

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

INGRID DE CAMPOS ALBUQUERQUE

**HBsAg E anti-HBs PRESENTES SIMULTANEAMENTE EM UMA POPULAÇÃO
ESPECÍFICA DE PORTADORES DO VÍRUS DA HEPATITE B**

**SÃO LUÍS
2016**

INGRID DE CAMPOS ALBUQUERQUE

**HBsAg E anti-HBs PRESENTES SIMULTANEAMENTE EM UMA POPULAÇÃO
ESPECÍFICA DE PORTADORES 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 Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profª Dra. Adalgisa de Souza Paiva Ferreira

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

SÃO LUÍS

2016

Albuquerque, Ingrid de Campos

HBsAg e Anti-HBs presentes simultaneamente em uma população específica de portadores do vírus da Hepatite B. / Ingrid de Campos Albuquerque. – São Luís, 2016.
70f.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 2016.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adalgisa de Souza Paiva Ferreira

1. Hepatite B. 2. HbsAg. 3. Mutações. I. Título.

CDU 616.36-002(812.1)

INGRID DE CAMPOS ALBUQUERQUE

**HBsAg E anti-HBs PRESENTES SIMULTANEAMENTE EM UMA POPULAÇÃO
ESPECÍFICA DE PORTADORES 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 Mestre 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
Doutora em Gastroenterologia

Memória: Prof^a Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo
Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Titular: Prof^a Dra. Andrea Martins Melo Fontenele
Doutora em Ciências da Saúde

Externo: Prof^a Dr. Marcos Augusto Grigolin Grisotto
Doutor em Imunologia

Suplente: Prof^a Dr. Valério Monteiro Neto
Doutor em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

AGRADECIMENTOS

"A cada vitória o reconhecimento devido ao meu Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor". Senhor, obrigada pelo fim de mais essa etapa.

Ao concluir este sonho, lembro-me de muitas pessoas a quem ressalto reconhecimento, pois, esta conquista concretiza-se com a contribuição de cada uma delas, seja direta ou indiretamente. No decorrer dos dias, vocês colocaram uma pitada de amor e esperança para que neste momento findasse essa etapa tão significativa para mim.

À todos da minha família que, de alguma forma, incentivaram-me na constante busca pelo conhecimento. Em especial a minha mãe Francisca Cordeiro Amorim, a minha avó Genecilda Cordeiro de Campos, a minha irmã Ingridiane de Campos Albuquerque, meu tio José Erasmo Cordeiro Amorim e meu padastro Francisco das Chagas Alves Albuquerque Filho, pessoas que nunca deixaram de acreditar nos meus sonhos, que me ensinaram a cativar a simplicidade, o gosto pela vida, o respeito e amor ao próximo, valores sem os quais jamais teria me tornado uma pessoa humana, que busca a cada dia, ser mais sensível às necessidades dos outros.

À enfermeira e professora Rosilda Silva Dias um agradecimento em especial, pois foi quem me possibilitou adentrar no mundo da pesquisa ao acreditar no meu potencial e também me acolheu como uma filha, se dedicando, com apoio, carinho, amor e sempre cuidando da minha alimentação, principalmente com suas frutinhas. Além, da importância que representa na minha vida, como profissional e exemplo de mulher.

À minha orientadora, Prof^a Doutora Adalgisa de Sousa Paiva Ferreira, expresso a mais profunda gratidão e agradeço os seus ensinamentos e conselhos, paciência, compreensão e incentivo que me fizeram crescer, além da confiança depositada em mim.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Clínica HUUFMA e aos participantes, em especial a Max Diego Cruz Santos, Jomar Diogo Costa Nunes, Lena Maria Barros Fonseca, do Projeto intitulado Prevalência das Hepatites B, C e D nos municípios de Urbano Santos e da Região do Baixo Munin, Maranhão, Brasil, que me proporcionaram dias maravilhosos e de descontração, durante a pesquisa.

Também às instituições de fomento e ao Programa de pós-graduação Ciências da Saúde.

À Alana Michelle da Silva Janssen e Vandiel Barbosa Santos, não apenas companheiros de turma do Curso de Enfermagem da UFMA, mas também amigos leais presente nas alegrias conquistadas, tristezas vivenciadas, e por acreditarem que posso conquistar todos os meus sonhos. Além de Tayane Cristina, Vinicius Jansen, Jardelle Corrêa, Clarissa Galvão, Bruno Campêlo, Daniele Cardoso e Rosana Martins, com vocês, as dificuldades do dia-a-dia se tornaram meros obstáculos a serem superados e a vitória pôde ser alcançada.

E aos amigos da turma de Mestrado Ciências da Saúde da UFMA, em especial à Marinilde Teles Sousa, a quem tenho uma imensa gratidão por proporcionar a oportunidade que está concluindo esta etapa, pois sem ela esse processo seria bem mais difícil.

Neste momento de encerramento de uma etapa muito especial, em que a alegria por estar terminando se junta ao cansaço, torna-se difícil lembrar-me de todos os amigos e colegas que participaram comigo dessa jornada, mas de uma maneira muito sincera, agradeço a todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização dessa dissertação.

Meus sinceros agradecimentos!

*Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão
que o amor existe,
que vale a pena se doar às amizades a às pessoas,
que a vida é bela sim,
e que eu sempre dei o melhor de mim
e que valeu a pena.*

Luís Fernando Veríssimo

RESUMO

INTRODUÇÃO: A concomitante presença do HBsAg e anti-HBs na infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) deve-se, principalmente, a mutações pontuais no determinante “a” que causam alterações na antigenicidade do HBsAg levando à existência de variantes não sensíveis à ação neutralizante do anti-HBs que possibilitam o escape imune. Assim, o objetivo desse estudo foi identificar indivíduos positivos para esse perfil entre portadores do HBsAg identificados em um estudo de prevalência HBV. **MÉTODOS:** Foram incluídos participantes de um estudo de prevalência de hepatites virais realizado em uma região do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil, que apresentaram positividade para HBsAg e anti-HBs e tinham HBV-DNA quantificado. Todas as amostras foram submetidas à realização do HBsAg, anti-HBs e Anti-HBc. Foram pesquisadas mutações no determinante “a” inserido na *Major Hydrophilic Region* (MRH) do gene S. **RESULTADOS:** Entre 3987 indivíduos avaliados no estudo, 92 (2,3%) eram portadores do HBsAg. Dentre estes, três tinham o perfil anômalo HBsAg e anti-HBs positivos (3,26%). Todos foram identificados como subgenótipo D4. Apenas um indivíduo apresentou duas mutações do gene S, dentro do determinante “a” (Y134N/T140I). **CONCLUSÃO:** Em uma comunidade do Nordeste do Brasil foi identificada baixa frequência do perfil atípico HBsAg e AntiHBs positivos simultaneamente. Entre eles, apenas um indivíduo apresentou mutações no determinante “a” do gene S, já descritos anteriormente associados a esse perfil. De qualquer modo, a existência de escape imune em uma comunidade pode ter grande importância, especialmente na avaliação dos programas de imunização.

Palavras-chaves: Hepatite B. HbsAg. Anticorpo. Mutação.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The concomitant presence of HBsAg and anti-HBs in hepatitis B virus (HBV) infections mainly results from isolated mutations in the a-determinant, which causes changes HBsAg antigenicity. This in turn causes variants unsusceptible to the neutralizing action of anti-HBs, thus permitting immune escape. Therefore, this study had the aim of identifying subjects with this profile among HBsAg carriers identified in an HBV prevalence study. **METHODS:** The study included participants enrolled in a study of viral hepatitis prevalence from the state of Maranhão in northeastern Brazil. These participants had tested positive for HBsAg and anti-HBs and had quantified HBV DNA. All samples were evaluated for HBsAg, anti-HBs, and anti-HBc. Mutations were sought in the a-determinant located in the S gene's major hydrophilic region (MHR). **RESULTS:** Among the 3,987 individuals evaluated, 92 (2.3%) were HBsAg carriers. Among these, three had the atypical HBsAg and anti-HBs-positive profile (3.26%). All were identified as subgenotype D4. Only one individual had two S gene mutations, within the a-determinant (Y134N/T140I). **CONCLUSION:** The frequency of individuals concomitantly positive for HbsAg and anti-HBs was low in the patient sample. Only one individual had mutations in the S gene a-determinant, which is known to be associated with this profile. Nevertheless, the existence of immune escape in communities can have great importance, especially for evaluating immunization programs.

Key words: Hepatitis B. HbsAg. Antibody. Mutation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral completa do HBV.....	13
Figura 2 - Representação esquemática da organização genômica do vírus da hepatite B (HBV) mostrando as fases abertas de leitura (ORF) existentes.....	14
Figura 3 - Representação esquemática da proteína S do HBV, demonstrando a MRH (aa100 a 169) e a localização do determinante "a" (aa124 a 147).....	15
Figura 4 - Representação esquemática da MRH demonstrando as ligações dos resíduos de cisteína formado por ligações de dissulfureto.....	16
Tabela 1 - Características epidemiológica dos portadores com concomitância de HBsAg e anti-HBs. São Luís, MA. 2016.....	31
Tabela 2 - Marcadores sorológicos e moleculares dos portadores com concomitância de HBsAg e anti-HBs. São Luís, MA. 2016.....	32
Figura 1 - Representação esquemática das mutações no determinante "a"	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Vírus da Hepatite B	13
2.2 Concomitância HBsAg e anti-HBs	16
2.3 Mutações de escape	18
3 OBJETIVOS.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Sujeitos e amostra	23
4.2 Testes sorológicos	24
4.3 Análise da sequência do gene S.....	24
4.4 Mutações no gene S	25
4.5 Considerações éticas	25
5 ARTIGO ORIGINAL	27
6 ARTIGO EM INGLÊS.....	39
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que cerca de 240 milhões de pessoas são cronicamente portadoras do vírus da hepatite B (HBV) (LOZANO et al., 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015a). Sua prevalência apresenta grandes variações em diferentes partes do mundo, definidas por endemicidades alta, média e baixa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015b). No Brasil, estudo de revisão recentemente publicado identificou que, de modo geral, o país apresenta taxa de prevalência menor do que 1%, exceto em algumas regiões da Amazônia e em algumas áreas rurais dos Estados do Nordeste e Centro-Oeste, onde são encontradas áreas de média endemicidade (entre 2 e 8%) (SOUTO, 2015).

Na infecção pelo HBV, o desaparecimento do HBsAg e a emergência do anti-HBs pressupõem o desenvolvimento da imunidade contra o vírus, já que esse último, é o anticorpo que o neutraliza (GERLICH, 2007). Do mesmo modo, a presença do anti-HBs após a vacinação tem o mesmo significado (COLSON et al., 2007; JANG et al., 2009). A concomitante presença do HBsAg e anti-HBs vem sendo descrita desde a década de 70 e se constitui em um desafio para o acompanhamento clínico dos portadores, pois a indefinição do seu real significado pode ser de grande importância epidemiológica em consequência da inatividade do anti-HBs resultante de vacinação diante da infecção com vírus que sofreram transformação de escape antigênico (LIU et al., 2012; DING et al., 2016).

A prevalência desse perfil ao redor do mundo tem se mostrado em torno de 2,43% a 8,9% em estudos com populações de alta e baixa endemicidades (LIU et al., 2012; ZHANG et al., 2007; LADA et al., 2006; PANCHER et al., 2015; COLSON et al., 2007; LIU et al., 2016; DING et al., 2015; HUANG et al., 2010; DING et al., 2016; CHEN et al., 2011; PU et al., 2015).

As proteínas do envelope do HBV são produzidas a partir das regiões Pré-S/S do genoma viral. Elas são compostas pelas frações *Large* (L), *Middle* (M) e *Small* (S). Esta última, que corresponde ao HBsAg, contém a chamada *Major Hydrophilic Region* (MHR) (aa 99 e 169), que contém o determinante “a” (aa 124 a 147), cuja conservação é importante na conformação do HBsAg para que sua ação imunogênica seja mantida (ZHANG; DING, 2015). Esse determinante corresponde ao principal sítio de reconhecimento do HBsAg pelos linfócitos e pelo anti-HBs gerando neutralização do vírus (CALIGIURI et al., 2016).

Um dos principais mecanismos pelo qual ocorre a presença do HBsAg e do anti-HBs concomitantemente é a mutação pontual na MHR, principalmente no determinante “a”, causando alterações relevantes nas propriedades antigênicas do HBsAg e levando à existência de variantes não sensíveis à ação neutralizante do anti-HBs (PONDÉ, 2011; SHI et al., 2012; BRUNETTO, 2014).

Estas mutações podem ocorrer principalmente: (1) por pressão imune de vacinação do HBV ou por ação da imunoglobulina humana anti-hepatite tipo B (IGHAHB), sendo esta utilizada em portadores do vírus ou; (2) de forma natural na infecção crônica, causada pela pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico, gerando um anti-HBs que não neutraliza o HBsAg coexistente (PONDÉ, 2011; ALAVIAN; CARMAN; JAZAYERI, 2013; GAO et al., 2015; COPPOLA et al., 2015; ZHANG et al., 2007).

Foram descritas 54 mutações no determinante “a” associadas ao perfil anômalo HBsAg e anti-HBs positivos. Dentre essas, as mais frequentemente descritas até agora foram a G145R (substituição de uma glicina por uma arginina na posição 145), associada a vacinação contra hepatite B e também ao uso da IGHAHB e I126S (substituição de isoleucina por serina na posição 126), relacionada com a infecção crônica que implica na alteração de antigenicidade do HBsAg, e consequente escape imune do HBV (CUESTAS et al., 2006; MATHET et al., 2006; LADA et al., 2006; LU et al., 2006; COLSON et al., 2007; ZHANG et al., 2007; SAYINER et al., 2007; VELU et al., 2008; JANG et al., 2009; VAN DOMMELEN et al., 2010; HSU et al., 2010; HUANG et al., 2010; WANG et al., 2010; CHEN et al., 2011; LIU et al., 2012; HSU et al., 2013; PANCHER et al., 2015; PU et al., 2015; DING et al., 2015; DING et al., 2016; LIU et al., 2016).

No Brasil, Bertolini et al. (2010) estudaram 25 crianças nascidas de mães portadoras do HBsAg, que foram submetidas à vacinação e ao IGHAHB, no qual encontraram apenas uma que apresentava este perfil atípico, mas não foi identificada a mutação G145R, a mais tradicionalmente associada a infecção viral que sofre ação da vacina e IGHAHB (CARMAN et al., 1990).

Ainda não há informações sobre a frequência desse perfil sorológico no Brasil em estudo envolvendo amostras de regiões específicas. Populações estas que podem estar susceptíveis à infecção pelo HBV mesmo tendo sido vacinadas e tenham desenvolvido o anti-HBs.

