

MARINILDE TELES SOUZA

**SOROCONVERSÃO TARDIA DO HBEAG EM PORTADORES DO
SUBGENÓTIPO D4 DO VÍRUS DA HEPATITE B**

SÃO LUÍS

2016

MARINILDE TELES SOUZA

**SOROCONVERSÃO TARDIA DO HBEAG EM PORTADORES DO SUBGENÓTIPO
D4 DO VÍRUS DA HEPATITE B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra. Adalgisa de Souza Paiva Ferreira

Linha de Pesquisa: Investigação Clínica e Laboratorial de Doenças Infecciosas e Parasitárias

SÃO LUÍS

2016

Souza Marinilde Teles

Soroconversão tardia do HBeAg em portadores do subgenótipo D4 do vírus da hepatite B/Marinilde Teles Souza. – São Luís, 2016.

67 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Adalgisa de Souza Paiva Ferreira
Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, 2016.

1. Hepatite B. 2. Soroconversão HBeAg. I. Ferreira, Adalgisa Teles. (Orient.) II. Título.
CDU 616.36-002

MARINILDE TELES SOUZA

**SOROCONVERSÃO TARDIA DO HBEAG EM PORTADORES DO SUBGENÓTIPO
D4 DO VÍRUS DA HEPATITE B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde.

Linha de Pesquisa: Investigação Clínica e Laboratorial de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Data: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dra. Adalgisa de Souza Paiva Ferreira
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Andréa Martins Melo Fontenele
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa
Universidade CEUMA

Prof.^a Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Maria dos Remédios Freitas Carvalho Branco (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Na sua grandiosa bondade agradeço a Deus que me oportunizou essa experiência, pela possibilidade de conviver com todas as pessoas que estiveram envolvidas neste processo e deixaram na minha vida a sua marca, pelos momentos que trouxeram para mim de alguma forma contribuição, aos que me moldaram com novos conhecimentos, melhorando a minha compreensão de mundo.

À Prof.^a Dr.^a Adalgisa de Souza Paiva Ferreira pelo incentivo perseverante, pela confiança que em mim depositou, pelo seu caráter exuberante, admirado em todos os momentos que com ela convivi, também por sua competência profissional notável e singular, que nos oportuniza uma orientação plenamente segura, visto que a sua responsabilidade pessoal a faz devotar em prol do cumprimento do seu papel, como só uma grande mestra o faria.

Ao Dr. Manuel Faria, pessoa com quem tenho o privilégio de conviver devido à labuta diária, pela confiança que sempre depositou no meu trabalho, por todas as contribuições dadas, segundo a generosidade existente no homem de caráter e humor refinado, que muito admiro, meu imenso agradecimento.

À minha família, sem a qual nada disto teria sido possível, aos meus irmãos Willame Teles, Raquel Teles, Washington Teles, Vicente Teles, Wellington Teles, aos meus sobrinhos Talita Teles, Willian Teles, Eva Teles, minha cunhada Ellen Lopes e a minha mãe, Maria Celeste Teles, pessoa simples, mas grande lutadora pelos filhos, que soube a seu modo assumir a responsabilidade maeterna.

Ao biólogo Max Diego Cruz Santos pela disponibilidade em contribuir com suas habilidades profissionais, assim como por toda colaboração dada a esta pesquisa.

A companheira de turma do mestrado, que esteve comigo no passo a passo desta caminhada Ingrid de Campos Albuquerque que de muitas formas colaborou com a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

Ao companheiro de viagem de campo, colaborador Jomar Diogo Costa Nunes, a toda equipe de pesquisadores do projeto que deu origem a este trabalho, assim como a professora Lena Maria Barros Fonseca e aos participantes da pesquisa em cada um dos municípios em que foi realizada.

As amigas Adriana Guimarães Sá e Anilde Carvalho Costa, pelo incentivo, disponibilização do seu tempo e por toda contribuição dada.

Ao Dr. João Batista Santos Garcia meu estimado coordenador do Centro de Pesquisa Clínica, porque sei que de alguma forma sonhou comigo este sonho que aqui se realiza.

À Enfermeira e querida amiga irmã, Patrícia Ribeiro Azevedo, gratidão pelo apoio em toda caminhada que se iniciou com a graduação, por toda contribuição dada e por sua permanente disponibilidade quando lhe é solicitada.

Aos profissionais do Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC) que acolheram este trabalho, local que foi a base de planejamento e execução de grande parte das tarefas desta pesquisa. Agradeço também às instituições de fomento e ao Programa de pós-graduação Ciências da Saúde.

A todos que deram contribuições e sei que tudo teve a sua importância, embora não mencionado nesta formulação por falha minha, receba o meu muito obrigada!

RESUMO

Introdução: O vírus da hepatite B (VHB) apresenta diversidade do seu genoma, o que o faz ser classificado em diferentes genótipos e subgenótipos (A-J). Tem sido demonstrado que os diversos genótipos estão relacionados com a história natural da infecção. A manutenção da replicação viral pode ser um dos fatores relacionado aos genótipos. **Objetivos:** Identificar o estado de replicação viral do VHB entre portadores dos subgenótipos A1 e D4. **Materiais e métodos:** Foram estudados portadores do VHB identificados em dois estudos que envolveram indivíduos provenientes do estado do Maranhão, nordeste do Brasil, que tinham determinação de genótipos e subgenótipos, sorologias para o HBeAg e anti-HBe e cargas virais determinadas. Sorologias foram realizadas por ELISA, VHB-DNA quantificado por PCR em tempo real e genotipagem realizada por sequenciamento. **Resultados:** Foram identificados 146 portadores. Dentre estes, 136 eram subgenótipo A1 ou D4. Sendo 85 - A1 (62,5%) e 51 - D4 (37,5%). Não houve diferença entre os grupos quando foi avaliado idade (42 ± 12 vs 38 ± 17 $p=0,11$) ou gênero (masculino 48,5% vs 51,5% $p=0,18$). Entre os portadores do subgenótipo D4 havia mais indivíduos com HBeAg positivo (23,5% vs 9,4%, $p=0,02$) e maior proporção de portadores de cargas virais acima de 20.000 UI/ml (43,1% vs 12,9% $p<0,0001$), mesmo quando avaliados apenas aqueles com HBeAg negativos (25,6% vs 6,5% $p=0,007$), quando comparados com os de subgenótipo A1. **Conclusão:** Portadores do VHB, subgenótipo D4, quando comparados com subgenótipo A1 apresentam soroconversão mais tardia do HBeAg e maiores níveis de VHB-DNA, sugerindo que esse subgenótipo possivelmente está relacionado com potencial para doença mais grave e maior facilidade de transmissão da infecção.

Palavras-chaves: Hepatite B. Soroconversão HBeAg. Subgenótipo D4.

ABSTRACT

Introduction: The hepatitis B virus (HBV) present diversity of its genome, which is to be classified in different genotypes and subgenotypes (A-J). It has been demonstrated that different genotypes are related to the natural history of infection. The maintenance of viral replication could be one of the factors related to genotypes. **Objectives:** To identify the viral replication status of HBV carriers among the subgenótipos A1 and D4. **Materials and methods:** HBV carriers identified have been studied in two studies involving individuals from the state of Maranhão, northeast, Brazil, which had genotyping and subgenotypes, serology for HBeAg and anti-HBe and certain viral loads. Serological tests were performed by ELISA, HBV – DNA quantification real time PCR and genotyping performed by sequencing. **Results:** We identified 146 patients. Among these, 136 were subgenotype A1 or D4. It is 85 - A1 (62.5%) and 51 - D4 (37.5%). No difference was found between groups when age was evaluated (42 ± 12 vs 38 ± 17 $p=0.11$) or gender (male 48.5% vs 51.5% $p=0.18$). Among the D4 subgenotype carriers had more patients with HBeAg positive (23.5% vs 9.4%, $p=0.02$) and a higher proportion of patients with viral loads above 20.000 IU / ml (43.1% vs 12.9% $p < 0.0001$), even when only those with negative HBeAg (25.6% vs 6.5%, $p=0.007$) when compared with the A1 subgenotype. **Conclusion:** HBV carriers, subgenotype D4, compared to A1 subgenotype have delayed HBeAg seroconversion and higher levels of HBV – DNA, suggesting that this subgenotype is possibly related to the potential for more severe illness and greater ease of transmission of infection.

Keywords: Hepatitis B. HBeAg Seroconversion. Subgenotype D4.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT/TGP	Alanina aminotransferase/transaminase glutâmica pirúvica
AST/TGO	Aspartato aminotransferase/transaminase glutâmica oxalacética
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do core do vírus da hepatite B
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno e do vírus da hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
CEPEC	Centro de Pesquisa Clínica do HU-UFMA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAPEMA	Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão
HBcAg	Antígeno do core do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno e do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HCC	Hepatocarcinoma
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IGG	Imunoglobulina da classe G
IGM	Imunoglobulina da classe M
LACEN	Laboratório Central do Estado
LGHTFM/USP	Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical da Faculdade de Medicina da USP
MI	Mililitro
MS 2	Transmissão parenteral
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
NANB	Hepatite não A não B
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPSUS	Programa Pesquisa para o SUS
SUS	Sistema Único de Saúde
UI/ml	Unidades Internacionais por mililitro
UNODOC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime
VHB	Vírus da Hepatite B

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura do Vírus da Hepatite B.....	16
Figura 2 – Esquema do ciclo de replicação do VHB	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	História das hepatites virais	12
2.2	Hepatite B	13
2.2.1	Epidemiologia	13
2.2.2	Vírus da hepatite	15
2.2.3	Marcadores sorológicos na infecção pelo VHB	17
2.2.4	Diagnóstico da infecção pelo VHB	18
2.2.5	História natural da infecção crônica	18
2.2.6	Genótipos do VHB	20
2.2.7	Replicação viral	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo Geral	24
3.2	Objetivos Específicos	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Estudos	25
4.1.1	Estudo 1	25
4.1.2	Estudo 2	25
4.2	Amostra estudada	27
4.3	Análise estatística	27
4.4	Considerações éticas	27
5	RESULTADOS	29
5.1	Artigo original	29
6	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXOS	51

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite B (VHB) é uma das principais causas de hepatite aguda e crônica e das suas complicações a longo prazo. Estimativas indicam que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com o vírus da hepatite B e que essas pessoas estão em maior risco de desenvolver descompensação hepática, cirrose e hepatocarcinoma (HCC) (LAZAREVIC, 2014; ALEXOPOULOU, KARAYIANNIS, 2014).

Cerca de um milhão de pessoas morrem por ano em consequência de complicações hepáticas relacionadas ao VHB. A partir da infecção aguda pelo VHB, o risco de progressão para cronicidade está relacionado com a idade da infecção, correspondendo a 5% em adultos e quase 95% das crianças que tornam-se portadoras crônicas nascidas de mães cronicamente infectadas (LAZAREVIC, 2014; ALEXOPOULOU, KARAYIANNIS, 2014).

Fatores associados ao vírus como manutenção da replicação, carga viral, genótipos e mutações específicas já foram identificados e associados à progressão da doença, dessa forma, a identificação desses fatores na infecção crônica pelo VHB é de grande importância para estimar fatores potenciais na evolução da doença (SUNBUL, 2014).

Elemento que tem sido considerado como o principal mecanismo de progressão da fibrose hepática, bem como a progressão para HCC é a replicação viral. Indivíduos com HbeAg positivo e/ou carga viral maior que 2000 UI/ml, que significam manutenção da replicação viral (MCMAHON, 2010) têm mostrado maior gravidade da doença (LAPALUS et al., 2015).

Há evidências na literatura de que determinados genótipos do VHB podem estar relacionados com maior gravidade da doença (TANGKIJVANICH et al., 2005; RONCATO, BALLARDIN, LUNGE, 2008; HADZIYANNIS, 2011). Como a manutenção da replicação viral é um fator preditivo de progressão para doença mais grave, é importante determinar se há relação entre os genótipos do VHB e manutenção da replicação viral na infecção crônica.

Como estudo anterior com portadores desse vírus no Maranhão demonstrou uma frequência inesperada de um genótipo africano (D4) (BARROS et al., 2014), ainda pouco descrito no Brasil e pouco estudado no mundo, há

necessidades de se avaliar portadores do VHB provenientes do Estado, para identificar fatores associados a prognóstico nos diferentes genótipos identificados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 História das hepatites virais

Informações contidas na literatura chinesa demonstram que a hepatite é uma doença conhecida desde a antiguidade, visto que já faziam referência à ocorrência de icterícia entre sua população há mais de cinco mil anos na Babilônia e surtos de icterícia foram relatados há mais de 2.500 anos (REUBEN, 2002; FONSECA, 2010).

Em carta do papa Zacharias ao arcebispo São Bonifácio, de Mainz (Alemanha), foi relatado no ano de 752 ocorrências de um surto de icterícia contagiosa entre residentes da cidade. Informava também que estava recomendando quarentena aos moradores ictericos, como forma de evitar a doença (REUBEN, 2002; FREITAS, 2009).

A descrição mais antiga de uma epidemia causada pelo vírus da hepatite B foi feita por Lurman em 1885. Em Bremen, entre 1883 e 1889, um surto de varíola ocorreu e empregados das docas foram vacinados com linfa de outras pessoas. Após várias semanas, 191 dos trabalhadores vacinados ficaram doentes com icterícia e foram diagnosticados como sofrendo de hepatite do soro (PASSOS, 2003).

Quando os testes sorológicos para a identificação dos vírus da hepatite A e B tornaram-se disponíveis, a partir de 1970, a etiologia de hepatite, associada à transfusão sanguínea, ainda era desconhecida. Os pacientes transfundidos acometidos de hepatite com etiologia desconhecida eram referidos como portadores de hepatite não A não B (NANB), em virtude de apresentarem resultados sorológicos negativos para os marcadores das hepatites A e B (PASSOS, 2003).

Em 1947, o termo hepatite B foi introduzido para definir a hepatite de transmissão parenteral, hepatites soro-homóloga, hepatite sérica, hepatite de transmissão parenteral (MS-2) e hepatite de longo período de incubação (MILICH, LIANG, 2003).

No estudo da Hepatite B, o passo primordial foi dado por Baruch Blumberg, em 1963, que detectou no soro de um aborígene australiano, a presença de um novo antígeno, que recebeu a denominação de antígeno Austrália, o qual reagia ao entrar

em contato com o soro de hemofílicos transfundidos de pacientes leucêmicos (BLUMBERG, ALTER, VISNICH, 1965).

