que, segundo os Censos de 2001, nota que a população está mais concentrada no litoral e junto dos grandes centros, note-se então um equilíbrio entre estes três factos, maior densidade populacional, maior número de dadas, maior número de dadores AgHBs e/ou ADN-VHB positivo.

Não obstante a importância dos resultados a que o nosso estudo chegou, completa ressaltar que, durante o período em análise houve uma alteração na sensibilidade de um dos testes utilizados (determinação quantitativa do ADN-VHB). De uma outra forma, note-se que só a partir de Agosto de 2006 se começou a realizar os TAN. Estas circunstâncias devem ser tidas em consideração, pois a existência de um enviesamento na avaliação de resultados não pode ser posta de lado, uma vez que é uma das limitações deste desenho de estudo.

7 - Conclusão

No período abrangido por este estudo foi observada uma tendência decrescente do número de dadores positivos para o AgHBs o que é coerente com os dados fornecidos pela Direcção Geral de Saúde.

A prevalência para o AgHBs nos dadores de sangue do CRSP entre 2000 e 2008 variou entre 0,14% no primeiro ano do estudo e 0,03% no último ano de estudo.

A introdução dos TAN no CRSP, em Agosto de 2006, tornou possível a detecção de um período de janela em 2007, facto que nos obriga a sublinhar a importância da introdução dos TAN no rastreio sistemático de dadores de sangue.

Em 2008, por outro lado, encontramos um dador com AgHBs positivo e ADN-VHB negativo nos TAN – circunstância que, por si só, reforça a imprescindibilidade da coexistência dos testes serológicos e moleculares no rastreio a dadores de sangue.

De uma outra forma, o trabalho desenvolvido evidenciou que 89,1% dos dadores com o AgHBs e/ou o ADN-VHB positivos não foram abrangidos pelo plano nacional de vacinação para o VHB.

8 - Perspectivas futuras

O presente estudo confirma o benefício dos TAN na segurança biológica dos produtos sanguíneos, diminuindo o risco transfusional.

Durante o período de estudo não conseguimos encontrar referências bibliográficas relativas ao risco residual do VHB por transfusão sanguínea pós – TAN em Portugal, pelo que consideramos oportuno a realização de estudos futuros que visem o seu cálculo.

9 - Considerações finais

A descoberta do AgHBs por Blumberg em 1964 (que lhe valeu o Nobel da Medicina em 1978) é considerada um dos marcos mais proeminentes da medicina no último século. O achado desencadeou avanços graduais no conhecimento da infecção por VHB. A evolução tecnológica produziu e potenciou testes de diagnóstico de sensibilidade e especificidade acrescidas, tendo-se verificado progressivos avanços quer na prevenção quer na terapêutica.

A tendência decrescente no número de novos casos de VHB ao nível mundial foi subsequente, sobretudo nos países ditos desenvolvidos. Portugal tem acompanhado essa tendência. Notam-no números e estudos recentes. E comprova-o o nosso estudo, que coloca o País no grupo dos de baixa endemicidade do VHB.

Mas, apesar de todos os avanços conseguidos no conhecimento da hepatite B, o que faltará então, do ponto de vista científico, para que a prevalência do VHB atinja o valor ideal – zero – quer na população de dadores de sangue quer na população em geral?

A resposta é (aparentemente) simples: a expansão mundialmente globalizada da vacinação contra o VHB, o desenvolvimento de testes que possam terminar com o período de janela do vírus e, por fim, a descoberta de novos tratamentos que possam suprimir e destruir o VHB definitivamente.

A união da medicina profilática, de diagnóstico à terapêutica seria, assim, o suporte ideal rumo à erradicação total – num futuro próximo – da doença ocasionada pelo VHB: a Hepatite B.

10 - Referências Bibliográficas

Abbott (1994). *Hepatitis*. Madrid: Abbott científica, S.A.

Alegre, F., Moreno, D., & Quiroga, J. (2004). Acute infection by Hepatitis B virus. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 27(2), 17-25.

Alexander, J., & Kowdley, V. K. (2006). *Epidemiology of Hepatitis B- Clinical Implications*. Obtido em 08 de Dezembro de 2008, de www.medscape.com.