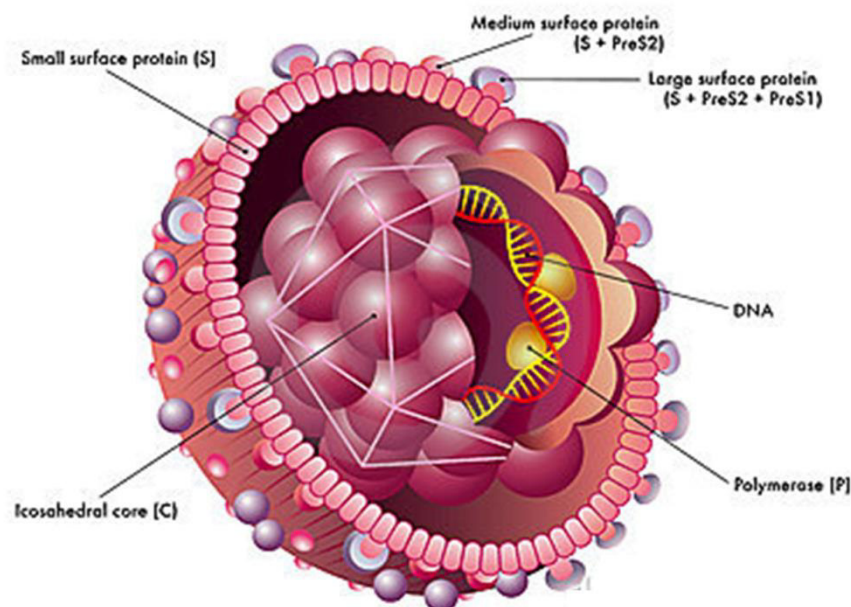
Assim o objetivo desse estudo foi identificar indivíduos positivos para esse perfil em uma pesquisa de prevalência do hepatites virais, incluindo o HBV realizado nos municípios de Axixá, Morros, Icatu, Humberto de Campos e Urbano Santos, localizados no Estado do Maranhão, região Nordeste do Brasil, onde foi realizado estudo de prevalência do HBV.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vírus da Hepatite B

O HBV é vírus envelopado que pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus* e possui tropismo por células hepáticas. Com aproximadamente, 42nm de diâmetro, com nucleocapsídeo icosaédrico de 27nm e genoma circular constituído de DNA de fita dupla incompleta contendo aproximadamente 3.200 nucleotídeos (LIU et al., 2006) (Figura 1).

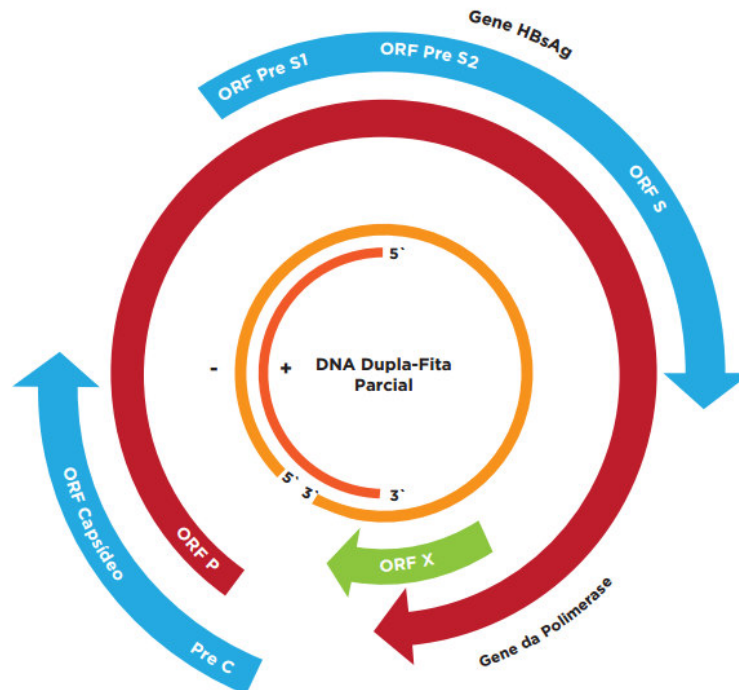
Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral completa do HBV.



Disponível em: <http://pt.dreamstime.com/imagen-de-stock-royalty-free-v%C3%A9rus-da-hepatite-b-image22144156>

O genoma do HBV (Figura 2) possui quatro fases abertas de leitura (*open reading frame* – ORF) compostas pelos seguintes genes: gene S que codifica as proteínas que formam o antígeno de superfície, as proteínas L (*large*), M (*middle*) e S (*small*), formado pelas regiões Pré-S1, Pré-S2 e S; gene C, formado pelas regiões Pré-Core e Core, sintetiza as proteínas do HBcAg e HBeAg; gene P, que codifica a DNA-polimerase; e gene X, com a função de síntese da proteína X, que parece ter uma função fundamental na replicação viral e no surgimento do carcinoma hepatocelular (LIANG, 2009; LIAO et al., 2012).

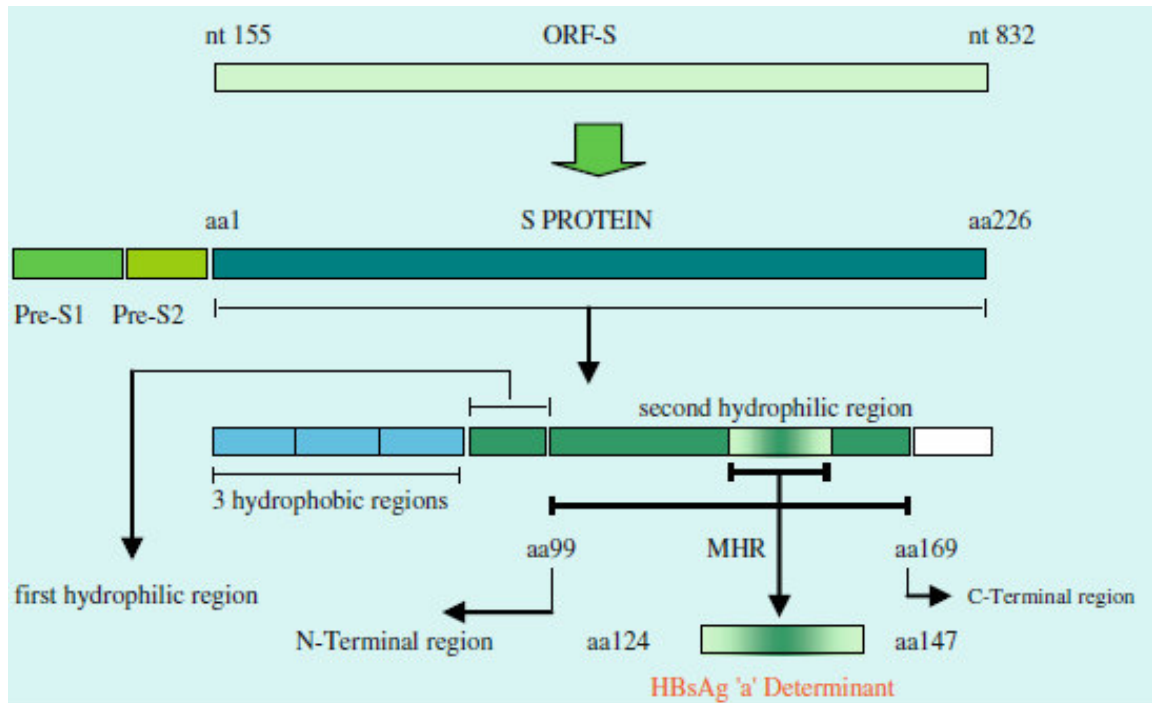
Figura 2 - Representação esquemática da organização genômica do vírus da hepatite B (HBV) mostrando as fases abertas de leitura (ORF) existentes.



Fonte: Brasil (2015)

A proteína S (*small*), que corresponde ao HBsAg (antígeno de superfície do HBV) codificada pelo gene S contém o segmento entre os aminoácidos 99 e 169 denominada *Major Hydrophilic Region* (MHR), em que o determinante “a” (aa 124 a 147) está localizado (Figura 3), cuja conservação é importante na conformação do HBsAg para que sua ação imunogênica seja mantida (ZHANG; DING, 2015). O anti-HBs reconhece esse epítipo na sua ação de neutralização (CALIGIURI et al., 2016).

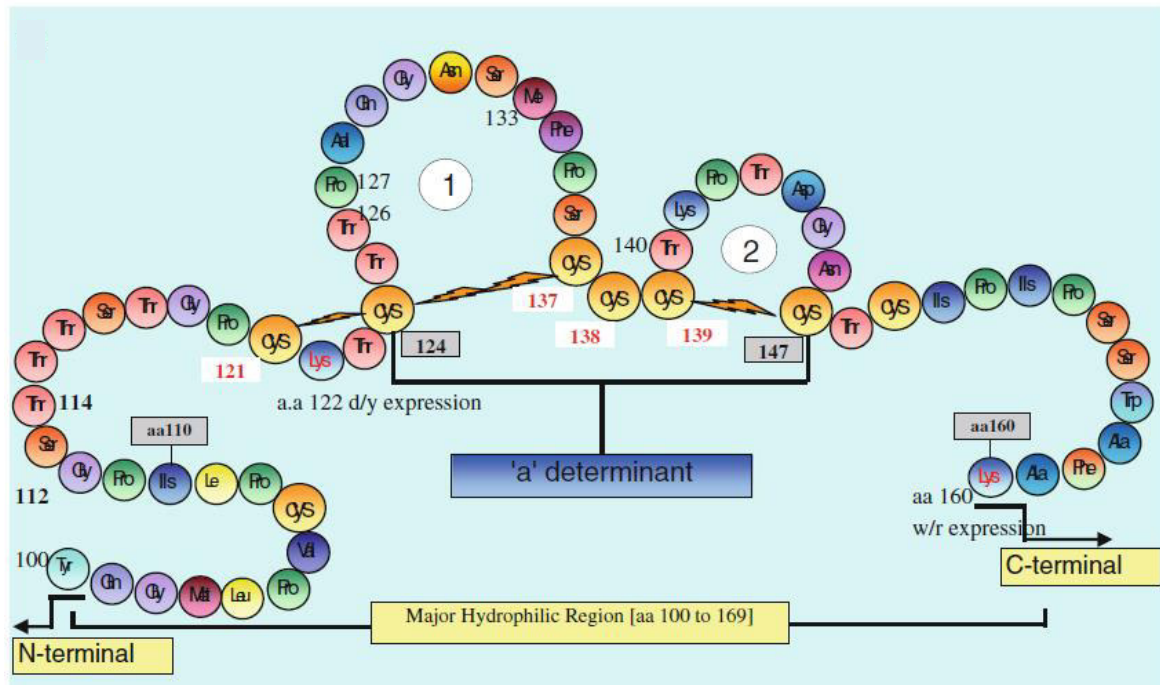
Figura 3 - Representação esquemática da proteína S do HBV, demonstrando a MRH (aa100 a 169) e a localização do determinante "a" (aa124 a 147).



Fonte: Pondé (2011).

O determinante "a" apresenta epítomos conformacionais que são estabilizados por uma estrutura principal de resíduos de cisteína ligados por pontes dissulfureto conservado (aa 121-124; aa 124-137 e aa 139-147) sendo essencial para a imunogenicidade do HBsAg (Figura 4). As alterações nos resíduos de cisteína podem resultar na antigenicidade reduzida ou na redução dos níveis de expressão da proteína, que implicará na falha da neutralização da infecção viral, além de afetar a detecção em ensaio de diagnóstico, dependendo dos epítomos reconhecidos pela configuração do reagente utilizado no ensaio (COLEMAN, 2006; PONDÉ, 2011; ALAVIAN; CARMAN; JAZAYERI, 2013; BIAN et al., 2013).

Figura 4 - Representação esquemática da MRH demonstrando as ligações dos resíduos de cisteína formado por ligações de dissulfureto.



Fonte: Pondé (2011).

2.2 Concomitância HBsAg e anti-HBs

O percurso sorológico da hepatite B geralmente descrito na literatura, que ocorre na maioria dos portadores do HBV, é a detecção do antígeno de superfície (HBsAg) no período de incubação (50 a 180 dias) que persiste durante a fase aguda, desaparecendo com a convalescença, cerca de três a cinco meses após a exposição. Enquanto, sua persistência por mais de 6 meses define o estado de portador crônico do HBV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015a).

No indivíduo que elimina o vírus, na fase de convalescência ocorre aumento progressivo das concentrações do anti-HBs, indicando desenvolvimento de imunidade para este vírus. Esse marcador surge com o desaparecimento do HBsAg e se mantém detectável no soro por toda a vida do paciente, indicando imunização ativa na grande maioria dos indivíduos submetidos a vacinação para o HBV (LIANG, 2009). Os níveis inferiores a 10 UI/ml são considerados não responsivos, baixo responsivos são aqueles que apresentam títulos entre 10,0 e 99,0 UI/ml e responsivos, aqueles cujos títulos são superiores a 100 UI/ml (MOMENI et al., 2015).

Em contradição a esse padrão sorológico, a coexistência do HBsAg e do anti-HBs é um perfil anômalo, apresentando uma prevalência de cerca 2,43% a 8,9% dependendo da população estudada (LIU et al., 2012; ZHANG et al., 2007; LADA et al., 2006; PANCHER et al., 2015; COLSON et al., 2007; LIU et al., 2016; DING et al., 2015; HUANG et al., 2010; DING et al., 2016; CHEN et al., 2011; PU et al., 2015). Entretanto, o mecanismo subjacente à presença de ambos os marcadores é desconhecido mesmo sendo relatado desde 1976, podendo ser observado nas hepatites aguda e crônica e no carcinoma hepatocelular (LADA et al., 2006; GERLICH, 2007).

Quando relatado pela primeira vez foi considerado como superinfecção por uma segunda cepa do HBV (COLSON et al., 2007; JANG et al., 2009; LIU et al., 2012), ideia adotada como justificativa na infecção aguda, que segundo Pondé (2011) pode apresentar um determinante "a" diferente do primeiro infectante do HBV, cujos anticorpos pré-existente não seriam capazes de reconhecer o novo vírus em circulação.

Na infecção crônica, acredita-se que substituições simples ou múltiplas de aminoácidos e/ou variações dentro e/ou fora do determinante "a" ou em outras regiões da proteína S (HBsAg), que ocorre naturalmente durante o curso da infecção, favorece as alterações de antigenicidade e, subsequentemente, a coexistência do HBsAg e anti-HBs (CUESTAS et al., 2006; LADA et al., 2006; KAJIWARA et al., 2008; HUANG et al., 2010; WANG et al., 2006; PONDÉ, 2011).