A partícula viral íntegra foi visualizada pela primeira vez por Dane et al., em 1970 e assim denominada “partícula de Dane”, também foi identificada como agente etiológico da hepatite B. No ano seguinte, Almeida et al., (1971), caracterizaram o antígeno Austrália como componente da superfície do vírus dando origem a sua denominação atual, antígeno de superfície do vírus da hepatite B.

A identificação do (HBsAg) como antígeno Austrália, do antígeno do core do vírus da hepatite B ou HBcAg e dos anticorpos anti-HBc e anti-HBs deram um incentivo ao estudo sobre a hepatite B nos Estados Unidos, incluindo pesquisas dos marcadores de infecção pelo VHB em doadores de sangue (GONÇALES JÚNIOR, 2009).

2.2 Hepatite B

2.2.1 Epidemiologia

A infecção pelo VHB constitui um relevante problema de saúde pública. Embora progressos notáveis em relação à doença tenham ocorrido nas últimas décadas com relação ao diagnóstico, tratamento e prevenção, ela se mantém como um grave problema no Brasil e no mundo (MIRANDA, PASSOS, FIGUEIREDO, 2000; BRASIL, 2008).

Esta infecção apresenta um amplo impacto pessoal, econômico e social uma vez que mais de dois bilhões de indivíduos vivos, o equivalente a um terço da população mundial, já foram infectados pelo vírus da hepatite B em algum momento de suas vidas e cerca de 350 milhões permanecem cronicamente infectados. Destes, 75% habitam em regiões da Ásia (Índia, Indonésia e Tailândia) e Pacífico (Filipinas, Samoa e Ilhas Salomão) (LAVANCHY, 2004; FONSECA, 2007; CAREY, ELGOUHARI, TAMIMI, 2008, LIAW, CHU, 2009; CDC, 2015).

É uma doença potencialmente grave, que pode causar um a dois milhões de mortes por ano. Embora seja uma doença imunoprevenível, esta infecção continua

a ser um sério problema de saúde pública principalmente em países em via de desenvolvimento (ALMEIDA et al., 2010; LOPES, SCHINONI, 2011).

As taxas de prevalência pelo VHB se apresentam bem diferentes ao redor do mundo, variando desde 0,1% até 20%. Quando menos de 2% da população é acometida, a região é considerada de baixa prevalência, corresponde às áreas que representam 12% da população mundial e incluem Europa Ocidental, Estados Unidos, Canadá, Austrália e Nova Zelândia.

A prevalência intermediária é definida entre 2% a 7% e inclui os países do Mediterrâneo, Japão, Ásia Central, Oriente Médio e América Latina e América do Sul, o que representa aproximadamente 43% da população mundial. Nas áreas de alta prevalência, ocorrem taxas maiores ou iguais a 8% e incluem o Sudeste da Ásia, China e África Subsaariana.

As diversas taxas de prevalência estão provavelmente relacionadas com as diferenças de idade em que é adquirida a infecção (fator que determina a taxa de cronificação). Quando o indivíduo é infectado durante o nascimento, a taxa de cronificação fica em torno de 90% e é tão baixa quanto 5% (ou menos) para indivíduos infectados na vida adulta (STEVENS et al., 1975; WASLEY, GRYTDAL, GALLAGHER, 2008).

A incidência de novos casos da infecção diminuiu na maioria dos países desenvolvidos, provavelmente devido à implantação de estratégias de vacinação (RANTALA,VAN DE LAAR, 2008; MOHR,BOESECKE, WASMUTH, 2014).

No Brasil, as taxas de prevalência são heterogêneas, sendo a região Amazônica e parte de alguns estados do sul e do sudeste consideradas zonas de alta e média endemicidade e demais regiões, com índices baixos, semelhantes à América do Norte e Europa Ocidental (BRASIL, 2005; NUNES; LACET, 2009).

Recentemente, foi realizado nas capitais brasileiras um inquérito nacional para identificar a prevalência das hepatites virais, por meio de uma parceria entre o Ministério da Saúde com diversas instituições de ensino e de saúde, onde os resultados demonstraram que a prevalência geral da infecção crônica pelo VHB foi de 0,37% (BRASIL, 2011). Este estudo foi determinante para que a OMS (Organização Mundial de Saúde) considerasse o país como sendo uma região de baixa endemicidade (OTTA et al., 2012).

Os dados do inquérito tiveram resultados semelhantes a alguns estudos brasileiros realizados a partir da década de 1990, que demonstraram mudanças na

endemicidade da infecção pelo vírus B da hepatite. Este fato, provavelmente deve estar atrelado à instituição da vacinação universal contra hepatite B para menores de um ano em 1998 e à posterior ampliação desta faixa etária para menores de 20 anos a partir de 2001 (BRASIL, 2009). Até 2012, essa vacina era preconizada para faixa etária até 29 anos, entretanto em 2013, o Ministério da Saúde amplia a vacinação para hepatite B para a faixa etária entre 30 a 49 anos (BRASIL, 2013).

A transmissão do VHB pode ocorrer por via sexual, parenteral, em procedimentos como transfusão de sangue, hemodiálise, compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas pelo VHB entre usuários de drogas, acidentes com perfuro cortantes, por exposição percutânea em tatuagens, piercings, procedimentos odontológicos e cirúrgicos, quando realizados sob condições precárias. Pouco frequente por via vertical (de mãe para filho), perinatal que ocorre, sobretudo, durante o parto devido exposição do recém-nascido a sangue ou líquido amniótico (BRASIL, 2010; MELO, ISOLANI, 2011).

Em áreas de baixa e média prevalência, a via sexual é a forma mais comum de transmissão do VHB, sendo responsável por metade dos casos. Em 15% dos pacientes a aquisição da infecção está relacionada ao uso de drogas injetáveis ilícitas. Já nas regiões hiperendêmicas (mínimo de 8% da população infectada), a transmissão do vírus ocorre no momento do nascimento (transmissão vertical) ou na infância (STEVENS et al., 1975; CAREY, 2009; MANDEVILLE et al., 2009).

2.2.2 Vírus da hepatite B

O vírus da hepatite B é considerado altamente infectivo e sabe-se que apenas uma partícula viral é capaz de infectar o ser humano. O VHB inicialmente circula no sangue e replica-se nos hepatócitos com uma produção de vírions em torno de 10^{11} cópias/ml/dia, enquanto o vírus da hepatite C (VHC) e da Imunodeficiência (HIV), próximo de 10^9 cópias/ml/dia. O VHB é estável e resistente ao meio ambiente, sobrevivendo até uma semana fora do corpo humano. No plasma, a vida média do VHB varia de 1 a 3 dias, enquanto nos hepatócitos, pode variar de 10 a 100 dias. O período de incubação varia de 6 a 8 semanas (LOPES, SCHINONI, 2011).

Da família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*, o VHB humano é um pequeno vírus cuja partícula viral apresenta 42 nm de diâmetro, composto por um envelope lipídico, onde existem várias proteínas de superfície, e pelo nucleocapsídeo.

O nucleocapsídeo abriga o material genômico viral, composto por duas fitas de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) de extensões diferentes, com aproximadamente 3200 pares de base. A fita longa ou L (-) detém toda a informação genética e está covalentemente ligada à polimerase viral. A fita curta ou S (+) tem sequências que cruzam com as terminações da fita longa sem necessidade de ligações covalentes, levando a uma configuração circular (ALVARIZ, 2006).

A partícula viral íntegra compreende externamente um envelope proteolipídico de 7 nm de espessura, composta principalmente por antígeno de superfície do vírus (HBsAg). Internamente, possui uma cápsula proteica denominada core que mede 27 nm de diâmetro, constituído pelo antígeno do core (HBcAg), que não é secretado pela corrente sanguínea, encontrando-se mais abundante nos hepatócitos (FIGURA 1). No interior do core, encontra-se o DNA viral, a proteína DNA Polimerase (proteína P) e o antígeno nuclear do VHB, o HBeAg. O HBeAg não faz parte da estrutura do VHB, encontra-se solúvel no soro, mas é sintetizado a partir do mesmo gene que codifica a proteína do core (FRIAS, JARDI, 2008; NOVA, 2010).

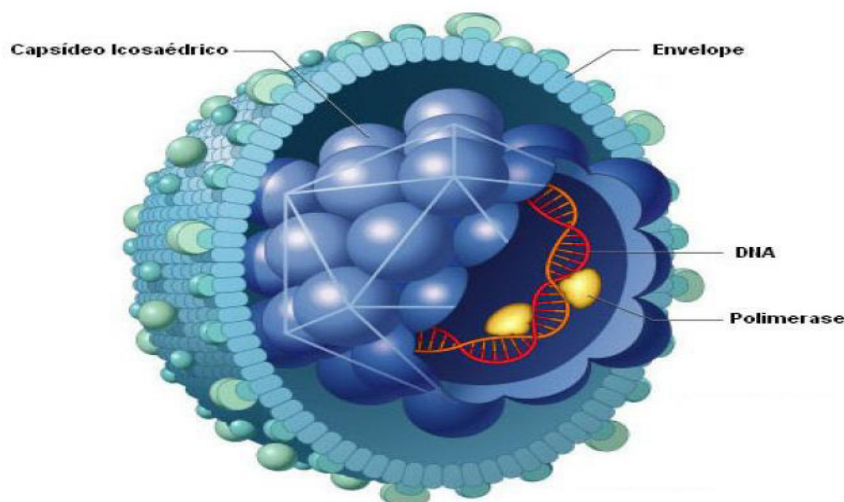


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura do Vírus da Hepatite B.

Fonte: BRASIL, 2010.

No soro dos indivíduos infectados pelo VHB, além da partícula de Dane, encontram-se outras duas formas distintas de partículas virais incompletas não infecciosas, uma com forma esférica, outra filamentosa, ambas apresentam diâmetro de 22 nm, sendo que a filamentosa possui comprimento variável. A natureza não infecciosa das partículas incompletas justifica-se pelo fato de serem compostas

exclusivamente por HBsAg, não apresentam core, polimerase e DNA (FRIAS, JARDI, 2008; NOVA, 2010).

2.2.3 Marcadores sorológicos na infecção pelo VHB

O primeiro marcador sorológico a aparecer no curso da infecção pelo VHB é o antígeno de superfície, o HBsAg, que pode ser detectado em torno de 30 a 45 dias após a infecção, permanecer detectável por média de 120 dias e posteriormente desaparecer por volta dos três meses do início da infecção. Em caso de sua permanência positiva além do sexto mês, o indivíduo é classificado como portador crônico (KIRSCHBERG et al., 2004; BRASIL, 2007; LIANG, 2009).

O HBeAg, que é uma proteína do núcleo capsídeo viral, é o segundo antígeno detectado. Este marcador está relacionado à replicação viral ativa e a alto risco de transmissão. O HBeAg permanece positivo entre 3-6 semanas (período em que há maior risco de transmissão) e a sua persistência está associada à evolução para infecção crônica. Este marcador é particularmente útil para determinar o risco em crianças nascidas de mães infectadas (crianças nascidas de mães HBeAg positivas apresentam um risco de 90% para desenvolverem infecção crônica pelo VHB). O anticorpo Anti-HB e aparece em 90 a 95% dos pacientes que tem HBeAg positivos, entre 2 a 3 semanas após o desaparecimento deste antígeno. A presença deste anticorpo constitui o primeiro sinal de recuperação e indica redução do risco de contágio (TONG et al., 2005).

O antígeno HBcAg não é encontrado no sangue periférico (LIBERATO, OLIVEIRA, CABRAL, 2002), mas está presente nos hepatócitos (BONINO, BRUNETTO, 2003). Seu anticorpo (anti-HBc) aparece logo após o HBsAg. Sua fração anti-HBc da classe IgM é um indicador de infecção recente, podendo permanecer detectável por até seis meses, mas também pode ser detectado em alguns indivíduos na forma crônica, particularmente no período de reativação (FERREIRA, 2000). Já a sua fração anti-HBc IgG é um marcador de infecção pregressa (GONÇALES JÚNIOR, 2009).

Se o indivíduo elimina o vírus, o último anticorpo a aparecer é o anti-HBs, cerca de duas semanas após o desaparecimento do HBsAg e permanece positivo por toda a vida (MOREIRA, 2006).

2.2.4 Diagnóstico da infecção pelo VHB

De forma geral, o diagnóstico da infecção pelo VHB é realizado pela pesquisa dos marcadores sorológicos da infecção viral, HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe e anti-HBc frações IgG e IgM. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) são frequentemente empregados e baseiam-se na interação entre epitopos das proteínas virais e seus respectivos anticorpos específicos. No tecido hepático, o HBsAg e o HBcAg podem ser detectados por meio de técnicas moleculares, como hibridização *in situ* (COLLIER, OXFORD, 2000). Os marcadores sorológicos vão sugerir a fase da infecção (aguda, crônica ou de resolução) (LIANG, 2009; SCHILDGEN, 2009; LEE et al., 2010).

Além do diagnóstico sorológico, é importante a realização de testes moleculares para detecção da carga viral. O teste mais utilizado atualmente é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real que identifica o genoma viral, que pode ser quantificado (carga viral do VHB-DNA, descrito em UI/ml) (LIU et al., 2006; SITNIK et al., 2010; GUIRGIS, ABBAS, AZZAZY, 2010). Outros testes importantes que contribuem no diagnóstico da doença são as aminotransferases (ALT/TGP e AST/TGO), alanina aminotransferase/transaminase glutâmico-pirúvica e aspartato aminotransferase/transaminas e glutâmico-oxalacética, embora não sejam específicas para nenhum tipo de hepatite, estas enzimas são indicadores sensíveis e marcam sinais de atividade necroinflamatória hepática, já identificáveis desde o período prodrômico, os níveis podem flutuar com o tempo. Normalmente, as concentrações de a ALT são mais elevadas do que as da AST, mas com a progressão da doença, a razão AST/ALT pode ser invertida na fase crônica. Associadas a outros marcadores, contribuem na tomada de decisão clínica (BRASIL, 2005; WHO, 2015).

2.2.5 História natural da infecção crônica

A hepatite B pode se apresentar sob diferentes formas: de autolimitada sem sintomas, hepatite clássica benigna até hepatite fulminante nas formas agudas e crônicas com manifestações diversas, que vão desde o portador assintomático até sintomas graves da cirrose hepática e/ou HCC podendo levar a óbito (LIANG, 2009; WASMUTH, 2009).

O período de incubação da infecção, que vai desde a exposição ao VHB até o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas da doença, varia de 50 a 180 dias, com um tempo médio de 70 dias. Após este tempo, inicia-se o chamado período prodrômico (pré-ictérico), durando vários dias e se caracterizando pelo aparecimento de fraqueza, anorexia e mal-estar geral. Nesta fase, os doentes podem sentir dores abdominais difusas, náuseas, intolerância a vários alimentos, desconforto abdominal e vômitos. O aparecimento de icterícia, com colúria e hipocolia fecal (período ictérico), ocorre em somente 20% dos doentes, sendo a hepatite B uma doença assintomática no restante dos casos (PAULA et al., 2015).