Allain, J.-P. (2004). Occult Hepatitis B virus infection. *Transfusion Clinique Et Biologique*. 11, 18-25.

Allain, J.-P. (2006a). Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. *Journal of Clinical Virology*. 36(S1) , S12-s17.

Allain, J.-P. (2006b). Occult hepatitis B virus infection and transfusion. *Journal of Hepatology*. 44, 617-619.

Allain, J.-P., Stramer, S. L., Carneiro-Proietti, A., Martins, M., da Silva, S. L., Ribeiro, M., et al. (2009). Transfusion-transmitted infectious diseases. *Biologicals*. 1-7.

Almeida, J. D., Rubenstein, D., & Scott, E. J. (1971). New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet*. II, 1225.

Barbara, J. A., Regan, F. A., & Conteras, M. C. (2008). *Tranfusion Microbiology*. Cambridge, Uk: Cambridge University Press.

Blumberg, B. S. (1977). Australia antigen and biology of hepatitis B. *Science*. 197-217.

Boot, H. J., Waaj, L. A., Schirm, J., Kallenberg, C. G., & Wolters, B. (2009). Acute Hepatitis in healthcare worker: A case report of genuine vaccination failure. *Journal of Hepatology*. 50, 426-431.

Candotti, D., & Allain, J.-P. (2009). Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 51(4), 798-809.

Carretero, C., & Herráiz, M. (2004). Chronic Hepatitis B virus infection. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 27(2), 27-32.

Carvalho, C., Neto, S., Leal, J., Mota, P., Moreira, C., Castro, C., et al. (2006a). Vírus da Hepatite : Diagnóstico Laboratorial e Prevenção. *ABO*. 28, 27-33.

Carvalho, C., Neto, S., Mota, P., Moreira, C., Castro, C., & Queirós, L. (2006b). Estudo dos marcadores serológicos do vírus da hepatite B numa população de dadores de sangue. *ABO*. 26, 39-42.

Chang, M.-H. (2007). Hepatitis B virus infection. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 12, 160-167.

Chaves, F. C. (2007). *Biblioteca Hepatologica: Hepatites virais crónicas*. Lisboa: Permanyer Portugal.

Chen, C.-H., Lee, C.-M., Lu, S. N., Changchien, C.-S., Eng, H.-L., Huang, C.-M., et al. (2005). Clinical significance of Hepatitis B virus (HBV) Genotypes and precore and Core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(12), 6000-6006.

Chevaliez, S., & Pawlosky, J.-M. (2008). Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: Antigens, Antibodies and viral genomes. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*. 22 (6), 1031-1048.

Ciorlia, L. A.-S., & Zanetta, D. M. (2005). Hepatitis B in healthcare workers: prevalence, vaccination and relation to occupational factors. *The Brazillian Journal of Infectious Diseases*. 9(5), 384-389.

Coleman, P. F. (02 de 09 de 2006). *Detecting hepatitis B surface antigen mutants*. Obtido em 8 de 12 de 2008, de www.medscape.com.

Cotter, J. (2003). *Hépatites Víricas*. Núcleo de Gastreenterologia dos hospitais distritais.

Datta, S. (2008). An overview of molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) in India. *Virology Journal*. 5, 1-25.

Dodd, R. (1996). *Clinical practice of Transfusion Medicine, 3rd ed.* Churchill Livingstone.

EASL, E. A. (2009). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic Hepatitis B. *Journal of Hepatology*. 50, 227-242.

EASL, E. A. (2003). EASL International Concensus Conference on Hepatitis B. *Journal of Hepatology*. 39, S3-S25.

Fang, Z.-L., Sabin, C. A., Dong, B.-Q., Wei, S.-C., Chen, Q.-Y., Fang, J.-Y., et al. (2009). The association of HBV core promoter double mutations (A1762T and G1764A) with viral load differs between HBeAg positive and ANTI-HBe positive individuals: A longitudinal analysis. *Journal of Hepatology*. 50, 273-280.

Fattovich, G., Bortolotti, F., & Donato, F. (2008). Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *Journal of Hepatology*. 48, 335-352.

Ferreira, C. T. (2004). Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 7(4), 473-487.