Desse modo, Chen et al. (2011) afirma que pode haver três situações importantes que conduzem a coexistência do HBsAg e anti-HBs: a) o portador crônico com resposta anti-HBs existente, mas ineficaz; b) avanço do HBV em pessoas vacinadas e; c) a reativação do HBV em pacientes que se submetem a imunossupressão. Ainda assim, o significado virológico, resposta imune e evolução clínica destes pacientes permanecem largamente desconhecidos.

Neste caso, a presença do anti-HBs não indica a eliminação viral e sugere que os portadores desse perfil apresentam replicação ativa. Além disso, a presença de anti-HBs não exclui a possibilidade de uma nova infecção do HBV ou reativação de uma infecção do HBV preexistente sob certas circunstâncias, tais como drogas tratamento imunossupressor ou infecção por HIV (PALMORE et al., 2009).

2.3 Mutações de escape

Ao analisar as mutações presentes no HBV deve-se atentar que o vírus utiliza transcriptase reversa para se replicar por meio de um RNA, em consequência disso genomas virais mutantes intermediários e *quasespécies* são geradas levando ao aparecimento de mutantes virais durante a infecção que ocorre naturalmente (PURDY, 2007). Esses mutantes muitas vezes misturam-se com vírus do tipo selvagem em portadores do HBV. Dessa maneira, a variabilidade genética desafia a sensibilidade dos ensaios imunológicos e moleculares que implica no diagnóstico, tratamento e pós-avaliação da hepatite B (SCHOCHETMAN; KÜHNS, 2006; WEBER, 2006).

Isto posto, os mutantes de escape do HBV têm sido capazes de escapar ou transferir passivamente as respostas neutralizantes induzidas pela vacina, levando ao desenvolvimento do HBsAg na presença de títulos elevados de anticorpos anti-HBs (PAWLOTSKY, 2005). Essas alterações podem tornar qualquer defesa humoral anti-HBs contra o HBsAg menos eficaz, direcionando a um escape do reconhecimento pelo sistema imunitário do hospedeiro, o que justifica a detecção simultânea de HBsAg e Anti-HBs (SONG et al., 2005; LADA et al., 2006; COLSON et al., 2007).

Essas variantes estão relacionadas com a simultaneidade de portadores com HBsAg e anti-HBs que podem, tanto comprometer a expressão da proteína do HBsAg quanto promover a retenção viral intracelular que conduz a uma baixa concentração de produtos gênicos extracelulares na corrente sanguínea, apesar de replicação viral ativa, resultante da falta de determinantes antigênicos principais reconhecidos por anticorpos específicos (CHEN et al., 2006; MUN et al., 2008; PONDÉ, 2011).

As mutações em locos únicos ou múltiplos do determinante "a" podem ser resultado de uma forte pressão seletiva imunológica sobre essas populações virais, possibilitando a sua emergência, induzindo um mecanismo de escape viral que irá impedir a neutralização do HBsAg, já que o escape imune ocorre pelo direcionamento de anticorpos que circulam no soro a um HBsAg que não está mais presente (PONDÉ, 2011; PANCHER et al., 2015; LIN et al., 2013; BRASIL, 2015).

Primeiramente foram descritas o surgimento do escape vacinal do HBV em 1990, em uma criança que recebeu imunização pós-exposição, devido a mutação

G145R, no qual trata-se de uma substituição de glicina por arginina na posição 145, localizada no segundo ciclo do determinante "a". Sendo esta a mutação a mais importante e documentada na literatura, porém muitas outras substituições têm sido descritas dentro e fora da sequência do determinante "a" e na região pré-S (CARMAN et al. 1990; WEBER, 2005; PAWLOTSKY, 2005; PONDÉ, 2011; SHIRAZI et al., 2013). Fato que levanta preocupações sobre o sucesso do programa de vacinação, bem como ensaios de diagnóstico, os quais dependem dos epítomos reconhecidos para a configuração do reagente do ensaio (COLEMAN, 2006; HORVAT, 2011).

A mutação G145R ocasiona alterações conformacionais que afetam a ligação dos anticorpos neutralizantes e que propicia a disseminação dessas variantes não detectadas pelos testes sorológicos habituais, tornando-se estável no decorrer do tempo, sendo esta capaz de replicar-se em altos títulos por muitos anos. Além disso, pode ser transmitida horizontalmente, uma vez que persiste em leucócitos no sangue periférico de portadores assintomáticos do HBV (LINDENBERG, 2013; MATOS, 2007).

O escape vacinal contesta o sucesso da estratégia universal de vacinação contra hepatite B, pois a descoberta do vírus mutante, mostra trocas de aminoácidos na proteína de superfície do HBsAg, o que pode levar à redução ou mesmo abole a ligação de anticorpos neutralizadores induzidos pela vacina. Consensos de diferentes estudos, indicam que a presença de escape mutantes da vacina pode ser considerado negligenciável em relação aos programas de vacinação em todo o mundo (SHEPARD et al., 2006; HSU et al., 2010; ALAVIAN; CARMAN; JAZAYERI, 2013).

Outra situação pertinente, são as fugas imunes naturais que foram descritas em pacientes que não receberam IGHAHB ou vacina, resultando, consequentemente, em uma replicação viral ativa com a detecção do HBsAg e doença hepática, apesar da soroconversão para anti-HBs em pacientes com hepatite B crônica devido à resposta endógena do anti-HBs existente (AVELLON; ECHEVARRIA, 2006; NOROUZI et al., 2010; NOROUZI et al., 2012; SAYAD et al., 2012; LADA et al., 2006; SONG et al., 2005). Possibilidade justificada pelo aparecimento das mutações de escape em que esta proteína não poderia ser reconhecida pelo sistema imunitário do hospedeiro devido a pressão seletiva (ALAVIAN; CARMAN; JAZAYERI, 2013).

Quando ocorrem dentro do determinante “a”, essas mutações tendem a ocorrer preferencialmente no primeiro *loop* que envolve as posições 126, 129, 130, 131, 133, no qual a posição 126 do primeiro ciclo foi afetada com maior frequência (SONG et al., 2005). No segundo ciclo, as posições 141 a 145 são cruciais para a ligação dos anticorpos anti-HBs induzidos pela vacina recombinante para o HBV e as posições de 144 e 145 especificamente são mais frequentemente associadas com a pressão imune do anti-HBs do que mutações em outros domínios ectópicos da MRH. As mutações nas posições 143, 144, 145 pode resultar em má reatividade com anticorpos monoclonais (LADA et al., 2006; BERTOLINI et al., 2010; LIU et al., 2012; ALAVIAN; CARMAN; JAZAYERI, 2013). Estas diferenças na localização de mutações pode representar uma característica distinta das mutações que ocorrem naturalmente e pode sugerir diferenças nos epítomos alvo do anti-HBs adquiridos naturalmente e dos obtidos por imunização (PONDÉ, 2011).

Quanto ao estado imunológico do hospedeiro, este padrão compreende um achado relativamente comum em indivíduos em tratamento dialítico, receptores de transplantes, infectados pelo HIV ou indivíduos em tratamento quimioterápico ou uso de drogas imunossupressora. Nesses indivíduos, que possuem HBV com mutações no determinante “a”, pode escapar da capacidade de neutralização de anti-HBs e, dessa forma, albergam cepas altamente replicativas e estão propensos a uma maior propagação da infecção. Isso indica que a sua detecção na rotina clínica pode ser um achado importante, uma vez que pode sugerir uma condição de imunossupressão (COLSON et al., 2007; PONDÉ, 2011; BRUNETTO, 2014).

Em contrapartida, se essa coexistência se fizer presente em portadores HBeAg positivo e imunotolerantes altamente virêmicos a alternativa é que a heterogeneidade da produção de anticorpos pode ultrapassar a variabilidade do vírus (ZHANG et al., 2007; SHI et al., 2012; YU et al., 2014).

O prognóstico de portadores com este perfil sorológico ainda necessita de mais pesquisas (ZHANG et al., 2007). Mas, Colson et al. (2007) sugerem que essa concomitância pode está relacionada com doença hepática mais avançada, como a hepatite B crônica com fibrose avançada, cirrose e pior prognóstico. Assim como, Jang et al. (2009) e Brunetto (2014) ao mostrarem a relação clínica dessa simultaneidade com carcinoma hepatocelular, concluíram que as mutações de escape contribuem significativamente para a hepatocarcinogênese. Todavia, esse

perfil sorológico atípico não foi incluído na maioria dos estudos clínicos devido à sua baixa prevalência (SEO et al., 2014).

3 OBJETIVOS

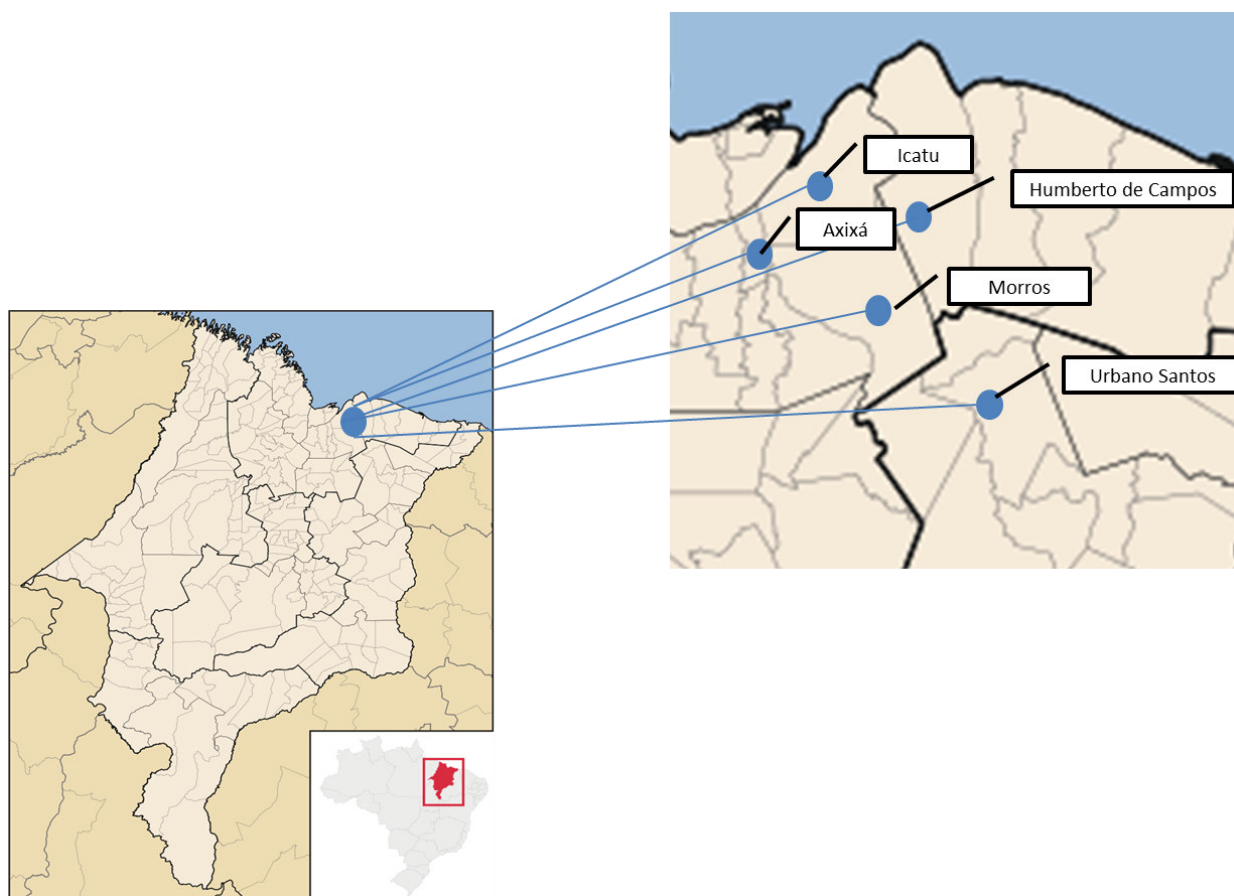
- Identificar indivíduos com perfil sorológico anômalo (HBsAg e anti-HBs positivos);
- Pesquisar mutações do gene S já identificadas que pudessem justificar esse perfil.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeitos e amostra

Trata-se de um estudo transversal com indivíduos que participaram de um estudo de prevalência de hepatites virais realizado em uma região do Estado do Maranhão (municípios de Humberto de Campos, Axixá, Morros, Icatu e Urbano Santos) (Figura 5), realizado entre Março de 2012 a Dezembro de 2014 onde foi identificada uma endemicidade intermediária da infecção, prevalência de 2,30% (dados ainda não publicados).

Figura 5 - Municípios em que o estudo foi realizado.



A coleta de dados se deu por de um questionário epidemiológico demográfico (ANEXO A) e amostras de 10 ml de sangue, que posteriormente foram feitas alíquotas em duplicata que foram conservadas em freezer a -70°C para realização dos exames sorológicos e moleculares.

A amostragem foi feita por conglomerado em dois estágios, no primeiro foram sorteados os setores com probabilidade proporcional à população e no segundo foram sorteados os quarteirões. Com o mapa do setor, foram sorteados: o quarteirão inicial, em seguida, o ponto de início do quarteirão, prosseguindo-se no sentido horário. Caso nesse, quarteirão sorteado não fosse alcançado o número de amostras para o setor, mais um quarteirão foi sorteado até que o número das amostras para o setor fosse alcançado.

4.2 Testes sorológicos

Todas as amostras foram submetidas à realização do HBsAg, anti-HBs e Anti-HBc, utilizando a técnica de imunoenzimático (ELISA) com utilização de kits comerciais (Diasorin, Itália). Os resultados dos anti-HBs foram obtidos em absorbância e convertidos em UI/ml, sendo definido como positivo os títulos superiores a 10 UI/ml. E os com HBsAg positivos foram submetidos a pesquisa de HBeAg e anti-HBe utilizando mesma metodologia dos demais marcadores.

Os portadores que apresentaram simultânea positividade para HBsAg e anti-HBs foram submetidos repetição dos testes. Naqueles confirmados foram realizados a determinação da carga viral e genotipagem do vírus.

4.3 Análise da sequência do gene S

A extração do DNA do HBV foi realizada nas amostras nas quais foi possível a detecção, empregando-se o Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®) a partir de 200 µL, seguindo instruções do fabricante.