O curso natural da infecção crônica pelo vírus B pode ser dividido em até quatro fases:

Fase I: considerada a primeira fase da doença, é chamada de imunotolerância, ocorre geralmente após o período de transmissão perinatal e é caracterizada pela presença do HBsAg e HBeAg com níveis elevados de carga viral (VHB-DNA 10^{5-10} cópias por mL), ALT normal, pouca ou nenhuma atividade necroinflamatória com fibrose ausente ou mínima na biópsia hepática e curso assintomático (FERREIRA, BORGES, 2007; FONSECA, 2007; MOHR, BOESECKE, WASMUTH, 2014).

Fase II: na fase imunoativa ou de hepatite crônica, ocorre uma reação inflamatória, com efeito citopático, caracterizada pela presença no soro do HBeAg ou do anti-HBe⁺ com carga viral elevada e ALT elevada demonstrando agressão hepatocitária (LAVANCHY, 2004). Quando mais tempo o indivíduo permanece nessa fase, maior a chance de evoluir para cirrose hepática (FONSECA, 2007; LOPES, SCHINONI, 2011).

Fase III: na terceira fase ou fase não replicativa (portador inativo do VHB), nota-se a presença no soro de HBsAg, anti-HBe, títulos baixos ou indetectáveis de VHB-DNA, ALT normal, mínima lesão histológica hepática, curso assintomático e de bom prognóstico (WRIGHT, 2006). Cerca de 10% a 20% dos portadores inativos apresentam fenômenos de reversão, caracterizado pelo reaparecimento do HBeAg (previamente HBeAg negativo e anti-HBe positivo). A reversão tem quadro acompanhado usualmente de elevação da ALT em razão do processo de reativação inflamatória do fígado (CHU, LIAW, 2007).

Fase IV: fase de reativação considerada por alguns autores como a quarta fase de infecção pelo VHB. A reativação do vírus B caracteriza-se pelo

reaparecimento da atividade necroinflamatória do fígado em pessoas portadoras inativas do VHB ou que tenham recebido diagnóstico de hepatite B resolvida (infecção prévia pelo VHB, sem sinais virológicos, bioquímicos ou evidência histológica de doença ativa viral) (LOK, MCMAHON, 2007). Estes pacientes são em geral, portadores de mutantes do vírus B (com mutação nas regiões pré-core e promotora do core do genoma viral) que deletam a expressão de HBeAg e mesmo tendo o anti-HBe positivo apresentam altas cargas virais. São hoje denominados portadores de hepatite crônica B HBeAg negativa (FERREIRA, BORGES, 2007).

2.2.6 Genótipos do VHB

O genoma do VHB apresenta diversidades que permite sua classificação em genótipos. Por meio de análise filogenética, são identificadas as divergências de sequência que ocorrem no genoma completo ou em genes específicos, de forma que variações acima de 8% no genoma total, ou acima de 4% no gene do antígeno de superfície (HBsAg) caracterizam diferentes genótipos. Atualmente, existem já identificados 10 genótipos, classificados de A-J (TATEMATSU et al., 2009; YU et al., 2010; AGARWAL et al., 2015).

Além disso, múltiplos subgenótipos também já foram identificados dentre os genótipos (quase 40), com mais de 4% e menos do que 7,5% de divergências sobre o genoma completo (KRAMVIS et al., 2008; POURKARIM et al., 2010, MINA et al., 2015).

Os genótipos têm distribuição geográfica variada e além do aspecto epidemiológico, sua heterogeneidade parece estar relacionada com diferenças na evolução clínica da infecção e na resposta ao tratamento antiviral. Alterações na estrutura genética do VHB, portanto, podem resultar em diferentes níveis de patogenicidade viral (RONCATO, BALLARDIN, LUNGE, 2008; MOTA, AREIAS, CARDOSO, 2011).

Cada genótipo é caracterizado por uma distribuição étnica e geográfica distinta, em todo mundo (POURKARIM et al., 2014). O genótipo A é prevalente no noroeste da Europa, América do Norte e África. Os genótipos B e C são comumente encontrados na Ásia, ao passo que o genótipo D mostra uma distribuição mundial, mas predomina na região do Mediterrâneo, incluindo o Oriente Médio e centro da Ásia. O Genótipo E é encontrado na região ocidental de África, o genótipo F está presente

na população indígena da América do Sul e o genótipo H é encontrado na população indígena da América Central (NORDER et al., 2004). Genótipo G foi inicialmente isolado em portadores de VHB na França e na Geórgia (Estados Unidos) e depois foi detectada nos Estados Kingdom, Italy e Alemanha. Recentemente o genótipo I do VHB foi descrito no noroeste da China, Vietnã e Laos (OLINGER et al., 2007; YU et al., 2010; MELLO et al., 2014).

No Brasil predomina o genótipo A seguido pelos genótipos D e F (MELLO et al., 2014). As regiões com maior frequência do genótipo A, são as regiões norte, nordeste e sudeste, enquanto o genótipo D é mais frequente na região sul e o F na Amazônia (MELLO et al., 2007). Os genótipos B e C também já foram identificados no Brasil em baixa prevalência, provavelmente refletindo o baixo percentual de descendentes asiáticos nos estados brasileiros (SITNIK et al., 2004).

A presença destes genótipos reflete a mistura de culturas no Brasil: Índio americano, Europeu e Africano, raízes ancestrais mostrando o país como um importante modelo para estudos de genética de populações, sugerindo uma influência do padrão de imigração para cada região (ALCADE et al., 2009).

Relatos de distribuição dos subgenótipos ainda não são tão frequentes no Brasil, mas sabe-se que são mais frequentes o A1 e o D3 (ALVARADO-MORA; PINHO, 2013). Mais recentemente foi descrito o subgenótipo D4 (africano no Maranhão) (BARROS et al., 2014).

Além da importância epidemiológica, há relação entre os vários genótipos e evoluções clínicas em portadores do VHB. Estudos prospectivos com adultos demonstraram 3 a 5 vezes maior risco de desenvolver cirrose hepática e HCC nos portadores do genótipo C, comparado com os portadores de outros genótipos (CHAN et al., 2004; YU et al., 2005). Foi ainda demonstrado que pacientes com genótipo B tem maior probabilidade de soroconversão do HBeAg que portadores do genótipo C (YUEN et al., 2004), com a soroconversão ocorrendo entre 9 e 10 anos antes (YUEN et al., 2004; LIN, KAO, 2008).

Devido a essa característica, os portadores do genótipo C apresentam altos níveis de replicação viral por longo tempo, evoluindo com hepatite mais ativa e grave e maior progressão para cirrose (CHU, HUSSAIN, LOK, 2002; GONCALES, GONCALES, 2006; PUNGPAPONG et al., 2007; FATTOVICH, BORTOLOTTI, DONATO, 2008). No estudo de Suzuki et al., (2005) observaram que a persistência da infecção foi maior nos pacientes portadores do genótipo A (23%), comparados com

os portadores dos genótipos B (11%) e C (7%). Já, estudos europeus, em que 80% dos pacientes crônicos portavam o genótipo A versus 11% do D (subgenótipos europeus), mostraram que portadores do genótipo D apresentavam maior atividade de agressão hepática com fibrose avançada quando comparados com o A (subgenótipo A1), enquanto a taxa de soroconversão do HBeAg no genótipo A era maior e mais sustentada (A 55% versus 32% D) (SANCHEZ-TAPIAS et al., 2002; SUMI, et al., 2003). Apesar destas evidências, ainda existem muitas dúvidas em relação ao real papel dos genótipos e subgenótipos do VHB na evolução da infecção.

2.2.7 Replicação viral

A replicação viral é definida como: presença do HBeAg positivo ou HBeAg negativo, anti-HBe positivo e com cargas virais acima de 2000 UI/ml, como verifica-se na Figura 2. A parada da replicação normalmente é acompanhada por uma diminuição na atividade inflamatória (LIAW, 2002; KAMIJO et al., 2015).

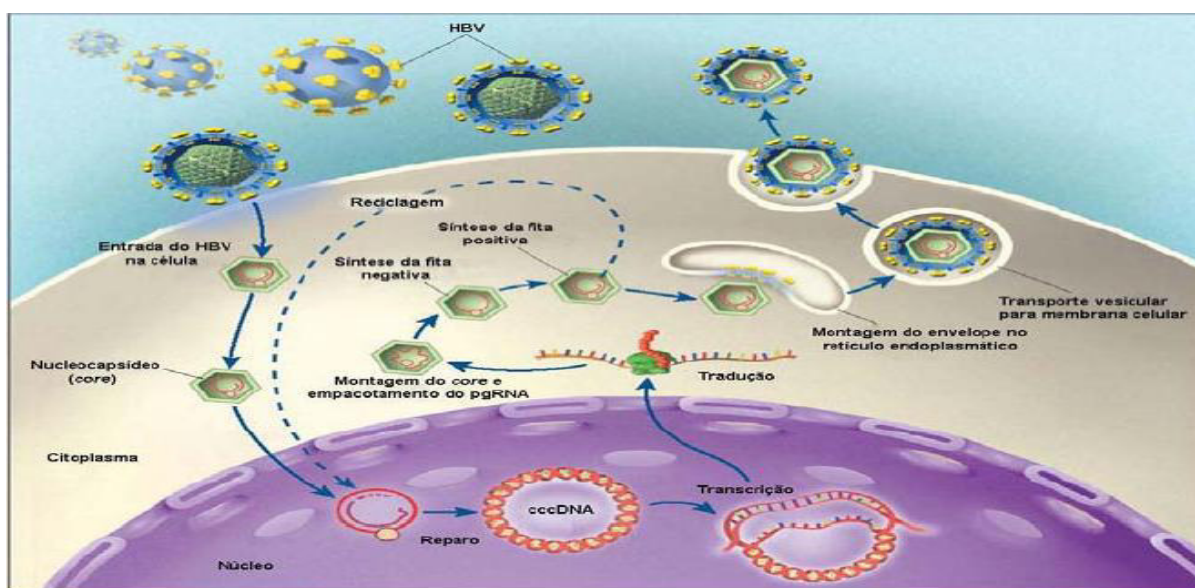


Figura 2 – Esquema do ciclo de replicação do VHB.

Fonte: Adaptada de Ganem; Prince (2004).

O portador crônico da infecção mantém a replicação viral se houver a presença do HBeAg, ou se houver a soroconversão para o anti-HBe com manutenção de carga viral elevada. Esta situação pode ocorrer em cerca de 30% dos portadores crônicos do VHB (MCMAHON, 2010; KAMIJO et al., 2015).

São poucas as publicações relacionando a replicação viral com os demais genótipos do VHB. Estudo envolvendo o subgenótipo D4 (subgenótipo africano) recentemente encontrado no Maranhão (BARROS et al., 2014) sugeriu possibilidade de haver maior frequência da presença do HBeAg e consequente manutenção da replicação viral do VHB. Não foi possível naquele estudo, identificar se esse subgenótipo apresentava cargas virais mais elevadas. Assim, foi idealizado esse estudo, envolvendo uma amostra maior de portadores para avaliar estas hipóteses.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar marcadores de replicação viral associados aos mais frequentes genótipos do vírus em portadores do VHB.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar indivíduos com replicação viral (portadores do HBeAg positivo ou HBeAg negativos com carga viral maior que 2000 UI/ml);
- Correlacionar a frequência da replicação viral com os mais frequentes genótipos do VHB encontrados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um estudo transversal que envolveu os portadores do VHB, que tinham carga viral e genótipos determinados, proveniente de dois estudos realizados no estado do Maranhão, nordeste do Brasil.

4.1 Estudos

4.1.1 Estudo 1

Foram incluídos 119 portadores crônicos acompanhados em um Centro de Referência de atendimento para hepatites virais em um Hospital Universitário que tinham VHB–DNA quantificado e com determinação de genótipo e subgenótipo (BARROS et al., 2014).

4.1.2 Estudo 2

Foram incluídos 27 portadores identificados em um estudo transversal, que é parte integrante de um projeto de pesquisa intitulado “Estudos das hepatites B, C E D nos municípios de Urbano Santos, Humberto de Campos e da Região do Baixo Munim, Maranhão, Brasil”. A população foi composta por indivíduos residentes nos municípios mencionados. A coleta de dados foi feita com o uso de questionário estruturado (ANEXO A) e as amostras de material biológico após o processamento foram armazenadas em freezers a – 80°C e direcionado aos exames sorológicos e de biologia molecular.

A amostragem foi feita com base em conglomerado, inicialmente foram sorteados os setores com probabilidade proporcional à população, em seguida, feito o sorteio dos quarteirões. Com o uso do mapa do setor, seguia-se com o sorteio do quarteirão inicial e do ponto do quarteirão que se iniciava os trabalhos, observando o sentido horário. Não sendo obtido o quantitativo da amostra no setor, seria feito mais

um sorteio de quarteirão, observando todos os detalhes, até que se completasse o número estipulado.

4.1.2.1 Testes realizados

Nos dois estudos os participantes foram submetidos à realização dos exames sorológicos (HBsAg, anti-HBc total, HBeAg e anti-HBe) e moleculares (quantificação do VHB–DNA e genotipagem) realizados sob a mesma metodologia. Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório Central do Maranhão (LACEN) e no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LGHT-FMUSP). Os testes moleculares tiveram sua realização no LGHT-FMUSP. Para diagnóstico sorológico foi usada a técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) usando kits comerciais DiaSorinLtda, Italy).

a. Extração de DNA

A extração do DNA do VHB foi realizada empregando-se o Kit Comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen®, HildenGermany) a partir de 200 µL de plasma ou soro, seguindo instruções do fabricante.

b. Amplificação, quantificação do VHB–DNA e genotipagem do VHB

A quantificação da carga viral foi realizada através da técnica de PCR em tempo real, tal como descrito anteriormente (SITNIK et al., 2010).

A amplificação de um fragmento de 136 pares de bases (pb), que compreende todo o gene HBsAg e parte da polimerase foi feito através da técnica de *nested*-PCR. Todas as sequências dos *primers* e procedimentos de amplificação e sequenciamento já foram descritos (GOMES-GOUVEIA et al., 2015; BARROS et al., 2014).

4.2 Amostra estudada

Entre os 119 portadores do primeiro estudo, 80 (67%) eram subgenótipo A1, 29 (24%) eram subgenótipo D4, 3 (3%) eram D3, 1 (1%) D2 e 6 (5%) eram F2a.

