

Adriana Parise Compri

**Estudo da infecção pelo vírus da hepatite B em
crianças e adolescentes e seus familiares:
distribuição dos genótipos e pesquisa de mutações
no gene pré-core e core**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof(a). Dr(a). Regina Célia Moreira

**São Paulo
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES

©reprodução autorizada pelo autor

Compri, Adriana Parise

Estudo da infecção pelo vírus da hepatite B em crianças e adolescentes e seus familiares: distribuição dos genótipos e pesquisa de mutações no gene pré-core e core / Adriana Parise Compri – São Paulo, 2007.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Regina Célia Moreira

1. Hepatite B 2. Genótipo 3. Mutação 4. Transmissão vertical de doença 5. Transmissão horizontal de doença

SES/CCD/CD-166/07

*Ao meu querido pai Antônio Carlos
(in memoriam) exemplo de pai e amigo,
gratidão pelo apoio e incentivo em todas as
etapas da minha vida.*

*A minha mãe Arlete,
pelo amor, carinho, compreensão
e estímulo constantes.*

*Ao meu esposo Alexandre,
pelo amor, carinho, dedicação, estímulo e
paciência não só na execução deste trabalho,
mas ao longo de nossas vidas.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença em todos os momentos de minha vida, principalmente nos mais difíceis e por ter me permitido chegar até aqui.

Às crianças e adolescentes, motivo deste trabalho, pela oportunidade de gerar conhecimento e maturidade científica.

A Prof^ª. Dr^ª. Regina Célia Moreira, minha orientadora, pelo apoio, confiança, amizade e dedicação em transmitir seus conhecimentos, contribuindo muito para minha formação profissional.

Às Doutoras Irene Miura e Gilda Porta, médicas da Unidade de Hepatologia do Departamento de Pediatria do Instituto da Criança, pela oportunidade de participar desse estudo, pelo fornecimento das amostras, além das informações e sugestões imprescindíveis à realização deste trabalho.

À amiga Cláudia Patara Saraceni, pela disposição em ensinar, compartilhando seus conhecimentos e questionamentos, ajudando na elaboração de boa parte desse trabalho, além do incentivo constante.

Ao amigo Marcilio Figueiredo Lemos por sua dedicação, prontidão e valioso auxílio dispensados não só na execução deste trabalho, mas ao longo desses anos de convivência.

Às amigas Angela Spina, Isabel Oba, Patrícia Nishimura, Adriana Cristina da Silva, companheiras do Laboratório de Hepatites do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo eficiente trabalho durante esses anos, carinho, respeito e principalmente, pela convivência harmoniosa e cooperativa, importantes para a realização deste trabalho.

A Dra. Julia Maria M. de Souza Felipe, diretora da Divisão de Biologia Médica e a Dra. Luiza T. Madia de Souza, diretora do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo acolhimento e oportunidade de desenvolver este trabalho na instituição.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-graduação, Tirces, Liria e Emiliana pela dedicação, prestatividade e ajuda nos momentos em que precisei.

A todos os professores do mestrado, pela boa instrução fornecida, contribuindo para a obtenção desse título. Em especial à Prof^a Ausônia Donato, profissional de renomada competência, que pela sabedoria, soube me ensinar a verdadeira postura de um educador.

À minha irmã Andrea, pela disposição e paciência em tirar minhas dúvidas quanto à escrita e pela revisão gramatical dessa dissertação.

À Cristina Oliveira, Adriana Lucks, Simone Morillo, pela amizade, apoio moral e pelas conversas descontraídas.

Ao Norberto Camilo Campos pela amizade, companheirismo e paciência ao longo desses anos.

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) na infância representa um desafio, pois as crianças que adquirem o VHB, por transmissão perinatal, têm risco de 90% de desenvolver infecção crônica. Vários estudos têm sido realizados na tentativa de demonstrar a relação entre os genótipos e a evolução clínica desta infecção, porém estes são ainda escassos e pouco consistentes, principalmente no que diz respeito à hepatite B na infância, devido ao número pequeno de pacientes envolvidos. Este estudo teve por objetivos caracterizar a infecção pelo VHB em crianças e adolescentes acompanhadas no Instituto da Criança do HC/FMUSP; avaliar os marcadores sorológicos; caracterizar o genótipo do VHB e a presença de mutações da região Pré-core e do BCP; identificar portadores crônicos do VHB e indivíduos suscetíveis no ambiente intrafamiliar; caracterizar o genótipo do VHB e observar a presença de cepas mutantes entre os familiares. A população desse estudo foi constituída por 95 crianças e adolescentes, menores de 19 anos, que apresentaram AgHBs positivo por mais de seis meses e 118 familiares dos pacientes. Foram utilizados kits comerciais para a pesquisa dos marcadores sorológicos. A “nested” PCR para região S foi utilizada para genotipagem do VHB nas amostras com AgHBs. Nas amostras AgHBs/anti-HBe positivas e AgHBe negativas foram pesquisadas mutações empregando-se a “nested” PCR para região pré-core. Das 95 crianças e adolescentes, 53 eram do gênero masculino e 42 do feminino, com média de idade de 7,6 anos. Em relação à sorologia, 63 (66,3%) apresentaram AgHBe e 2,1% (2/95) não apresentaram anti-HBc total. Das 32 amostras AgHBe negativas, 30 (93,7%) apresentaram resultado positivo para o anti-HBe, dos quais três apresentaram mutação na região pré-core e 11 na região BCP. Das 89 amostras de pacientes em que foi possível amplificar a região S, 39 (43,8%) foram caracterizadas como genótipo A, cinco (5,6%) como C e 45 como D (50,6%). Dos 118 familiares estudados, 40 eram portadores crônicos do VHB, 52 tinham marcador

sorológico de contato prévio e sete eram suscetíveis. Quanto à distribuição dos genótipos dentre os familiares AgHBs positivos, os genótipos A e D foram os mais freqüentes e todos os indivíduos com genótipo C eram de origem oriental. Apenas um familiar apresentou mutação na região pré-core e quatro apresentaram mutação na região do BCP. Os resultados encontrados neste estudo são semelhantes aos poucos estudos publicados no Brasil, ou seja, os genótipos A e D foram os mais freqüentes dentre as crianças adolescentes e seus familiares e todos os indivíduos com genótipos C eram de origem oriental. Baixa freqüência de mutações na região pré-core e core foram encontradas devido à alta freqüência de genótipo A. Medidas de prevenção e controle da infecção pelo VHB devem sempre ser incentivadas, especialmente para pessoas que dividem o mesmo ambiente domiciliar, tendo em vista o alto grau de propagação deste vírus.

ABSTRACT

Viral hepatitis in childhood represents a challenge worldwide. Children who acquire the hepatitis B (HBV) perinatally have up 90% risk to develop chronic infection. Some studies have been carried out to demonstrate the relation between the genotypes and the clinical evolution of this infection, however these data are still scarce and little consistent, because of the small number of involved patients. The objectives of this work were to characterize the infection of HBV in children and adolescents followed in the Institute of the Child of the HC/FMUSP; to evaluate the serologic markers; to determine the genotypes of the HBV; to observe the presence of precore region mutations; to identify chronic carriers of the HBV and susceptible individuals in the intrafamilial environment; to characterize the genotype of the HBV and to observe the presence of mutants between the households contacts. 95 children and adolescents, minors of 19 years that presented positive HBsAg for more than six months and 118 intrafamilial contacts constituted the population of this study. Commercial kits were used to detect the serologic markers. The "nested" PCR was used to characterize the S region of the genome and for genotyping the samples with HBsAg positive. Precore mutations were determined in HBsAg/Anti-HBe positive and HBeAg negative samples. Of the 95 children and adolescents, 53 were of the masculine gender and 42 were feminine, with average of age of 7,6 years. The HBeAg was found in 66,3% (63/95) of the patients and anti-HBe was positive in 30 (93,7%) of the 32 negative HBeAg patients, of which only three presented precore mutation and 11 presented BCP mutation. The anti-HBc was not found in 2,1% (2/95) of the patients. It was possible to identify the genotype in 89 samples and 39 (43,8%) were characterized as genotype A, five (5,6%) as genotype C and 45 (50,6%) as D. Of the 118 relatives who were studied, 40 were chronic carriers of HBV, 52 presented serologic marker of past infection and seven were susceptible. In relation of genotypes distribution among HBsAg positive relatives, genotypes A and D were the most frequent

and the two individuals with genotype C were from Asian origin. Only one parent presented mutation in the precore region and four individuals presented mutation in the BCP region. The results found in this study, are similar to the few studies published in Brazil, or either, the genotypes A and D had been most frequent amongst the children, adolescents and its familiar and all the individuals with genotypes C were of eastern origin. Low frequency of mutations in the pre-core and core region had been found, due the high frequency of genotype A. Measures of prevention and control of HBV infection must always be stimulated, especially for people who divide the same domiciliary environment, in view of the high degree of propagation of this virus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL microlitro

aa aminoácido

AgHBc antígeno do core do vírus da hepatite B

AgHBe antígeno e do vírus da hepatite B

AgHBs antígeno de superfície do vírus da hepatite B

AgHBx antígeno X do vírus da hepatite B

ALT (TGP) alanina amino transferase

Anti-HBc anticorpo contra o antígeno do core do vírus da hepatite B

Anti-HBe anticorpo contra o antígeno e do vírus da hepatite B

Anti-HBs anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B

AST (TGO) aspartato amino transferase

BCP promotor basal do core

bDNA DNA ramificado

cccDNA em inglês “circular covalent closed desorribonucleic acid”

ddNTPs trifosfatos de didesoxinucleotídeos

dNTPs trifosfatos de desoxinucleotídeos

DNA ácido desoxirribonucléico

DNA polimerase polimerase do ácido desoxirribonucléico

DR1 região repetida 1 do vírus da hepatite B

DR2 região repetida 2 do vírus da hepatite B

Elisa do inglês “enzyme-liked immunosorbent assay”

Fita L fita longa do vírus da hepatite B

Fita S fita curta do vírus da hepatite B

g grama

h hora

HC/FMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

HCl ácido clorídrico

HIV vírus da imunodeficiência humana

HNANB hepatite não A não B.

IC intervalo de confiança

ICR Instituto da Criança

IgG imunoglobulina da classe G

IgM imunoglobulina da classe M

Kg kilo

L litro

mg miligrama

MgCL₂ cloreto de magnésio

min minuto

nm nanômetro

nt nucleotídeo

ORF fase de leitura aberta

PCR reação em cadeia da polimerase

Proteína L proteína maior do envelope

Proteína M proteína média do envelope

Proteína S proteína menor do envelope

Região C região de codificação das proteínas do core

Região P região de codificação da polimerase do DNA

Região pré-S1 seqüência entre o primeiro e o segundo códon de iniciação
da região S

Região pré-S2 seqüência entre o segundo e o terceiro códon de iniciação
da região S

Região S região de codificação das proteínas do envelope

Região X região de codificação do antígeno X

Região YMDD região da polimerase do DNA que codifica os aminoácidos
tirosina-metionina-aspartato-aspartato

RNA ácido ribonucléico

RT transcriptase reversa

SPI promotor I do gene S

SPII promotor II do gene S

Taq *Thermus aquaticus*

TBE tris-borato-EDTA

UI/L unidades internacionais por litro

VHB vírus da hepatite B

VHC vírus da hepatite C

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1. Esquema representativo do vírus da Hepatite B e suas quatro regiões codificadoras:C, S, P, X.....	21
Figura 2. Esquema representativo do ciclo de replicação viral do VHB.....	24
Figura 3. Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite aguda.....	35
Figura 4. Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite crônica.....	35
Figura 5. Distribuição geográfica da infecção pelo VHB.....	41
Figura 6. Fluxograma do diagnóstico laboratorial.....	52
Figura 7. Freqüência das crianças e adolescentes portadores de infecção crônica pelo VHB acompanhados no Instituto da Criança, HC/FMUSP, por perfil sorológico.....	62
Figura 8. Freqüência das crianças e adolescentes do VHB acompanhados no Instituto da Criança, HC/FMUSP, por genótipo.....	62
Figura 9. Freqüência dos familiares por genótipo do VHB.....	65
Quadro 1. Diferença nos resíduos de aminoácidos entre os diferentes subtipos sorológicos.....	25
Quadro 2. Relação entre genótipo, os principais subtipos sorológicos e sua distribuição geográfica.....	27
Quadro 3. Distribuição dos genótipos do VHB América Latina.....	28
Quadro 4. Infecção pelo VHB: Interpretação do Quadro Sorológico.....	37
Quadro 5. Programa utilizado em termociclador para amplificação da região S do VHB.....	55
Quadro 6. Programa utilizado em termociclador para amplificação da região Pré-core e core do VHB.....	56

Tabela 1. Freqüência das crianças e adolescentes portadores de infecção crônica pelo VHB acompanhados no Instituto da Criança, HC/FMUSP, segundo faixa etária e marcador sorológico.....	61
Tabela 2. Distribuição das mutações encontradas nas regiões Pré-core e BCP do VHB por criança e adolescente.....	63
Tabela 3. Freqüência dos familiares por grau de parentesco e por marcador sorológico.....	64
Tabela 4. Freqüência dos familiares por grau de parentesco e por perfil sorológico.....	65
Tabela 5. Mutações encontradas nas regiões Pré-core e BCP do VHB por familiar.....	66

ÍNDICE

1. Introdução.....	18
1.1. O vírus da hepatite B (VHB).....	20
1.2. Replicação Viral.....	23
1.3. Subtipos e Genótipos do VHB.....	24
1.4. Mutações.....	30
1.4.1. Mutações na região Pré-core.....	31
1.5. Diagnóstico Laboratorial do VHB.....	33
1.5.1. Diagnóstico sorológico.....	34
1.5.2. Diagnóstico molecular.....	38
1.6. Epidemiologia do VHB.....	39
1.7. Prevenção.....	45
2. Objetivos.....	48
2.1. Objetivos gerais.....	49
2.2. Objetivos específicos.....	49
3. Casuística e métodos.....	50
3.1. População de Estudo.....	51
3.2. Aspectos éticos.....	51
3.3. Amostras.....	51
3.4. Sorologia.....	52
3.5. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	53
3.5.1. Extração do DNA do VHB com solução de isotiocianato de guanidina (GT) e fenol	53
3.5.2. Primers.....	54
3.5.3. Preparação de Desoxinucleotídeos (dNTPs).....	55
3.5.4. Metodologia da “Nested” PCR.....	55
3.5.4.1. Primeira PCR.....	55
3.5.4.2. Segunda PCR (“Nested”).....	56
3.5.4.3. Identificação do produto amplificado.....	56
3.6. Sequenciamento.....	57

3.6.1. Reação de Sequenciamento por “Cycle Sequencing”.....	57
3.6.2. Precipitação das amostras após “Cycle Sequencing”, Denaturação e Aplicação no gel.....	58
3.6.3. Análises das seqüências.....	58
3.6.4. Interpretação.....	59
4. Resultados.....	60
4.1. Crianças e adolescentes crônicos do VHB.....	61
4.2. Famílias.....	64
5. Discussão.....	67
6. Conclusões.....	76
7. Referências Bibliográficas.....	78

1. INTRODUÇÃO

Hepatite é uma doença com múltiplas causas que foi descrita por Hipócrates há mais de dois mil anos e, essa forma foi provavelmente devida à hepatite A (Krugman, 1978). A natureza epidêmica da doença foi conhecida desde o século VIII, a partir do qual se descreveram numerosas epidemias entre populações civis e militares. Durante a primeira metade do século 20, essa “icterícia epidêmica” recebeu denominações diferentes, entre outras, hepatite infecciosa (Inglaterra, Estados Unidos), hepatite epidêmica (Estados Unidos), icterícia dos campos (França), doença icterica dos soldados (Alemanha) e doença de Botkin (Rússia) (Silva, 1995).