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

A genotipagem foi realizada por meio da utilização de *primers* para amplificação de um fragmento de 1306 pares de bases (pb), que compreende todo o gene Pré-S/S do HBsAg e parte da polimerase, Todas as sequências dos *primers* e procedimentos de amplificação e sequenciamento já foram descritos (BARROS et al., 2014; GOMES-GOUVÊA et al., 2015). Nesse processo, foi utilizada a enzima polimerase Platinum Taq DNA (Invitrogen) e os primers PS3132F (5' CCT CCY GCH TCY ACC AAT CG 3'; nt 3132-3151) e 2920RM (5' ACG TCC CKC GHA GRA TCC

AG 3'; nt 1417-1398) na primeira rodada de PCR, e PS3201F (5' CAY CCH CAG GCM ATG CAG TGG 3'; nt 3201-3221) e P1285R (5' CWA GGA GTT CCG CAG TAT GG 3'; nt 1285-1266) na segunda rodada que anelam em regiões conservadas do gene S.

Para o sequenciamento foram utilizados três pares de *primers* da região S/Pol: 1 – PS3201F e HBV477R (5' GGA CAV ACG GGC AAC ATA CCT T 3'; nt 477–456); 2 – L372 (5' – TCG YTG GAT GTR TCT GCG GCG TTT TAT – 3'; nt 370–396) e RADE2M (5' – TGR CAN ACY TTC CAR TCA ATN GG – 3'; nt 989–970); 3 – P781F (5' GAR TCC CTT TWT RCC KCT RTT ACC 3'; nt 781–804), e P1285R (GOMES-GOUVÊA et al., 2015).

A eletroforese foi realizada pelo sequenciador automático o ABI 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

4.4 Mutações no gene S

As sequências dos fragmentos sequenciados foram traduzidas para aminoácidos e comparadas à sequência de aminoácidos de uma sequência referência consenso em relação a cada subgenótipo.

As mutações foram investigadas em todo determinante “a” (aa 124 a 147) que está incluído na MRH entre os resíduos 100 a 169.

4.5 Considerações éticas

Este estudo foi submetido à Comissão Científica do HUUFMA, à análise do Comitê de Ética em Pesquisa do HUUFMA e tem Parecer Consubstanciado aprovado sob o nº 448.731 (ANEXO B) após emenda (via Plataforma Brasil) que solicitou prorrogação do tempo de execução do projeto, atendendo aos requisitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Somente após a autorização de cada participante, com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C) é realizada a coleta das informações por meio de um questionário, assim como a coleta de sangue para a realização dos exames laboratoriais. Os procedimentos de biossegurança referentes à coleta, manipulação e processamento do material biológico, estão sendo

realizados segundo as regras básicas para o trabalho em laboratório (BRASIL, 2006).

5 ARTIGO ORIGINAL

MUTAÇÃO NO DETERMINANTE “a” DO GENE S DO VÍRUS DA HEPATITE B ASSOCIADA AO HBsAg E anti-HBs PRESENTES SIMULTANEAMENTE EM UMA POPULAÇÃO DO NORDESTE DO BRASIL

INTRODUÇÃO

Estima-se que cerca de 240 milhões de pessoas são cronicamente portadoras do vírus da hepatite B (HBV) [Lozano et al., 2012; World Health Organization, 2015a]. Sua prevalência apresenta grandes variações em diferentes partes do mundo, definidas por endemicidades alta, média e baixa [World Health Organization, 2015b]. No Brasil, estudo de revisão recentemente publicado identificou que, de modo geral, o país apresenta taxa de prevalência menor do que 1%, exceto em algumas regiões da Amazônia e em algumas áreas rurais dos Estados do Nordeste e Centro-Oeste, onde são encontradas áreas de média endemicidade (entre 2 e 8%) [Souto, 2015].

Na infecção pelo HBV, o desaparecimento do HBsAg e a emergência do anti-HBs pressupõem o desenvolvimento da imunidade contra o vírus, já que esse último, é o anticorpo que o neutraliza [Gerlich, 2007]. Do mesmo modo, a presença do anti-HBs após a vacinação tem o mesmo significado [Colson et al., 2007; Jang et al., 2009]. A concomitante presença do HBsAg e anti-HBs vem sendo descrita desde a década de 70 e se constitui em um desafio para o acompanhamento clínico dos portadores, pois a indefinição do seu real significado pode ser de grande importância epidemiológica em consequência da inatividade do anti-HBs resultante de vacinação diante da infecção com vírus que sofreram essa transformação de escape antigênico [Liu et al., 2012; Ding et al., 2016].

A prevalência desse perfil ao redor do mundo tem se mostrado em torno de 2,43% a 8,9% em estudos com populações de alta e baixa endemicidades [Liu et al., 2012; Zhang et al., 2007; Lada et al., 2006; Panchar et al., 2015; Colson et al., 2007; Liu et al., 2016; Ding et al., 2015; Huang et al., 2010; Ding et al., 2016; Chen et al., 2011; Pu et al., 2015].

As proteínas do envelope do HBV são produzidas a partir das regiões Pré-S/S do genoma viral. Elas são compostas pelas frações *Large* (L), *Middle* (M) e *Small*

(S). Esta última, que corresponde ao HBsAg, contém a chamada *Major Hydrophilic Region* (MHR) (aa 99 e 169), que contém o determinante “a” (aa 124 a 147), cuja conservação é importante na conformação do HBsAg para que sua ação imunogênica seja mantida [Zhang; Ding, 2015]. Esse determinante corresponde ao principal sítio de reconhecimento do HBsAg pelos linfócitos e pelo anti-HBs gerando neutralização do vírus [Caligiuri et al., 2016].

Um dos principais mecanismos pelo qual ocorre a presença do HBsAg e do anti-HBs concomitantemente é a mutação pontual na MHR, principalmente no determinante “a”, causando alterações relevantes nas propriedades antigênicas do HBsAg e levando à existência de variantes não sensíveis à ação neutralizante do anti-HBs [Pondé, 2011; Shi et al., 2012; Brunetto, 2014].

Estas mutações podem ocorrer principalmente: (1) por pressão imune de vacinação do HBV ou por ação da imunoglobulina humana anti-hepatite tipo B (IGHAHB), sendo esta utilizada em portadores do vírus ou; (2) de forma natural na infecção crônica, causada pela pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico, gerando um anti-HBs que não neutraliza o HBsAg coexistente [Pondé, 2011; Alavian et al., 2013; Gao et al., 2015; Coppola et al., 2015; Zhang et al., 2007].

Foram descritas 54 mutações no determinante “a” associadas ao perfil anômalo HBsAg e anti-HBs positivos. Dentre essas, as mais frequentemente descritas até agora foram a G145R (substituição de uma glicina por uma arginina na posição 145), associada a vacinação contra hepatite B e também ao uso da IGHAHB e I126S (substituição de isoleucina por serina na posição 126), relacionada com a infecção crônica que implica na alteração de antigenicidade do HBsAg, e consequente escape imune do HBV [Cuestas et al., 2006; Mathet et al., 2006; Lada et al., 2006; Lu et al., 2006; Colson et al., 2007; Zhang et al., 2007; Sayiner et al., 2007; Velu et al., 2008; Jang et al., 2009; Van Dommelen et al., 2010; Hsu et al., 2010; Huang et al., 2010; Wang et al., 2010; Chen et al., 2011; Liu et al., 2012; Hsu et al., 2013; Pancher et al., 2015; Pu et al., 2015; Ding et al., 2015; Ding et al., 2016; Liu et al., 2016].

No Brasil, Bertolini et al. [2010] estudaram 25 crianças nascidas de mães portadoras do HBsAg, que foram submetidas à vacinação e ao IGHAHB, no qual encontraram apenas uma criança que apresentava este perfil atípico, mas não foi identificada a mutação G145R, a mais tradicionalmente associada a infecção viral que sofreu ação de vacinação e IGHAHB [Carman et al., 1990].

Ainda não há informações sobre a frequência desse perfil sorológico no Brasil em estudo envolvendo amostras de regiões específicas. Populações estas que podem estar susceptíveis à infecção pelo HBV mesmo tendo sido vacinadas e tenham desenvolvido o anti-HBs.

Assim o objetivo desse estudo foi identificar indivíduos positivos para esse perfil em uma pesquisa de prevalência de hepatites virais, incluindo o HBV realizado nos municípios de Axixá, Morros, Icatu, Humberto de Campos e Urbano Santos, localizados no Estado do Maranhão, região Nordeste do Brasil, onde foi realizado estudo de prevalência do HBV.

MATERIAL E MÉTODOS

Sujeitos e amostra

Trata-se de um estudo transversal com indivíduos que participaram de um estudo de prevalência de hepatites virais realizado em uma região do Estado do Maranhão (municípios de Humberto de Campos, Axixá, Morros, Icatu e Urbano Santos) (Fig. 1), realizado entre Março de 2012 a Dezembro de 2013 onde foi identificada uma endemicidade intermediária da infecção, prevalência de 2,30% (dados ainda não publicados).

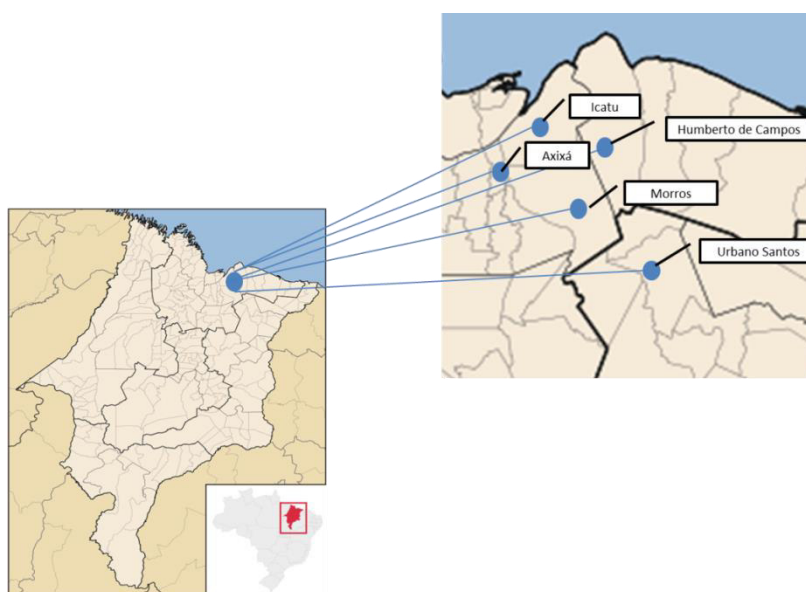


Fig. 1. Municípios em que o estudo foi realizado.

Testes sorológicos

Todas as amostras foram submetidas à realização do HBsAg, anti-HBs e Anti-HBc, utilizando a técnica de imunoenzimático (ELISA) com utilização de kits comerciais (Diasorin, Itália). Os resultados dos anti-HBs foram obtidos em absorbância e convertido em UI/ml, sendo definido como positivo os títulos superiores a 10 UI/ml. E os com HBsAg positivos foram submetidos a pesquisa de HBeAg e anti-HBe utilizando mesma metodologia dos demais marcadores.

Os portadores que apresentaram simultânea positividade para HBsAg e anti-HBs foram submetidos repetição dos testes. Naqueles confirmados foram realizados a determinação da carga viral e genotipagem do vírus.

Análise da sequência do gene S

A extração do DNA do HBV foi realizada nas amostras nas quais foi possível a detecção, empregando-se o Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®) a partir de 200 µL, seguindo instruções do fabricante.

A quantificação da carga viral foi feita através de PCR em tempo real, tal como descrito na literatura [Sitnik et al., 2010].

A genotipagem foi realizada através da utilização de *primers* para amplificação de um fragmento de 1306 pares de bases (pb), que compreende todo o gene Pré-S/S do HBsAg e parte da polimerase. Todas as sequências dos *primers* e procedimentos de amplificação e sequenciamento já foram descritos [Barros et al., 2014; Gomes-Gouvêa et al., 2015].

A eletroforese foi realizada pelo sequenciador automático o ABI 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Mutações no gene S

As sequências dos fragmentos sequenciados foram traduzidas para aminoácidos e comparadas à sequência de aminoácidos de uma sequência referência consenso em relação a cada subgenótipo.

As mutações foram investigadas em toda região MRH entre os resíduos 100 a 169 que inclui o determinante “a” (aa 124 a 147).

RESULTADOS

Dentre os 92 indivíduos com HBsAg positivo e DNA quantificado, três tinham o perfil anômalo HBsAg e anti-HBs positivos (3,26%).

Os três portadores foram identificados como A, B e C.

As características demográficas e epidemiológicas dos portadores foram descritas na Tabela I.

Tabela I. Características epidemiológica dos portadores com concomitância de HBsAg e anti-HBs.

Portador	A	B	C
Sexo	Feminino	Masculino	Masculino
Município	Morros	Morros	Humberto de Campos
Zona	Rural	Rural	Urbana
Idade (anos)	62	30	61
Profissão	Lavrador	Lavrador	Pescador
Vacina	Não sabe	Não	Não
Vida sexual	Inativa	Ativa	Ativa
Relação sexual estável	Um parceiro	Um parceiro	Mais de um parceiro
Uso de preservativo	Nunca	Nunca	Às vezes
Perfuro cortante compartilhado	Não	Sim	Sim

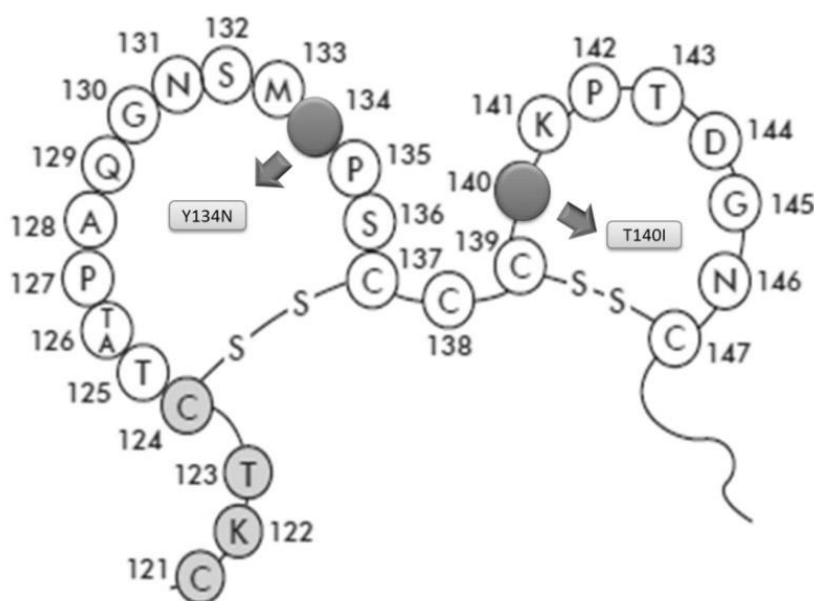
As características sorológicas e virológicas são descritas na Tabela II, a qual demonstrou que todos os portadores eram anti-HBc positivo e HBeAg negativo e os foram identificados como subgenótipo D4.