Ferraz, M. L. (2007). Vacinação contra hepatite B. *Patologia Médica Laboratorial*. 43(5), 1-3.

Figueiredo, N. C., Page-Shafer, K., Pereira, F. E., & Miranda, A. E. (2008). Marcadores sorológicos do vírus da hepatite B em mulheres jovens atendidas pelo programa de Saúde da família em Vitória do Espírito Santo, 2006. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(6), 590-595.

Fonseca, J. C. (2007). História natural da Hepatite crônica B. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40(6), 672-677.

Fonseca, J. C. (2006). Histórico das Hepatites B e D. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 10 (sup.1), 2-5.

Ganem, D., & Prince, A. M. (2004). Hepatitis B virus infection- Natural History and clinical consequences. *The new England Journal of Medicine*. 350, 1118-1129.

Gilles, J. P., McCollum, R. W., Berdstrom, L. W., & Krugman, S. (1969). Viral hepatitis : Relation of Australia /SH Antigen to the Willowbrook MS-2 Strain. *New England Journal of Medicine*. 119, 281.

Goncalves, J., Lopes, F., & Gonçalves, N. S. (2006a). Perfis Sorológicos Anómalos, Genótipos e Mutantes do VHB. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 10 (sup 1), 23-28.

Gonçalves, N. S., & Cavalheiro, N. d. (2006b). Marcadores Sorológicos da Hepatite B e sua Interpretação. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 10 (sup 1), 19-22.

Gunther, V., Fischer, L., Pult, L., Sterneck, M., & Will, H. (1999). Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Journal of Virology*. 52, 25-137.

Hatzakis, A., Magiorkinis, & Haida, C. (2006). HBV virological assessment. *Journal of Hepatology*. 44, 71-76.

Hemert, F. J., Zaaijer, H. L., Berkhout, B., & Lukashov, V. V. (2008). Occult Hepatitis B infection: An evolutionary scenario. *Virology Journal*. 5, 146.

Imunization Action Coalition "Ask the Experts" Questions relating to health care workers. (2009). Obtido em 27 de Outubro de 2009, de www.immunize.org.

Jardi, R., Rodriguez-Frias, F., Schaper, M., Giggi, E., Taberner, D., Homs, M., et al. (2008). Analysis of Hepatitis B genotype changes in chronic Hepatitis B infection: Influence of antiviral therapy. *Journal of Hepatology*. 49, 695-701.

Jongerijs, J., Van der Poel, C., & Leewen, E. (1998). A simple strategy to look back on posttransfusion Hepatitis B in a multitransfused patient. *Vox Sanguinis*, 75, 66-69.

Kao, J. H., & Chen, D. S. (2002). Global control of Hepatitis B virus infection. *The Lancet- Infectious Diseases*. 2 (7), 395-403.

Kao, J.-H. (2008). Diagnosis of Hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Journal of Gastroenterol Hepatology*. 2(4), 553-562.

Keeffe, E. B., Dieterich, D. T., Steven-huy, B., Jacobson, I. M., Martin, P., Schiff, E. R., et al. (2008). A treatment algorithm for the Management of Chronic Hepatitis B Virus infection in the United States : 2008 Update. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 6 (12), 1315-1341.

Khouri, M. E. ,& Santos,V. A.(2004). HepatitisB: Epidemiological,Immunological, and Serological considerations emphasizing mutation. *Revista Hospitalar Clinica - Faculdade Medicina São Paulo*. 59(4), 216-224.

Kleinman, S. H., & Busch, M. P. (2006). Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk. *Journal of Clinical Virology*. 36 (Suppl.1), s23-s29.

Kupek, E. (2004). Transfusion Risk for Hepatitis B, Hepatitis C and HIV in the State of Santa Catarina, Brasil, 1991-2001. *The Brazillian Journal of Infectious Diseases*. 8(3), 236-240.

Laperche, S. (Fevereiro de 2005). *Blood safety and nucleic acid testing in Europe*. Obtido em 24 de Março de 2006, de www.eurosurveillance.org.

Lavanchy, D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatology*. 11, 97-107.

Lecour, H. (1983). Hepatite Vírica. Epidemiologia e Diagnóstico. *Tese de Doutoramento*.