A primeira descrição de hepatite transmitida por inoculação direta de sangue ou por produtos sangüíneos foi em 1885 durante uma campanha de imunização contra o vírus da varíola em trabalhadores de estaleiros em Bremen, Alemanha (Lurman, 1885; Ranger-Rogez, 2004).

Em 1918, essa síndrome foi relacionada a uma provável etiologia viral, que foi posteriormente confirmada por estudos epidemiológicos, incluindo experimentos realizados em voluntários humanos durante a 2ª Guerra Mundial. Estes estudos permitiram distinguir duas formas de contágio desta doença: uma de transmissão oral- fecal, que recebeu a denominação de hepatite infecciosa e outra de transmissão parenteral, denominada de hepatite soro-homóloga (Memorandum, 1943; Hollinger, 2001). Entretanto, em 1947, McCALLUM definiu o termo hepatite B para esta entidade.

Na década de 60, Blumberg et al (1965) caracterizaram a presença de um antígeno, presente no soro de um aborígine australiano leucêmico, utilizando a técnica de imunoprecipitação. Este antígeno foi denominado de antígeno Austrália. Sua relação com a hepatite B foi feita um ano depois por Okochi & Murakami (1968) e por Prince (1968), recebendo posteriormente o nome de antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs). Contudo, a visualização da partícula viral íntegra do VHB foi realizada somente em 1970 por Dane et al.

1.1. O vírus da hepatite B (VHB)

O vírus da hepatite B (VHB) pertence à família Hepadnaviridae, gênero Orthohepadnavírus. O VHB pode ser encontrado no soro de pacientes infectados sob duas formas: partícula completa (partícula de Dane) contendo o ácido nucléico viral, com 42nm de diâmetro e nucleocapsídeo de 27nm, que é infectante e capaz de replicar-se; partículas esféricas e cilíndricas de 22nm de diâmetro constituídas apenas pelo envelope viral e, portanto, não infectante (Tiollais et al, 1985). O DNA é compactado em um nucleocapsídeo icosaédrico formado pela proteína do core, o qual é envolvido por um envelope esférico composto pelo antígeno de superfície (AgHBs), que desempenha papel importante no diagnóstico da infecção pelo VHB. Além das proteínas do core e de superfície, o genoma do VHB codifica a DNA polimerase que também age como transcriptase reversa (Lin et al, 2004).

A partícula viral é constituída de uma fita de DNA circular parcialmente dupla de aproximadamente 3.200 pares de bases, com uma fita longa ou L (-) e uma fita curta ou S (+) (Ganem et al, 2001; Lok et al, 2003; Lin et al, 2004). A totalidade do genoma do VHB é codificante, apresentando quatro fases de leitura aberta (ORF) designadas de pré-S/S, pré-C/C, P e X (Ganem et al, 2001) (figura 1). Esta capacidade codificadora está restrita à fita L(-) e os genes possuem pelo menos uma região de sobreposição a outro (Tiollais et al, 1985; Gomes, 2002; Lok et al, 2003).

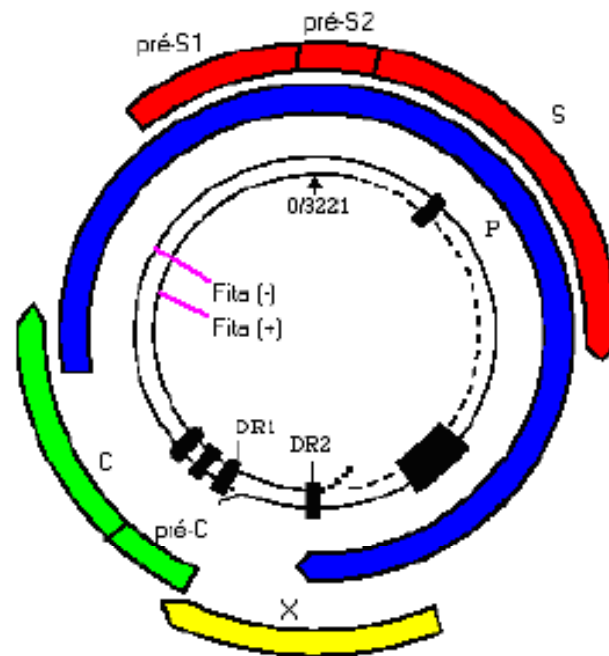


Figura 1. Esquema representativo do vírus da Hepatite B e suas quatro regiões codificadoras: C, S, P, X

O gene pré-S/S codifica as proteínas que formam o antígeno de superfície do vírus (AgHBs). Ele inclui as regiões pré-S1, pré-S2 e S, com três códons de iniciação na mesma fase de leitura. A maior proteína que compõe o AgHBs, “large” (L), cujo códon de iniciação é localizado no início da região pré-S1, é codificada pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S. A proteína de tamanho intermediário designada de “medium” (M) é codificada pelas regiões pré-S2 e S. A menor proteína, “small” (S), é sintetizada a partir do códon de iniciação localizado no início da região S (Lok et al, 2003; Gomes, 2002).

A região pré-C/C possui dois códons de iniciação na mesma fase de leitura aberta (Gomes, 2002). O gene é traduzido em uma poliproteína Pré-core a qual é modificada em uma proteína solúvel, o antígeno “e” da hepatite

B (AgHBe) e na proteína do nucleocapsídeo, o antígeno do core da hepatite B (AgHBc) (Lok et al, 2003).

O gene P cobre aproximadamente 75% do genoma e codifica uma enzima com atividade de DNA polimerase, transcriptase reversa e RNaseH. A polimerase viral é composta por quatro domínios: o domínio aminoterminal, que atua como proteína terminal ou primase, sendo necessário para o início da síntese da fita curta; uma região denominada de “espaçadora” sem função definida; o domínio de transcriptase reversa e o domínio C-terminal que exibe atividade de RNase H (Gomes, 2002). Existe homologia entre a polimerase viral e outras transcriptases reversas, em particular estas enzimas compartilham o motivo Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD) essencial para a atividade de transcrição reversa (Bartholomeusz et al, 1997).

O gene X especifica um polipeptídeo em torno de 154aa que pode ser detectado apenas nos hepatócitos infectados. Sua seqüência é conservada entre os hepadnavírus que infectam os mamíferos; entretanto, este evento não acontece nos vírus que infectam as aves (Gomes, 2002). A proteína codificada por este gene é um potente transativador e desempenha papel na carcinogênese (Lok et al, 2003). Mas, seu papel no ciclo de vida do vírus, bem como no curso natural da infecção, permanece incerto (Glebe, 2007).

A configuração circular da molécula ocorre devido à complementaridade da extremidade 5' de 234 bases das duas fitas de DNA. No final dessa região coesa há duas seqüências repetitivas de 11 bp chamadas de DR1 (região repetitiva 1 do VHB) e DR2 (região repetitiva 2 do VHB). A seqüência da fita curta começa na região DR1, enquanto a fita longa compartilha o gene DR2 (Machado, 2002).

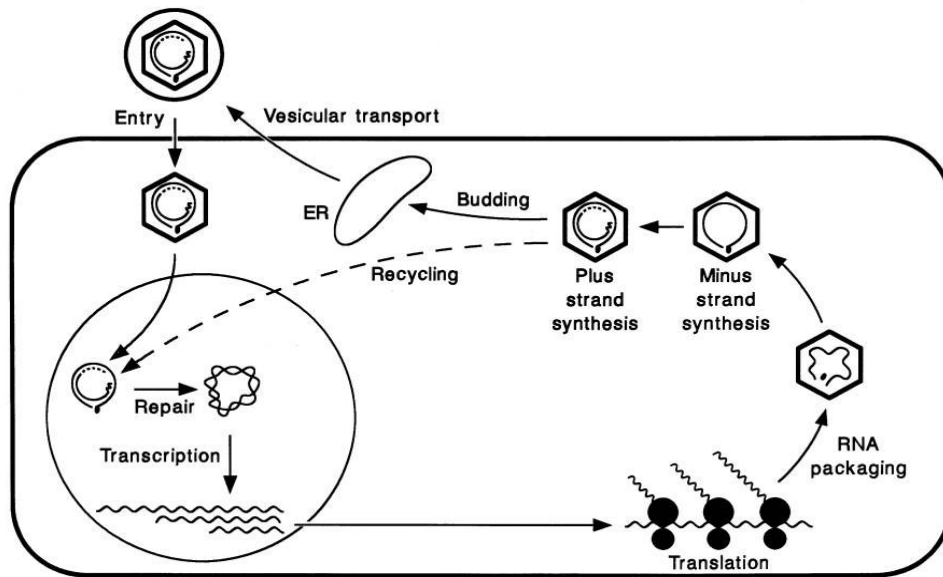
O controle da expressão dos genes do VHB é realizado por promotores. O promotor SPI (“S promoter I”), localizado imediatamente antes da região pré-S1, controla o gene da proteína de envelope L (Siddiqui et al., 1986) e o SPII (“S promoter II”), localizado na região pré-S1, é o promotor do gene da proteína de envelope M e S (Cattaneo et al., 1983). O promotor basal do core (BCP) regula a síntese das proteínas do nucleocapsídeo viral

e do RNAm pré-genômico (Yuh et al, 1992) e se situa na região X (Treinin et al, 1987). O promotor do gene X origina um transcrito que regula a síntese de proteína AgHBx (Guo et al, 1991).

1.2. Replicação viral

O ciclo de replicação do VHB inicia-se com a adesão do vírus à membrana do hepatócito. No núcleo do hepatócito, a síntese da molécula de DNA do VHB é finalizada e o genoma viral é convertido em uma molécula de DNA circular, covalente e fechada (cccDNA). O genoma do VHB se replica por meio da transcrição reversa, via RNA intermediário. A molécula de cccDNA produz novas cópias do vírus, inicialmente através de um RNA pré-genômico, que funciona tanto como modelo para a transcrição reversa quanto para o RNA mensageiro para a síntese posterior das proteínas do nucleocapsídeo e a polimerase (Liang, 2000; Casey, 2000; Lok et al, 2000).

O RNA pré-genômico, as proteínas do nucleocapsídeo e a polimerase são encapsuladas na porção central do vírus, dentro do qual a transcrição reversa ocorrerá. Seguindo-se a transcrição, novas fitas negativa e positiva de VHB-DNA serão produzidas. Após a ligação às proteínas do envelope viral, novas partículas virais completas serão produzidas e liberadas (Figura 2) (Mello et al, 2001; Lin et al, 2004).



Fonte: Ganem, 2001.

Figura 2. Esquema representativo do ciclo de replicação viral do VHB.

1.3. Subtipos e Genótipos do VHB

Baseado na heterogeneidade antigênica do AgHBs, quatro subtipos sorológicos foram identificados inicialmente: adw, adr, ayw e ayr (Le Bouvier et al, 1971; Bancroft et al, 1972). O determinante “a” é comum à maioria das cepas e é atribuído a um epítipo descontínuo, ao qual são dirigidos os anticorpos neutralizantes (Machado, 2002). Este determinante faz parte da região hidrofóbica principal do domínio S. Mutações envolvendo as alças dessa região estão associadas com resistência à vacina (Carman et al, 1990; Mimms, 1995; Oon et al, 1995). As substituições nos aminoácidos das posições 122 e 160 do AgHBs são responsáveis pela expressão das especificidades d/y e w/r, respectivamente (Okamoto et al, 1987). O subtipo ad é comumente encontrado em indivíduos assintomáticos, uma vez que, em infecções agudas, os subtipos ay são os mais frequentes (Khoury et al, 2004).

Com a descrição de subdeterminantes adicionais do determinante “a”, o número de subtipos sorológicos aumentou para nove: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr^{q+}, adr^{q-} (Couroucê-Pauty et al, 1976; Couroucê-Pauty et al, 1978; Couroucê-Pauty et al, 1983). Várias diferenças de aminoácidos no AgHBs têm sido identificadas entre os diferentes subtipos sorológicos, como está ilustrado na quadro 1.

Quadro 1. Diferença nos resíduos de aminoácidos entre os diferentes subtipos sorológicos

Posição	Aminoácido	Especificidade
122	Lys(k)	D
	Arg (R)	Y
127	Pro(P)	w1/w2
	Thr (T)	w3
	Leu (L)	w4
134	Tyr (y)	ayw2/ayw3
	Phe(F)	ayw1/ayw4/adw2/adw4
160	Lys (k)	W
	Arg R)	R

Fonte: Kramvis et al, 2005

A divergência das seqüências do genoma completo dentro de um mesmo subtipo é de aproximadamente 8%, que é semelhante à encontrada entre diferentes subtipos, o que mostra que a subtipagem não reflete a variabilidade genotípica nas seqüências codificadoras da proteína S. Por esta razão, em 1988 Okamoto et al propuseram um método de classificação baseado na seqüência viral completa, sendo sua utilização cada vez mais freqüente. Uma classificação baseada no grau de similaridade da seqüência nucleotídica do genoma do VHB, levou à classificação em seis grupos, A a F (Okamoto et al, 1988; Norder et al, 1992). Recentemente dois outros genótipos, designados como G e H, foram relatados. O primeiro em

indivíduos dos Estados Unidos e da França (Stuyver et al, 2000) e o segundo em indivíduos da América do Sul e Central (Arauz-Ruiz et al, 2002).

Além disso, recentes trabalhos têm demonstrado a presença de subgenótipos, devido a divergência de 4% nas seqüências do genoma completo dentro de um mesmo genótipo. Até agora foram descritos subgenótipos nos genótipos A (Bowyer et al, 1997; Kramvis et al, 2002; Kimbi et al, 2004), B (Sugauchi et al, 2002; Sugauchi et al, 2004a e 2004b), C (Huy et al, 2004) e F (Mbayed et al, 2001; Norder et al, 2003).

Embora o sequenciamento do AgHBs possa identificar tanto sorotipo quanto genótipo, eles necessariamente não se correspondem e os sorotipos não refletem a relação genética. O genótipo, ao contrário do sorotipo, tem demonstrado relação com a distribuição geográfica do VHB, além de ser mais útil em estudos de epidemiologia molecular (Kramvis et al, 2005).

A relação entre os quatro principais subtipos e os genótipos tem sido determinada (Quadro 2). Os oito genótipos do VHB estão distribuídos em áreas geográficas distintas. O genótipo A é encontrado no Norte Europeu, América do Norte e África (Norder et al, 1993; Lindh et al, 1997). Os genótipos B e C são característicos da Ásia e Oceania (Okamoto et al, 1988; Lindh et al, 1997; Westland et al, 2003), enquanto que o genótipo D tem distribuição mundial, mas predomina na área Mediterrânea (Lindh et al, 1997; Westland et al, 2003). O genótipo E parece ser originário de aborígenes da África. O genótipo F, que pode ter surgido no Novo Mundo, é um dos mais prevalentes em alguns países da América do Sul e América Central e o mais divergente entre os genótipos do VHB (Gomes, 2002). Em 2000, foi descrito o genótipo G do VHB, encontrado em mais de 10% dos casos estudados na França e Estados Unidos (Stuyver et al, 2000). O genótipo H, descrito em 2002, é encontrado na América do Sul e Central (Arauz-Ruiz et al, 2002).