Tabela II. Marcadores sorológicos e moleculares dos portadores com concomitância de HBsAg e anti-HBs.

Portador	A	B	C
Anti-HBs (UI/ml)	18,1	260,6	100,4
HBV DNA (IU/ml)	1306,57	1176,4	9164,4
Anti-HBc	+	+	+
Anti-HBe	+	+	-
HBeAg	-	-	-
Genótipo	D	D	D
Subgenótipo	D4	D4	D4
Mutações	Y134N/ T140I	ND	ND

ND: não detectado

Apenas um indivíduo apresentou duas mutações do gene S, dentro do determinante “a”. Apresentaram uma substituição de uma tirosina por uma asparagina na posição 134 e uma treonina por uma isoleucina na posição 140 (Y134N/T140I) (Fig. 2).



Fonte: Adaptada de Leyva et al. (2011)

Fig. 2. Representação esquemática das mutações no determinante “a”.

DISCUSSÃO

Este estudo, envolvendo uma população que representou cinco municípios do Estado do Maranhão (Nordeste do Brasil), identificou três indivíduos com perfil anômalo HBsAg e anti-HBs positivos e com HBV-DNA detectável entre 92 portadores do HBsAg (3,26%). Esta frequência, coincide com resultados de estudos ao redor do mundo, onde a prevalência variou de 2,43% a 8,9% [Liu et al., 2012; Zhang et al., 2007; Lada et al., 2006; Pancher et al., 2015; Colson et al., 2007; Liu et al., 2016; Ding et al., 2015; Huang et al., 2010; Ding et al., 2016; Chen et al., 2011; Pu et al., 2015]. As pequenas diferenças observadas podem estar relacionadas com metodologias diversas adotadas e pelas diferentes regiões geográficas estudadas.

A principal justificativa, para o aparecimento dessa simultânea positividade de HBsAg e anti-HBs, tem sido a seleção de variantes de escape imunológico do HBV devido a mutações na MRH da proteína S do antígeno de superfície, o alvo principal do anti-HBs, especificamente no determinante “a”, pois as substituições de aminoácidos nessa região podem alterar a estrutura conformacional, imunogenicidade do HBsAg e a estrutura do epítopo do antígeno, levando a um escape de reconhecimento pelo sistema imunológico [Lada et al., 2006; Ding et al., 2016]. A existência dessas mutações em certos grupos populacionais é determinada pela endemicidade da infecção, prevalência de transmissão vertical e extensão da imunoprofilaxia nas campanhas de vacinação, uma vez que esses fatores podem favorecer a emergência de escape imune do HBV [Lazarevic et al., 2010; Zaaijer et al., 2008].

Entre os pacientes avaliados nesse estudo, apenas um apresentou mutações no gene S dentro do determinante “a”. As mutações que se fizeram presentes foram Y134N e T140I, que já foram descritas em outros estudos que avaliaram esse perfil sorológico atípico.

A Y134N foi encontrada em indivíduos com esse mesmo perfil, no estudo realizado por Pu et al. [2015] e Li et al. [2009] em comunidades chinesas. Esta também, foi identificada em portadores do HBV com outras características que não a presença desse perfil atípico, como em portadores do HBV com mutações de resistência à análogos de núcleos(t)ídeos, que realizaram transplante hepático, sendo a maioria portadores de hepatite B oculta [Rahimi et al., 2015] e em indivíduos com hepatite B oculta e carcinoma hepatocelular [Pollicino et al., 2007]. Assim, não é uma mutação específica do perfil anômalo HBsAg/anti-HBs positivos, mas é possível que a sua presença favoreça o desenvolvimento dessa alteração.

A T140I, identificada aqui no mesmo paciente, também foi descrita por Ding et al. [2015] em chineses portadores crônicos do HBV que apresentavam a simultaneidade do HBsAg e anti-HBs. Similarmente, foi identificada em crianças imunizadas de mães HBsAg positiva [Hsu et al., 2010; Hsu et al., 2013; Jaramillo; Navas, 2015], em portadores crônicos do HBV com cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular [Yamani et al., 2015], portadores de hepatite B oculta [Huang et al., 2012; Lazarevic, 2014] e em portadores do HBV que não receberam vacina e nem IGHAHB [Komatsu et al., 2012].

Neste estudo, não foi identificada a substituição de glicina (G) com a arginina (R) na posição 145 (G145R) no determinante “a” inserido na MHR da proteína S, a variante mais comumente associada com a resistência induzida pela vacina e IGHAHB. De fato, não havia relatos de que estes indivíduos tenham sido submetidos à vacinação HBV.

No Brasil, foi encontrado apenas um estudo que analisou esse perfil [Bertolini et al., 2010], porém também não foi encontrada a mutação G145R, e sim a presença de uma treonina (T) na posição 140 e uma glutamina (Q) na posição 129 dentro do determinante “a” e outras na região da proteína S, que também podem interferir na imunogenicidade da vacina e da IGHAHB.

Dois pacientes com o perfil atípico HBsAg e anti-HBs positivos nesta pesquisa não apresentaram mutações no determinante “a” do gene S. A possibilidade para justificar esse achado seria possíveis mutações em outros locais da região Pré-S/S, que não foram pesquisadas nesse estudo, e que já foram descritas em portadores desse perfil [Pu et al., 2015; Chen et al., 2011; Liu et al., 2016], como a L209V descrita por Mathet et al. [2006].

Em conclusão, em um estudo de base populacional para prevalência do HBV, foram identificados indivíduos com perfil atípico de HBsAg e anti-HBs positivo (3,26%), com identificação de mutações no determinante “a” do gene S, que podem significar modificações na antigenicidade do HBsAg favorecendo escapes imunes do HBV. Esse achado em uma comunidade pode ter grande importância, especialmente na avaliação dos programas de imunização.

REFERÊNCIAS

- Alavian SM, Carman WF, Jazayeri SM. 2013. HBsAg variants: diagnostic-escape and diagnostic dilemma. *J Clin Virol* 57:201-208.
- Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Kramvis A, Mendes-Corrêa MC, dos Santos A, Souza LA, Santos MD, Carrilho FJ, Domicini AJ, Pinho JR, Ferreira ASP. 2014. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol* 24:68-75.
- Bertolini DA, Ribeiro PC, Lemos MF, Saraceni CP, Pinho JRR. 2010. Characterization of a Hepatitis B virus strain in southwestern Paraná, Brazil, presenting mutations previously associated with anti-HBs Resistance. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 52: 25-30.

Brunetto MR. 2014. Chance and necessity of simultaneous HBsAg and anti-HBs detection in the serum of chronic HBsAg carriers. *J Hepatol* 60:473-475.

Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, Bruzzone B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. 2016. *World J Gastroenterol* 22:145-154.

Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336:325-329.

Chen Y, Qian F, Yuan Q, Li X, Wu W, Guo X, Li L. 2011. Mutations in hepatitis B virus DNA from patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *J Clin Virol* 52:198-203.

Colson P, Borentain P, Motte A, Henry M, Moal V, Botta-Fridlund D, Tamalet C, G  rolami R. 2007. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers. *Virology* 367:30-40.

Coppola N, Onorato L, Minichini C, Di Caprio G, Starace M, Sagnelli C, Sagnelli E. 2015. Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants. *World J Hepatol* 7:2729-2739.

Cuestas ML, Mathet VL, Ruiz V, Minassian ML, Rivero C, Sala A, Corach D, Alessio A, Pozzati M, Frider B, Oubiña JR. Unusual naturally occurring humoral and cellular mutated epitopes of hepatitis B virus in a chronically infected argentine patient with anti-HBs antibodies. 2006. *J Clin Microbiol* 44:2191-2198.

Ding F, Miao XL, Li YX, Dai JF, Yu HG. 2016. Mutations in the S gene and in the overlapping reverse transcriptase region in chronic hepatitis B Chinese patients with coexistence of HBsAg and anti-HBs. *Braz J Infect Dis* 20:1-7.

Ding F, Yu HG, Li YX, Cui N, Dai JF, Yu JP. 2015. Sequence analysis of the HBV S protein in Chinese patients with coexisting HBsAg and anti-HBs antibodies. *J Med Virol* 87:2067-2073.

Gao S, Duan Z, Coffin CS. 2015. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World J Hepatol* 7:1086-1096.

Gerlich WH. 2007. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg. *Clin Infect Dis* 44:1170–1172.

Gomes-Gouvêa MS, Ferreira AC, Teixeira R, Andrade JR, Ferreira AS, Barros LM, Rezende RE, Natri AC, Leite AG, Piccoli LZ, Galvan J, Conde SR, Soares MC, Kliemann DA, Bertolini DA, Kunyoshi AS, Lyra AC, Oikawa MK, de Araújo LV, Carrilho FJ, Mendes-Corrêa MC, Pinho JR. 2015. HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naive patients. *Antivir Ther* 20:387-395.

Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chiang CL, Chen HL, Wu JF, Chen PJ. 2010. No increase in prevalence of hepatitis B surface antigen mutant in a population of

children and adolescents who were fully covered by universal infant immunization. *J Infect Dis* 201:1192-1200.

Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Jeng YM, Chiang CL, Chen HL, Wu JF, Chen PJ. 2013. Long-term follow-up of children with postnatal immunoprophylaxis failure who were infected with hepatitis B virus surface antigen gene mutant. *J Infect Dis* 207:1047-1057.

Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, Yeh SH, Yu H, Xue Y, Chen YX, Liu PG, Ge SX, Zhang J, Xia NS. 2012. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J Hepatol* 57:720-729.

Huang X, Qin Y, Zhang P, Tang G, Shi Q, Xu J, Qi F, Shen Q. 2010. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies. *J Med Virol* 82:23-31.

Jang JS, Kim HS, Kim HJ, Shin WG, Kim KH, Lee JH, Kim HY, Kim DJ, Lee MS, Park CK, Jeong BH, Kim YS, Jang MK. 2009. Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 81:1531-1538.

Jaramillo CM, Navas MC. 2015. Variantes de escape del virus de la hepatitis B. *Rev chil infectol* 32:190-197.

Komatsu H, Inui A, Sogo T, Konishi Y, Tateno A, Fujisawa T. 2012. Hepatitis B surface gene 145 mutant as a minor population in hepatitis B virus carriers. *BMC Res Notes* 5:22.

Lada O, Benhamou Y, Poynard T, Thibault V. 2006. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of a determinant variants. *J Virol* 80:2968-2975.

Lazarevic I, Cupic M, Delic D, Svrtlih NS, Simonovic J, Jovanovic T. 2010. Prevalence of hepatitis B virus MHR mutations and their correlation with genotypes and antiviral therapy in chronically infected patients in Serbia. *J Med Virol* 82:1160-1167.

Lazarevic I. 2014. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances. *World J Gastroenterol* 20:7653-7664.

Li F, Zhang C, Liu J, Zhang X, Yan B, Zhang B, Huang Y, Gong J, Chen Y. 2009. Preparation, identification, and clinical application of anti-HBs monoclonal antibody that binds both wild-type and immune escape mutant HBsAg. *Frontiers of Medicine in China* 3: 277-283.

Liu W, Hu T, Wang X, Chen Y, Huang M, Yuan C, Guan M. 2012. Coexistence of hepatitis B surface antigen and anti-HBs in Chinese chronic hepatitis B virus patients

relating to genotype C and mutations in the S and P gene reverse transcriptase region. *Arch Virol* 157:627-34.

Liu Y, Zhang L, Zhou J-Y, Pan J, Hu W, Zhou Y-H. 2016. Clinical and Virological Characteristics of Chronic Hepatitis B Patients with Coexistence of HBsAg and Anti-HBs. *PLoS ONE* 11:e0146980.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, [...], Murray CJL. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 380:2095-2128.

Lu H-Y, Zeng Z, Xu X-Y, Zhang N-L, Yu M, Gong W-B. 2006. Mutations in surface and polymerase gene of chronic hepatitis B patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *World Journal of Gastroenterology* 12:4219-4223.

Mathet VL, Cuestas ML, Ruiz V, Minassian ML, Rivero C, Trinks J, Daleoso G, León LM, Sala A, Libellara B, Corach D, Oubiña JR. 2006. Detection of hepatitis B virus (HBV) genotype E carried--even in the presence of high titers of anti-HBs antibodies--by an Argentinean patient of African descent who had received vaccination against HBV. *J Clin Microbiol* 44:3435-3439.

Pancher M, Désiré N, Ngo Y, Akhavan S, Pallier C, Poynard T, Thibault V. 2015. Coexistence of circulating HBsAg and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B carriers is not a simple analytical artifact and does not influence HBsAg quantification. *J Clin Virol* 62:32-37.

Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, Levrero M, Raimondo G. 2007. Molecular and Functional Analysis of Occult Hepatitis B Virus Isolates from Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 45:277-285.

Pondé RAA. 2011. The underlying mechanisms for the “simultaneous HBsAg and anti-HBs serological profile”. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 30:1325-1340.

Pu Z, Li D, Wang A, Su H, Shao Z, Zhang J, Ji Z, Gao J, Choi BC, Yan Y. 2015. Epidemiological characteristics of the carriers with coexistence of HBsAg and anti-HBs based on a community cohort study. *J Viral Hepat* 23:286-293.

Rahimi R, Hosseini SY, Fattahi MR, Sepehrimanesh M, Safarpour A, Malekhosseini SA, Nejabat M, Khodadad M, Ardebili, M. 2015. YMDD Motif Mutation Profile Among Patients Receiving Liver Transplant Due to Hepatitis B Virus Infection With Long Term Lamivudine/Immunoglobulin Therapy. *Hepat Mon* 15: e27120.

Sayiner A, Agcab H, Sengonul A, Celik A, Akarsu M. 2007. A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Virology* 38:157–160.

Shi Y, Wei F, Hu D, Li Q, Smith D, Li N, Chen D. 2012. Mutations in the major hydrophilic region (MHR) of hepatitis B virus genotype C in North China. *J Med Virol* 84:1901-1906.

Sitnik R, Paes A, Manguiera CP, Pinho JR. 2010. A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (HBV) developed to detect all HBV genotypes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 52:119-24.

Souto FJD. 2015. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. *Rev Soc Bras Med Trop*.

van Dommelen L, Verbon A, van Doorn HR, Goossens VJ. 2010. Acute hepatitis B virus infection with simultaneous high HBsAg and high anti-HBs signals in a previously HBV vaccinated HIV-1 positive patient. *J Clin Virol* 47:293-296.

Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, Kumarasamy T, Thyagarajan SP. 2008. Transmission of "a" determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. *Jpn J Infect Dis* 61:73-76.

Wang L, Liu H, Ning X, Gao F. 2010. Sequence analysis of the S gene region in HBV DNA from patients positive for both HBsAg and HBsAb tests. *Hepatol Res* 40:1212-1218.