Entre os 27 do segundo estudo, 5 (19%) eram subgenótipo A1 e 22 (81%) eram subgenótipo D4. Não foram encontrados outros subgenótipos.

Foram então incluídos no estudo os dois subgenótipos mais frequentemente encontrados: A1 e o D4 (n=136). Os dois grupos foram comparados quanto à idade, sexo, frequência do HBeAg e cargas virais (categorizadas em < 2000 UI/ml, entre 2000UI/ml e 20.000 UI/ml e > 20.000 UI/ml).

4.3 Análise estatística

Diferenças entre variáveis numéricas foram calculadas pelo teste t de Student e entre as nominais o Qui-quadrado. Foi utilizado o programa SPSS, versão 22.0.

4.4 Considerações éticas

Estes estudos foram submetidos à Comissão Científica do HUUFMA, à análise do Comitê de Ética em Pesquisa do HUUFMA e tiveram Parecer Consubstanciado de aprovação 487/2007 e 448.731 (ANEXO C), atendendo aos requisitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (ANEXO D).

Somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO E) foi realizada a coleta das informações por meio de questionário, assim como a coleta de sangue para a realização dos exames. Os procedimentos de biossegurança referentes à coleta, manipulação e processamento

do material biológico, foram realizados segundo as regras básicas para o trabalho em laboratório (LIMA et al., 2013).

5 RESULTADOS

5.1 Artigo original

SOROCONVERSÃO TARDIA DO HBEAG EM PORTADORES DO SUBGENÓTIPO D4 DO VÍRUS DA HEPATITE B

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
Medicina II – B2 – ISSN: 0037-8682

ARTIGO ORIGINAL

SOROCONVERSÃO TARDIA DO HBEAG EM PORTADORES DO SUBGENÓTIPO D4 DO VÍRUS DA HEPATITE B

DELAYED HBEAG SEROCONVERSION IN CARRIERS OF SUB GENOTYPE D4 VIRUS HEPATITIS B

Marinilde Teles Souza – Enfermeira, especialista, Hospital Universitário da Universidade Federal do MA (HUUFMA);
 Lena Maria Barros Fonseca – Enfermeira, Prof^ª Dr^ª da UFMA, Dep. de Enfermagem da UFMA;
 Max Diego Cruz Santos - Biólogo;
 Jomar Diogo Costa Nunes – Mestre, farmacêutico, Prof^ª da UFMA;
 Maria Jozélia Diniz Moraes – Enfermeira, especialista, Hospital Universitário da Universidade Federal do MA (HUUFMA);
 Francisco Carlos Costa Magalhães – Enfermeiro, mestre, Prof^ª da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA;
 Ingrid de Campos Albuquerque - Enfermeira;
 Camila Maria Pinheiro de Mello e Silva - Enfermeira, Mestre;
 Michele Soares Gomes Gouvêa- Prof^ª Dr^ª da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical da USP, Doutorado em Gastroenterologia;
 João Renato Rebello Pinho Prof. Dr. da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical da USP, Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica);
 Adalgisa de Souza Paiva Ferreira – Prof^ª Dr^ª da UFMA, Dep. de Medicina, doutorado em Gastroenterologia.

RESUMO

O vírus da hepatite B (VHB) apresenta diversidade do genoma, o que o faz ser classificado em diferentes genótipos e subgenótipos (A-J). Tem sido demonstrado que diversos genótipos estão relacionados com a história natural da infecção. A manutenção da replicação viral pode ser um dos fatores relacionado aos genótipos. Identificar o estado de replicação viral do VHB entre portadores dos subgenótipos A1 e D4. Foram estudados portadores do VHB identificados em dois estudos que envolveram indivíduos provenientes do estado do Maranhão, nordeste do Brasil, que tinham determinação de genótipos e subgenótipos, sorologias para o HBeAg e anti-HBe e cargas virais determinadas. Sorologias foram realizadas por ELISA, VHB-DNA quantificado por PCR em tempo real e genotipagem realizada por sequenciamento. Foram identificados 146 portadores. Dentre estes, 136 eram subgenótipo A1 ou D4. Sendo 85 - A1 62,5%) e 51 - D4 (37,5%). Não houve diferença entre os grupos quando foi avaliado idade (42 ± 12 vs 38 ± 17 $p=0.11$) ou gênero (masculino 48,5% vs 51,5% $P=0.18$). Entre os portadores do subgenótipo D4 havia mais indivíduos com HBeAg positivo (23,5% vs 9,4 %, $p=0.02$) e maior proporção de portadores de cargas virais acima de 20.000 UI/ml (43,1% vs 12,9% $p<0.0001$), mesmo quando avaliados apenas aqueles com HBeAg negativos (25,6% vs 6,5% $p=0.007$), quando comparados com os de subgenótipo A1. Portadores do VHB, subgenótipo D4, quando comparados com subgenótipo A1 apresentam soroconversão mais tardia do HBeAg e maiores níveis de VHB-DNA, sugerindo que esse subgenótipo possivelmente está relacionado com potencial para doença mais grave e maior facilidade de transmissão da infecção.

Palavras-chaves: Hepatite B. Soroconversão HBeAg. Subgenótipo D4.

ABSTRACT

The hepatitis B virus (HBV) present diversity of its genome, which is to be classified in different genotypes and subgenotypes (A-J). It has been demonstrated that different genotypes are related to the natural history of infection. The maintenance of viral replication could be one of the factors related to genotypes. To identify the viral replication status of HBV carriers among the subgenótipos A1 and D4. HBV carriers identified have been studied in two studies involving individuals from the state of Maranhão, northeast Brazil, which had genotyping and sub

genotypes, serology for HBeAg and anti-HBe and certain viral loads. Serological tests were performed by ELISA, HBV-DNA quantification Real time PCR and genotyping performed by sequencing. We identified 146 patients. Among these, 136 were sub genotype A1 or D4. It is 85 - A1 (62.5%) and 51 - D4 (37.5%). No difference was found between groups when age was evaluated (42 ± 12 vs 38 ± 17 $p = 0.11$) or gender (male 48.5% vs 51.5% $P = 0.02$). Among the D4 subgenotype carriers had more patients with HBeAg positive (23.5% vs 9.4%, $p = 0.02$) and a higher proportion of patients with viral loads above 20,000 IU / ml (43.1% vs 12.9 % $p < 0.0001$), even when only those with negative HBeAg (25.6% vs 6.5%, $p = 0.007$) when compared with the A1 subgenotype. HBV carriers, subgenotype D4, compared to sub A1 genotype have delayed HBeAg seroconversion and higher levels of HB-DNA, suggesting that this subgenotype is possibly related to the potential for more severe illness and greater ease of transmission of infection.

Keywords: Hepatitis B. HBeAg Seroconversion. Subgenotype D4.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) ainda é um grande problema de saúde no mundo e tem desfechos importantes como cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (HCC), que estão associados a aproximadamente 600.000 mortes por ano¹. Estimativas atuais indicam que dois bilhões de pessoas já foram infectados pelo VHB em todo o mundo^{2,3} e cerca de 240 milhões são portadores crônicos⁴.

O diagnóstico das várias fases desta infecção viral baseia-se em achados sorológicos e moleculares, alterações bioquímicas e histológicas⁵. Na primeira fase, denominada de Imunotolerância, há positividade do HBsAg, HBeAg, altos níveis de DNA viral (VHB-DNA), aminotransferases normais e em geral, não há dano hepático. Na segunda fase, denominada Imunorreação ou hepatite crônica HBeAg positiva, verifica-se a manutenção de HBsAg e HBeAg, flutuações nos níveis de aminotransferases, diminuição do VHB-DNA e presença de atividade inflamatória hepática. Na terceira fase, denominada não replicativa, ocorre soroconversão para o anti-HBe, níveis de VHB-DNA baixos ou indetectáveis e aminotransferases normais. Essa fase pode persistir por período indeterminado^{6,7}.

A soroconversão para o anti-HBe pode não significar parada da replicação viral porque podem ocorrer mutações pontuais nas regiões *precore* ou *core promoter* do genoma viral (causando a parada de produção do HBeAg), mas a replicação viral permanece, sendo identificada pelos níveis elevados do VHB-DNA, seria a chamada fase de hepatite crônica HBeAg negativa^{7,8,9}.

Assim, a replicação viral é caracterizada pela presença do HBeAg, que em geral associa-se a altos níveis de VHB-DNA^{3,4} ou identificação de cargas virais acima de 2000 UI/ml em indivíduos com HBeAg negativos⁸.

A progressão da doença hepática está associada com fatores virológicos e do hospedeiro⁹. Entre os fatores virológicos tem sido demonstrado que a presença do HBeAg e

maiores cargas virais estão diretamente associadas com a progressão para cirrose e HCC¹⁰. A diversidade genética do seu genoma, caracterizada por diferentes genótipos do VHB (A-J) também parece ter importante papel na manutenção da replicação viral com seus consequentes resultado na história natural¹¹.

Os genótipos têm distribuição diversa ao redor do mundo e guardam estreita relação com a formação dos povos^{12,13,14}. Para os genótipos A, B, C, D e F, foram descritos subgenótipos^{12,14}.

Dentre os mais frequentes, o genótipo A, encontra-se distribuído por todo o mundo, os genótipos B e C são predominantes no continente asiático e o genótipo D prevalece na Europa e nordeste da África^{12,14}. O genótipo E é predominante na África¹⁵ e o F encontra-se mais frequentemente na América do Sul^{16,17}.

O papel dos diferentes genótipos do VHB na manutenção da replicação viral tem sido demonstrado mais frequentemente nas comparações entre genótipos B e C e entre genótipos A e D, correspondendo aos tipos mais frequentes em cada região estudada^{18,19,20}.

Estudos asiáticos mostraram soroconversão mais tardia do HBeAg em portadores do genótipo C, quando comparado ao genótipo B^{18,21,22,23}. Mais elevadas cargas virais também foram observadas em portadores do genótipo C²⁴.

Entre os genótipos A e D estudos europeu e americano mostraram maiores taxas de soroconversão sustentada do HBeAg entre os primeiros^{25,26}. Do mesmo modo, foram identificadas maiores cargas virais em portadores do genótipo D²⁷.

A maioria dos estudos no Brasil mostra uma maior frequência do genótipo A, seguido pelos genótipos D e F^{16,17,28,29,30,31} justificada pela formação do povo brasileiro composto por índios e indivíduos provenientes da imigração africana e européia¹⁷. Entre os portadores do genótipo D, o subgenótipo mais frequentemente identificado foi o D3³², atribuído a imigração europeia¹⁷.

No estado do Maranhão, nordeste do país, recentemente foi descrito por Barros et al.,³⁰ frequência elevada do subgenótipo D4. Esse último havia sido descrito em apenas dois outros estudos brasileiros da região da Amazônia Ocidental^{31,32}.

Ainda não há informações sobre o comportamento deste subgenótipo em relação à frequência de replicação viral. Assim o objetivo desse estudo foi avaliar o estado de replicação viral entre portadores do VHB estudados no estado do Maranhão.

MÉTODOS

Todos os portadores do VHB, que tinham carga viral e genótipos identificados provenientes de dois estudos realizados no estado do Maranhão, nordeste do Brasil, foram incluídos:

(1) Pacientes acompanhados em um Centro de Referência de atendimento para hepatites virais em um Hospital Universitário n=119³⁰.

(2) Indivíduos oriundos de um estudo de prevalência realizado nos municípios de Urbano Santos, Humberto de Campos, Morros, Icatu e Axixá n=27, conforme a metodologia de Valente et al.,³³.

Em ambos os estudos os testes sorológicos (HBsAg, anti-HBc total, HBeAg e anti-HBe) e moleculares (quantificação do VHB-DNA e genotipagem) foram realizados utilizando a mesma metodologia. Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório Central (LACEN) do Maranhão e no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LGHT-FMUSP). Os testes moleculares foram realizados no LGHT-FMUSP.

Os testes sorológicos foram realizados por técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) usando kits comerciais DiaSorin Ltda, Italy.

a. Extração de DNA

A extração do DNA do VHB foi realizada empregando-se o Kit Comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen®, HildenGermany) a partir de 200 µL de plasma ou soro, seguindo instruções do fabricante.

b. Amplificação, quantificação do VHB-DNA e genotipagem do VHB

A quantificação da carga viral foi realizada através da técnica de PCR em tempo real, tal como descrito anteriormente³⁴. A amplificação de um fragmento de 136 pares de bases (pb), que compreende todo o gene HBsAg e parte da polimerase foi feito através da técnica de *nested*-PCR. Todas as sequências dos *primers* e procedimentos de amplificação e sequenciamento já foram descritos^{30,35}.

Foram avaliados 119, A1 (67,2%), D2 (0,8%), D3 (2,5%), D4 (24,4%) e F2a (5,0%) no primeiro estudo e 27 no segundo A1 (18,5%) e D4 (81,5%), totalizando 146 indivíduos.

Apenas os portadores dos dois subgenótipos mais frequentemente encontrados (A1 e D4) foram incluídos e comparados quanto à idade, sexo, frequência do HBeAg e cargas virais (categorizadas em < 2000 UI/ml, entre 2000 UI/ml e 20.000 UI/ml e > 20.000 UI/ml).

Análise Estatística: diferenças entre variáveis numéricas foram calculadas pelo teste t de Student e entre as nominais o Qui-quadrado. Foi utilizado o programa SPSS, versão 22.0.

RESULTADOS

Entre os 146 portadores do VHB com VHB-DNA quantificado, genótipos e subgenótipos definidos, 136 (93,1%) tinham subgenótipos A1 e D4. Oitenta e cinco indivíduos tinham genótipo A1 (62,5%) e 51 (37,5%) eram D4. Idade, gênero e frequência do HBeAg são descritos na tabela 1.

Quando comparados portadores dos subgenótipos A1 e D4, não houve diferença quanto idade ($p=0,11$) ou gênero ($p=0,18$). Maior frequência de HBeAg positivo (23,5% vs 9,4% $p=0,02$) e cargas virais mais elevadas foram identificadas entre os portadores de D4 ($p<0,001$) (Tabela 2). Quando avaliados apenas os com HBeAg negativos, os portadores do subgenótipo D4 ainda apresentaram maior frequência de cargas virais acima de 20.000 UI/ml (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas características de replicação viral entre 136 portadores do VHB, subgenótipos A1 e D4 (subgenótipos mais frequentemente encontrados) provenientes do estado do Maranhão, nordeste do Brasil. Uma frequência superior do subgenótipo A1 identificada corresponde ao que tem sido descrito na maioria das regiões brasileiras^{17,29,36}.