Quadro 2. Relação entre genótipo, os principais subtipos sorológicos e sua distribuição geográfica.

Genótipo	Subtipo	Localidade
A	Adw2, ayw1	Norte europeu e ocidental, EUA, África central e Índia.
B	Adw2, ayw1	Japão, Taiwan, Indonésia, China.
C	adw2, adr _q +, adr _q -, ayr, adr	Leste asiático, Taiwan, Coreia, China, Japão, Polinésia, Vietnã, Austrália, EUA.
D	ayw2, ayw3, ayw4	Região mediterrânea, Rússia, Índia, EUA.
E	ayw4	Oeste africano.
F	adw4-, adw2, ayw4	América do sul e central, Polinésia.
G	adw2	América central (?), França, EUA, Alemanha
H	adw4	América do sul e central.

Fonte: Bartholomeusz & Schaefer, 2004, modificado

A distribuição dos genótipos pode ser influenciada pelos antecedentes étnicos e pelo país de origem dos portadores do vírus. Num estudo realizado nos EUA, uma forte associação estatística tem sido encontrada entre o genótipo e a etnia e, entre o genótipo e o local de nascimento. Os genótipos A e D foram detectados mais freqüentemente em Caucasianos (Westland, 2003; Chu et al, 2003), enquanto que os portadores asiáticos foram infectados com genótipos B e C (Westland, 2003; Chu et al, 2003).

As informações genéticas sobre as cepas do VHB na América do Sul ainda são limitadas (Casey et al, 1996; Arauz-Ruiz et al, 1997; Teles et al, 1999), devido ao número reduzido de cepas que tem seu genoma estudado e caracterizado.

Na América Latina, principalmente na Amazônia, é encontrado predominantemente o genótipo F (Blitz et al, 1998) e subtipos adw4 e adw2. Os genótipos A, B e D têm sido descritos na Argentina (Telenta et al, 1997), no Sudeste e Nordeste do Brasil (Quadro 3).

Quadro 3. Distribuição dos genótipos do VHB América Latina

Localidade	População (n)	Genótipos do VHB							Referência
		A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	E (%)	F (%)	G (%)	
América Central*	vários (333)	14,0	-	1,0	6,0	-	79,0	-	Arauz-Ruiz et al (1997)
Peru	crônicos (15)	-	-	-	-	-	100,0	-	Casey et al (1996)
Argentina	crônicos (12)	33,3	8,3	-	16,7	-	41,7	-	Telenta et al (1997)
	crianças (22)	36,0	-	-	9,0	-	55,0	-	Mbayed et al (1998)
Brasil									
Rio de Janeiro	crônicos (11)	27,3	-	-	54,5	-	18,2	-	Moraes et al (1996)
Goiás	hemodiálise (26)	36,0	-	-	9,0	-	55,0	-	Telles et al (1999)
Amazonas	índios (27)	22,7	-	-	-	-	77,3	-	Bertolini et al (2000)
S. Catarina	hemodiálise (63)	30,2	-	-	58,7	-	11,1	-	Carrilho (2000)
Norte	crônicos (9)	77,8	-	-	-	-	22,2	-	Sitnik (2002)
Nordeste	crônicos (14)	92,9	-	-	-	-	7,1	-	
Centro Oeste	crônicos (8)	50,0	-	-	50,0	-	-	-	
Sudeste	crônicos (159)	45,9	2,5	24,5	20,8	-	6,3	-	
Sul	crônicos (15)	26,7	-	-	66,7	-	6,7	-	
Geral	crônicos (221)	48,9	1,8	18,1	24,9	-	6,3	-	
Amazônia Oriental	crônicos (51)	89,1	-	-	2,2	-	8,7	-	Conde et al (2004)
Amazônia brasileira	vários (89)	73,5	-	-	-	-	26,5	-	Viana et al (2005)
Ribeirão Preto	crônicos (50)	41,3	-	-	56,5	-	2,2	-	Rezende et al (2005)
Salvador	crônicos (114)	85,5	1,0	-	-	-	13,5	-	Ribeiro et al (2006)

(*) Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicarágua e Costa Rica.

Num estudo realizado por Arauz-Ruiz et al. (1997) em 5 países da América Central, foi encontrada prevalência dos genótipos A (14,0%), C (1,0%), D (6,0%) e F (79,0%). A presença do genótipo F em alta proporção em todos os grupos estudados sugere predominância do mesmo em populações nativas da América Central.

Na Argentina, Telenta et al. (1997), estudando 12 pacientes crônicos pelo VHB, encontraram uma prevalência de 41,7% do genótipo F, seguida de 33,3% do genótipo A, 16,7% do genótipo D e 8,3% do genótipo B. A presença dos genótipos A e D nesta região sugerem influência da

colonização européia, enquanto que o genótipo B corresponde a portadores imigrantes da Ásia. Já a elevada ocorrência do genótipo F suporta a teoria de que o mesmo é natural de populações nativas do Novo Mundo.

Mbayeb et al. (1998) encontraram num grupo de 22 crianças a predominância dos genótipos A (36%), D (9%) e F (55%) na cidade de Buenos Aires. Em Gualeguay somente o genótipo A foi encontrado.

No Brasil, os estudos são raros e o número de cepas analisadas é pequeno.

Moraes et al. (1996) encontraram os genótipos A, D e F no Rio de Janeiro. Estes mesmos genótipos também foram descritos em populações de Goiânia [A (50,0%), D (46,2%) e F (3,8%)] e Santa Catarina [A (30,6%), D (57,1%) e F (3,8%)] (Carrilho et al, 2001; Teles et al, 1999).

Bertolini et al. (2000) demonstraram em três comunidades indígenas da região Amazônica o predomínio do genótipo F e em uma quarta população 100% pertencia ao genótipo A.

Sitnik et al. (2004) analisaram 103 amostras de pacientes crônicos pelo VHB de diferentes regiões do Brasil. O genótipo A, B, C, D e F foram encontrados nas frequências de 49,5, 2,9, 13,6, 24,3 e 9,7% respectivamente. Os genótipos A, D e F foram encontrados em indivíduos ocidentais, enquanto os genótipos B e C foram prevalentes em indivíduos orientais.

Conde et al. (2004) encontraram uma prevalência de 89,1% do genótipo A, 8,7% do genótipo F e 2,2% do genótipo D ao estudarem 51 pacientes crônicos de AgHBs e VHB-DNA positivos, provenientes da Amazônia Oriental.

Viana et al. (2005), investigando a prevalência dos marcadores das hepatites B e D na Amazônia Brasileira, encontraram predominância dos genótipos A (73,5%) e F (26,5%).

Num estudo conduzido por Rezende et al. (2005), onde avaliou-se a distribuição dos genótipos em 50 indivíduos crônicos para o VHB na cidade de Ribeirão Preto, houve maior frequência dos genótipos D (56,5%) e A (41,3%) seguidos do genótipo F (2,2%).

Ribeiro et al. (2006), avaliando a distribuição de genótipos e subtipos do VHB entre 114 pacientes portadores crônicos do VHB pertencentes ao serviço de Hepatologia da Universidade Federal de Salvador, encontraram prevalência de 85,5% para o genótipo A, 13,5% do genótipo F e 1% do genótipo B. O genótipo D não foi detectado nessa população em contraste com um estudo anterior realizado por este mesmo grupo em pacientes com infecção aguda.

1.4. Mutações

Apesar do diagnóstico sorológico ser bastante sensível e específico, este não detecta casos de Hepatite B mutantes para o AgHBs, cada vez mais frequentes devido a escape ou resistência à vacina, terapias antivirais, imunossupressão dentre outras (Khouri et al, 2004). Mutações têm sido descritas em várias regiões do DNA viral, incluindo o gene de superfície (envelope), o gene X, o gene do core, o gene da polimerase e o gene Pré-core. As principais mutações ocorrem nos genes de superfície e nos genes Pré-core/core, podendo também ser conhecidas como hepatite oculta, uma vez que, os marcadores de infecção ativa (AgHBs) e replicação viral (AgHBe) podem estar negativos (Asahina et al, 1996). Dessa forma, torna-se relevante a suspeita de mutação viral nos casos em que a sorologia para a hepatite B indica imunidade ou ausência de replicação com piora na evolução do quadro clínico, excluindo-se outras causas de hepatites (Khouri et al, 2004).

1.4.1. Mutações na Região Pré-core

Mutações na região Pré-core foram descritas pela primeira vez na Itália, relatando casos onde os pacientes, após a soroconversão AgHBe-anti-HBe, apresentavam altos níveis séricos de DNA viral, acompanhados de aumento persistentes ou intermitentes da ALT sérica (Brunetto et al, 1990).

O AgHBe é considerado um marcador de replicação viral, uma vez que a presença de anticorpos anti-HBe freqüentemente indicam diminuição da produção viral (Castro et al, 2001). A soroconversão AgHBe/anti-HBe normalmente correlaciona-se com evolução benigna da infecção. Entretanto, variantes do VHB têm sido descritas apresentando mutações na região Pré-core que inibem a síntese de AgHBe, apesar de continuar a produzir virions. A mais comum dessas mutações é a substituição de G → A no nucleotídeo (nt) 1896, que impede a produção de AgHBe por introduzir um stop códon prematuro na ORF da região Pré-core (Brunetto et al, 1990; Carman et al, 1989). A região Pré-core também contém um sinal de encapsidação ϵ que é uma estrutura secundária mantida por pontes de hidrogênio entre bases na mesma fita. A presença dessa mutação está restrita a genótipos que apresentam uma timina (T) no nt 1858, como é o caso dos genótipos B, C, D, e E (Castro et al, 2001). O genótipo A geralmente apresenta uma citosina (C) nesta posição (Li et al, 1993), enquanto que o genótipo F pode apresentar um T ou um C (Arauz-Ruiz et al, 1997).

Da mesma forma que os genótipos não são distribuídos de maneira uniforme pelo mundo, as mutações Pré-core têm uma distribuição particular, sendo mais freqüentes em regiões geográficas tais como Ásia e Mediterrâneo, onde os genótipos B, C e D são predominantes e, raras na América do Norte e Europa, onde o genótipo A é comumente encontrado (Lindh et al, 1997; Lindh et al, 1998).

O impacto da mutação pré-core na história natural da hepatite B e, seu papel na patogênese da doença hepática ainda permanece incerto (Rezende et al, 2005). Infecção aguda com mutante Pré-core tem sido associada com alta incidência de hepatite fulminante (Bahn et al, 1995;

Rezende et al, 2005). Na infecção crônica, a emergência da variante Pré-core durante a fase de clareamento imune ou na soroconversão AgHBe/Anti-HBe, pode estar associado com episódios de exarcebação da doença e com baixa resposta ao tratamento comparado com o vírus selvagem (Rizzetto et al, 2000). No entanto, a variante Pré-core tem sido observada também em portadores inativos (Niitsuma et al, 1995; Tur-Kaspa et al, 1992).

Muitos estudos têm associado esta mutação com uma exarcebação dos sintomas clínicos causados pela infecção pelo VHB (Brunetto et al, 1991; Brunetto et al, 1993). Os pacientes com este perfil freqüentemente respondem mal ao tratamento com interferon-alfa; entretanto, não existem dados convincentes de que a presença de variantes da região Pré-core afeta a eficácia da terapêutica em pacientes virêmicos, anti-HBe positivos (Barone, 2002).

Na América do Sul, a freqüência dessa mutação é pouco estudada, mas Castro et al. (2001) encontraram baixa freqüência das mutações Pré-core (7/29 [24%]) em portadores brasileiros e anti-HBe positivos.

No Brasil, a prevalência desta mutação ainda é desconhecida. Num estudo realizado por Pinho et al (1993), o DNA do vírus da hepatite B foi detectado por reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes crônicos e positivos para o anti-HBe, sugerindo que a infecção pela variante mutante pré-core poderia ocorrer em nosso país.

No Estado do Amazonas, Conde et al. (2004), pesquisando a mutação Pré-core A-1896 em 12 indivíduos AgHBe negativos assintomáticos e 14 indivíduos AgHBe negativos sintomáticos, encontraram esta mutação em apenas três indivíduos do grupo assintomático. A baixa prevalência desta mutação (11,5%) já era esperada devido à alta prevalência do genótipo A nos grupos estudados.

Sitnik et al. (2004), analisando 103 amostras de pacientes crônicos do VHB de diferentes regiões do Brasil, encontraram 31,7% de freqüência de mutações na região Pré-core, sendo mais freqüente em pacientes infectados com genótipo D.

No estudo conduzido por Rezende et al. (2005) envolvendo 21 pacientes positivos para o AgHBe e 29 negativos para este marcador, a mutação Pré-core ocorreu em 36% deles, sendo que a frequência dessa mutação foi maior no grupo AgHBe negativo, demonstrando maior prevalência dessa mutação durante a fase tardia de infecção, ou seja, após a soroconversão AgHBe/Anti-HBe.

Outra mutação que pode afetar os indivíduos AgHBs, anti-HBe e VHB-DNA positivos é a mutação do promotor basal do core (BCP), caracterizada pela substituição pontual de adenina (A) por timidina (T) na posição 1762 e guanina (G) por adenina (T) na posição 1764. Estas mutações têm sido associadas com hepatite ativa, doença severa após transplante hepático, desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e hepatite fulminante (Takahashi et al, 1995; Baumert et al, 1996).

1.5. Diagnóstico Laboratorial do VHB

Pelo fato dos sintomas clínicos da infecção pelo VHB serem indistinguíveis das outras formas de hepatites virais, o diagnóstico definitivo é dependente dos testes sorológicos e moleculares para a infecção (Mahoney, 1999).

O desenvolvimento de ensaios sorológicos para a detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) tem desempenhado importante papel no diagnóstico da infecção pelo VHB. Inicialmente a detecção do AgHBs era realizada através de diferentes técnicas, como imunodifusão radial, imunoeletroforese, fixação de complemento, hemaglutinação passiva, radioimunoensaio (RIA) (Blumberg et al, 1965; Coombs et al, 1975; Kingham et al, 1978; Lofgren et al, 1980; De Cock et al, 1987).

Atualmente, a detecção do AgHBs é realizada por ensaios imunoenzimáticos automatizados adequados para “screening” em massa (Bowden, 2006). Em combinação com os outros testes sorológicos para

hepatite B, podem auxiliar na determinação do diagnóstico da infecção aguda ou crônica, bem como infecção passada ou vacinação bem sucedida.

Entretanto, os perfis sorológicos podem, algumas vezes, serem atípicos ou ambíguos. Algumas dessas dificuldades podem ser elucidadas pela pesquisa qualitativa e quantitativa do DNA do VHB, os quais podem revelar o verdadeiro status da infecção pelo VHB no indivíduo infectado (Bowden, 2006).

Todas essas técnicas revelam-se fundamentais não apenas para o diagnóstico, mas também se mostram muito úteis no seguimento da infecção viral, na avaliação do estado clínico do paciente, na pesquisa de mutações no genoma viral e na monitoração de terapêutica específica (Ferreira, 2000; Gonçalves et al, 2002; Bowden, 2006).