World Health Organization (WHO). Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. WHO, 2015.

World Health Organization (WHO). Hepatitis B. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Accessed 24 set 2015.

Yamani LN, Yano Y, Utsumi T, Juniastuti, Wandono H, Widjanarko D, Triantanoe A, Wasityastuti W, Liang Y, Okada R, Tanahashig T, Murakamih Y, Azumac T, Soetijpto, Lusida MI, Hayashi Y. 2015. Ultradeep sequencing for detection of quasispecies variants in the major hydrophilic region of hepatitis B virus Indonesian Patients. *J Clin Microbiol* 53: 3165-3175.

Zaaijer HL, Bouter S, Boot HJ. 2008. Substitution rate of the hepatitis B virus surface gene. *J Viral Hepat* 15:239-245.

Zhang JM, Xu Y, Wang XY, Yin YK, Wu XH, Weng XH, Lu M. 2007. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific anti-bodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis* 44:1161-1169.

Zhang X, Ding H-G. 2015. Key role of hepatitis B virus mutation in chronic hepatitis B development to hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 7:1282-1286.

6 ARTIGO EM INGLÊS

Artigo submetido à revista Journal Medical Virology.

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

INTRODUCTION

It is estimated that approximately 240 million people are chronic carriers of the hepatitis B virus (HBV) [Lozano et al., 2012; World Health Organization, 2015a]. The prevalence of HBV infection varies greatly in different parts of the world, which are defined as areas of high, intermediate, or low endemicity [World Health Organization, 2015b]. A recently published review study reported that the overall prevalence in Brazil is <1%, with the exception of some areas in regions of the Amazon and some rural areas in the northeastern and midwest states, where intermediate endemicity is found (2%–8%) [Souto, 2015].

In HBV infection, the disappearance of HBsAg and emergence of anti-HBs imply the development of immunity against the virus because anti-HBs neutralizes the virus [Gerlich, 2007]. The presence of anti-HBs after vaccination has the same implication [Colson et al., 2007; Jang et al., 2009]. The concomitant presence of HBsAg and anti-HBs has been described since the 1970s, and this status presents a challenge for the clinical monitoring of carriers. This status may be of great epidemiological importance because of the inactivity of the anti-HBs resulting from vaccination in the face of infection with viruses that have undergone the transformation required for antigenic escape [Liu et al., 2012; Ding et al., 2016].

The prevalence of this profile worldwide has been reported to vary between 2.43% and 8.9% in studies of populations with varying endemicity [Liu et al., 2012; Zhang et al., 2007; Lada et al., 2006; Pancher et al., 2015; Colson et al., 2007; Liu et al., 2016; Ding et al., 2015; Huang et al., 2010; Ding et al., 2016; Chen et al., 2011; Pu et al., 2015].

HBV envelope proteins are encoded by the Pre-S/S regions of the viral genome. They are composed of the large (L), middle (M), and small (S) fractions. S

protein, which corresponds to HBsAg, contains the major hydrophilic region (MHR) (aa 99 and 169), which in turn contains the a-determinant (aa 124–147); preservation of this determinant is important in HBsAg formation because it ensures that the immunogenicity of HbsAg is maintained [Zhang; Ding, 2015]. This determinant corresponds to the main site where HBsAg is recognized by lymphocytes and by anti-HBs, causing virus neutralization [Caligiuri et al 2016].

One of the main mechanisms by which HBsAg and anti-HBs occur concomitantly is the isolated mutation in the MHR, particularly in the a-determinant; this causes relevant changes in the antigenic properties of HBsAg and leads to variants that are not susceptible to the neutralizing action of anti-HBs [Pondé, 2011; Shi et al., 2012; Brunetto, 2014].

These mutations occur mainly because of the following reasons: (1) immune pressure from HBV vaccination or as a result of the action of human hepatitis B immune globulin (HBIG) administered to carriers of the virus; (2) natural response in chronic infection, caused by the selective pressure exerted by the immune system, generating an anti-HBs that does not neutralize the coexistent HBsAg [Pondé, 2011; Alavian et al., 2013; Gao et al., 2015; Coppola et al., 2015; Zhang et al., 2007].

Fifty-four mutations in the a-determinant associated with the atypical profile of positivity for both HBsAg and anti-HBs have been described. Among these mutations, the most frequently described so far have been G145R (glycine-to-arginine substitution at position 145; associated with hepatitis B vaccination and the use of HBIG) and I126S (isoleucine-to-serine substitution at position 126; related to chronic infection that alters the antigenicity of HBsAg, and consequent immune escape by HBV) [Cuestas et al., 2006; Mathet et al., 2006; Lada et al., 2006; Lu et al., 2006; Colson et al., 2007; Zhang et al., 2007; Sayiner et al., 2007; Velu et al., 2008; Jang et al., 2009; Van Dommelen et al., 2010; Hsu et al., 2010; Huang et al., 2010; Wang et al., 2010; Chen et al., 2011; Liu et al., 2012; Hsu et al., 2013; Pancher et al., 2015; Pu et al., 2015; Ding et al., 2015; Ding et al., 2016; Liu et al., 2016].

In Brazil, Bertolini et al. [2010] studied 25 children born to HbsAg-positive mothers and who received vaccination and HBIG. They found that only one child who showed this atypical profile. However, the G145R mutation, which is more traditionally associated with the viral infection that has been affected by the action of vaccination and HBIG, was not identified in this child [Carman et al., 1990].

There is still no information about the frequency of this profile in Brazil in serological studies involving samples from specific regions. These populations may be susceptible to HBV infection even though they have been vaccinated and developed anti-HBs.

Therefore, the objective of this study was to identify individuals who were positive for this profile in a survey of the prevalence of viral hepatitis, including that of HBV infection. This survey took place in the municipalities of Axixá, Morros, Icatu, Humberto de Campos, and Urbano Santos, in the state of Maranhão, northeastern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and sample

This was a cross-sectional study of individuals who participated in a survey of the prevalence of viral hepatitis conducted in a region of the state of Maranhão (in the municipalities of Humberto de Campos, Axixá, Morros, Icatu, and Urbano Santos) (Fig. 1). The survey was conducted from March 2012 to December 2013 and identified the intermediate endemicity of this infection, with a prevalence of 2.30% (data not yet published).

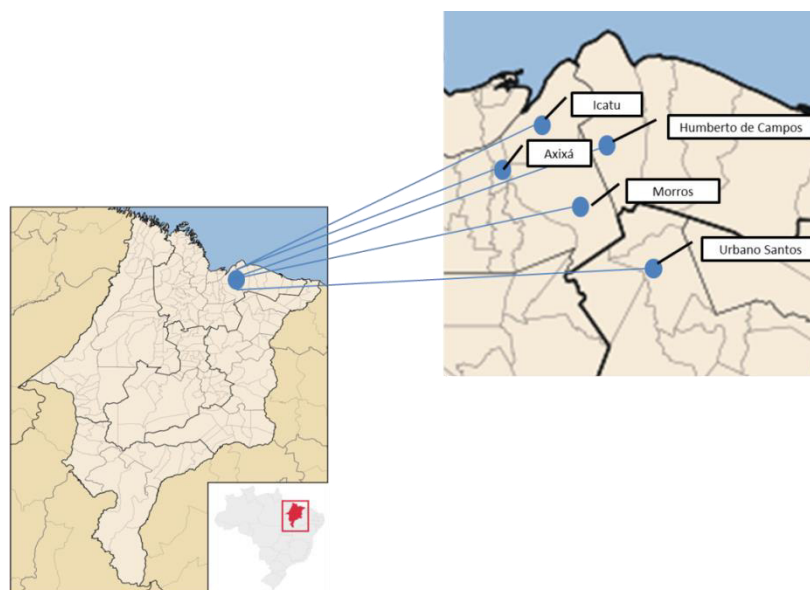


Fig. 1. Municipalities in which the study was conducted.

Serological testing

All samples were evaluated for HBsAg, anti-HBs, and anti-HBc via the enzyme-linked immunosorbent assay technique (ELISA) using commercial kits (Diasorin, Italy). The results for anti-HBs were obtained in absorbance and converted to IU/ml, with positive results defined as titers >10 IU/ml. The HbsAg-positive samples were tested for HBeAg and anti-HBe using the same methodology used for the other markers.

Samples from the carriers who concomitantly tested positive for HBsAg and anti-HBs underwent repeated tests. For samples with confirmed results, viral load was determined and virus genotyping was performed.

Analysis of S gene sequencing

DNA was extracted from the HBV using the samples in which detection was possible using 200 µL of QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®), according to the manufacturer's instructions.

The viral load was quantified using real-time PCR, as described in the literature [Sitnik et al., 2010].

Genotyping was performed using primers to amplify a fragment with 1306 base pairs (bp), which consists of the entire Pre-S/S gene of HBsAg as well as a part of the polymerase. All the sequences of the primers and the amplification and sequencing procedures have been described [Barros et al., 2014; Gomes-Gouvêa et al., 2015].

Electrophoresis was performed using an automatic sequencer (ABI 3500 DNA Sequencer; Applied Biosystems).

Mutations in the S gene

The sequences of the analyzed fragments were translated into amino acids and compared to the amino acid sequence of a consensus reference sequence for each subgenotype.

The mutations were investigated throughout the MRH region between residues 100 and 169, which includes the a-determinant (aa 124–147).

RESULTS

Among the 92 patients with positive HBsAg and for whom DNA was quantified, three had the atypical profile with HBsAg and anti-HBs positivity (3.26%).

The three carriers were identified as A, B, and C.

The demographic and epidemiological characteristics of the carriers are described in Table I.

Table I. Epidemiological characteristics of the carriers with concomitant HBsAg and anti-HBs.

Carrier	A	B	C
Sex	Female	Male	Male
Municipality	Morros	Morros	Humberto de Campos
Area	Rural	Rural	Urban
Age (years)	62	30	61
Profession	Farmer	Farmer	Fisherman
Vaccine	Unknown	No	No
Sexual activity	Inactive	Active	Active
Stable relationship	One partner	One partner	More than one partner
Condom use	Never	Never	Sometimes
Shared needles or sharp instruments	No	Yes	Yes

Serological and virological characteristics are described in Table II; all the patients were positive for anti-HBc and negative for HBeAg, and they were identified as subgenotype D4.

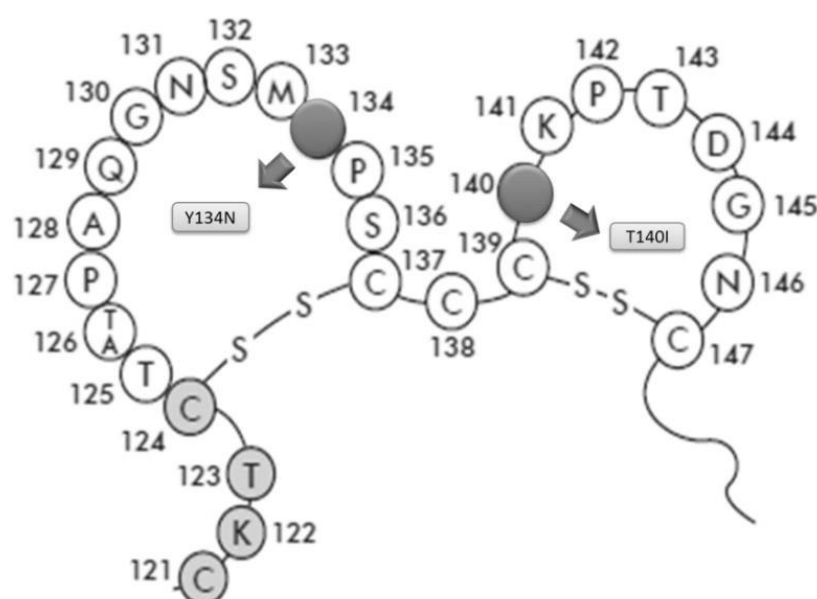
Table II. Serological and molecular markers for the carriers with concomitant HBsAg and anti-HBs.

Carrier	A	B	C
Anti-HBs (IU/ml)	18.1	260.6	100.4
HBV DNA (IU/ml)	1306.57	1176.4	9164.4
Anti-HBc	+	+	+
Anti-HBe	+	+	–

HBeAg	–	–	–
Genotype	D	D	D
Subgenotype	D4	D4	D4
Mutations	Y134N/T140I	ND	ND

ND: not detected

Only one individual presented two mutations of the S gene, within the a-determinant. These were a thyrosine-to-asparagine substitution at position 134 and a threonine-to-isoleucine substitution at position 140 (Y134N/T140I) (Fig. 2).



Source: Adapted from Leyva et al. (2011)

Fig. 2. Schematic representation of the mutations in the a-determinant.

DISCUSSION

This study involved a population from five municipalities in the state of Maranhão (northeast of Brazil) and identified three individuals with atypical profile for HBsAg and anti-HBs positivity, and detectable HBV DNA among 92 HBsAg carriers (3.2%). This frequency is in line with results from studies around the world, in which the prevalence varied from 2.43% to 8.9% [Liu et al., 2012; Zhang et al., 2007; Lada et al., 2006; Pancher et al., 2015; Colson et al., 2007; Liu et al., 2016; Ding et al., 2015; Huang et al., 2010; Ding et al., 2016; Chen et al., 2011; Pu et al., 2015]. The

minor differences observed may be related to the variety of methodologies adopted and the different geographical regions that were studied.

The main reason attributed for the appearance of the concomitant positivity for HBsAg and anti-HBs has been the selection of variants for HBV immune escape. This is considered to occur because of mutations in the MRH of the surface antigen S protein, the primary target of anti-HBs, specifically the a-determinant, because amino acid substitutions in this region alter the conformational structure, the immunogenicity of HBsAg, and the structure of the T cell epitope, leading to an escape of recognition by the immune system [Lada et al., 2006; Ding et al., 2016]. The existence of these mutations in certain population groups is determined by the endemicity of infection, prevalence of vertical transmission, and extension of immunoprophylaxis in vaccination campaigns, because these factors can promote the emergence of HBV immune escape [Lazarevic et al., 2010; Zaaijer et al., 2008].

Among the patients evaluated in this study, only one showed mutations in the S gene within the a-determinant. The mutations that were present were Y134N and T140I, which have already been described in other studies that evaluated this atypical serological profile.

Y134N was found in individuals with the same profile in a study conducted by Pu et al. [2015] and Li et al. [2009] in Chinese communities. It was also identified in HBV carriers with other characteristics apart from the presence of this atypical profile; these include HBV carriers with resistance mutations to nucleoside and nucleotide analogs who received liver transplants, carriers of occult hepatitis B [Rahimi et al., 2015], and individuals with occult hepatitis B and hepatocellular carcinoma [Pollicino et al., 2007]. Therefore, this is not a specific mutation of the atypical profile for HBsAg and anti-HBs positivity; however, it is possible that its presence favors the development of this alteration.