O genótipo D tem distribuição mundial, revisado recentemente em Ozaras et al.,³⁷ mas o subgenótipo D4 tem sido descrito em poucas regiões como na Austrália e Nova Guiné¹⁴, Ruanda³⁸ e predomina no Haiti entre os genótipos D encontrados¹⁵.

Este subgenótipo D4, o segundo mais frequentemente observado no Maranhão³⁰ tem sido pouco encontrado em outras regiões do Brasil^{31,32}. Sua presença no Maranhão tem sido justificada pelo tráfico de escravos provenientes do sudeste da África, diferentemente das regiões de onde vieram os africanos para o Rio de Janeiro e Bahia, locais de maior desembarque dos escravos no Brasil³⁹.

No estudo de Barros et al.,³⁰ foram incluídos 29 portadores do subgenótipo D4 e na comparação com portadores do subgenótipo A1 houve maior frequência de HBeAg positivo. No presente estudo, que incluiu 51 portadores do subgenótipo D4, incluindo os 29 do estudo de Barros et al.,³⁰ foi confirmada a maior frequência do HBeAg e também observada maior

proporção de indivíduos com níveis séricos mais elevados de VHB-DNA, mesmo entre aqueles com HBeAg negativos. Não houve diferenças entre as idades dos indivíduos ($p=0.11$) sugerindo que os portadores do D4 não são mais jovens e, portanto, esta não seria a justificativa para a maior frequência do HBeAg.

A permanência do HBeAg tem sido associada a piores prognósticos na infecção pelo VHB, como foi descrito em Yang et al.⁴⁰, Chu et al.⁴¹, Chen et al.⁴², Ott, Stevens, Wiersma³, Seto et al.,⁴³. Esse pior prognóstico deve estar associado ao fato de que em portadores do HBeAg são observadas taxas mais elevadas de VHB-DNA, que claramente estão relacionadas com maior frequência de evolução para cirrose e HCC^{10,40,42,44,45}.

Nessa amostra também foi observada maior frequência de cargas virais acima de 20.000 UI/ml entre os D4 comparados com A1 (43,1% vs 12,9% $p<0.001$), mesmo entre aqueles com HBeAg negativos (25,6% vs 6,5% $p=0.007$). Outro elemento de grande importância é que altas cargas virais também apresentam maiores taxas de transmissão do vírus^{3,45,46}.

Diferentemente do que foi observado, a maioria dos estudos tem associado ao genótipo D a soroconversão mais precoce do HBeAg quando comparado com o genótipo A^{18,25,47}. De fato, um estudo realizado no sul do Brasil, em região onde a maioria é composta por descendentes europeus, que avaliou a frequência do HBeAg entre indivíduos com genótipos A e D, identificou uma menor frequência de HBeAg entre os portadores do genótipo D (59.5% vs 28.6% respectivamente)⁴⁸.

É importante observar que a maioria dos estudos que comparam os genótipos A e D envolveram populações onde predominam os subgenótipos D1, D2 e D3^{18,19,47,49}. É possível que a ausência do subgenótipo D4 possa ter tido influência nesses resultados. Concordando com esta suposição, um estudo multicêntrico africano desenvolvido por Tanaka et al.¹⁹, comparando o subgenótipo A1 com o genótipo D (não houve descrição de subgenótipo) observou maior frequência do HBeAg nesses últimos, sugerindo que no continente africano, os portadores do genótipo D (e aqui poderia ter influência o subgenótipo D4) podem apresentar soroconversão mais tardia do HBeAg.

Agradecimentos ao Ministério da Saúde, através do UNODOC-2013, Prioridades do Programa de Pesquisa para o SUS (FAPEMA-PPSUS, 2013) e a Secretaria de Estado da Saúde do MA.

REFERÊNCIAS

1. Kong L-N, Qin B, Ma Q, Li L, Yao Y, Relationship between hepatitis B virus genotype B and C and response to interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis B patients: A meta-analysis, positive chronic. *Journal of gastroenterology and Hepatology*. 2014; 29: 1387–1395.
2. Besharat S, Poustchi H, Mohamadkhani A, Katoonizadeh A, Moradi A, Roshandel G et al. Association of Mutations in the Basal Core Promoter and Pre-core Regions of the Hepatitis B Viral Genome and Longitudinal Changes in HBV Level in HBeAg Negative Individuals: Results From a Cohort Study in Northern Iran, *Hepat Mon*. 2015;15(2): e 23875.
3. Otta J , Stevens G, Wiersma St. The risk of perinatal hepatitis B virus transmission: hepatitis B e antigen (HBeAg) prevalence estimates for all world regions. *BMC Infectious Diseases*. 2012: 12:131.
4. WHO. World Health Organization. *Hepatitis B infection*. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> Acesso em:10/mar /2016.
5. Liang T. J. Hepatitis B: The Virus and Disease, *Hepatology*. 2009; 49(5).
6. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *Journal of hepatology*. 2008; 48(2): 335-352.
7. Gish, Robert G. et al. Chronic hepatitis B: virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral research*. 2015;121: 47-58.
8. Kamijo N, Matsumoto A, Umemura T, et al. Mutations of pre-core and basal core promoter before and after hepatitis B e antigen seroconversion. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2015;21(2):541-548.
9. Trépo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2014; 384(9959); 2053-2063.
10. Iloeje U H.; Yang H-I.; Natural history of chronic hepatitis B: what exactly has Reveal revealed? *Liver International*. 2012;32(9): 1333-1341.
11. Zhang Z-H, Wu C-C, Chen X-W, Li X, Li J, Lu M-J. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2016; 22(1):126-144.
12. Kramvis A, Kew M. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology Res*. 2007; 37.
13. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatology Res*. 2010; 40: 14-30.
14. Norder H, Courouce A, Coursaget P, Eche V, Lee S, MushahwarIk, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004; 47(6):289–309.

15. Andernach I., Nolte C, Pape J, Muller C. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2009;15, 1222–1228.
16. Alvarado-Mora MV, Botelho L, Gomes-Gouvêa MS, de Souza VF Nascimento MC. Detection of hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil. *Virology*. 2011; 8 (1): 415-7.
17. Mello FCA *et al.* Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BioMed Central Microbiology*.2007; 7(103): 1-9.
18. Chu CJ, Lok A. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology*.2002;35(5): 1274-1276.
19. Tanaka Y, Hasegawa I, Kato T, Orito E, Hirashima N, Acharya SK, et al. A case–control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology*. 2004; 40:747–755.
20. Schaefer BE, Collazzi AC. Generalized tests for eight GRB luminosity relations. *The Astrophysical Journal Letters*.2007; 656 (2).
21. Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology*. 2001; 44: 43-47.
22. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B virus genotypes and spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in Taiwanese hepatitis B carriers. *J Med Virol*.2004; 72: 363-369.
23. Ni YH, Chang MH, Wang KJ, Hsu HY, Chen HL, Kao JH et al. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*.2004; 127: 1733-1738.
24. Yu M-W et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *Journal of the National Cancer Institute*.2005; 97(4):265-272.
25. Sánchez-Tapias JM et al. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology*.2002; 123(6): 1848-1856.
26. Chu C-J et al. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology*.2003; 125(2): 444-451.
27. Oommen PT, Wirth S, Wintermeyer P, Gerner P. Relationship between viral load and genotypes of hepatitis B virus in children with chronic hepatitis B. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.2006; 43: 342-347.
28. Alcaide R *et al.* Distribution of Hepatitis B virus genotypes and viral load levels in brazilian chronically infected patients in São Paulo city. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*.2009; 51(5):269-3.
29. Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA: Genotyping of hepatitis N virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, south of brazil. *Arq Gastroenterol*. 2010; 47:13-17.

30. Barros LMF, Gouvêa MSG, Kramvis A, Coorêa MCJM, Santos A, Souza LAB. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014; 24(1): 68–7.
31. Gomes-Gouvea MS, Soares MC, Bensabath G, Carvalho-Mello IM, Brito, EM, Souza et al. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *The Journal of general virology*. 2009; 90, 2638-2643.
32. Santos AO *et al*. Characterization of Hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. *Virology Journal*. 2010;7:315: 2-7.
33. Valente CM, Ferreira ASP, Costa LMC et al. Prevalência de marcadores sorológicos do vírus da hepatite B (HBV) nos municípios de urbano Santos, Axixá, Humberto de Campos, Morros e Icatu: resultados parciais de um estudo de base populacional. *Cad. Pes*, 2014; 21(Esp.).
34. Sitnik R, Paes A, Mangueira CP, Pinho JR. A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (HBV) developed to detect all HBV genotypes. *Ver Inst Med Trop*. 2010; 52:119-124.
35. Gomes-Gouvea MS, Ferreira AC., Teixeira R., Andrade JR, Ferreira AS. et al. HBV carrying drug resistance mutations in chronically infected treatment-naïve patients. *Antiviraltherapy*. 2015; 20: 387-395.
36. Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JR, Mello IM, et al.: Hepatitis B virus infection in haemodialysis centres from Santa Catarina state, southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. *BMC Public Health*. 2004; 4:13.
37. Ozaras R, Inanc Balkan I, Yemisen M, Tabak F: Epidemiology of HBV subgenotypes D. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015; 39:28-37.
38. Hubschen JM, Mugabo J, Peltier CA, Karasi JC., Sausy A, Kirpach P et al. Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide. *J. Med. Virol*. 2009; 81, 435–440.
39. Silva DBD. The Atlantic Slave Trade to Maranhão, 1680–1846: Volume, Routes and Organization. *Slavery Abolit*. 2008; 29, 477–501.
40. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY et al. Taiwan Community-Based Cancer Screening Project Group. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2002, 347:168–174.
41. Chu CM, Hung SJ, Lin J, Tai DI, Liaw YF. Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels. *Am J Med*. 2004; 116:829–834.
42. Chen C-J et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *Jama*. 2006; 295(1): 65-73.
43. Seto WK, Wong DK, Fung J, et al. High hepatitis B surface antigen levels predict insignificant fibrosis in hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B. *PLoS One*. 2012; 7:43087.

44. Viana R, Wang R, Yu MC, Welschinger R, Chen C-Y, Kew MC. Hepatitis B viral loads in southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *Journal of Medical Virology*. 2009; 81(9):1525–1530.
45. Yin J, Xie J, Liu S, Zhang H, Han L, Lu W et al. Association between the various mutations in viral core promoter region to different stages of hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106:81–92.
46. Shepard CW et al. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiologic reviews*. 2006; 28(1):112-125.
47. Kumar A, Kumar SI, Pandey R, Naik S, Aggarwal R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D. *Indian J Gastroenterol*. 2005; 24:19–22.
48. Tonetto PA, Gonçalves NS, Fais VC, Vigani AG, et al.: Hepatitis B virus: Molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. *BMC Infect Dis*. 2009; 9:149.
49. Zalewska M, Domagała M, Simon K, Gładysz A Hepatitis B virus genotypes and the response to lamivudine therapy. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2005, 114(6): 1190-1199.

TABELAS

Tabela 1. Descrição das características demográficas e virológicas de portadores do VHB, com subgenótipos A1 e D4. São Luís, MA, 2016.

CARACTERÍSTICAS	(n =136)	%
Idade (anos) Média $\pm$ Dp		42 $\pm$ 12
Gênero		
Masculino	66	48,5
Feminino	70	51,5
Subgenótipos do VHB		
A1	85	62,5
D4	51	37,5
HBeAg		
Positivo	20	14,7
Negativo	116	85,3
Total	136	100,0

Tabela 2. Comparação das características demográficas e virológicas de portadores do VHB, com subgenótipos A1 e D4. São Luís, MA, 2016.

CARACTERÍSTICAS	Subgenótipo A1 (n=85)	Subgenótipo D4 (n=51)	Valor de p
Gênero (masc.)	45 (52,9%)	21 (41,2%)	0,18
Idade (anos)	41 $\pm$ 12	38 $\pm$ 16	0,11
HBeAg positivo	8 (9,4%)	12 (23,5%)	0,02
VHB-DNA			
< 2000 UI/ml	43 (50,6%)	21 (41,2%)	
>2000 UI/ml e < 20.000 UI/ml	31 (36,5%)	8 (15,7%)	< 0,001
$\geq$ 20.000 UI/ml	11 (12,9%)	22 (43,1%)	

Tabela 3. Comparação dos níveis de VHB-DNA entre portadores do VHB subgenótipos A1 e D4, com HBeAg negativos. São Luís, MA, 2016.

VHB-DNA	Subgenótipo A1 (n=77)	Subgenótipo D4 (n=39)	Valor de p
< 2000 UI/ml	42 (54,5%)	21 (53,8%)	
>2000 UI/ml e < 20.000 UI/ml	30 (38,9%)	8 (20,5%)	0,007
$\geq$ 20.000 UI/ml	05 (6,5%)	10 (25,6%)	

6 CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo demonstrou que portadores do VHB do subgenótipo D4 têm uma maior frequência de HBeAg e maiores taxas de VHB – DNA, mesmo entre os HBeAg negativos, quando comparados com portadores de A1, sugerindo uma possível ocorrência de soroconversão tardia do HBeAg e manutenção de cargas virais mais elevadas em portadores do subgenótipo D4 o que poderia favorecer um maior risco de evolução para doença mais grave e também maior taxa de transmissão do vírus.

Este é o estudo com o maior número de portadores do subgenótipo D4 já descrito, em comparação com sugenótipo A1. Infelizmente não puderam ser avaliadas as apresentações clínicas dos portadores e, assim, não foi possível verificar se estas maiores taxas de replicação viral estavam relacionadas com pior prognóstico.

Estudos de acompanhamento a longo prazo são necessários para definir a real influência do sugnenótipo D4 na história natural da infecção pelo VHB.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. K. et al. Distribution of hepatitis B virus genotype and cancer predicting precore and basal core promoter Mutations. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, p. 225- 232, 2015.

ALCADE, R,et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes and viral load levels in Brazilian chronically infected patients in São Paulo city. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 269-272, 2009.

ALEXOPOULOU, A., KARAYIANNIS, P. HBeAg negative variants and their role in the natural history of chronic hepatitis B virus infection. **World J Gastroenterol**; v. 20, n. 24, p. 7644-52, 2014.

ALMEIDA, A.M, et al. Eficácia do adefovirdipivoxil, entecavir e telbivudina para o tratamento da hepatite crônica B: revisão sistemática, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 440-51, 2010.

ALMEIDA, J.D., RUBENSTEIN, O., SCOTT, E.J. New antigen-antibody system in Australia-antigen positive hepatitis. **Lancet**, v. 298, n. 7736, p. 1225-1227, 1971.