1.5.1. Diagnóstico Sorológico

A dinâmica de aparecimento dos marcadores sorológicos varia de acordo com a fase evolutiva da infecção, e podem ser correlacionados com a ocorrência de sinais clínicos (icterícia) e com as elevações dos níveis das aminotransferases séricas (ALT e AST) (Figuras 3 e 4) (Gonçales et al, 2002).

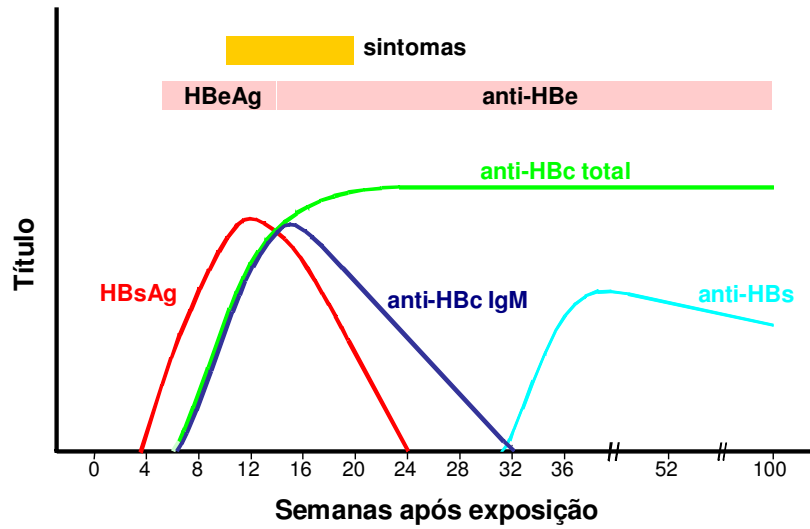


Figura 3. Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na Hepatite B aguda.

Fonte: CDC 1995, modificado.

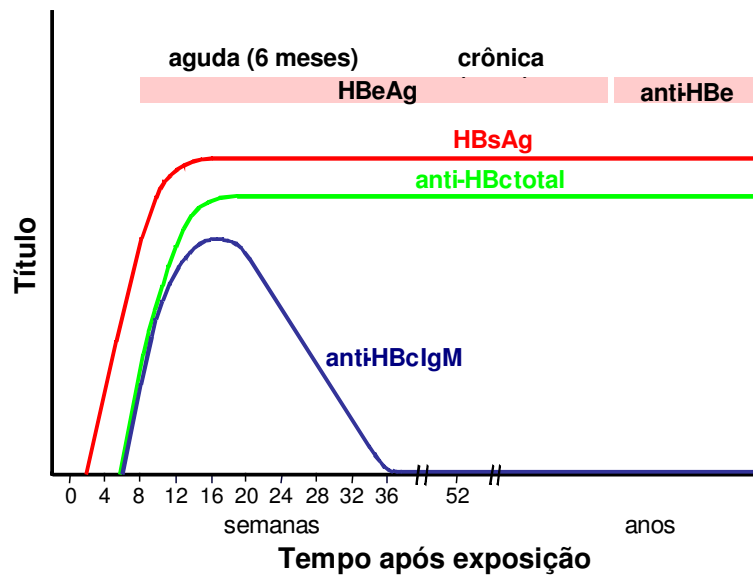


Figura 4. Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite B CRÔNICA.

Fonte: CDC 1995, modificado.

Após o período de incubação, que varia de 40 a 180 dias com média de 60 a 90 dias, e duas a seis semanas antes do aparecimento da icterícia, já podem ser detectados no soro os antígenos AgHBs e AgHBe que indicam a presença do VHB replicante e infectante. O AgHBs é o primeiro marcador a aparecer e sua persistência por mais de seis meses é indicativo de hepatite crônica (Decker, 1998). Na hepatite aguda ele persiste de três a quatro meses após a infecção, desaparecendo nos casos de cura.

O AgHBe é o segundo marcador sorológico a aparecer sendo considerado um marcador de replicação viral e sua presença geralmente está associada com a positividade do DNA viral no soro e com alto risco de transmissão da infecção (Gonçales et al, 2002). Na doença aguda tem duração efêmera, desaparecendo em poucas semanas, dando lugar ao aparecimento do anti-HBe, que indica queda na replicação viral. A persistência do AgHBe por 8 ou 10 semanas após o surgimento dos sintomas pode ser indicativo de evolução para a cronicidade. Seu desaparecimento na fase aguda da doença, sucedido do desaparecimento do AgHBs, é sugestivo de evolução para a cura (Decker, 1998).

Cerca de um mês após o surgimento do AgHBs, surgem anticorpos dirigidos ao antígeno do core do VHB (Hollinger, 2001). Inicialmente surge a fração IgM que representa o primeiro sinal de resposta imune após infecção pelo VHB. Esta fração também pode estar elevada em pacientes com infecção crônica que apresentam períodos de elevações de ALT durante os episódios de reativação da doença (Hollinger, 2001). O anticorpo anti-HBc IgG também está presente na vigência da infecção aguda, quando aumentam seus títulos no soro, permanecendo positivos em valores mais baixos, na maioria dos indivíduos, ao longo da vida. O anti-HBc IgG é um importante marcador de infecção passada, porém não é um anticorpo neutralizante.

Na fase de convalescença ocorrerá aumento progressivo das concentrações do anti-HBs que, associado ao anti-HBc, indica cura da infecção pelo VHB, com o conseqüente desenvolvimento de imunidade para este vírus.

Apesar da melhora no desenvolvimento dos kits de diagnóstico, com aumento importante nos índices de sensibilidade, existe um período chamado “janela imunológica” onde não se detecta o AgHBs no soro e, também ainda não está presente o anti-HBs. Nesta fase, o diagnóstico é evidenciado pela pesquisa de anticorpos anti-HBc, que pode, portanto, ser detectado durante a fase de antigenemia do AgHBs (fase aguda), na fase intermediária (“janela imunológica”) e durante a fase de convalescença e de imunidade, associado ao anti-HBs (Gonçales et al, 2002; Bowden, 2006).

Em indivíduos vacinados contra hepatite B, o anti-HBs é encontrado isoladamente (Gonçales et al, 2002).

O significado da presença dos diferentes marcadores sorológicos dos indivíduos com hepatite B está representado no Quadro 4.

Quadro 4. Infecção pelo VHB: Interpretação do Quadro Sorológico

INTERPRETAÇÃO	AgHBs	anti-HBc	anti-HBc IgM	anti-HBs	anti-HBe	AgHBe
Fase de incubação	+	-	-	-	-	-
Fase aguda	+	+	+	-	-	+
	+	+	+	-	-	-
Final da fase aguda ou Hepatite crônica	+	+	-	-	-	+
	+	+	-	-	+	-
	+	+	-	-	-	-
Fase convalescente	-	+	+	-	-	-
Infecção passada	-	+	-	-	-	-
	-	+	-	+	+	-
	-	+	-	+	-	-
Resposta vacinal	-	-	-	+	-	-

Fonte: Hollinger, 2001; Bowden, 2006, modificado.

1.5.2. Diagnóstico Molecular

A detecção do DNA do VHB é o marcador mais sensível e preciso de replicação e infectividade viral. Diversos testes baseados em hibridização de fase líquida, amplificação do alvo ("Polymerase Chain Reaction"; amplificação por PCR em Tempo Real; amplificação mediada por transcrição) e amplificação do sinal (bDNA) têm sido empregados na detecção e quantificação do DNA do VHB (Germanidis & Pawlotsky, 2002).

A técnica de hibridização molecular tem limite de detecção de 10 a 50 pg/mL. É considerada complexa e, atualmente, restrita a laboratórios de pesquisa. O b-DNA apresenta baixa sensibilidade, podendo detectar títulos de 7×10^5 até 5×10^9 equivalentes de DNA/mL. Com a implementação dos ensaios *in vitro*, surgidos na década de 90, utilizando a técnica da PCR, houve ganho significativo na sensibilidade, tornando possível a detecção de 1 até 10 genomas equivalentes/mL (Mello et al, 2001; Hollinger, 2001). Atualmente, os ensaios baseados na tecnologia da PCR em tempo real, oferecem grande sensibilidade e larga escala de dinâmica linear (Welzel et al, 2006; Lu et al, 2006).

As indicações para a detecção do DNA do VHB incluem a monitoração do tratamento antiviral, com o objetivo de avaliar a resposta virológica completa e sustentada. Durante o tratamento antiviral, as técnicas mais indicadas são as de hibridização de fase líquida ou de branched-DNA, que habitualmente se mostram indetectáveis quando da perda do AgHBe ou da soroconversão AgHBe/anti-HBe e a PCR (Mello et al, 2001).

Outras indicações dizem respeito à definição etiológica de hepatites fulminantes, criptogênicas ou ocultas, decorrentes do VHB. Os ensaios quantitativos do DNA do VHB são importantes na diferenciação das formas de hepatite B crônica, de alta ou baixa replicação viral, especialmente naqueles indivíduos AgHBe negativos, com aminotransferases elevadas (mutantes pré-core), na monitoração da eficiência da terapia antiviral, na identificação do desenvolvimento de resistência a drogas e recaída após terapia descontinuada (Bowden, 2006; Lu et al, 2006).

1.6. Epidemiologia do VHB

A hepatite causada pelo VHB é, ainda nos dias atuais, uma das principais causas de doença hepática no mundo. Estudos epidemiológicos revelam uma forte relação entre a infecção pelo VHB, a cirrose e o carcinoma hepatocelular. Calcula-se que em torno de um milhão de pessoas morrem por complicações da doença hepática a cada ano (Schiff, 2005; CDC, 2006; Davis, 2005). A hepatite crônica causada pelo VHB tem se revelado uma doença complexa, de difícil manejo, em função de, entre outros fatores, peculiaridades na relação vírus-hospedeiro, surgimento de mutantes, heterogeneidade viral e diversidade das formas clínicas (Lok, 2005). Nos Estados Unidos, foi estimado que um indivíduo tem 5% de chance, no decorrer de sua vida, de entrar em contato com o VHB (MMWR, 1999; CDC, 2006)

O VHB é um agente altamente infectante. O vírus é 100 vezes mais infectante do que o HIV e, diferentemente deste, pode resistir até uma semana em superfície seca (Ott et al,1999). É estável em temperaturas próximas de 30°C por pelo menos seis meses e -20°C por 15 anos. A imunogenicidade e a antigenicidade viral são mantidas após a exposição ao éter, ao ácido (pH 2,4 por 6 horas) e ao calor (98°C por 1 minuto, 60°C por 10 horas). O soro perde a infectividade quando sujeito à fervura por 2 minutos ao calor seco (160°C por 1 hora) ou autoclavado a 121°C por 20 minutos. O VHB, em plasma humano seco, é inativado à temperatura ambiente por 10 minutos, pelo hipoclorito de sódio (500 mg/L), ácido isopropil a 70%, glutaraldeído a 0,125% associado a fenol a 0,44, glutaraldeído 2% em pH 8,6 e iodo (75 mg/L) (Perrenoud 1995, Hollinger 2001).

O VHB é transmitido principalmente através de exposição percutânea ou de mucosas aos fluidos corpóreos ou a sangue contaminado. As maiores concentrações de vírus são verificadas no sangue e secreções serosas, diminuindo consideravelmente no sêmen, fluído vaginal e saliva (Kiffer et al, 2002). As principais formas de contágio são: transmissão vertical, relações sexuais, transfusão de sangue ou derivados, uso de drogas endovenosas,

transplante de órgãos ou tecidos, lesões de pele ou acidentes com agulhas, principalmente entre profissionais da área da saúde. A saliva pode ser veículo de transmissão em caso de mordidas, porém não foram documentados casos de transmissão por beijo ou outros tipos de exposição à mesma (Kiffer et al, 2002). Outros fluídos corpóreos, incluindo lágrimas, suor, urina, fezes, líquido e líquido sinovial, podem apresentar o AgHBs, porém não o vírion intacto, razão pela qual não têm sido associados com a transmissão (Focaccia et al, 1998).

Merece destaque a transmissão vertical que, em termos mundiais, representa a principal via de disseminação do VHB nas regiões de altas prevalências (Hollinger, 2001; Arraes et al, 2003). Os neonatos, quando infectados, têm alto risco de desenvolver formas crônicas (90% dos casos), devido à imaturidade do sistema imunológico. A transmissão vertical ocorre predominantemente durante o parto, por meio de contato com sangue, líquido amniótico ou secreções maternas, sendo rara a transmissão via transplacentária, leite materno ou após o nascimento. Os riscos de transmissão vertical aumentam quando se tem alta carga viral materna, altos títulos de AgHBs e a presença do AgHBe, sendo que em mães AgHBe positivas esse risco varia entre 70 a 90%. Entretanto, se a mãe for AgHBe negativa o risco de transmissão diminui para 10 a 40% (Shiraki et al, 2000; Broderick et al, 2003). Além disso, o risco de infecção do concepto após uma hepatite B aguda, autolimitada, ocorrida na gravidez, depende do período gestacional em que a infecção ocorreu. É maior o risco se a mãe se infectar no terceiro trimestre. Neste caso, 80 a 90% dos neonatos serão AgHBs positivos, em comparação com 10% de positivos se ocorrer no primeiro trimestre. Esta cronificação precoce leva a risco de aproximadamente 25% de evolução para cirrose ou hepatocarcinoma (Arraes et al, 2003).

As crianças que não se infectaram ao nascimento permanecem com a possibilidade de adquirir o estado de portador até os cinco anos de idade, isso se a mãe tiver o vírus replicando (Ruiz-Moreno et al, 2002). A partir daí, a transmissão se considera horizontal, ou seja, através de contatos com ambientes diferentes que não o materno, tais como o meio familiar ou

escolar. A importância desse tipo de transmissão vem sendo documentada em regiões de alta prevalência, como o Sudeste Asiático, Oriente Médio e África subsaariana, embora o modo como o contágio ocorre ainda não tenha sido bem esclarecido (Yao, 1996; Broderick et al, 2003). O contato íntimo entre moradores de um mesmo domicílio e o uso comum de objetos pessoais, como escovas de dente, lâminas de barbear são apontados como possíveis veículos de transmissão (Kim et al, 1993; Broderick et al, 2003).

A frequência da infecção pelo VHB e seus padrões de transmissão variam consideravelmente em diferentes partes do mundo, dependendo da taxa de infecção crônica, da proporção de indivíduos com o vírus replicando ativamente e da via predominante de transmissão em cada região (Triki et al, 1997; Mahoney, 1999). Em função dessas características, as distintas regiões do mundo são divididas em áreas de alta, intermediária e baixa endemicidade (Margolis et al, 1991; Evans & London, 1998; Mahoney, 1999) (Figura 5).