T140I, which was identified here in the same patient, was also described by Ding et al. [2015] in Chinese chronic carriers of HBV with concurrent HBsAg and anti-HBs. Similarly, it was identified in immunized children born to HbsAg-positive mothers [Hsu et al., 2010; Hsu et al., 2013; Jaramillo; Navas, 2015], in chronic carriers of HBV with cirrhosis or hepatocellular carcinoma [46], carriers of occult hepatitis B [47, 48], and HBV carriers who did not receive the vaccine or HBIG [49].

In this study, the replacement of glycine (G) with arginine (R) at position 145 (G145R) in the a-determinant inserted into the MHR of the S protein, the variant most

commonly associated with vaccine-induced resistance and HBIG, was not ascertained. In fact, there were no reports that these individuals were vaccinated for HBV.

In Brazil, only one study that examined this profile has been reported [Bertolini et al., 2010], but the G145R mutation was also not detected in it; instead, a mutation involving threonine (T) was at position 140 and a glutamine (Q) at position 129 within the a-determinant and other mutations in the region of the S protein, which can also affect the immunogenicity of the vaccine and of HBIG, were reported.

Two patients with atypical profile for HBsAg and anti-HBs positivity in this study did not show mutations in the a-determinant of the S gene. This finding can be explained by mutations in other areas of the Pre-S/S region, which were not examined in this study and have already been described in patients with this profile [Pu et al., 2015; Chen et al., 2011; Liu et al., 2016], such as L209V described by Mathet et al. [2006].

In conclusion, in this population-based study to identify the prevalence of HBV, individuals with atypical profile for HBsAg and anti-HBs positivity were identified (3.26%). Mutations were also observed in the a-determinant of the S gene, which can indicate changes in the antigenicity of HBsAg favoring HBV immune escapes. This finding in communities can have great importance, especially for evaluating immunization programs.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) for the support and availability of the necessary resources that made possible the realization of this work.

REFERENCES

Alavian SM, Carman WF, Jazayeri SM. 2013. HBsAg variants: diagnostic-escape and diagnostic dilemma. *J Clin Virol* 57:201-208.

Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Kramvis A, Mendes-Corrêa MC, dos Santos A, Souza LA, Santos MD, Carrilho FJ, Domicini AJ, Pinho JR, Ferreira ASP. 2014. High

prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol* 24:68-75.

Bertolini DA, Ribeiro PC, Lemos MF, Saraceni CP, Pinho JRR. 2010. Characterization of a Hepatitis B virus strain in southwestern Paraná, Brazil, presenting mutations previously associated with anti-HBs Resistance. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 52: 25-30.

Brunetto MR. 2014. Chance and necessity of simultaneous HBsAg and anti-HBs detection in the serum of chronic HBsAg carriers. *J Hepatol* 60:473-475.

Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, Bruzzone B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. 2016. *World J Gastroenterol* 22:145-154.

Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336:325-329.

Chen Y, Qian F, Yuan Q, Li X, Wu W, Guo X, Li L. 2011. Mutations in hepatitis B virus DNA from patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *J Clin Virol* 52:198-203.

Colson P, Borentain P, Motte A, Henry M, Moal V, Botta-Fridlund D, Tamalet C, Gérolami R. 2007. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers. *Virology* 367:30-40.

Coppola N, Onorato L, Minichini C, Di Caprio G, Starace M, Sagnelli C, Sagnelli E. 2015. Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants. *World J Hepatol* 7:2729-2739.

Cuestas ML, Mathet VL, Ruiz V, Minassian ML, Rivero C, Sala A, Corach D, Alessio A, Pozzati M, Frider B, Oubiña JR. Unusual naturally occurring humoral and cellular mutated epitopes of hepatitis B virus in a chronically infected argentine patient with anti-HBs antibodies. 2006. *J Clin Microbiol* 44:2191-2198.

Ding F, Miao XL, Li YX, Dai JF, Yu HG. 2016. Mutations in the S gene and in the overlapping reverse transcriptase region in chronic hepatitis B Chinese patients with coexistence of HBsAg and anti-HBs. *Braz J Infect Dis* 20:1-7.

Ding F, Yu HG, Li YX, Cui N, Dai JF, Yu JP. 2015. Sequence analysis of the HBV S protein in Chinese patients with coexisting HBsAg and anti-HBs antibodies. *J Med Virol* 87:2067-2073.

Gao S, Duan Z, Coffin CS. 2015. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World J Hepatol* 7:1086-1096.

Gerlich WH. 2007. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg. *Clin Infect Dis* 44:1170–1172.

Gomes-Gouvêa MS, Ferreira AC, Teixeira R, Andrade JR, Ferreira AS, Barros LM, Rezende RE, Natri AC, Leite AG, Piccoli LZ, Galvan J, Conde SR, Soares MC, Kliemann DA, Bertolini DA, Kunyoshi AS, Lyra AC, Oikawa MK, de Araújo LV, Carrilho FJ, Mendes-Corrêa MC, Pinho JR. 2015. HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naïve patients. *Antivir Ther* 20:387-395.

Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chiang CL, Chen HL, Wu JF, Chen PJ. 2010. No increase in prevalence of hepatitis B surface antigen mutant in a population of children and adolescents who were fully covered by universal infant immunization. *J Infect Dis* 201:1192-1200.

Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Jeng YM, Chiang CL, Chen HL, Wu JF, Chen PJ. 2013. Long-term follow-up of children with postnatal immunoprophylaxis failure who were infected with hepatitis B virus surface antigen gene mutant. *J Infect Dis* 207:1047-1057.

Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, Yeh SH, Yu H, Xue Y, Chen YX, Liu PG, Ge SX, Zhang J, Xia NS. 2012. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J Hepatol* 57:720-729.

Huang X, Qin Y, Zhang P, Tang G, Shi Q, Xu J, Qi F, Shen Q. 2010. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies. *J Med Virol* 82:23-31.

Jang JS, Kim HS, Kim HJ, Shin WG, Kim KH, Lee JH, Kim HY, Kim DJ, Lee MS, Park CK, Jeong BH, Kim YS, Jang MK. 2009. Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 81:1531-1538.

Jaramillo CM, Navas MC. 2015. Variantes de escape del virus de la hepatitis B. *Rev chil infectol* 32:190-197.

Komatsu H, Inui A, Sogo T, Konishi Y, Tateno A, Fujisawa T. 2012. Hepatitis B surface gene 145 mutant as a minor population in hepatitis B virus carriers. *BMC Res Notes* 5:22.

Lada O, Benhamou Y, Poynard T, Thibault V. 2006. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of a determinant variants. *J Virol* 80:2968-2975.

Lazarevic I, Cupic M, Delic D, Svrtlih NS, Simonovic J, Jovanovic T. 2010. Prevalence of hepatitis B virus MHR mutations and their correlation with genotypes and antiviral therapy in chronically infected patients in Serbia. *J Med Virol* 82:1160-1167.

Lazarevic I. 2014. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances. *World J Gastroenterol* 20:7653-7664.

- Li F, Zhang C, Liu J, Zhang X, Yan B, Zhang B, Huang Y, Gong J, Chen Y. 2009. Preparation, identification, and clinical application of anti-HBs monoclonal antibody that binds both wild-type and immune escape mutant HBsAg. *Frontiers of Medicine in China* 3: 277-283.
- Liu W, Hu T, Wang X, Chen Y, Huang M, Yuan C, Guan M. 2012. Coexistence of hepatitis B surface antigen and anti-HBs in Chinese chronic hepatitis B virus patients relating to genotype C and mutations in the S and P gene reverse transcriptase region. *Arch Virol* 157:627-34.
- Liu Y, Zhang L, Zhou J-Y, Pan J, Hu W, Zhou Y-H. 2016. Clinical and Virological Characteristics of Chronic Hepatitis B Patients with Coexistence of HBsAg and Anti-HBs. *PLoS ONE* 11:e0146980.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, [...], Murray CJL. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 380:2095-2128.
- Lu H-Y, Zeng Z, Xu X-Y, Zhang N-L, Yu M, Gong W-B. 2006. Mutations in surface and polymerase gene of chronic hepatitis B patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *World Journal of Gastroenterology* 12:4219-4223.
- Mathet VL, Cuestas ML, Ruiz V, Minassian ML, Rivero C, Trinks J, Daleoso G, León LM, Sala A, Libellara B, Corach D, Oubiña JR. 2006. Detection of hepatitis B virus (HBV) genotype E carried--even in the presence of high titers of anti-HBs antibodies--by an Argentinean patient of African descent who had received vaccination against HBV. *J Clin Microbiol* 44:3435-3439.
- Pancher M, Désiré N, Ngo Y, Akhavan S, Pallier C, Poynard T, Thibault V. 2015. Coexistence of circulating HBsAg and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B carriers is not a simple analytical artifact and does not influence HBsAg quantification. *J Clin Virol* 62:32-37.
- Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, Levrero M, Raimondo G. 2007. Molecular and Functional Analysis of Occult Hepatitis B Virus Isolates from Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 45:277-285.
- Pondé RAA. 2011. The underlying mechanisms for the “simultaneous HBsAg and anti-HBs serological profile”. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30:1325-1340.
- Pu Z, Li D, Wang A, Su H, Shao Z, Zhang J, Ji Z, Gao J, Choi BC, Yan Y. 2015. Epidemiological characteristics of the carriers with coexistence of HBsAg and anti-HBs based on a community cohort study. *J Viral Hepat* 23:286-293.
- Rahimi R, Hosseini SY, Fattahi MR, Sepehrimanesh M, Safarpour A, Malekhosseini SA, Nejabat M, Khodadad M, Ardebili, M. 2015. YMDD Motif Mutation Profile Among Patients Receiving Liver Transplant Due to Hepatitis B Virus Infection With Long Term Lamivudine/Immunoglobulin Therapy. *Hepat Mon* 15: e27120.

Sayiner A, Agcab H, Sengonul A, Celik A, Akarsu M. 2007. A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Virology* 38:157–160.

Shi Y, Wei F, Hu D, Li Q, Smith D, Li N, Chen D. 2012. Mutations in the major hydrophilic region (MHR) of hepatitis B virus genotype C in North China. *J Med Virol* 84:1901-1906.

Sitnik R, Paes A, Manguera CP, Pinho JR. 2010. A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (HBV) developed to detect all HBV genotypes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 52:119-24.

Souto FJD. 2015. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. *Rev Soc Bras Med Trop*.

van Dommelen L, Verbon A, van Doorn HR, Goossens VJ. 2010. Acute hepatitis B virus infection with simultaneous high HBsAg and high anti-HBs signals in a previously HBV vaccinated HIV-1 positive patient. *J Clin Virol* 47:293-296.

Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, Kumarasamy T, Thyagarajan SP. 2008. Transmission of "a" determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. *Jpn J Infect Dis* 61:73-76.

Wang L, Liu H, Ning X, Gao F. 2010. Sequence analysis of the S gene region in HBV DNA from patients positive for both HBsAg and HBsAb tests. *Hepatol Res* 40:1212-1218.

World Health Organization (WHO). Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. WHO, 2015.

World Health Organization (WHO). Hepatitis B. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Accessed 24 set 2015.

Yamani LN, Yano Y, Utsumi T, Juniastuti, Wandono H, Widjanarko D, Triantanoe A, Wasityastuti W, Liang Y, Okada R, Tanahashig T, Murakamih Y, Azumac T, Soetjipto, Lusida MI, Hayashi Y. 2015. Ultradeep sequencing for detection of quasispecies variants in the major hydrophilic region of hepatitis B virus Indonesian Patients. *J Clin Microbiol* 53: 3165-3175.

Zaaijer HL, Bouter S, Boot HJ. 2008. Substitution rate of the hepatitis B virus surface gene. *J Viral Hepat* 15:239-245.

Zhang JM, Xu Y, Wang XY, Yin YK, Wu XH, Weng XH, Lu M. 2007. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific anti-bodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis* 44:1161-1169.

Zhang X, Ding H-G. 2015. Key role of hepatitis B virus mutation in chronic hepatitis B development to hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 7:1282-1286.

REFERÊNCIAS

- ALAVIAN, S. M.; CARMAN, W. F.; JAZAYERI, S. M. HBsAg variants: diagnostic-escape and diagnostic dilemma. **J Clin Virol.**, v. 57, p. 201–208, 2013.
- AVELLON, A.; ECHEVARRIA, J. M. Frequency of hepatitis B virus ‘a’ determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. **J Med Virol.**, v. 5, n. 1, p. 24–36, 2006.
- BARROS, L. M. et al. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. **Infect Genet Evol.**, v. 24, p. 68–75, 2014.
- BERTOLINI, D.A. et al. Characterization of a hepatitis B virus strain in southwestern Paraná, Brazil, presenting mutations previously associated with anti-HBs resistance. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 52, n. 1, p. 25–29, 2010.
- BIAN, T. et al. Change in Hepatitis B Virus Large Surface Antigen Variant Prevalence 13 Years after Implementation of a Universal Vaccination Program in China. **J. Virol.** v. 87, n. 22, p. 121–196, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **O Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRUNETTO, M. R. Chance and necessity of simultaneous HBsAg and anti-HBs detection in the serum of chronic HBsAg carriers. **Journal of Hepatology**, v. 60, p. 473–475, 2014.
- CALIGIURI, P. et al. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. **World J Gastroenterol.**, v. 22, n. 1, p. 145-154, 2016.
- CARMAN, W. F. et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. **Lancet.**, v. 336, n. 8711, p. 325-9, 1990.
- CHEN, B. F. et al. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. **Gastroenterology**, v. 130, p. 1153–1168, 2006.
- CHEN, Y. et al. Mutations in hepatitis B virus DNA from patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. **J Clin Virol.**, v. 52, n. 3, p. 198–203, 2011.
- COLEMAN, P. F. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. **Emerg Infect Dis.**, v. 12, p. 198–203, 2006.
- COLSON, P. et al. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers. **Virology**, v. 367, n. 1, p. 30–40, 2007.

COPPOLA, N. et al. Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants. **World J Hepatol.**, v. 7, n. 27, p. 2729-2739, 2015.

CUESTAS, M. L. et al. Unusual naturally occurring humoral and cellular mutated epitopes of hepatitis B virus in a chronically infected argentine patient with anti-HBs antibodies. **J Clin Microbiol.**, v. 44, p. 2191–2198, 2006.

DING, F. et al. Mutations in the S gene and in the overlapping reverse transcriptase region in chronic hepatitis B Chinese patients with coexistence of HBsAg and anti-HBs. **Braz J Infect Dis.**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2016.