ALVARADO-MORA, M.V., PINHO, J.R.R. Distribution of VHB genotypes in Latin America. **International Medical Press** 1359-6535, p.459-65. 2013.

ALVARIZ, R.C. Hepatite crônica pelo vírus B (VHB). **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Universidade Estadual do Rio de Janeiro,v. 5, n. 1 2006.

BARROS, L.M.F., et al. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil, 567-1348/2014 **Elsevier** v.I, n. 24. p. 68–75, 2014.

BLUMBERG, B.S., ALTER, H.G., VISNICH, S.A. A “new” antigen in leukemia sera. **Journal of the American Medical Association**, v .191, p.541-546, 1965.

BONINO, F., BRUNETTO, M.R. Chronic HBeAg negative, anti-HBe positive Hepatitis B: An overview. In: EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. **J. Hepatol**; v. 38, p. 533-540, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Hepatites virais no Brasil: Situação, Ações e Agenda**. 2011. (b).

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, **Hepatites virais**, CID 10: B15, Brasília – DF, janeiro de 2007, OS 0044/200
http://bvs.ms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/07_0044_M2.pdf> acesso em 09/10/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais**, 201, 2011. Disponível:http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/50073/boletimhepatites_2011_pdf_64874.pdf. Acesso em 14 de Julho de 2013 (a).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais**. 2005. 2ª edição 40 p. e. ISBN 85-334-1202-
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hepatites_virais_brasil_atento.pdf>Acesso em: 10/out /2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções**. Brasília (DF), 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite viral crônica B e coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. PNHV, **Programa Nacional de Hepatites Virais**, Ministério da Saúde, Brasília, DF <http://www.ibvivavida.org.br/noticias.asp>, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais . **Hepatite B**. Disponível em:
<http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-b>. Acesso em Fevereiro, 2016.

CAREY, W.D. The Prevalence and Natural History of Hepatitis B in the 21st Century. Cleveland Clinic **Journal of Medicine**; v. 76, p. S2-5, 2009.

CAREY, W.D.; ELGOUHARI, H.M.; TAMIMI, T.I.A.R. Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, course, and diagnosis. **Cleveland clinic journal of medicine**, v. 75, n. 12, p. 881-889, 2008.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Viral Hepatitis - CDC Recommendations for Specific Populations and Settings**. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/hepatitis/Populations/api.htm> >. Acesso em: 08 de setembro de 2015.

CHAN, H.L., et al. Genotype C hepatitis, B virus infection is associated with an increased risk, of hepatocellular carcinoma. **Gut**, v. 53, n. 10, p. 1494-1498, 2004.

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

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

COLLIER, L, OXFORD, J. Introduction to the hepatitis viruses. 2th ed. Human Virology. New York: **Oxford University**. p. 153-154, 2000.

DANE, D.S., et al. Virus like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. **Lancet**, v. 1, p.695-698, 1970.

FATTOVICH, G., BORTOLOTTI, F., DONATO, F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. **J Hepatol**, v. 48, p. 335-352, 2008.

FERREIRA, M. S. Diagnóstico e Tratamento da Hepatite B. R. **Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 389-400, jul/ago, 2000.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Avanços no Tratamento da Hepatite pelo Vírus B. **R. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 451-62, jul/ago, 2007.

FONSECA, J.C.F. História Natural da Hepatite B Crônica. R. **Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 672-677, nov. /dez, 2007.

FONSECA, J.C.F. Histórico das Hepatites Virais. Rev. Soc. Bras. **Med. Trop.** v. 43 n.3 Uberaba May/June, 2010.

FREITAS, J. **Hepatites Víricas**: Perspectiva histórica. Disponível em: <http://www.aidsportugal.com/hepatitte>, acesso em: 23 de abril, de 2009.

FRIAS, F. R. JARDI. R. Virologia molecular de vírus da hepatite B. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**v. 26, supl 7. P.2-10, 2008.

GANEM, D., PRINCE, A. M. Hepatitis B virus infection: natural history and clinical consequences. **The new england journal of medicine**, v. 350, n. 11, p. 1118-1129, 2004.

GONÇALES JÚNIOR, F. L. Hepatite B. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**.4. Ed.- São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

GONÇALES, N.S.L., GONCALES, F.L. Perfis Sorológicos anômalos, genótipos e mutantes do VHB. In I consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o diagnóstico e manuseio da hepatite B e Delta. **Braz J Infect Dis**, v. 10, n. Suppl 1, p. 23-27, 2006.

GUIRGIS, B.S.S., ABBAS, R.O., AZZAZY, H.M.E. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. **International Journal of Infectious Diseases**, v.14, p. 941–953, 2010.

HADZIYANNIS, E. Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African Countries. **J Hepatology**, v. 55, p. 183-191, 2011.

KAMIJO, N., et al. Mutations of pre-core and basal core promoter before and after hepatitis B e antigen seroconversion. **World J Gastroenterology**v. 21, n. 2, p. 541, 2015.

KIRSCHBERG, O., et al. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus-genotypes A-F. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, n. 1, p. 39-43, 2004.

KRAMVIS, A., et al. Relationship of serological subtype, basic core promoter and pre-core mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. **J Med Virol**, v. 80, n. 1, p. 27-46, 2008.

LAPALUS, M.,et al. Precore/Core promoter variants to predict significant fibrosis in both HBeAg positive and negative chronic hepatitis B. **Liver International**. v. 35, n. 9, p. 2082-2089, 2015.

LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treat, and current and emerging and control measures. **Journal of Viral hepatitis**v. 11, n. 2, p. 97-107, 2004.

LAZAREVIC, I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. **World J Gastroenterology**.v. 20, n. 24, p. 7653-7664, 2014.

LEE, H., et al. Management of Hepatitis B Virus Infection. **Gastroenterology Nursing**, v. 33, n. 2, p. 120-126, 2010.

LIANG, J. T. Hepatitis B: The virus and disease. **Hepatology**, National Institutes of Health (NIH), Bethesda. 49, n. 5, p. S13-S21, 2009.

LIAW, Y.F. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 35, n. 6, p. 1522-1527, 2002.

LIAW, Y. F; CHU, C. M. Hepatitis B Virus Infection. **Lancet**, London, v. 373, n. 9663, p. 582-592, Feb. 2009.

LIBERATO, M.I.M., OLIVEIRA, B.C., CABRAL, M.C. Hepatites Virais. In: Santos NOS. Introdução a Virologia Humana. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; p.135-144, 2002.

LIMA, E. G. et al., Ceará. Secretaria de Saúde. Laboratório Central de Saúde Pública. **Manual de coleta, acondicionamento e transporte de amostras para exames laboratoriais**, 2ª. ed. Fortaleza: SESA, 2013.

LIN, C.L., KAO, J.H. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B. **J Biomed Sci**, v. 15, p.137-145, 2008.

LIU, W.C. et al., Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis B virus for genotypes A to G by real-time PCR and two-step melting curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p.4491–4497, 2006.

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

LOPES, T.G., SCHINONI M, I. Aspectos gerais da hepatite B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**; R. Ci. med. biol., v.10, n.3, p.337-344, 2011.

MANDEVILLE, K.L, et al. Gastroenterology in developing countries: Issues and advances. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, p. 2839-2854, 2009.

MCMAHON, B.J. Natural History of Chronic Hepatitis B. **Clin Liver Dis.**, v. 14, p. 381-396, 2010.

MELLO, F.C., et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 1, 2007.

MELLO, F.M.M.A., et al. Hepatitis B virus genotypes and mutations in the basal core promoter and pre-core/core in chronically infected patients in southern Brazil: a cross-sectional study of VHB genotypes and mutations in chronic carriers **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v. 47, n. 6, p. 701-708, 2014.

MELO, F.C.A., ISOLANI, A. P. Hepatite B e C: Do Risco de Contaminação por Materiais de Manicure/Pedicure à Prevenção. **R. Saúde e Biol.**, Campo Mourão, v. 6, n. 2, p. 72-78, maio/ago. 2011.

MILICH, D.T., LIANG, J. Exploring the Biological Basis of Hepatitis B e Antigen in Hepatitis B Virus Infection; by the American Association for the Study of Liver Diseases, **Hepatology**, v. 38, n. 5, p. 1075-1086, 2003.

MINA, T., et al. Genomic Diversity of Hepatitis B Virus Infection Associated With Fulminant Hepatitis B Development; **Published online Hepat Mon.** June; v. 15, n. 6, 2015.

MIRANDA, L.V.G., PASSOS, A.D.C., FIGUEIGUEREDO, J.F., et al. Marcadores sorológicos de hepatite B em indivíduos submetidos a exames de sangue em unidade de saúde, **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 286-291, 2000.

MOHR, R., BOESECKE, C., WASMUTH, J.C., Hepatitis B. In: Mauss, Berg, Rockstroh, Sarrazin, Wedemeyer. **Hepatology**, A Clinical, Textbook, 5th Edition p. 35-47, 2014.

MOREIRA, M. Prevalência de Hepatites B e C em pacientes infectados com retrovírus humanos na cidade de Salvador-Bahia. Dissertação (**Mestrado**) Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2006.

MOTA, A., AREIAS, J., CARDOSO, M.F. A expressão genotípica do Vírus da Hepatite B em Portugal e no mundo, **Acta Med Port**,v. 24, n. 4, 2011.

NORDER, H., et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. **Intervirology**.v. 47, n. 6, p. 289-309, 2004.

NOVA, M. L. Estudo epidemiológico, Clínico e Molecular do Vírus da hepatite B na cidade de Chapecó, Oeste de Santa Catarina, 2010. 148 p. Dissertação (**Mestrado em Ciências – Programa de Gastroenterologia Clínica**) São Paulo, 2010.

NUNES, T.S.O., LACET, C., História natural da hepatite B crônica. Sociedade Brasileira de Clínica Médica Ver. **Rev. Bras. Clin. Med.** v. 7, p.124-131, 2009.

OLINGER, C.M., et al. Hepatitis B virus genotype E surface antigen detection with different immunoassays and diagnostic impact of mutations in the preS/S gene. **Med Microbiol Immunol**, v. 196, p. 247-252, 2007.

OTTA, J. J., et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2212-2219, 2012.

PASSOS, A.D.C. Aspectos epidemiológicos das hepatites virais. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 36, n. 1, p. 30-36, 2003.

PAULA, V.S., et al. **Manual de hepatites virais**; 1.ed. - Rio de Janeiro: Rede Sirius; OUERJ, 2015.

POURKARIM, M.R., et al. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/ sub genotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. **World J Gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7152-68, 2014.

POURKARIM, M.R. Novel hepatitis B virus sub genotype A6 in African-Belgian patients. **J Clin Virol**, v. 47, n. 1, p. 93-96, 2010.

PUNGPAONG, S., et al. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. In: Mayo clinic proceedings. **Elsevier**, v. 82, n. 8, p. 967-97, 2007.

RANTALA, M., VAN DE LAAR, M.J. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe – a review. **Euro Surveill**, v. 13, n. 21, p. 717-727, 2008.

REUBEN, A. Landmarks in hepatology: the thin red line. **Hepatol**, v. 36, n. 3, p. 770-773, 2002.

RONCATO, M., BALLARDIN, PAZ., LUNGE, V.R. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite B. **Rev.HCPA**, v. 28, n. 3, p. 188-93, 2008.

SANCHEZ-TAPIAS, J.M., COSTA, J., MAS, A., et al. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. **Gastroenterology**, v. 123, p. 1848-1856, 2002.

SCHILDGEN, O. **Acute and chronic hepatitis B diagnostic test**. In: MAUSS, S. et al. Hepatology: a clinical textbook; Germany, Chapter 8, 113, 2009.

SITNIK, R., et al. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2455-2460, 2004.

SITNIK, R., et al. A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (VHB) developed to detect all VHB genotypes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 52, n.3, p.119-124, 2010.

STEVENS, C.E., et al. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. **N Engl J Med**, v. 292, n. 15, p. 771-4, 1975.

SUMI, H., et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. **Hepatology**, v. 37, n. 1, p. 19-26, 2003.

SUNBUL, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. **World J Gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5427-5434, 2014.

SUZUKI, Y., et al. Persistence of acute infection with hepatitis B virus genotype A and treatment in Japan. **J Med Virol**, v. 76, n. 1, p. 33-39, 2005.

TANGKIJVANICH, P., et al. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Thailand. **World J Gastroenterol**, v.11, n.15, p.2238-2243, 2005.

TATEMATSU, K., et al. A genetic variant of hepatitis B virus Divergent from Known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and Provisionally assigned to a new genotype J, **J virol**. v. 83, n. 20, p. 10538-10547, 2009.

TONG, S., et al. Hepatitis B virus e antigen variants. **International Journal of Medicine Science**, v. 2, n. 1, p. 2-7, 2005.

WASLEY, A., GRYTDAL, S., GALLAGHER, K. **Surveillance for acute viral hepatitis United States**, MMWR Surveillance Summ, v.1, 2008.

WASMUTH, J.C. **Hepatitis B - Epidemiology, transmission and natural history** In: MAUSS, S. et al. **Hepatology: a clinical textbook**. Germany: Flying Publisher, cap.2. p. 25-34. 2009.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection**. I. World Health Organization. 2015
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059_eng.pdf?ua=1. Accessed: 10/04/2015.

WRIGHT, TL. Introduction to chronic hepatitis B infection. The American Journal of **Gastroenterology**, v. 101, S1-S6, 2006.

YU, H., et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". **PLoS One**. v. 5, n. 9, p. 929, 2010.

YU, M.W., et al. Hepatitis B virus genotype, and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective, study in men. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, n. 4, p. 265-272, 2005.

YUEN, M.F., et al. Longitudinal study of hepatitis activity and viral replication before and after HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B patients infected with genotypes B and C. **J Clin. Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5036-5040, 2004.

ANEXOS

ANEXO A. INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS.

ESTUDO DAS HEPATITES B, C E D NOS MUNICÍPIOS DE URBANO SANTOS, HUMBERTO DE CAMPOS E DA REGIÃO DO BAIXO MUNIM, MARANHÃO, BRASIL.