Lee, W. M. (1997). Hepatitis B virus infection. *Medical Progress*. 337(24), 1733-1745.

Liaw, Y.-F., & Chu, C.-M. (2009). Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 373, 582-592.

Lima, M. L., Rodrigues, G., & Gonçalves, H. (2000). Rastreio do Antígeno HBs na população obstétrica da Mternidade Julio Dinis. *Revista Portuguesa Clinica Geral*. 16(1), 35-42.

Lisotti, A., Greci, C., Caponi, A., & Roda, E. (2008). Chronic hepatitis B in 2008. *Digestive and Liver Disease*. S 2, 3-6.

Lok, A. S.-F. (2000). Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *Journal of Hepatology*. 32(1), 89-97.

Lopes, M. H. (2006). Prevenção da Hepatite B e Delta. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 10 (sup 1), 72-78.

Macedo, G., & Marinho, R. T. (2009). *O essencial sobre hepatite B*. Lisboa: best news.

Mackie, C. O., Buxton, J. A., Tadwalkar, S., & Patrick, D. M. (2009). Hepatitis B immunization strategies. timing is everything. *Canadian Medical Association*. 180(2), 196-202.

Mahoney, F. (1999). Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(2), 351-366.

Marcellin, P. (17 de 03 de 2009). *Hepatitis B and Hepatitis C in 2009*. Obtido em 26 de 03 de 2009, de www.medscape-com.

Marinho, R., Pedro, M., & Ramalho, F. (1998). Vacinação contra hepatite B- oito anos de experiencia. *Acta Médica Portuguesa* .11(11), 971-977.

Méndez, D. K., Barboza, L., & Valles, R. C. (2007). Genotipos de Hepatitis B: Importancia Clínica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 27(1), 349-363.

Mendonça, J. S., & Vigani, A. G. (2006). História Natural da Hepatite B Aguda e Crónica. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.10 (sup 1), 15-18.

Moreira, V. F., & San Roman, A. L. (2005). Portador inativo del virus de la Hepatitis B. *Revist Española de Enfermedades Digestivas*. 97(12), 916.

Moreno, D., Alegre, F., & González, N. G. (2004). Virology, epidemiology and transmission mechanisms of Hepatitis B virus. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 27(2), 7-16.

Mota, A. O., Ferrão, J., & Velez, J. (1989). Marcadores de Hepatite B em funcionarios hospitares. *Jornal do Médico*. 126, 22-30.

Neves, I., Boavida, N., Peres, C., Rodrigues, P., Castro, L., & Nascimento, F. (2009). HBV genotypes in blood donors of Lisbon Regional Blood Centre. *Vox Sanguinis*. 96(1), 84.

Ocama, P., Opio, C. K., & Lee, W. M. (2005). Hepatitis B virus infection : Current status. *The American Journal of Medicine*. 118, 1413.e15-1413e22.

Palumbo, E., Scotto, G., Faleo, G., & Cibeli, D. C. (2007). Prevalence of HBV-genotypes in Immigrants affected by HBV-related Hronic active Hepatitis. *Arq gastroenterol*. 44(1), 55-57.

Passos, A. D., Gomes, U. A., Figueiredo, J. F., Nascimento, M. M., Oliveira, J. M., Gaspar, A. M., et al. (1992). Prevalencia de marcadores sorológicos de hepatite B numa pequena comunidade rural do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 26(2).

Pungpapong, S., Kim, R., & Poterrucha, J. J. (2007). Natural History of Hepatitis B virus infection: An update for Clinicians. *Mayo Clinic Proceedings*. 82, 967-975.

Raimondo, G., Alain, J.-P., Brunetto, M. R., Buendia, M.-A., Chen, D.-S., Colombo, M., et al. (2008). Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 49, 652-657.

Relatório de Consenso e recomendações para o diagnóstico e tratamento das hepatites B e C. (2004). *Jornal Português de Gastreenterologia*. sup.

Sanchez, J. M., & Soler, M. A. (1999). Situacion actual de la atenuacion viral de hemoderivados. *X Congresso de la Sociedad Española de Trnsfusion Sanguinea*. (pp. 91-106). Madrid.