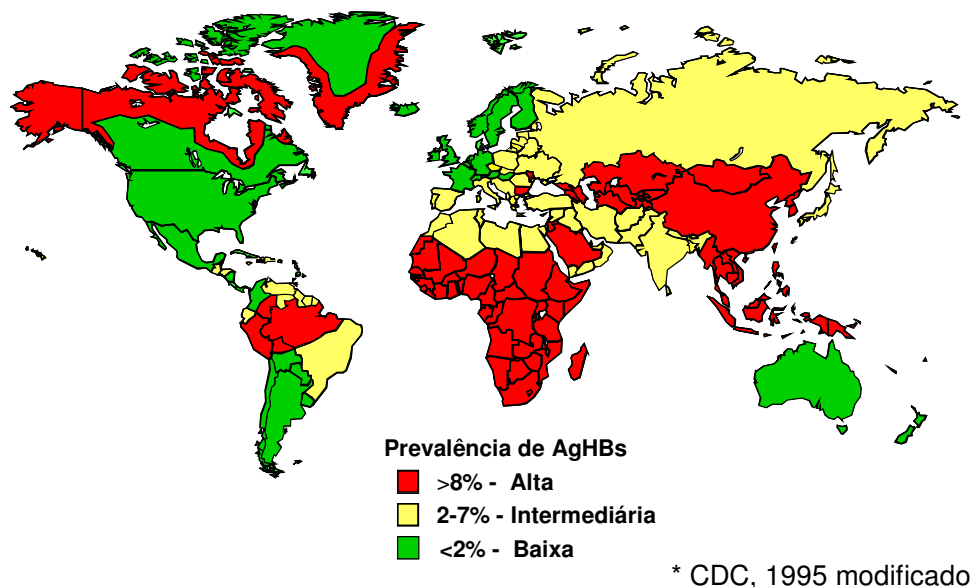


Figura 5 - Distribuição geográfica da infecção pelo VHB

Aproximadamente 45% da população mundial vive em áreas onde a prevalência de infecção crônica pelo VHB é alta (>8% da população é positiva para o AgHBs), 43% vive em áreas onde a prevalência é moderada (2 a 7% da população é positiva para o AgHBs) e 12% vive em áreas de baixa endemicidade (<2% da população é positiva para o AgHBs) (Mahoney, 1999). Em regiões de alta prevalência a transmissão perinatal adquire grande importância, ao passo que, em regiões de baixa prevalência, as transmissões sexual e parenteral assumem maior relevância. Locais com prevalência intermediária apresentam certa mistura de padrões de transmissão, com comportamento epidemiológico variável (Ferreira, 2000; Focaccia et al 1998; Lee, 1997).

Na América Latina, recentes estudos têm mostrado alta soroprevalência do anti-HBc total na República Dominicana (21,4%) e no Brasil (7,9%), seguido por Venezuela (3,2%) e Argentina (2,1%). Baixa endemicidade foi encontrada no México (1,4%) e no Chile (0,6%) (Silveira et al, 1999; Tanaka, 2000).

No Brasil, a infecção pelo VHB é considerada endêmica, com distribuição de menos de 2% na Região Sul, 2 a 7% nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste, até 8% na Amazônia Legal, Estado do Espírito Santo e região oeste do Estado do Paraná. No Brasil a taxa de mortalidade é de 0,6 por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 1999-2000).

O Ministério da Saúde estima que, no Brasil, pelo menos 15% da população já esteve em contato com o VHB e que 1% da população apresenta doença crônica relacionada a este vírus (Ministério da Saúde, 2002).

Os estudos epidemiológicos sobre hepatite B no Brasil são escassos e, em geral, ocuparam-se de grupos populacionais específicos.

A análise de base populacional feita no município de São Paulo por Focaccia et al. (1998) detectou uma prevalência de 5,94% do anti-HBc total e de 1,04% em portadores crônicos (AgHBs positivo). Alta frequência de infecção ativa também foi observada no grupo com idade entre 15-17 anos (3,73%).

A prevalência do anti-HBc total foi estudada por Clemens et al. (2000) em diferentes regiões do Brasil e a soroprevalência geral foi de 7,9%, sendo que para a região Nordeste foi de 1,2%, para Sudeste 5,5%, para Sul 7,2% e para Norte 21,4%. Quando a população estudada foi estratificada por faixa etária, observou-se um aumento significativo da infecção em adolescentes e adultos jovens, com prevalência do anti-HBc quase triplicando, principalmente nas cidades do Rio de Janeiro, Porto Alegre e Fortaleza.

Em São Paulo, um dos trabalhos pioneiros no estudo da hepatite B em crianças abaixo de 12 anos foi conduzido por Oselka et al em 1978. Neste estudo não foi encontrado nenhum caso positivo para o AgHBs em 554 crianças sadias, 1,6% entre crianças em favelas e 4% em crianças institucionalizadas, com retardo mental, sugerindo que crianças com baixo nível sócio-econômico têm risco consideravelmente maior de se tornarem portadores crônicos do VHB.

Barone (1986), estudando 63 indivíduos pertencentes a três famílias orientais provenientes da cidade de São Paulo em relação a marcadores sorológicos do VHB, encontrou uma elevada prevalência do AgHBs (71,43%) na população total, enquanto que a prevalência entre os filhos de portadores de AgHBs foi de 85%, sugerindo forte participação de fatores genéticos envolvidos na capacidade de eliminação do VHB por esta etnia.

Passos et al. (1993) estudaram a população total (de baixa endemicidade) do município de Cássia dos Coqueiros, São Paulo, e encontraram prevalência de anti-HBc total de 2,3% em menores de 5 anos e de 5,2% em menores 10 anos.

Silveira et al. (1999), em estudo multicêntrico que pesquisou a prevalência de anti-HBc total entre amostras populacionais de seis países da América Latina, encontraram uma prevalência de 33,8% entre crianças brasileiras de 1 a 5 anos, e de 8,0% entre as de 6 a 10 anos.

Em um inquérito soro-epidemiológico sobre infecção pelo VHB em um município do médio-Norte do Estado do Mato-Grosso, Souto et al. (2001) encontraram dentre os 217 indivíduos com idade entre dois e 10 anos uma prevalência de 8% de infecção pelo VHB (anti-HBc total positivo) e de 19%

entre os indivíduos com idade variando de 11 a 20 anos. Foi observada também baixa cobertura vacinal neste estudo a partir dos 11 anos de idade (74% de suscetíveis), alertando para a necessidade de um programa de vacinação eficaz para adolescentes nas regiões de baixa e moderada endemicidade.

Motta-Catro et al. (2003), investigando a prevalência de marcadores sorológicos para a hepatite B e fatores de risco em 260 indivíduos provenientes de uma comunidade afro-descendente no Estado do Mato Grosso do Sul, encontraram uma prevalência de infecção (anti-HBc total positivo) de 42,7% e 9,2% de positividade para o AgHBs. Quando a população estudada foi estratificada em 2 grupos: 0-14 anos e 15-79 anos, uma alta prevalência de AgHBs (7,4%) foi encontrada em crianças e adolescentes.

Em uma análise do comportamento intrafamiliar da infecção pelo VHB em 97 casos índices e 258 familiares provenientes do Estado do Amazonas, observou-se elevada proporção de familiares com marcador de infecção pregressa (51,6%) como também indicadores de infecção ativa (12%) para o VHB, e uma alta prevalência entre os irmãos (23,6%), caracterizando a transmissão de caráter horizontal e familiar. Encontrou-se também uma frequência importante entre os irmãos e filhos menores de 15 anos ressaltando a idéia de que nas áreas endêmicas a infecção ocorre frequentemente durante a infância (Brasil et al, 2003).

Assis et al. (2004), estimando a prevalência da infecção pelo VHB e identificando as possíveis vias de infecção em crianças entre três e 9 anos em um município da Amazônia Brasileira, observaram uma prevalência de 11,1% dos marcadores virais, com 1,2% de crianças AgHBs positivas. Em relação à vacinação apenas 10,9% das crianças foram vacinadas, mas nenhuma completou o esquema de três doses possibilitando a livre circulação viral.

Lobato et al. (2006), determinando a prevalência intrafamiliar do vírus da hepatite B na Amazônia Oriental, encontraram uma frequência de 10,4% e 1,9% para o AgHBs entre crianças, com seis meses e 16 anos de idade,

filhos de mães AgHBs positivas e AgHBs negativas respectivamente. Quando essas crianças foram estratificadas por faixa etária, foi observada uma elevada positividade do anti-HBc (66,7%) nas crianças menores de um ano pertencentes ao grupo de mães AgHBs positivas, sugerindo que a transmissão vertical não é a principal via de contaminação.

1.7. Prevenção

As características da transmissão do VHB tornam necessário implantar estratégias complexas de vacinação, para que sejam protegidos tanto recém nascidos quanto adolescentes e adultos. A estratégia utilizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), endossada por praticamente todas as outras organizações oficiais para controlar a infecção pelo VHB, foi à introdução da vacina para todas as crianças ao nascimento (CDC, 2004; Shete et al, 2002).

A experiência da imunização contra a hepatite B tem sido sempre um sucesso nas campanhas de vacinação universal em diferentes países. É bem conhecido que o êxito não é alcançado quando a estratégia se orienta para vacinar somente grupos de risco (Ferreira et al, 2006). Nos Estados Unidos somente após a recomendação da vacinação para todos os recém-nascidos em 1991, e da imunização de rotina para adolescentes de 11 e 12 anos, em 1996, é que foi constatada uma redução substancial na incidência da hepatite B (Davis, 2005).

Desde a implantação dos programas de vacinação contra a hepatite B na América do Norte e países Europeus em 1985, tem se observado redução significativa na endemicidade desta doença.

A OMS recomenda que, em populações com prevalência de infecção crônica acima de 2%, a intervenção seja realizada por meio da vacinação precoce infantil (Chavez et al, 2003). Para regiões com taxa de prevalência inferior, as recomendações da OMS incluem a triagem em gestantes e a imunização ativa de filhos recém-nascidos de mulheres infectadas (Paraná et al, 2005).

No Brasil, a vacinação contra a hepatite B é garantida pelo governo. De fato, desde 1988, programas de vacinação têm sido implementados em áreas endêmicas da Amazônia Ocidental. Fonseca (2002) encontraram resultados satisfatórios desses programas na região Labrea, onde a prevalência do AgHBs decaiu de 20% para 3,5% em 12 anos.

Desde 1998, o Programa Nacional de Imunizações (PNI) recomenda a vacinação universal das crianças contra a hepatite B a partir do nascimento. A aplicação da primeira dose nos primeiros 12-24 horas de vida resulta em elevada eficácia na prevenção da infecção vertical. A partir de 2001, a faixa etária foi ampliada até 19 anos de idade (CVE, 2006).

Nas populações de baixo risco, como na maioria dos estados do Brasil, onde a transmissão primariamente ocorre em indivíduos com mais idade, a imunização dos recém-nascidos é usada para prevenir contaminação no início da vida e subsequente cronificação (Ferreira et al, 2006). Sabe-se que o risco de desenvolver a infecção crônica está inversamente relacionado com a idade (Davis, 2005; Poland, 2005). Com a vacinação das crianças no início da vida, diminui também a contaminação horizontal, tão freqüente nos domicílios onde há portador de VHB. Além disso, quando o esquema vacinal é instituído nessa fase da vida, há maior probabilidade da realização de series completas de vacinação (Petersen et al, 2004).

Não há dúvida que a imunoprofilaxia é o método de maior custo-benefício para controlar globalmente a infecção pelo VHB e suas complicações (Chang, 2004). A imunização passiva, através da imunoglobulina hiperimune (HBIG), provê imunidade temporária, com um custo alto. Por isso, a estratégia mais eficaz tem sido programas de imunização universal para prevenir tanto a transmissão vertical como horizontal da infecção pelo VHB (Ferreira et al, 2006).

As estratégias utilizadas para a imunização universal são constituídas pelos seguintes componentes: prevenção de infecção perinatal, através de triagem de gestantes e de profilaxias pós-exposição dos recém-nascidos de mães AgHBs positivas utilizando vacina e imunoglobulina; vacinação contra

hepatite B de todas as crianças visando prevenir a infecção na infância e em idade mais avançada; vacinação dos adolescentes que não foram protegidos; vacinação de indivíduos com risco acrescido (CVE, 2006; Ferreira et al, 2006).

Essas estratégias dependem tanto das condições epidemiológicas locais (alta ou baixa prevalência do AgHBs em crianças) quanto dos recursos governamentais para implementação da vacinação (Ferreira et al, 2006).

Nos últimos anos, algumas inovações relacionadas às vacinas vem sendo analisadas. Estão sendo testados novas vias de administração (intranasal, transcutânea, aerossol e oral), novos dispositivos (sistema de microagulhas), finalidade do seu uso (profilático ou terapêutico) e época de administração da vacina (Mancini-Bourgine et al, 2004). Patwardahan et al (2005) testaram, recentemente, a vacinação pré-natal em mães pertencentes a populações de alto risco, e os resultados foram encorajadores quando as mães foram vacinadas na 20^a e na 24^a semanas de gestação.

Diante do exposto, percebemos que a infecção pelo VHB na infância representa um desafio, pois as crianças que adquirem o VHB, por transmissão perinatal, têm risco de 90% de desenvolver infecção crônica

Na literatura encontramos diversos trabalhos que tentam elucidar a relação entre os genótipos e a evolução clínica desta infecção, porém estes são ainda escassos e pouco consistentes. Estas dúvidas são mais evidentes no que diz respeito à hepatite B na infância, tendo em vista o número pequeno de pacientes envolvidos nos estudos e na conclusão da relação genótipo e infecção crônica.

Assim, o presente estudo é de extrema importância, uma vez que propõe analisar amostras de soros de crianças e adolescentes portadoras de hepatite B e de seus familiares, identificando os genótipos circulantes e a frequência de cepas mutantes na região Pré-core e no BCP. Estes dados podem auxiliar no entendimento da disseminação deste agente no ambiente familiar, além de colaborar na conduta terapêutica e epidemiológica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

- Caracterizar a infecção pelo VHB em crianças e adolescentes acompanhadas no Instituto da Criança do HC/FMUSP, bem como nos familiares desses pacientes.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar os marcadores sorológicos, caracterizar o genótipo do VHB e a presença de mutações na região Pré-core e no BCP entre os pacientes;
- Identificar possíveis portadores crônicos do VHB e indivíduos suscetíveis no ambiente familiar, discutindo as possíveis vias de transmissão;
- Caracterizar o genótipo do VHB e observar a presença de cepas mutantes entre os familiares (mãe, pai, irmãos e outros).

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. População de Estudo

A população deste estudo foi constituída por 95 crianças e adolescentes, menores de 19 anos que procuraram a Unidade de Hepatologia do Departamento de Pediatria do Instituto da Criança, HC/FMUSP, que apresentavam AgHBs positivo por mais de seis meses e virgens de tratamento. Também foram convidados a participar desse estudo os familiares desses pacientes que moravam no mesmo domicílio.

3.2. Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelos Comitês Científico da Divisão de Biologia Médica (BM nº 04/04), de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) e de Ética do Instituto da Criança, segundo a resolução nº 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos publicada pelo Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde - Brasília (1996) (cópia em anexo).

Vale ressaltar que todas as amostras foram coletadas somente após o preenchimento do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1).

3.3. Amostras

As amostras de sangue dos pacientes e de seus familiares foram colhidas no período de 1999 a 2004. Os soros encontravam-se estocados a -80°C no Instituto da Criança, HC/FMUSP e, no momento da pesquisa, foram enviados para o Laboratório de Hepatites Virais do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz. Duas alíquotas de soro foram armazenadas a -20°C para serem utilizadas nas análises sorológicas e de biologia molecular. As alíquotas restantes foram estocadas a -80°C para realização de algum teste confirmatório, se necessário.