Ficha n.º _____ Data do preenchimento ____/____/____

Município _____ Zona _____ Nº setor censitário _____

I. IDENTIFICAÇÃO		
Nome:		
Apelido:		
2. Data de nascimento ____/____/____ Idade:		Idade:
3. Sexo: (1) Masculino (2) Feminino		Sexo:
4. Grau de instrução (0) Analfabeto (1) Ensino Fundamental Incompleto (2) Ensino Fundamental Completo (3) Ensino Médio Incompleto (4) Ensino Médio Completo	(6) Ensino Superior Incompleto (7) Ensino Superior Completo (8) Não se aplica (9) Não quer responder	Grau de instrução:
5. Local de nascimento:		Lnascimento:
6. Residência atual:		Resdatual:
Mora há quanto tempo:		Moratempos;
Ponto de referência:		
7. Última procedência:		Utimaproa;
8. Outros locais onde morou/trabalhou:		Loctrabalhou:
9. Há quanto tempo morou/trabalhou		Tempotrabalhou:
10. Cor (impressão do entrevistador) (1) Preta (2) Branca (3) Marrom 4) Vermelha (5) Amarela (6) Outra:		Cor:
11. Religião (0) Nenhuma (1) Católica (2) Evangélica (3) Outra:		Religião:
12. Estado civil (1) Solteiro (2) Casado (4) Divorciado (5) Viúvo (3) Separado judicialmente (6) União estável/mora junto		Estado civil:
II – OCUPAÇÃO		
13. Atual:		Atualocupação:
14. Pregressa:		Pregressocupação:
III - RENDA FAMILIAR		
15. Renda familiar em salários mínimos: menos de 1 salário mínimo; 1 a 3 salários mínimos; 4 a 6 salários mínimos; (0) 7 a 11 salários mínimos; mais de 11 salários mínimos		Rendafam:
IV - IMUNIZAÇÃO		
16. Cartão de vacina: (1) Sim (2) Não (3) Não sabe		Cartvacina:
17. Vacinação para hepatite B (1) Sim (2) Não (3) Não sabe Quantas doses? 1 dose 2 doses 3 doses		VacinaHB: VacHBdose:
18. Fez anti-Hbs (Teste para Hepatite pós-vacina)? (1) Sim. Se sim, há quanto tempo? (). (2) Não		AntiHbs: tempAntiHBS:
19. Doador* (1) Sim. Se sim, nº doações por ano: (). (2) Não (3) Não se aplica		Doador: Anodoador:
20. Última aceita: ____/____/____		Ultimaaceita:
21. Transfusão sanguínea (1) Sim (2) Não		Transfussangue:
22. Se sim, data da última transfusão:		Datatransfussangue:
23. Local da última transfusão:		Localultimasangue:
VI – DROGAS		
24. Alcool: (1) Sim (2) Não (3) Não se aplica		Alcool:
Tempo de Consumo (anos): Frequência: diariamente (2) semanalmente (3) esporadicamente		Alcooltemp: Alcoolfreq:
Quantidade (fechar em número exato/copos): _____		Alcoolquant:
Tipo de bebida: _____ Abstinência há meses): _____		Alcooltipo: Alcoolabst:

25. Drogas Ilícitas(1) Usa 2) Já usou (3) Nunca usou (4) Não respondeu(8) não se aplica	Drogailic:
26. Via:(1) Inalatória(2) Endovenosa	Dorgavia:
27. Seringa própria: (1) Sim (2) Não	Drogaseringaprop:
28. Tipo de droga:	Drogatipo:
VII – ATIVIDADE SEXUAL	
29. Vida sexual:(0) Nunca teve(1) Ativa (2) Inativa (9) Não quer responder (3) Não se aplica	Vidasex:
30. Prática sexual (pregressa e atual) (1) Homem/Mulher(2) Homem/Homem (3) Mulher/Mulher (4) Mulher e Homem (bissexual)	Pratsex:
31. Relação sexual estável:1) 1 parceiro (2) Mais de 01 parceiro(9) Não quer responder	Sexestavel:
32. Numero de parceiros (+ 3 parceiros em 6 meses): (1) Sim (2) Não(9) Não quis responder	Sexparceirnumero:
33. Preservativo: (1) Sempre(2) Às vezes (3) Nunca(9) Não quer responder	Sexpreserv:
Em caso positivo, usa preservativo para : (1) Proteção contra DST (2) Contraceptivo(3) Não sabe	Sexpreservpara:
VIII-PACIENTE SUBMETIDO A:	
Endoscopia: (1) Sim (2) Não Qts vezes: Local:	Endoscopia: Endoscopiavezes: EndoscopiaLocal:
Cirurgia:(1) Sim (2) Não Qual _____ Há quanto tempo (anos): _____	Cirurgia: Cirurgiaqual: Cirurgiatemp:
Tratamento Odontológico: (1) extração(2) extração + canal (3) Canal(4) Nunca fez (5) Outro: _____ Há quanto tempo fez o tratamento (anos): _____ Foi com odontólogo (1) Sim Qnd?: _____ Local _____ Foi com protético(1) Sim Qnd?: _____ Local _____	Tratodonto: Tratodontotemp: Odontologo: Odontologoqnd: Odontologoloc: Protetico: Proteticoqnd: Proteticoloc:
Tatuagem (1) Sim. Qnd?: _____ Local _____ (2) Não	Tatuagem: Tatuagemqnd: Tatuagemloc:
Piercing(1) Sim. Qnd?: _____ Local _____ (2) Não	Piercing Piercingqnd: Piercingloc:
Acupuntura(1) Sim. Qnd?: _____ Local _____ (2) Não	Acump: Acumpqnd: Acumploc:
Injeções com seringa de vidro e agulha de metal no passado antes 1993? (1) Sim (2) Não (3) não lembra	Seringvidro:
IX-PERFURO-CORTANTES (Materiais usados)	
Alicate: (1) No salão (4) Salão-individual (2) Salão-compartilhada(5) Casa-individual (3) Casa-compartilhada.(6) Outros materiais: Barbeadores(1)No salão(3) Casa-individual (2) Casa-compartilhada Navalha(1) No salão (3) Casa-individual (2) Casa-compartilhada Pinça depilatória(1)No salão(2) Casa-individual (3) Casa-compartilhada	Alicate: Barb: Navalha: Pinça:
X- EXPOSIÇÃO A MATERIAL BIOLÓGICO	
Lesão de pele (ferimento, perfuração) em acidente, no trabalho, etc. (1)Sim(2)Não (3) Não lembra QdoQts vezes?	Lesão: Lesãoqnd: Lesãovezes:

XI-ANTECEDENTES PESSOAIS		
HIV (1)Sim (2)Não (3) Não sabe DST'S (1)Sim(2)Não (3) Não sabe Icterícia (1)Sim (2)Não (3) Não sabe	IRC (1)Sim (2)Não(3) Não sabe Hepatite B(1)Sim (2)Não(3) Não sabe Hepatite C(1)Sim (2)Não(3) Não sabe Outros:	Hiv: Dst: Icter: Irc: HpB: HpC: Outroantecp:
XII – ANTECEDENTES FAMILIARES		
Contato com portadores de Hepatite B-C (1)Sim(2)Não Quem era o portador (1) pai(4) mãe (2) Filhos(5) irmãos (3) esposo(a)/companheiro(a). (6) não domiciliar O portador apresentou (1) Icterícia (2) IRC-Diálise(3) Outros _____		ContatoHpBC: PortHpBC: Portapresent: Outroantfam:
XIII – ADULTO/ADOLESCENTE (SE SEXO FEMININO)		
Gestante:(1)Sim (2)NãoSe sim, mês de gestação: Realiza pré-natal?(1)Sim (2)Não Nutriz: (1)Sim (2)Não GESTA: _____ PARA: _____ ABORTO: _____ Quando ocorreu o último parto? _____ Onde?Tipo de parto? (1) Vaginal(2) cesárea		Gest:Gestmes PrenatalNutriz: Gesta: Para: Aborto:Ultimopart: Ondeparto:Tipoparto:
XIV – DE QUAL RAÇA VOCÊ SE CONSIDERA?		
(1) Negra (2) Branca (3) Indígena (4) Mestiça (5) Outra. Qual? _____ Possui parentesco estrangeira conhecida?1)Sim (2)Não De que origem você se considera? (1) Européia (2) Africana(3) Ameríndia(4) outra		Raça: Outraraça: Origem:

ANEXO B. INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS.

Estudo dos genótipos dos vírus das hepatites B no Delta no Maranhão.

Nome: _____ Idade _____ Nasc. ____/____/____
 Endereço _____ Naturalidade _____
 Estado civil _____ sexo _____ escolaridade _____

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Ocupação	Atual:	Trabalhou na saúde:	S () N ()	
Sangue	Doador S () N () 1ª vez	Doações/ano:	Última aceita:	
	Transfusão: S () N ()	Quando:	Motivo:	
Drogas	Álcool: abstinência por toda vida () abstinência há:	Consumo ativo () Tempo de consumo:		
	Cerveja () cachaça () vinho () uísque () outro	Quantificação:		
	Ilícitas: N () S () Via: Ina: () EV () Quando:	Seringa própria: S () N ()		
Atividade sexual	Vida sexual: ativa () inativa () oligoativa ()	Heterossexual () Homo () Bissexual ()		
	Relação estável () 1 parceiro () mais de 1 parce. ()	Promisc. sexual (> 3 parc. em 6 m) S () N ()		
	Preservativo: S () N () Extraconjugal () às vezes	DST S () N () Qual e quando:		
Pérfuro cortantes	Cirurgia eletiva: S () N ()	Qual e quando:		
	Dentista: Extração () Canal () Outro () Qual:	Quando: Dentista prático: S () N ()		
	Uso comum de alicates, barbeadores, navalhas, etc:	Em casa () no salão/ barbearia () Quando:		
	Acidentes com obj. pérfuro cortante: S () N () Quando:	Contato com sang. de outro: S () N () quando:		
	Injeções com seringa de vidro no passado: S () N ()	Acupuntura: S () N ()		
	Tatuagem: S () N () Quando:	Piercing: S () N () Quando:		
Antec. Pessoal	(Especificar condição e tempo: medicamentos, doença, icterícia, hepatite, internações, etc)			
Doenças associad	(Especificar condição e tempo: HAS, DM, dislipidemias, tireopatias, etc)			
Anteced. familiar	(Especificar condição e tempo: contato com doente hepático agudo ou crônico, icterícia, IRC/diálise, DM, etc)			
Exame físico	PA:	FC:	FR: Peso:	
	Altura:	IMC:		
	Geral:	AR/ACV:		
	Abdome:			
Spiders () Eritema palmar () Flapping () Icterícia (/4+) Circulação colateral () Baqueteamento digital ()				

EXAMES COMPLEMENTARES					
Data do exame					Cônjuge
Marca do res Vi rais	HBsAG				
	Anti-HBs T				
	Anti – HBcIgM				
	Anti-HBAS				
	HBeAg				
	Anti-HBe HBV-DNA Genotipagem Anti-HDV				
Tes tes He pá ti.	ALT (LSN)				
	AST (LSN)				
	GGT (LSN)				
	FA (LSN)				
	Bilirrubina D/I				
	TAP				
	Albumina				
Alfafetoproteína					
He mo gra ma	Hb/Htc				
	VCM				
	Leucócitos				
	Neutrófilos				
	Diferencial				
	Plaquetas				
Glicemia em jejum					
Lipi dogr	Colesterol total				
	HDL/LDL				
	Triglicérides				
EDA					
Biopsia					

Coleta de sangue para HBV-DNA: _____/_____/_____

ANEXO C. PARECER CONSUBSTANCIADO CEP.

	Universidade Federal do Maranhão Hospital Universitário Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa e Extensão Comitê de Ética em Pesquisa			
PARECER CONSUBSTANCIADO Tese de Doutorado em Biotecnologia	Nº. do Parecer: 487/2007 Nº do Protocolo: 33104-1065/2007 Data de Entrada no CEP: 18/07/2007 Data da Assembléia: 17/08/2007			
I - Identificação: Título do projeto: Genotipagem do vírus da hepatite B em São Luís-Ma. Identificação do Pesquisador Responsável: Adalgisa de Souza Paiva Ferreira Identificação da Equipe executora: Lena Maria Barros Fonseca e Adalgisa de Souza Paiva Ferreira Instituição onde será realizado: Núcleo de Fígado do Hospital Universitário-UFMA <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Área temática: III</td> <td>Multicêntrico: NÃO</td> <td>Cooperação estrangeira: NÃO</td> </tr> </table>		Área temática: III	Multicêntrico: NÃO	Cooperação estrangeira: NÃO
Área temática: III	Multicêntrico: NÃO	Cooperação estrangeira: NÃO		

II - Objetivos:

O presente projeto tem como objetivo principal caracterizar os genótipos do vírus da Hepatite B de portadores crônicos atendidos no núcleo de Fígado do Hospital Universitário-UFMA.

III- Sumário do projeto:

O protocolo de pesquisa é um projeto de tese de doutorado, estando estruturado da seguinte forma: resumo do projeto, justificativa do projeto, objetivos, metodologia e estratégias de ação, considerações éticas, agência financiadora, resultados esperados, avaliação crítica e risco em relação ao objetivo final.

No projeto, é apresentada uma exposição conceitual de Hepatite B, como também uma justificativa para o estudo do tema.

Conforme descrito na metodologia, a população em estudo será constituída por todos os indivíduos atendidos no núcleo de Fígado do Hospital Universitário-UFMA, no período da pesquisa. Posteriormente, será calculado o tamanho da amostra, assumindo um erro amostral de 5% e prevalência de infecção crônica de 1%. Não é apresentada a análise estatística dos dados.

No item FINANCIAMENTO E EXECUÇÃO consta que todas as despesas serão subsidiadas pela UFMA, por meio do Laboratório de Estudo Genômico e de histocompatibilidade Hospital Universitário-UFMA.

IV- Comentários frente à resolução 196/96 CNS e complementares:

Levando-se em consideração o que preconiza a resolução 196/96 do CNS, pode-se dizer que o projeto possui relevância científica, que visa assegurar benefícios para a melhoria das condições de saúde da população alvo (III.3, n.o, Lei 8080/90); conta com os recursos humanos necessários, bem como há competência do pesquisador com o projeto proposto (III.3, h).

No cronograma, não é especificado o mês que a coleta de dados será iniciada. Também não foi especificada a equipe executora do projeto. Falta o currículo Lattes da co-orientadora.

No termo de consentimento Livre e Esclarecido, observa-se alguns termos técnicos, não foram especificados os benefícios diretos da participação da pesquisa e a forma de seguro que cobrirá os danos previstos, o endereço do CEP-HUUFMA. É necessário assegurar explicitamente o retorno dos benefícios para os sujeitos envolvidos, conforme preconiza a resolução 196/96-III.3.m.n, seja na forma de assistência, seja na posse dos resultados dos exames, etc, bem como, que os resultados da pesquisa serão usados unicamente para fins científicos (Res 196/96-IV.3.f).