Santos, A., Carvalho, A., & Bento, D. (2000). Prevalência dos marcadores de infecção pelo vírus da hepatite B na população do distrito de Coimbra. *Acta Médica Portuguesa*. 13, 167-171.

Sarmiento, C. (14-15 Novembro 2005). Poster apresentado no I Congresso Nacional de Virologia. *Coimbra*.

Sarmiento, C., Ferreira, C., Almeida, A., Silva, E., & Neto, P. (2009). Molecular Epidemiology of HBV in Portugal. *Vox Sanguinis*. 96(1), 87.

Saúde, Direcção Geral. d. (2004). Plano Nacional de Saúde 2004-2010: mais saúde para todos. *Orientações estratégicas*. 1, 88-216.

Saúde, Ministério d. (Dezembro 2004). Avaliação do Programa Nacional de Vacinação: 2º inquérito serológico nacional. Portugal Continental 2001-2002. *Direcção Geral da Saúde*. 123-158.

Schiff, L., & Schiff, E. R. (1999). *Diseases of liver* (Vol. 3rd.ed). Lippincott Williams & Williams.

Seeger, C., & Mason, W. S. (2000). Hepatitis B virus Biology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. 64(1), 51-68.

Shouval, D., Lai, C.-L., Chang, T.-T., Cheinquer, H., Martin, P., Carosi, G., et al. (2009). Relapse of Hepatitis B in HBeAg-negative chronic Hepatitis B patients who discontinued successful entecavir treatment: The case for continuous antiviral therapy. *Journal Of Hepatology*. 50, 289-295.

Sorrel, M. F., Belongia, E. A., Costa, J., Gareen, I. F., Grem, J. L., Inadomi, J. M., et al. (2009). National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis B. *Annals of Internal Medicine*. 150 (2).

Souto, F. J., Rodrigues, E. N., Fortes, H. M., & Saldanha, A. A. (2006). Soroconversão do Anti-HBs após vacina contra hepatite B em doadores de sangue HBsAg-negativos, Anti-HBc positivos na rede pública de saúde, Mato Grosso, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. 35(3), 205-211.

Specter, S., Hodinka, R. L., & Young, S. A. (2000). *Clinical Virology Manual* (Vol. Third Edition). Herndon, United States of America: ASM Press.

Tengan, F. M., & Araújo, E. S. (2006). Epidemiologia da Hepatite B e D e seu impacto no Sistema de Saúde. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 10 (sup 1), 6-10.

Vaio, T., Santos, A., & Garcia, J. (2004). Epidemiologia e história natural da hepatite B crônica. *Jornal Português Gastreenterologia*. Mai/Jun, 3-108.

Valsamakis, A. (2007). Molecular testing in the diagnosis and management of chronic Hepatitis B. *Clinical Microbiology Reviews*. 20(3), 426-439.

Viso, A. T., & Barone, A. A. (2006). Patogenia da Hepatite B e Delta. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 10(1), 11-14.

Weber, B., Bayer, A., Kirch, P., Schluter, V., Schlieper, D., & Melchior, W. (2006). Improved detection of hepatitis B virus surface by a new rapid automated test. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(8), 2639-2647.

Wei, Y., & Tiollais, P. (1999). Molecular biology of hepatitis B virus. *Clinic Liver Diseases*. 3, 189-219.

Widmann, M., Kluwick, S., Walter, M., Fauchald, G., Howe, J., Bronold, M., et al. (2007). HIV-1, HCV and HBV seronegative window reduction by the new Roche cobas TaqScreen MPX test in seroconverting donors. *Journal of Clinical Virology*. 39, 282-287.

Yuen, M.-F. (2007). Revisiting the Natural History of chronic Hepatitis B: Impact of new concepts on clinical management. *Journal of gastroenterol Hepatology*. 22(7), 973-976.

Zanetti, A. R., Van Damme, P., & Shouval, D. (2008). The Golbal impact of vaccination against Hepatitis B : A historical overview. *Vaccine*. 26, 6266-6273.

Zheng, D.-L., Zhang, L., Cheng, N., Xu, X., Deng, Q., Teng, X.-M., et al. (2009). Epigenetic modification induced by Hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A. *Journal of Hepatology*. 50, 377-387.