3.4. Sorologia

Os ensaios sorológicos foram realizados no momento da coleta das amostras pelo laboratório Central do Instituto da Criança, e confirmados posteriormente pelo Laboratório de Hepatites Virais do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz. Foram utilizados testes imunoenzimáticos de terceira geração baseados na técnica do ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), empregando-se kits comerciais da marca Diasorin®(Saluggia, Vercelli, Itália).

Em todas as amostras foram pesquisados os marcadores sorológicos AgHBs e anti-HBc total. Os demais marcadores (AgHBe, anti-HBe e anti-HBs) foram determinados seguindo o algoritmo abaixo.

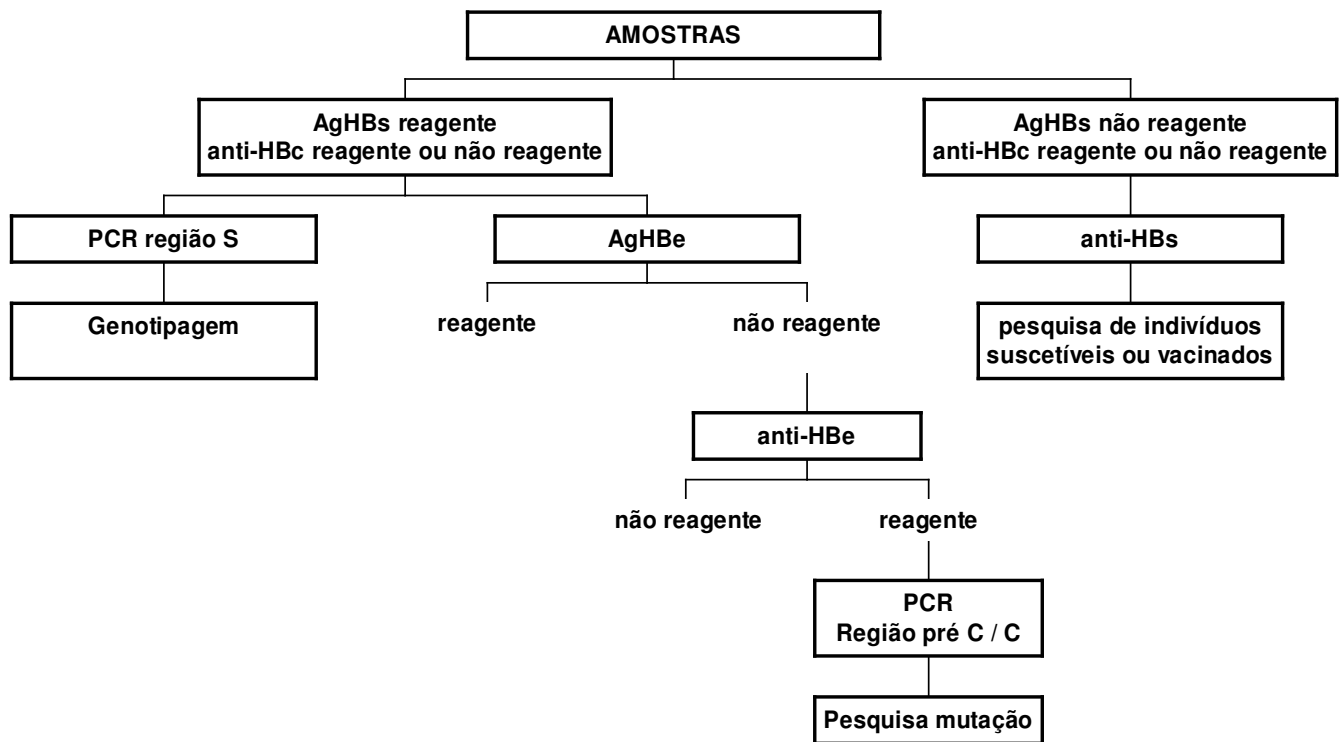


Figura 6. Algoritmo do diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHB

3.5. PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

A PCR foi utilizada para a amplificação das regiões S, Pré-core e Core utilizando-se o método do “nested” PCR descrito por Kaneko et al. (1989a e 1989b) com pequenas modificações (Pinho et al, 1993).

A amplificação da região S foi realizada em todas as amostras de soro que apresentaram resultado positivo para o AgHBs pelo teste de ELISA com objetivo de genotipar o VHB. Nas amostras AgHBs/Anti-HBe positivas e AgHBe negativas foram pesquisadas mutações na região Pré-core e no promotor basal do core (BCP) empregando-se a PCR para região Pré-core e core.

Foram seguidas as normas de controle de qualidade propostas por Kwok & Higuchi (1989) para se evitar contaminações das salas e, conseqüentemente, dos materiais e dos soros manipulados.

3.5.1. Extração do DNA do VHB com solução de isotiocianato de guanidina (GT) e fenol

À 300µL de solução de isotiocianato de guanidina (GT) 5M e fenol equilibrado foram adicionados 200µL de soro e, após agitação, foram adicionados 50µL de clorofórmio gelado, seguido de centrifugação a 12.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 300µL de isopropanol absoluto gelado, agitando-se e centrifugando-se a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Retirou-se todo sobrenadante e adicionou-se 300µL de etanol absoluto gelado. O tubo foi centrifugado novamente a 12.000xg por 10 minutos a 4°C, o precipitado resultante foi seco com o auxílio de bomba de vácuo e, posteriormente, ressuspenso em 50µL de água ultrapura (MilliQ) e armazenado em geladeira por 12 horas para completa eluição do DNA.

3.5.2. “Primers”

Os "primers" externos utilizados nas reações de amplificação da região S foram: HBS1F e HBS1R, e os internos: HBS2F e HBS2R (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil). Estes “primers” foram desenvolvidos por Sitnik et al. (2002) e geraram produtos de 450 pb.

Para a região Pré-core e core utilizaram-se os "primers" externos 2032 e EP1.1 e os "primers" internos 2017 e EP2.1 (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil), os quais foram desenvolvidos por Takahashi et al. (1995) e Kaneko et al. (1989) gerando produtos de 500 pb.

Ambos os "primers" foram diluídos à concentração de 20 μM . Abaixo são apresentadas as seqüências de bases nitrogenadas dos "primers" mencionados.

Região S:

HBS1F: 5` - GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC - 3`

HBS1R: 5` - AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA - 3`

HBS2F: 5` - CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC – 3`

HBS2R: 5` - GCC ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC – 3`

Região Pré-core e core:

EP1.1: 5` - TCA TGG AGA CCA CCG TGA AG - 3`

EP2.1: 5` - CAT AAG AGG ACT CTT GGA CT – 3`

2032R: 5` - CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT - 3`

2017R-B: 5` - ATG GGA TCC CTG GAT GCT GGG TCT TCC AAA -3`

3.5.3. Preparação de Desoxinucleotídeos (dNTPs)

Foram utilizados dNTPs (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil) diluídos em água ultrapura (MilliQ), na concentração de 2,5mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP.

3.5.4. Metodologia da “Nested” PCR

3.5.4.1. Primeira PCR

A cada microtubo, contendo 10µL de DNA viral, obtido após extração com solução de GT e fenol, foram adicionados 90µL da mistura da PCR. Essa mistura da PCR foi constituída por 67,5µL de água ultrapura (MilliQ), 10µL de Tampão 10X (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil), 6µL de dNTPs, 4µL de cloreto de magnésio (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil), 10µL de cada um dos “primers” HBS1F e HBS1R (S) ou 2032 e EP1.1 (Pré-core e core), 0,5µL de Taq DNA polimerase (INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil). Após a adição da mistura da PCR, as amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, em termociclador, com programa específico, os quais estão apresentados nos quadros abaixo.

Quadro 5. Programa utilizado em termociclador para a amplificação da região S do VHB

REGIÃO S (1 ^a e 2 ^a PCR)		
Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	30 segundos
30	94°C	20 segundos
	56°C	20 segundos
	72°C	30 segundos
1	72°C	7 minutos

Quadro 6. Programa utilizado em termociclador para a amplificação da região Pré core e core do VHB

REGIÃO Pré-core e Core (1ª e 2ª PCR)		
Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	60 segundos
35	94°C	60 segundos
	45,5°C	60 segundos
	72°C	90 segundos
1	72°C	7 minutos

3.5.4.2. Segunda PCR (“Nested”)

A cada microtubo contendo 90µL da mistura para a segunda PCR, constituída por: 67,7µL de água ultrapura (MilliQ), 10µL de Tampão 10X (INVITROGEN®), 6µL de dNTPs, 4µL de cloreto de magnésio (INVITROGEN®), 10µL de cada um dos “primers” HBS2F e HBS2R (S) ou 2017 e EP2.1 (Pré-core e core) e 0,3µL de Taq DNA polimerase (INVITROGEN®), foram adicionados 10µL do produto da primeira PCR. Os microtubos foram então levados ao termociclador utilizando programas específicos descritos no item anterior.

3.5.4.3. Identificação do Produto Amplificado

Após a amplificação, o produto obtido pela PCR, foi identificado por eletroforese em gel de agarose 2%, preparado em tampão tris-borato EDTA (TBE 0,5 X) com 0,005% de brometo de etídio. Para isto, foram aplicados 10µL do produto final da PCR misturado com 2µL tampão de corrida, constituído de blue juice 5%, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,1%. Além

do padrão de quantificação (Low DNA Mass Ladder - INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil), foram aplicados no gel controles positivos e negativos. As bandas foram observadas em transiluminador com luz ultravioleta e o gel foi fotografado em Sistema de Captura digital de Imagens (Imagem Acquisition and Analysis Software, UVP, INC. CA, USA). Uma cópia de cada gel foi impressa na impressora Digital Graphic Printer (UP-D890) para registro.

3.6. Sequenciamento

A técnica de sequenciamento foi realizada nas amostras em que foi possível a amplificação das regiões S e Pré-core e core.

A técnica empregada foi a de sequenciamento por PCR, derivada da metodologia de Sanger et al. (1977), utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o “Kit” ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.6.1. Reação de Sequenciamento por “Cycle Sequencing”

A 2µL do DNA purificado e quantificado (3 – 10 ng) foram adicionados 2µL de “primer” HBS2F e HBS2R (S) ou 2017 e EP2.1 (Pré-core e core) em concentração de 1,6 pmol, 4µL da mistura de reação do “Kit” de sequenciamento que contém ddNTPs marcados e as enzimas *AmpliTag* DNA Polimerase FS e *rTth* pirofosfatase, 4µL de tampão Tris-HCl (pH 9,0) e MgCl₂ 5 X e 8,0µL de água ultrapura (MilliQ) para um volume final de 20µL. Em seguida, as amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, em termociclador, com programa específico para a síntese da fita complementar e incorporação dos ddNTPs marcados (25 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos).

3.6.2. Precipitação das Amostras após “Cycle Sequencing”, Denaturação e Aplicação no Gel

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas com isopropanol para a retirada dos ddNTPs marcados não incorporados.

Aos 20µL de reação, foram adicionados 80µL de isopropanol 75%. Os microtubos foram submetidos a forte agitação por 10 segundos e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 12.000xg à temperatura ambiente. Em seguida, foi removido o isopropanol e adicionado 1000µL de etanol 70% ao precipitado. As amostras foram novamente centrifugadas por 20 minutos a 12.000xg à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o etanol foi retirado e as amostras incubadas a 90°C por 3 minutos para a retirada total do etanol.

A cada microtubo contendo as amostras, foram adicionados 5µL de tampão de amostra [5 partes de formamida (Amresco) e 1 parte de “blue dextran” (PE Applied Biosystems®)], homogeneizadas várias vezes, submetidas a forte agitação por 10 segundos, centrifugadas a 12.000xg por 15 segundos e incubadas a 95°C por 5 minutos para desnaturação. Imediatamente após a incubação, as amostras foram colocadas em gelo até a aplicação de 1,5µL no gel de poliacrilamida.

O gel de sequenciamento é constituído por poliacrilamida 5% (Long Ranger™ Gel Solution, FMC) com uréia 6M em tampão TBE 1 X concentrado em placas de 36 cm com 0,5 mm de espessura. O tampão TBE 1X concentrado foi utilizado na eletroforese, realizada no Seqüenciador Automático ABI PrismR 377 (PE Applied Biosystems®).

3.6.3. Análise das Seqüências

A classificação dos genótipos e a pesquisa de mutações na região Pré-core e core foi realizada pela comparação do alinhamento das

seqüências de aminoácidos obtidas com as 54 seqüências já conhecidas dos diferentes genótipos de VHB depositadas no Genbank. Para estas análises foram utilizados os programas EditSeq e Megalign do pacote DNASTar (Lasergene Inc., Madison, WI, EUA). A classificação dos genótipos foi confirmada pela ferramenta Genotyping disponível no site do ncbi (Rozanov et al, 2004).

3.6.4. Interpretação

O genótipo do VHB foi caracterizado como A, B, C, D, E, F ou G. A presença da mutação de adenina para timidina na posição 1762 (A1762T) e guanina para adenina na posição 1764 (G1764A) caracterizam mutação da região do promotor basal do core. Já a presença da mutação de guanina para adenina no nucleotídeo 1896 (G1896A) e de guanina para adenina no nucleotídeo 1899 (G1899A) caracterizam mutação na região pré-core.

4. RESULTADOS

4.1. Crianças e adolescentes com infecção crônica pelo VHB

Das 95 crianças e adolescentes AgHBs positivas, 53 eram do gênero masculino (55,8%) e 42 do gênero feminino (44,2%). A faixa etária variou de 0 a 19 anos, com média de 7,6 anos e desvio padrão de 4,4 (tabela 1).

Tabela 1. Frequência das crianças e adolescentes portadores de infecção crônica pelo VHB acompanhados no Instituto da Criança, HC/FMUSP, segundo faixa etária e marcador sorológico.

Faixa etária (em anos)	N (%)	Masculino n	Feminino n	Anti-HBc total n (%)	AgHBe n(%)	Anti-HBe n (%)*
0 a 4	23 (24,2)	10	13	23 (100,0)	16 (69,5)	7 (30,4)
5 a 9	40 (42,1)	27	13	38 (95,0)	26 (65,0)	14 (35,0)
10 a 14	26 (27,4)	14	12	26 (100,0)	18 (69,2)	6 (23,0)
15 a 19	6 (6,3)	2	4	6 (100,0)	3 (50,0)	3 (50,0)
Total	95 (100,0)	53 (55,8)	42 (44,2)	93 (97,9)	63 (66,3)	30 (93,7)

**O anti-HBe foi pesquisado apenas nas amostras com AgHBe negativo.*

Observando os resultados de sorologia, 66,3% (63/95) apresentaram AgHBe reagente e 2,1% dos pacientes (2/95) não apresentaram anti-HBc total. Das 32 amostras AgHBe negativas, 30 (93,7%) apresentaram resultado positivo para o anti-HBe (tabela 1).

A figura 7 apresenta a distribuição dessas crianças e adolescentes segundo perfil sorológico.