V – Pendências:

As pendências foram supridas, tendo importância social e atendendo aos princípios da ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

VI – Recomendações:

Não há recomendações a serem feitas para esse protocolo.

VII - Parecer Consubstanciado do CEP:

Diante do exposto, o protocolo 33104-1065/07, referente a tese de doutorado sob o título influência da Genotipagem do vírus da hepatite B em São Luis-Ma. é considerado: **APROVADO**

Relatórios parciais (um por ano) devem ser apresentados ao CEP-HUUFMA, sendo o primeiro para 09/10/2008, ou se houver algum evento adverso, emenda ou alteração no protocolo. O relatório final deve ser entregue, acompanhado de cópia do trabalho final gravado em CD RO

São Luís, MA, 09 de outubro de 2007.


Wildoberto Batista Gurgel
Filósofo
Coordenador do CEP-HUUFMA
Ethica homini habitat est

ANEXO D. PARECER CONSUBSTANCIADO CEP.



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/HU/UFMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo das Hepatites B, C e D nos Municípios de Urbanos Santos, Humberto de Campos, e da Região do Baixo Munin, Maranhão, Brasil.

Pesquisador: Adalgisa de Souza Paiva Ferreira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 20935413.5.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 448.731

Data da Relatoria: 01/11/2013

Apresentação do Projeto:

A hepatite viral é uma doença provocada por diferentes agentes etiológicos que apresentam particularidades importantes em suas características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões e 170 milhões de pessoas estejam infectadas com os vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV), respectivamente. A infecção pelo vírus da hepatite D (HDV) tem distribuição geográfica heterogênea, estimando-se cerca de 18 milhões de infectados pelo HDV entre os 350 milhões de portadores crônicos do HBV. Estudo transversal com 4000 participantes para conhecer a prevalência de hepatites virais e caracterizar os genótipos e subgenótipos desses vírus nos municípios de Urbano Santos, Humberto de Campos e de municípios da região do Baixo Munim (Axixá, Morros e Icatú)-MA. Serão submetidos à coleta de 15 ml de sangue periférico para realização dos seguintes marcadores sorológicos: HBsAg, anti-HBc e anti-HBs, anti-HDV e anti-HCV que serão realizados no Laboratório Central do Estado do Maranhão (LACEN), através da técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA) sendo os testes de biologia molecular no CEPEC (Com a orientação do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical da Faculdade de Medicina da USP LGHT-FM/USP). O DNA e RNA viral serão extraídos de soro ou plasma. Os dados serão analisados utilizando o programa EPI-INFO (2000) do CDC de

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SÃO LUÍS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br



**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/HU/UFMA**



Continuação do Parecer: 448.731

Protocolo com temática com relevante com proposta de diagnóstico precoce e conhecimento da prevalência das hepatites na região estudada trazendo impacto social de grande relevância. Estudo aprovado anterior à plataforma Brasil e inserido com emenda solicitando inclusão de novos participantes, prorrogação de execução e substituição da palavra "prevalência para Estudo" do título do estudo, sendo justificado que a alteração não reflete na metodologia. A inclusão de novos pesquisadores e prorrogação do tempo esta associada ao número da amostra(4.000 participantes.)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo cumpre com as exigências em relação aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Projeto de pesquisa, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) orçamento e currículo do(s) pesquisador(es). Apresenta justificativa para solicitação de emenda. Atende, portanto às exigências da Resolução CNS/MS nº 466/12.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado antes da plataforma Brasil com inserção de emenda com solicitações referente à prorrogação do tempo de coleta, inclusão de novos pesquisadores e modificações no título original. Documentos apresentados para justificativa da solicitação foram analisados sendo a emenda considerada aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PROTOCOLO APROVADO por atender aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12). Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser inseridas à plataforma encaminhada ao CEP-HUUFMA de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br

ANEXO E. TCLE.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

As hepatites virais são doenças que afetam o fígado e que possuem grande importância na saúde pública. Estas doenças na maioria das vezes não têm sintomas e quando apresentam podem ser fatais. Por esta razão convidamos o Senhor (a), a participar da pesquisa **“Estudo das Hepatites B, C e D nos municípios de Urbano Santos, Humberto de Campos e da Região do Baixo Munim, Maranhão, Brasil,”** a ser realizada, nos municípios de Urbano Santos, Axixá, Morros, Icatu e Humberto de Campos, coordenada pela Professora Doutora Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira, residente à rua, Mitra, Ed. Maison Lafite Ap 1101. Renascença II, São Luís – MA. Telefone: (98) 3227-39.08; Fax-(98)32270131; e-mail adalgisa@terra.com.br. Este projeto tem como objetivo verificar o número de pessoas contaminadas com os vírus das Hepatites B (HBV), C (HCV) e D (HDV) na população dos municípios já citados. Também serão feitos exames de sangue para mostrar se há uma maior facilidade ou dificuldade para o aparecimento e desenvolvimentos dessas hepatites, de onde ela vem, (da África, Europa ou América) e se algum desses vírus tem alguma relação com as raças (branca, negra, indígena). Serão coletadas amostras de 15 mL de sangue. A coleta de sangue poderá causar um leve desconforto local, ou mesmo sensibilização e escurecimento do local de coleta, porém se o senhor (a) pressionar com algodão à parte puncionada, mantendo o braço estendido, sem dobrá-lo, a possibilidade de ficar roxo ou dolorido é muito pequena.

O material utilizado para coleta de sangue será descartado em recipientes apropriados para materiais perfuro-cortante e todos os tubos de sangue serão mantidos em caixas térmicas com gelo. Todas as amostras de sangue serão utilizadas exclusivamente para este projeto. Ao término desta pesquisa o restante do material será descartado.

Em caso de dúvidas e/ou questionamentos relacionados com a ética da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Universidade Federal do Maranhão-HUUFMA, situado na Rua Barão de Itapary, 227, Centro, CEP 65020-070, São Luís-MA, telefone: (98) 2109 1250, email: cep@huufma.br. Quaisquer outras dúvidas a respeito da pesquisa, entrar em contato com a Prof. Dra. Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira pelo telefone (98) 2109 1294.

Para realizar esta pesquisa, contamos com sua colaboração no sentido de responder as perguntas do formulário. Informamos que a pesquisa não lhe trará nenhum prejuízo, não afetará em nada se você tiver fazendo algum tratamento. Não haverá nenhum gasto com sua participação como também não receberá nenhum pagamento. Os exames serão totalmente gratuitos. Será garantido sigilo sobre as informações pessoais, tais como nome e RG. Sua participação não é obrigatória, mas é importante e, a qualquer momento poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, como também poderá se recusar a responder quaisquer das questões que lhes causar constrangimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com a instituição.

Caso o exame seja positivo para algum dos vírus das hepatites, entraremos em contato para devida orientação. O resultado será de fundamental importância para melhorar o atendimento à população acometida da Hepatite B, C e D como também será usado para fins científicos e será publicado para uso da comunidade acadêmico-científica. Se concordar em participar, favor assinar as duas vias desse documento na final página sendo uma sua e outra do pesquisador. Agradecemos pela sua participação e nos colocamos à sua disposição para quaisquer esclarecimentos.

NOME E ASSINATURA DO SUJEITO OU RESPONSÁVEL

São Luís (MA) ____/____/____

(Assinatura)

(Nome por extenso)

Assinatura do (a) _____

Pesquisador

ANEXO F. SUBMISSÃO DE ARTIGO.

ScholarOne Manuscripts

<https://mc.manuscriptcentral.com/j> Journal of Medical Virology

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to Journal of Medical Virology**Manuscript ID** JMV-16-5294**Title** Mutation in the a-determinant of the S gene of the hepatitis B virus associated with concomitant HBsAg and anti-HBs in a population in Northeastern Brazil**Authors** Albuquerque, Ingrid
Ferreira, Adalgisa
Sousa, Marinilde**Date Submitted** 31-Mar-2016[Author Dashboard](#)

ANEXO G. SUBMISSÃO DE ARTIGO.

33

Submission Confirmation for Journal of General Virology article JGV-D-16-00072 - [EMID:91f46444041e483f]

JGV <em@editorialmanager.com>

Para: m13teles@yahoo.com.br

Fev 4 em 3:24 PM

You are being carbon copied ("cc:d") on an e-mail "To" "Max Diego Cruz Santos"

mandiegoes@usp.brCC: gomesmic@yahoo.com.br, jomdiogo@yahoo.com.br, camismalta@yahoo.com.br, m13teles@yahoo.com.br, lenabarrosf@gmail.com, fjcarri@usp.br, adalgisa@terra.com.br, jrrpinho@usp.br

Ms. No. JGV-D-16-00072

A high prevalence of the rare subgenotype D4 of Hepatitis B virus supports the peculiar pattern of slave trade to Maranhão State, Northeast Brazil.

Max Diego Cruz Santos; Michele Soares Gomes-Gouvêa, Ph.D.; Jomar Diogo Costa Nunes; Camila Malta Romano, Ph.D.; **Marinilde Teles Sousa**; Lena Maria Fonseca Barros, Ph.D.; Flair José Carrilho, Ph.D.; **Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira**, Ph.D.; João Renato Rebello Pinho, Ph.D.

Dear Dr. Santos,

Your submission entitled "A high prevalence of the rare subgenotype D4 of Hepatitis B virus supports the peculiar pattern of slave trade to Maranhão State, Northeast Brazil." has been received by Journal of General Virology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jgv.edmgr.com/>.

Your manuscript reference number is JGV-D-16-00072. Please use this in all correspondence relating to this manuscript.
Publish ahead of print:

Journal of General Virology publishes a PDF of the author accepted manuscript online within 3 working days of acceptance, and before it is scheduled to appear in an issue, either online or in print. Please note that we cannot publish the accepted version of the manuscript without a completed Licence to Publish form. In addition, for papers reporting new sequence data, papers will not appear online in Papers in Press until the sequence data are released in public databases.

Please make sure you check the details you have entered into the Editorial Manager site very carefully, particularly the manuscript title, subject category and author details, as these will be used when your accepted PDF is published online

ANEXO H. NORMAS DA REVISTA.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Major Articles: Major article manuscripts must report original research not previously published or in consideration for publication elsewhere. Major articles have a 3,500-word limit (excluding the abstract, title and references). Manuscripts must include a structured abstract of no more than 250 words, organized using the following headings: Introduction, Methods, Results, and Conclusions. The manuscript text should be organized using the following headings: Title, Running Title, Structured Abstract, Keywords (up to five words), Manuscript Text (Introduction, Methods, Results, Discussion), Conflict of Interest Statement, References List and Figures Titles/Legends. A total of five illustrations (tables and figures) are allowed

Manuscript layout

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should use Times New Roman size 12 font with double spacing throughout the text, figure title/legends, and references, with margins of at least 3 cm. Divide the manuscript into the following sections: Cover Letter (addressed to the Editor-in Chief), Title Page, Manuscript Title, Running title, Abstract, Keywords, Manuscript Text, Conflict of Interest statement, Acknowledgments, Financial Support, References and Figure Title/Legends. Cover Letter, Title Page, Acknowledgments and Financial Support must be included in a separated document. Acknowledgments and Financial Support information can be included in the Title Page document. Abbreviations should be used sparingly.

Title Page: The title page should include the authors' names in direct order and without abbreviations, along with institutional affiliations (e.g. each author's department, institution, city, state, and country). The complete address of the corresponding author must be specified, including telephone and fax numbers and e-mail address. Financial Support and Acknowledgments could be included in Title page too. The number of authors and co-authors per paper should be limited to eight, except for multicenter studies.

Potential reviewers: Authors are asked to provide names and contact information (e.g., e-mail and Institutional Affiliation) for three potential unbiased reviewers, preferably from a different institution or region than the authors.

Title: The title should be as concise, clear and, informative as possible. It should not contain abbreviations and should not exceed 200 characters, including spaces.

Running Title: The running title may include up to 50 characters.

Structured Abstract: The structured abstract should summarize the results obtained and the major conclusions in such a way that a reader not already familiar

with the particular topic of the paper can understand the implications of the article. The abstract should not exceed 250 words (100 words in the case of short communications) and must be structured according to the following headings: *Introduction*, *Methods*, *Results*, and *Conclusions*. Abbreviations should be avoided.

Keywords: Three to five important keywords should be listed in English immediately below the structured abstract.

Introduction: The article's introduction should be brief, setting out the purposes for which the study has been performed. Any relevant previous studies should be cited only when essential.

Methods: The methods used in the study should be reported in sufficient detail that readers and reviewers can understand precisely what has been done; any description should be thorough enough to allow repetition or replication by others. Standard techniques only need to be referenced; detailed descriptions are not required.

Ethics: When reporting on experiments on human beings, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional, regional, or national) and in keeping with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 1975, 1983, 1989, 1996, and 2000. When reporting on experiments on animals, indicate whether a national research council's guide for animal experimentation or any law on the care and use of laboratory animals was complied with and the approval number must be sent to the journal.

Clinical trials: In the case of clinical trials, the manuscript should be accompanied by the number and agency of register of the relevant clinical trial (REBEC platform). This requirement is in accordance with guidelines set by BIREME/OPAS/OMS and the International Committee of Medical Journal Editors (www.icmje.org) and the Workshop ICTPR.

Results: The results section should be a concise and impersonal account of the new information revealed by the study or research in question. Avoid repeating in the text the data presented in any tables or illustrations.

Discussion: The discussion section should directly relate to the study being reported. Do not include a general review of the topic and keep the discussion concise and relevant.

Acknowledgments: Any acknowledgments should be short, concise, and restricted to those that are absolutely necessary. In case of sponsoring institutions, do not use acronyms.

Conflict of Interest: All authors should disclose any type of conflict of interest during the development of the study.

Financial Support: List all the financial support received from agencies, institutions, and other organizations that funded the research in whole or in part.

References: References should be numbered consecutively as they appear in the text. List all authors when there are up to six. For seven or more authors, list the first six, followed by “et al.” Type the reference list on a separate page at the end of the manuscript, using double spacing.

Numbered references to personal communications, unpublished data, or manuscripts either “in preparation” or “submitted for publication” should not be listed among the references. If essential, such material can be incorporated at the appropriate place in the text in accordance with the following examples: (AB Figueiredo: Personal Communication, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: Unpublished Data). In-text citations should be indicated using the appropriate reference numbers as superscripts to the corresponding word, using parentheses and no commas (e.g. World^{(1) (2) (3)}; Life^{(30) (42) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50)}.)

The references at the end of the manuscript should follow the system used in the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (for more information, please see: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>).

The titles of any journals referenced should be abbreviated according to the style used in the *Index Medicus* (for more information, please see: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits>).