DING, F. et al. Sequence analysis of the HBV S protein in Chinese patients with coexisting HBsAg and anti-HBs antibodies. **J Med Virol.**, v. 87, n. 12, p. 2067–2073, 2015.

GAO, S.; DUAN, Z.; COFFIN, C. S. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. **World J Hepatol.**, v. 7, n. 8, p. 1086-1096, 2015.

GERLICH, W. H. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg. **Clin Infect Dis.**, v. 44, n. 9, p. 1170–1172, 2007.

GOMES-GOUVÊA, M. S. et al. HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naïve patients. **Antivir Ther.**, v. 20, n. 4, p. 387-95, 2015.

HORVAT, R. T. Diagnostic and Clinical Relevance of HBV Mutations. **Lab Med.**, v. 42, p. 488–496, 2011.

HSU, H. Y. et al. Long-term follow-up of children with postnatal immunoprophylaxis failure who were infected with hepatitis B virus surface antigen gene mutant. **J Infect Dis.**, v. 207, n. 7, p. 1047-57, 2013.

HSU, H. Y. et al. No increase in prevalence of hepatitis B surface antigen mutant in a population of children and adolescents who were fully covered by universal infant immunization. **J Infect Dis.**, v. 201, n. 8, p. 1192–1200, 2010.

HUANG, C. H. et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. **J Hepatol.**, v. 57, n. 4, p. 720-729, 2012.

HUANG, X. et al. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies. **J Med Virol.**, v. 82, p. 23–31, 2010.

JANG, J. S. et al. Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. **J Med Virol.**, v. 81, n. 9, p. 1531–1538, 2009.

JARAMILLO, C. M.; NAVAS, M. C. Variantes de escape del virus de la hepatitis B. **Rev. chil. infectol.**, v. 32, n. 2, p. 190-197, 2015.

KAJIWARA, E. et al. Hepatitis B caused by a hepatitis B surface antigen escape mutant. **J Gastroenterol.**, v. 43, p. 243–247, 2008.

KOMATSU, H. et al. Hepatitis B surface gene 145 mutant as a minor population in hepatitis B virus carriers. **BMC Res Notes.** v.10, n. 5, p. 22, 2012.

LADA, O. et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of a determinant variants. **J Virol.**, v. 80, n. 6, p. 2968–2975, 2006.

LAZAREVIC, I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances. **World J Gastroenterol.**, v. 20, n. 24, p. 7653-64, 2014.

LAZAREVIC, I. et al. Prevalence of hepatitis B virus MHR mutations and their correlation with genotypes and antiviral therapy in chronically infected patients in Serbia. **J Med Virol.**, v. 82, n. 7, p. 1160-7, 2010.

LEYVA, Alberto et al . Development, validation and application of a new ELISA for process control of the production of recombinant Hepatitis B surface antigen. **Biotechnol Apl.**, v. 28, n. 4, 2011.

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

LIAO, Y. et al. Precore mutation of hepatitis b virus may contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. **PLoS One**, v. 7, n. 6, 2012.

LIN, Y. M. et al. Naturally occurring hepatitis B virus B-cell and T-cell epitope mutants in hepatitis B vaccinated children. **Scientific World Journal.**, 2013.

LINDENBERG, A. S. C. **Infecção pelo vírus da hepatite B em Mato Grosso do Sul: variações genômicas e infecção oculta.** Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 12, p. 4491-4497, 2006.

LIU, W. et al. Coexistence of hepatitisB surface antigen and anti-HBs in Chinese chronic hepatitis B virus patientsrelating to genotype C and mutations in the S and P gene reverse transcriptaseregion. **Arch Virol.**, v. 157, n. 4, p. 627–634, 2012.

LIU, Y et al. Clinical and Virological Characteristics of Chronic Hepatitis B Patients with Coexistence of HBsAg and Anti-HBs. **PLoS One.**, v. 11, n. 1, 2016.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet.** , v. 380, n. 9859, p. 2095-2128, 2012.

LU, H. Y. et al. Mutations in surface and polymerase gene of chronic hepatitis B patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. **World J Gastroenterol.**, v. 12, n. 26, p. 4219-23, 2006.

MATHET, V. L. et al. Detection of hepatitis B virus (HBV) genotype E carried--even in the presence of high titers of anti-HBs antibodies--by an Argentinean patient of African descent who had received vaccination against HBV. **J Clin Microbiol.**, v. 44, n. 9, p. 3435-9, 2006.

MATOS, M. A. D. de. **Estudo epidemiológico e molecular da infecção pelo vírus da hepatite B em afro-descendentes de comunidade isolada no estado de Goiás (Kalungas)**. Tese (Doutorado em em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

MOMENI, N. et al. HBV Vaccination Status and Response to Hepatitis B Vaccine Among Iranian Dentists, Correlation With Risk Factors and Preventive Measures. **Hepat Mon.**, v. 15, n. 1, 2015.

MUN, H. S. et al. The prevalence of hepatitis B virus preS deletions occurring naturally in Korean patients infected chronically with genotype C. **J Med Virol.**, v. 80, n. 7, p. 1189–1194, 2008.

NOROUZI, M. et al. Hepatitis B virus surface antigen variants clustered within immune epitopes in chronic hepatitis B carriers from Hormozgan Province, South of Iran. **IJBMS.**, v. 13, n. 4, p. 11, 2010.

NOROUZI, M. et al. Identification of Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) genotypes and variations in chronic carriers from Isfahan province, Iran. **Iranian J public Health**, v. 41, n. 3, p. 104–111, 2012.

PALMORE, T. N. et al. Reactivation of hepatitis B with reappearance of hepatitis B surface antigen after chemotherapy and immunosuppression. **Clin Gastroenterol Hepatol.**, v. 7, n. 10, p. 1130–1137, 2009.

PANCHER, M. et al. Coexistence of circulating HBsAg and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B carriers is not a simple analytical artifact and does not influence HBsAg quantification. **Journal of Clinical Virology**, v. 62, p. 32–37, 2015.

PAWLOTSKY, J. M. The concept of hepatitis B virus mutant escape. **Journal of Clinical Virology**. v. 34, n. 1, p. 125–129, 2005.

POLLICINO, T. et al. Molecular and Functional Analysis of Occult Hepatitis B Virus Isolates from Patients with Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**. v. 45, n. 2, p. 277-85, 2007.

PONDÉ, R. A. A. The underlying mechanisms for the “simultaneous HBsAg and anti-HBs serological profile”. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 30, p. 1325–1340, 2011.

PU, Z. et al. Epidemiological characteristics of the carriers with coexistence of HBsAg and anti-HBs based on a community cohort study. **J Viral Hepat.**, v. 14, 2015.

PURDY, M. A. Hepatitis B virus S gene escape mutants. **Asian J Transfus Sci.** v. 1, p. 62–70, 2007.

RAHIMI, R. et al. YMDD Motif Mutation Profile Among Patients Receiving Liver Transplant Due to Hepatitis B Virus Infection With Long Term Lamivudine/Immunoglobulin Therapy. **Hepat Mon.**, v. 15, n. 7, 2015.

SAYAD, B. et al. Correlation of Hepatitis B Surface Antigen Mutations with Clinical Status of the Chronically Infected Patients from Kermanshah, West of Iran. **Minerva Gastroenterol Dietol.**, v. 58, n. 1, p. 9–18, 2012.

SAYINER, A. et al. A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. **Journal of Clinical Virology**, v. 38, p. 157–160, 2007.

SCHOCHETMAN, G.; KUHNS, M.C. HIV variants and hepatitis B surface antigen mutants: Diagnostic challenges for immunoassays. **J Med Virol.**, v. 78, p. 3–6, 2006.

SEO, S. I. et al. Coexistence of Hepatitis B Surface Antigen and Antibody to Hepatitis B Surface May Increase the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B Virus Infection: A Retrospective Cohort Study. **Journal of Medical Virology**, v. 86, p. 124–130, 2014.

SHEPARD, C.W. et al. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. **Epidemiol. Rev.** v. 28, p. 112–125, 2006.

SHI, Y. et al. Mutations in the major hydrophilic region (MHR) of hepatitis B virus genotype C in North China. **J Med Virol.**, v. 84, p. 1901–1906, 2012.

SHIRAZI, F. G. et al. Construction and Expression of Hepatitis B Surface Antigen Escape Variants within the "a" Determinant by Site Directed Mutagenesis. **Iran.J.Immunol.**, v. 10, n. 3, 2013.

SITNIK, R. et al. A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (HBV) developed to detect all HBV genotypes. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 52, n. 3, p. 119–24, 2010.

SONG, B. C. et al. Prevalence of naturally occurring surface antigen variants of hepatitis B virus in Korean patients infected chronically. **J Med Virol.**, v. 76, p. 194–202, 2005.

SOUTO, F. J. D. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2015.

VAN DOMMELEN, L. et al. Acute hepatitis B virus infection with simultaneous high HBsAg and high anti-HBs signals in a previously HBV vaccinated HIV-1 positive patient. **J Clin Virol.** v. 47, n. 3, p. 293–6, 2010.

VELU, V. et al. Transmission of "a" determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. **Jpn J Infect Dis.** v. 61, n. 1, p. 73–6, 2008.

WANG, H. C. et al. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. **Cancer Sci.** v. 97, p. 683–688, 2006.

WANG, L. et al. Sequence analysis of the S gene region in HBV DNA from patients positive for both HBsAg and HBsAb. **Hepatology Research.** v. 40, p. 1212–1218, 2010.

WEBER, B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. **J Med Virol.**, v. 78, p. 59–65, 2006.

WEBER, B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. **J Clin Virol.**, v. 32, n. 2, p. 102–112, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection.** WHO; 2015b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Hepatitis B.** 2015. Disponível em >
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>. Acesso em 24 set 2015a.

YAMANI, L. N. et al. Ultradeep sequencing for detection of quasispecies variants in the major hydrophilic region of hepatitis B virus Indonesian Patients. **J Clin Microbiol.**, v. 53, n. 10, p. 3165-75, 2015.

YU, D. M. et al. N-glycosylation mutation within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape. **J Hepatol.**, v. 60, p. 515–522, 2014.

ZAAIJER, H. L.; BOUTER, S.; BOOT, H. J. Substitution rate of the hepatitis B virus surface gene. **J Viral Hepat.**, v. 15, n. 4, p. 239-45, 2008.

ZHANG, J. M. et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific anti-bodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection. **Clin Infect Dis.**, v. 44, n. 9, p. 1161–9, 2007.

ZHANG, X.; DING, H. Key role of hepatitis B virus mutation in chronic hepatitis B development to hepatocellular carcinoma. **World J Hepatol.**, v. 7, n. 9, p. 1282-1286, 2015.

ANEXOS

ANEXO A - QUESTIONÁRIO

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:		Moratempo;
Ponto de referência:		
7. Última procedência:		Utimaproa;

17. Vacinação para hepatite B (1) Sim (2) Não (3) Não sabe Quantas doses? (1) 1 dose (2) 2 doses (3) 3 doses	VacinaHB: VachHBdose:
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 22. Se sim, data da última transfusão: 23. Local da ultima transfusão:	Transfussangue: Datatransfussangue: Localultimasangue:
VI – DROGAS	
24. Álcool: (1) Sim (2) Não (3) Não se aplica	Alcool:
Tempo de Consumo (anos): Frequência: (1) diariamente (2) semanalmente (3) esporadicamente	Alcooltemp: Alcoolfreq:
Quantidade (fechar em número exato/copos): _____ Tipo de bebida: _____ Abstinência há (meses): _____	Alcoolquant: Alcooltipo: Alcoolabst:
25. Drogas Ilícitas	Drogailic:

(1) Usa (2) Já usou (3) Nunca usou (4) Não respondeu (8) não se aplica	
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	Cirurgia:

(2) Casa-compartilhada Navalha (1) No salão (3) Casa-individual (2) Casa-compartilhada Pinça depilatória (1)No salão (2) Casa-individual (3) Casa-compartilhada		Navalha: Pinça:
X- EXPOSIÇÃO A MATERIAL BIOLÓGICO		
Lesão de pele (ferimento, perfuração) em acidente, no trabalho, etc. (1)Sim (2)Não (3) Não lembra Qdo Qts 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)Não		Gest:

Se 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	Gestmes Prenatal Nutriz: 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 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO 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: SAO LUIS

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

Atlanta /EUA e Excel (Windows 2007). A estimativa dos alelos será feita a partir do método de contagem e também será utilizado o programa ADMIX.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Conhecer a prevalência das hepatites virais B, C e D 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 e realizar estudos imunogenéticos e de ancestralidade nessa população.

Objetivo Secundário:

Identificar os indivíduos com sorologia positiva para os marcadores HBsAg, anti-HBc e/ou anti-HBs e anti-HCV. Identificar os indivíduos que apresentam o marcador sorológico para a hepatite D (anti-HDV) entre os portadores do HBsAg. Caracterizar os genótipos, subgenótipos (HBV) e subtipos (HCV) dos vírus da hepatite B, C e D através da técnica de sequenciamento direto. Estimar a ancestralidade genômica nessa população através de marcadores moleculares. Verificar a diversidade genética do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, genes KIR e IL28B. Verificar a existência de associação entre maior percentagem de marcadores africanos e portadores das hepatites comparadas com não portadores. Verificar a existência de associação entre maior percentagem de marcadores africanos e genótipos virais. Verificar a existência de associação entre os alelos de MHC, KIR e IL28B com a presença da infecção viral pelos HBV e HCV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Desconforto na coleta de sangue, assim como a possibilidade de formação de edema na área da punção venosa.

Benefícios: Os pesquisadores destacam que os benefícios estão vinculados às ações de saúde de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento além de informações precisas sobre as reais prevalências destas infecções trazendo impacto social de grande relevância.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SÃO LUIS

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 C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (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 Muni, Maranhão, Brasil,”** a ser realizada, nos municípios de Urbano Santos, Arixá, 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 no 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 (menor de 18 anos):

São Luís (MA)_____/_____/_____

(Assinatura)

(Nome por extenso)

Assinatura do (a)_____

Pesquisador

ANEXO D – SUBMISSÃO DO ARTIGO

Journal of Medical Virology



Journal of Medical Virology

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

Journal:	Journal of Medical Virology
Manuscript ID	JMV-16-5294.R1
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Albuquerque, Ingrid; Universidade Federal do Maranhão, Ciências da Saúde; Ferreira, Adalgisa; Universidade Federal do Maranhão, Ciências da Saúde Sousa, Marinilde; Universidade Federal do Maranhão, Ciências da Saúde
Keywords:	Hepatitis B virus < Virus classification, Mutation < Genetics, Humoral immunity < Immune responses

SCHOLARONE™
Manuscripts