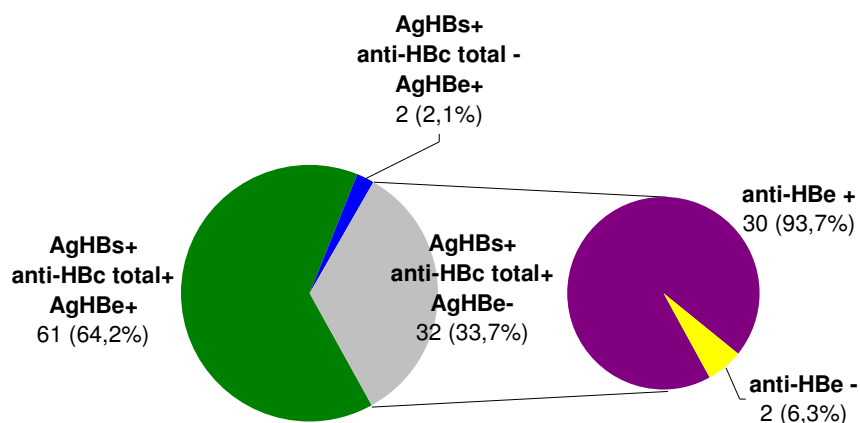


Figura 7. Frequência das crianças e adolescentes portadores de infecção crônica pelo VHB acompanhados no Instituto da Criança, HC/FMUSP, por perfil sorológico.

Das 95 amostras positivas para o AgHBs, foi possível amplificar a região S de 89 (93,7%). A distribuição das crianças e adolescentes por genótipo é apresentada na figura 8.

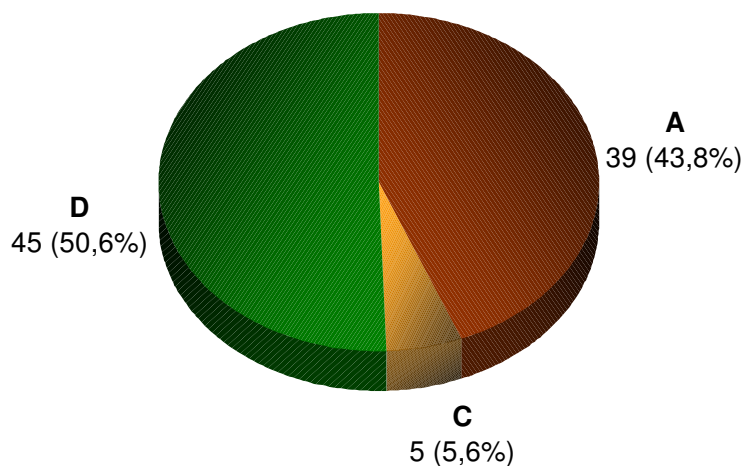


Figura 8. Frequência das crianças e adolescentes do VHB acompanhados no Instituto da Criança, HC/FMUSP, por genótipo.

No total, 30 crianças e adolescentes apresentaram perfil sorológico passível de investigação de mutação, ou seja, AgHBs/Anti-HBe positivos e AgHBe negativo, sendo possível amplificar a região Pré-core e core de 21 amostras (70,0%). Dessas, 13 apresentaram mutação para esta região e 8 não. A distribuição da frequência das mutações encontradas na região Pré-core e no BCP dessas crianças e adolescentes está representada na tabela 2.

Tabela 2. Distribuição das mutações encontradas nas regiões Pré-core e BCP do VHB por criança e adolescente.

Crianças e Adolescentes	Mutações			
	Região Pré-core		BCP	
	G1896A	G1899A	A1762T	G1764A
ICR069			X	X
ICR037			X	X
ICR039			X	X
ICR057			X	X
ICR075	X			
ICR046	X			
ICR005			X	X
ICR192				X
ICR099			X	X
ICR197			X	X
ICR023				X
ICR100				X
ICR081		X	X	X
Total	2	1	8	11

4.2. Famílias

Das 95 crianças e adolescentes envolvidas no estudo, foi possível contatar os familiares de 85 delas, totalizando 118 indivíduos, sendo 58 mães, 28 pais, 25 irmãos e 7 com outro grau de parentesco como tia, avó, primo, filho e marido. A distribuição dos familiares por grau de parentesco, bem como a presença dos marcadores sorológicos é apresentada na tabela 3.

Na tabela 4 os familiares estão agrupados de acordo com o perfil sorológico.

Tabela 3. Freqüência dos familiares por grau de parentesco e por marcador sorológico.

Parentesco	N	Marcadores Sorológicos				
		AgHBs n (%)	Anti-HBc total n (%)	AgHBe n (%)	Anti-HBe n (%)	Anti-HBs n (%)
Mãe	58	30 (51,7)	52 (89,7)	13 (22,4)	16 (29,3)	22 (37,9)
Pai	28	7 (25,0)	22 (78,6)	2 (7,1)	4 (14,3)	15 (53,6)
Irmãos (ãs)	25	1 (4,0)	13 (52,0)	0 (0)	0 (0)	13 (52,0)
Outros	7	2 (28,5)	3 (42,8)	0 (0)	1 (14,3)	2 (28,5)
Total	118	40 (33,9)	90 (76,3)	15 (12,7)	21 (17,8)	52 (44,1)

Tabela 4. Frequência dos familiares por grau de parentesco e por perfil sorológico.

Parentesco	N	Crônico ¹ n (%)	Infecção passada ² n (%)	Suscetível ³ n (%)	Vacinado ⁴ n (%)
Mãe	58	30 (52,7)	22 (37,9)	3 (5,2)	3 (5,2)
Pai	28	7 (25,0)	15 (53,6)	2 (7,4)	4 (14,3)
Irmãos (ãs)	25	1 (4,0)	13 (52,0)	1 (4,0)	10 (40,0)
Outros	7	2 (28,5)	2 (28,5)	1(14,5)	2 (28,5)
Total	118	40 (33,9)	52 (44,0)	7 (6,0)	19 (16,1)

1- AgHBs + por mais de 6 meses;

2- Anti-HBc total +/-Anti-HBs+;

3- AgHBs - /Anti-HBc total -/anti-HBs -;

4- Anti-HBs +.

Das 40 amostras de familiares positivos para o AgHBs, foi possível amplificar a região S do VHB de 27 (67,5%), e assim genotipá-las. Foi observada discordância de genótipo em apenas duas das 61 famílias estudadas, famílias 13 e 46 (anexo 2). A distribuição dos genótipos é representada na figura 9.

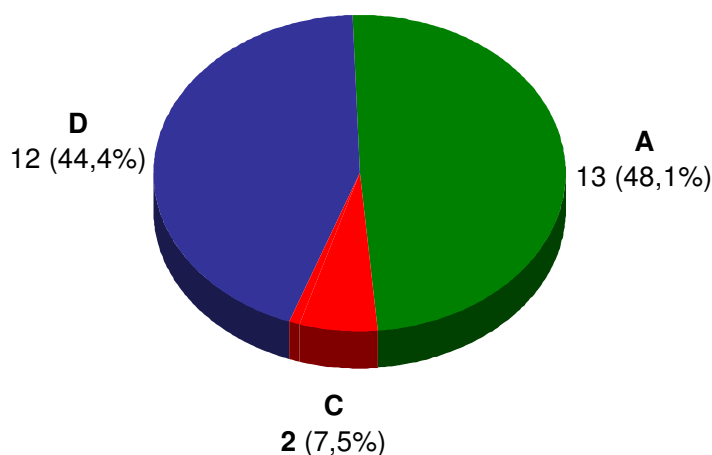


Figura 9. Frequência dos familiares por genótipo do VHB.

Quando analisados os perfis sorológicos dos familiares, observou-se que em 24,6% (15/61) das famílias, todos os indivíduos apresentavam perfil sorológico de portador crônico do VHB (*famílias 1 a 15*). Por outro lado, em 13 (21,3%) famílias foram identificados apenas indivíduos com marcador de contato prévio (*famílias 17 a 29*). Nas famílias 49 e 50 foram identificados indivíduos suscetíveis, enquanto que nas famílias 42, 43, 44 e 45, todos os indivíduos haviam sido vacinados (anexo 2).

Dos 21 familiares que tinham perfil sorológico passível de investigação de mutação, ou seja, AgHBs/Anti-HBe positivos e AgHBe negativo, foi possível amplificar a região Pré-core e core de nove familiares (54,3%). Apenas quatro amostras apresentaram mutação nessa região. A distribuição da frequência das mutações encontradas nas regiões Pré-core e BCP desses familiares está representada na tabela 5.

Tabela 5. Mutações encontradas nas regiões Pré-core e BCP do VHB por familiar.

Familiar	Parentesco	Mutações			
		Região Pré-core		BCP	
		G1896A	G1899A	A1762T	G1764A
ICR200	pai	X		X	X
ICR107	mãe			X	X
ICR102	pai			X	X
ICR054	mãe				X
Total		1	0	3	4

5. DISCUSSÃO

O estudo da Hepatite B em crianças tem importância significativa, uma vez que, 40% das transmissões ocorrem no período neonatal. Crianças nascidas de mães portadoras de AgHBs e AgHBe apresentam maior probabilidade de adquirir a infecção, com cerca de 90% de chance de desenvolver infecção crônica (Broderick, 2003).

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de demonstrar a relação entre os genótipos e a evolução clínica desta infecção, porém estes são ainda escassos e pouco consistentes, principalmente no que diz respeito à hepatite B na infância, devido ao número pequeno de pacientes envolvidos.

Assim, o presente trabalho foi de extrema importância, uma vez que analisou um número grande de amostras de soros de crianças e adolescentes portadoras de hepatite B, além disso, conseguiu assiduidade dos familiares, pois apenas de 10 pacientes não foi possível contatar seus familiares. Nos estudos conduzidos em crianças provenientes da Argentina e Bélgica o número de pacientes envolvidos foi de 22 e 23, respectivamente (Maybed et al, 1998; Liu et al, 2005).

É sabido que a exposição à infecção pelo VHB aumenta com a idade e em indivíduos do sexo masculino. Observando os dados da frequência das crianças e adolescentes AgHBs positivas segundo faixa etária, percebemos que o maior número de crianças com infecção crônica pelo VHB se concentrou na faixa etária entre 0 e 14 anos e apenas 6,3% da população estudada era constituída por adolescentes. Este fato pode estar relacionado com a característica do serviço de saúde que atende, em sua maioria, crianças.

Nos pacientes com infecção crônica pelo VHB o perfil sorológico esperado é AgHBs positivo e anti-HBc total positivo e nosso estudo confirmou isso, pois de toda a nossa casuística apenas duas crianças não apresentaram positividade para o anti-HBc total. Estes resultados foram confirmados pela mesma metodologia em reações e dias diferentes.

Os marcadores AgHBe e anti-HBe foram pesquisados por serem importantes indicadores de replicação viral, além de servirem como ferramenta para a triagem de cepas com possibilidade de apresentarem mutações no gene pré-core do VHB, que na infecção crônica estão relacionadas com os episódios de exacerbação da doença e com baixa resposta ao tratamento (Rizetto et al, 2000). Analisando os resultados do AgHBe observamos que os pacientes com idade entre 0 e 9 anos apresentaram maior positividade, demonstrando maior grau de replicação viral nessa faixa etária comparado com os adolescentes. Com isso percebe-se que houve um declínio gradual na positividade do AgHBe e um crescimento similar na positividade do anti-HBe com a idade. Estes dados estão em concordância com os encontrados na literatura (Chang et al, 1989; Satapathy et al, 2006).

Quando os pacientes foram agrupados de acordo com o perfil sorológico, observamos que 66,3% apresentaram replicação viral ativa e dos 32 restantes, 30 apresentaram soroconversão do AgHBe, nos quais foram pesquisadas as mutações no gene pré-core. A alta positividade do AgHBe pode estar associada ao fato de que, na maioria das crianças com infecção crônica pelo VHB, o vírus selvagem é a cepa dominante durante o curso natural da infecção (Ni et al, 2004b; Chang et al, 2006).

Do total de 118 contatos familiares estudados, 58 eram mães, sendo que 30 eram portadoras crônicas do VHB. Este dado ressalta a importância da triagem sorológica para o VHB durante a gravidez uma vez que os neonatos ao se infectarem verticalmente, têm alto risco de desenvolver formas crônicas chegando a 90% dos casos.

Além disso, dessas 58 mães, 13 apresentaram positividade para o AgHBe, sendo este dado de extrema relevância uma vez que os riscos de transmissão vertical aumentam quando se tem alta carga viral materna, altos títulos de AgHBs e a presença do AgHBe, variando entre 70 a 90% (Broderick et al, 2003).

Em relação aos pais, observamos que dos 28 envolvidos no estudo 22 apresentaram apenas o anti-HBc total positivo, sendo que esses

indivíduos podem ter sido possíveis transmissores do VHB no ambiente familiar. O mesmo ocorreu com os 32 familiares restantes, onde 16 apresentaram esse marcador, indicando a disseminação intrafamiliar do VHB.

Na análise dos perfis sorológicos dos 118 contatos familiares, observamos que uma elevada proporção de indivíduos apresentou marcadores sorológicos de infecção pregressa como também indicadores de infecção crônica para o VHB, sugerindo a presença de circulação viral no ambiente familiar. Estes achados são semelhantes aos descritos por diversos autores (Brasil et al, 2003; Erol et al, 2003; Donganci et al, 2005; Zervou et al, 2005; Takegoshi et al, 2006; Salkic et al, 2007; Ucmak et al, 2007), que discutem a importância da transmissão intrafamiliar do VHB.

Foi observada baixa taxa de vacinação entre os familiares dos portadores crônicos do VHB (19/118). Esse dado é preocupante, pois mesmo com a disponibilidade da vacina na rede pública para todas as crianças ao nascimento, para os adolescentes, para os pacientes em situação de risco acrescido e para os contatos de portadores crônicos, ainda nos deparamos com baixa adesão à vacina principalmente entre os adolescentes (Souto et al, 2001; Ferreira et al, 2006).

Outro ponto a ser ressaltado é a importância da orientação e do encaminhamento dos comunicantes de portadores crônicos aos serviços de saúde, pois como foi observado na família 16 a ICR 77, portadora crônica do VHB, teve um filho, o qual não recebeu a vacina ao nascer se infectando posteriormente. O contrário aconteceu com a família 51 quando da administração da vacina no ICR22, logo após o nascimento, protegendo-o da infecção por este agente.

Diante disso, seria necessário incentivo maior da vacinação por parte dos serviços de saúde, já que a vacina é a ferramenta mais importante e eficaz para a prevenção da hepatite B, possibilitando assim, maior adesão das mães com relação às crianças e dos adolescentes, quando é maior a chance de contaminação.

A frequência de 6,0% (7/118) de indivíduos suscetíveis nas famílias estudadas reforça a hipótese da necessidade de maior conscientização para a importância da vacinação dos comunicantes de portadores crônicos do VHB, uma vez que esse vírus apresenta alta transmissibilidade principalmente no ambiente familiar.

Das 61 famílias analisadas, foi possível investigar os marcadores sorológicos para o VHB tanto do pai quanto da mãe dos pacientes em 21 delas, sendo que três famílias (7, 13 e 47) apresentaram ambos os pais com marcadores de infecção crônica, cinco (21, 22, 28, 57, 59) apresentaram ambos os pais com marcadores de infecção passada, seis (32, 34, 35, 37, 40, 41) apresentaram a mãe com perfil de portador crônico do VHB e o pai com marcador de contato prévio e a família 38 com a situação inversa. Nesses casos percebe-se forte evidência de transmissão intrafamiliar, mas não se consegue definir a fonte de infecção, se horizontal, vertical ou outra, somente com base nos achados sorológicos.

Nas famílias 56 e 60 apenas a mãe apresentou marcadores sorológicos de infecção pregressa, sendo o pai suscetível ou vacinado. Nestes casos provavelmente a via de transmissão foi vertical. O contrário ocorreu nas famílias 54 e 61 onde apenas o pai apresentou marcadores sorológicos positivos, sugerindo a transmissão horizontal como possível via de disseminação do VHB.

A família 55 foi composta por duas famílias morando no mesmo domicílio. A ICR 146 era irmã da ICR 143, ambas portadoras crônicas do VHB, e através de dados do prontuário médico, foi informado que a mãe delas também era portadora do vírus. O marido da ICR 146 (ICR142) apresentava marcadores de infecção passada e os três filhos (ICR147, ICR148 e ICR145) desse casal eram portadores crônicos do VHB. Já o marido da ICR 143 (ICR144) era vacinado e os dois filhos (ICR149 e ICR150) eram portadores crônicos do VHB. Estes dados sugerem que circulação viral no ambiente familiar, entretanto sem definição da via de transmissão.

Nas famílias 49 e 50 foram identificados indivíduos suscetíveis, enquanto que nas famílias 42, 43, 44 e 45, todos os indivíduos haviam sido vacinados e apenas os pacientes eram portadores crônicos do VHB. Após consulta aos prontuários médicos, foi observado que as crianças das famílias 42, 43, 45 e 50 haviam recebido transfusão sangüínea. Este dado é relevante, pois as crianças das famílias 43 e 50 oferecem risco de infectar os demais contatos familiares que ainda permanecem suscetíveis.

Este estudo teve algumas limitações como a falta de aplicação de um questionário epidemiológico com informações sobre os prováveis fatores de risco de infecção do VHB na população estudada, o que poderia auxiliar na determinação das possíveis vias de transmissão viral. Uma outra ferramenta para confirmação da disseminação do vírus no ambiente familiar seria a utilização da genotipagem do VHB e de análises filogenéticas que auxiliariam na identificação de cepas idênticas do VHB entre os indivíduos que dividem o mesmo domicílio.

Na literatura, diversos autores (Dumpis et al, 2001; Zampino et al, 2002; Lin et al, 2005) utilizaram as análises filogenéticas para tentar determinar a contribuição das transmissões vertical e horizontal no ambiente familiar.

A detecção do DNA do VHB por PCR em 93,7% dos pacientes e em 67,5% dos familiares, independente do status AgHBe/Anti-HBe, reforça a hipótese de que a presença de AgHBs circulante se correlaciona com a replicação viral ativa. Os 19 casos em que não foi possível amplificar a região S podem estar associados com a integração do DNA viral no genoma das células hospedeiras, com expressão exclusiva do AgHBs, sem replicação viral ativa, já que esses 19 indivíduos não apresentaram positividade para o AgHBe. Além disso, não se pode descartar também a possibilidade das partículas virais circulantes estarem em concentrações inferiores àquelas detectadas pela PCR (Pinho et al, 1993).

Como esperado, os genótipos prevalentes na população estudada foram os genótipos A e D e estes resultados coincidem com os raros estudos sobre prevalência de genótipos no Brasil. Moraes et al. (1996)

encontraram os genótipos A, D e F no Rio de Janeiro. Estes mesmos genótipos também foram descritos em populações de Goiânia, Santa Catarina e Amazônia (Carrilho et al, 2001; Teles et al, 1999; Conde et al, 2004; Viana et al, 2005).

A presença dos genótipos A e D em nosso meio, sugerem influência de descendentes africanos que ocorreram devido ao período de escravidão, bem como a influência da colonização européia e da forte imigração italiana que ocorreram durante o século XX (Paraná et al, 2005).

Vários estudos têm demonstrado a relação entre os diferentes genótipos e evolução para cronicidade, gravidade da doença hepática, desenvolvimento de hepatocarcinoma, freqüência dos VHB mutantes, resposta ao tratamento da hepatite crônica e do hepatocarcinoma (Kao et al, 2000; Kao et al, 2002; Lee et al, 2003; Schaefer et al, 2005). Entretanto, existem poucos estudos sobre a importância dos diferentes genótipos do VHB na infância (Ni et al, 2004a).

O genótipo C também foi encontrado em nossa população, nas famílias 8, 47 e 52, todas de origem oriental, coincidindo com os estudos que relatam a ocorrência do genótipo C em países Asiáticos (Kao et al, 2002; Chu et al, 2002; Orito et al, 2003). Sitnik et al. (2004) estudando a prevalência dos genótipos do VHB em portadores crônicos de diferentes regiões do Brasil também encontraram o genótipo C em indivíduos de origem oriental.

Foi observada discordância de genótipo entre os indivíduos das famílias 13 e 46, sendo que o sequenciamento dessas amostras discordantes foi confirmado. Na família 13 os pacientes ICR06 e ICR99 apresentaram genótipo A e o pai (ICR200) apresentou genótipo D. Entretanto, não foi possível amplificar a região S da amostra da mãe o que poderia elucidar essa divergência. Na família 46 a divergência entre o genótipo da paciente (ICR12) e da mãe (ICR13) não pode ser elucidada apenas pelas evidências sorológicas, pois o pai era vacinado. Neste caso tanto a mãe quanto à criança podem ter se infectado por fontes distintas e em momentos diferentes.

No estudo conduzido por Lobato et al. (2005), sobre a prevalência intrafamiliar do VHB na Amazônia Oriental, também foi encontrada divergência entre genótipos de indivíduos dentro da mesma família em 6 das 22 famílias estudadas (27,3%).

A procura de mutação na região pré-core nos pacientes AgHBe negativos e AgHBs/Anti-HBe positivos, mostrou que apenas dois pacientes (ICR75 e ICR46) apresentaram somente a mutação G1896A e o ICR81 apresentou mutação tanto na região pré-core (G1899A) quanto no BCP, sendo que todos pertenciam ao genótipo D (tabela 3). Da mesma forma o único familiar que apresentou mutação na região pré-core (ICR200) também pertencia ao genótipo D (tabela 5). Essa baixa prevalência de mutação pré-core era esperada devido à alta prevalência do genótipo A (15/30) nos indivíduos com perfil sorológico passível de investigação de mutação.

A mutação na região pré-core em indivíduos AgHBe negativos tem sido descrita por vários autores (Niitsuma et al, 1995; Mangia et al, 1996; Fujiwara et al, 1998) em uma proporção variável, de 17,6% a 57,2%, de acordo com a região geográfica estudada. Nos locais onde predominam os genótipos B, D ou C, a mutação pré-core é encontrada de 35 a 100% dos casos (Kaspar et al, 1992; Frias et al, 1995; Tu et al, 1997), enquanto que nos países de maior prevalência do genótipo A, essa mutação se situa entre 28,5 a 45,2%, sendo encontrada em indivíduos com outro genótipo diferente do A (Mangia et al, 1996; Lindh et al, 1998; Sitnik et al, 2004).

Em nosso país, a frequência de mutação na região pré-core é pouco estudada, mas alguns autores também encontraram baixa frequência dessa mutação em pacientes AgHBe negativos, devido à alta frequência de indivíduos infectados pelo genótipo A (Castro et al, 2001; Sitnik et al, 2004; Conde et al, 2004; Rezende et al, 2005).

Em crianças, poucos estudos também têm sido realizados sobre a prevalência de mutações na região pré-core. Wintermeyer et al. (2006), investigando a presença de mutações G1896A em 155 crianças européias, encontraram prevalência de 2,2% dessa mutação em crianças AgHBe positivas e 7,7% em crianças anti-HBe positivas, todos pertencentes ao

genótipo D, demonstrando que a variante pré-core não desempenha papel significativo no curso da hepatite B crônica em crianças européias.

No nosso trabalho a mutação na região do BCP foi mais freqüente do que na região pré-core, o que pode estar relacionado ao fato da mutação no BCP estar associada a genótipos que apresentam uma citosina na posição 1858 como é o caso do genótipo A (Kramvis et al, 1999). Estes dados vão de encontro com os raros estudos desenvolvidos no Brasil que também encontraram maior prevalência da mutação na região do BCP em isolados infectados pelo genótipo A (Castro et al, 2001; Sitnik et al, 2004; Conde et al, 2004).

Quando confrontamos os resultados de mutações encontradas nos pacientes e nos familiares observamos que na família 13 ambos pai (ICR200) e paciente (ICR99) apresentaram mutação no BCP embora seus genótipos fossem discordantes. Já na família 32 tanto as pacientes (ICR37 e ICR39) quanto à mãe (ICR107) apresentaram essa mesma mutação e todas pertenciam ao genótipo A.

Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos poucos estudos publicados no Brasil, ou seja, os genótipos A e D foram os mais freqüentes dentre as crianças adolescentes e seus familiares e todos os indivíduos com genótipos C eram de origem oriental. Baixa freqüência de mutações na região pré-core e core foram encontradas devido à alta freqüência de genótipo A na população estudada. Observou-se ainda elevado índice de indivíduos suscetíveis, confirmando que medidas de prevenção e controle da infecção pelo VHB devem sempre ser incentivadas, especialmente para pessoas que dividem o mesmo ambiente domiciliar, tendo em vista o alto grau de propagação deste vírus.

6. CONCLUSÕES

1. Os genótipos prevalentes entre as crianças e adolescentes foram os genótipos D (50,6%) e A (43,8%) seguido do genótipo C (5,6%), este último observado entre famílias orientais.
2. Dos pacientes com perfil sorológico sugestivo de mutação, 11 apresentaram mutação na região do BCP e três na região Pré-core, sendo esses últimos pertencentes ao genótipo D.
3. Foi encontrada a frequência de 33,9% (40/118) de contatos familiares portadores de infecção pelo VHB, 44,0% (52/118) de indivíduos com marcador de contato prévio e 6,0% (7/118) de indivíduos suscetíveis nas famílias estudadas.
4. Dentre os familiares, os genótipos A (48,1%) e D (44,4%) foram também os mais frequentes.
5. Do total de familiares com perfil sorológico sugestivo de mutação, apenas um familiar apresentou mutação na região Pré-core e três apresentaram mutação na região BCP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asahina Y, Enomoto N, Ogura Y, Kurosaki M, Sakuma I, Izumi N et al. Sequential changes in full-length genomes of hepatitis B virus accompanying acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1996; 25(6): 787-94.

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

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

Arraes LC, Sampaio AS, Barreto S, Guilherme MSA, Lorenzato F. Prevalência de hepatite B em parturientes e perfil sorológico perinatal. *RBGO* 2003; 25(8): 571-6.

Assis SB, Valente JG, Fontes CJF, Gaspar AMC, Souto FJD. Prevalência de marcadores do vírus da hepatite B em crianças de 3 a 9 anos em um município da Amazônia brasileira. *Rev Panam Salud Publica* 2004; 15(1): 26-34.

Bahn A, Hilbert K, Martiné U, Westedt J, Weizsäcker FV, Wirth S. Selection of a precore mutant after vertical transmission of different hepatitis B virus variants is correlated with fulminant hepatitis B in infants. *J Med Virol* 1995; 47: 336-41.

Bancroft WH, Mundon FK, Wirth S. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* 1972; 109: 842-8.

Barone AA. Prevalência do estado de portador e de formas graves de hepatite por vírus B em três famílias de pacientes de origem oriental [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1986.

Barone AA. Mutantes do HBV. Significado clínico e abordagem terapêutica. In: Focaccia R. Tratado de hepatites Virais. São Paulo, Atheneu; 2002. p.151-3.

Bartholomeusz A, Groenem IC et al. Clinical experience with famciclovir against hepatitis B virus. *Intervirol* 1997; 40(5-6): 337-42.

Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004; 14: 3-16.

Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* 1996; 98: 2268-76.

Bertolini DA, Moreira RC, Soares M, Bensabath G, Lemos MF, Mello IMVCG, Pinho JRR. Genotyping of hepatitis B virus in indigenous populations from Amazon region, Brazil. *Reviews & Research* 2000; 5 (suppl 1): 101.

Blitz L, Pujol F, Sweonson P, Porto L, Atencio R, Araújo M, et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strain of genotype F in ameridians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 648-51.

Blumberg B.S, Alter HJ, and Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191(7): 541-6.

Bowden S. Serological and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis* 2006; 26(2): 97-103.

Bowyer SM, van Staden L, Kew MC, Sim JG. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *J Gen Virol* 1997; 78: 1719-29.

Brasil LM, Fonseca JCF, Souza RB, Braga WSM, Toledo LM. Prevalência de marcadores para o vírus da hepatite B em contatos domiciliares no Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36 (5): 565-70.

Broderick AL, Jonas MM. Hepatitis B in children. *Semin Liver Dis* 2003; 23(1): 59-68.

Brunetto MR, Stemler M, Bonino F, Schodel F, Olivieri F, Rizetto M et al. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990; 10: 258-61.

Brunetto MR, Giarin MM, Olivieri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfarano A et al. Wilde-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4186-90.

Brunetto MR, Giarin MM, Saracco G, Olivieri F, Calvo P, Capra G et al. Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1993; 105: 845-50.

Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A et al. Mutations preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2(8663): 588-91.

Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336 (8711): 325-9.

Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Moreira RC, Bertolini DA, Mello IM et al. Hepatitis B virus infection in haemodialysis centers from Santa Catarina State, Southern Brazil: predictive factors for infection and molecular epidemiology. *Hepatology* 2001; 34(Pt.4): 612A.

Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, Gomez H, Carthym MC, Watts DM, Hyams KC, Gerin JL. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) co infection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis* 1996; 147(5): 920-6.

Casey J. Hepatitis D virus. In: Schiff E, Hoofnagle JH (Editors). Update on Viral Hepatitis. AASLD Postgraduate Course 2000. pp: 83-87.

Castro I, Niel C, Gomes SA. Low frequency of mutations in the core promoter and precore regions of hepatitis B virus in anti-HBe positive Brazilians carriers. *BMC Microbiology* 2001; 1:10-18.

Cattaneo R, Will H, Hernandez N, Schaller H. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* 1983; 305 (5932): 336-8.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis Branch Slides Set. [online] last rev. 1995. available from <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset> [2007 january 24].

[CDC] Center for Disease Control and Prevention. Hepatitis surveillance report no. 59. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2004. <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/resource/>, Acesso: 08/02/2006.

[CDC] Center for Disease Control and Prevention. Hepatitis B. In: Atkinson W, Hamborsky J, Wolfe C, editors. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases*. 8th ed. Washington: Public Health Foundation; 2004. p. 191-212.

Chang MH, Sung JL, Lee CY, Chen JS, Hsu HY, Lee PI, Chen DS. Factors affecting the clearance of hepatitis B e antigen in hepatitis surface antigen carrier children. *J Pediatr* 1989; 115:385–390.

Chang MH. New insights in hepatitis B virus infection. In *Semin Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 12: 9-14.

Chang MH. Hepatitis B virus mutation in children. *Indian J Pediatr* [serial online] 2006 [cited 2006 oct23]; 73: 803-7.

Chavez JH, Campana SG, Haas P. An overview of hepatitis b in Brazil and the State of Santa Catarina. *Rev Pan Salud Publica* 2003; 14: 91-6.

Chu, C.J.; Hussain, M.; Lok, A.S. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002; 122(7): 1756-62.

Chu CJ, Kuffer EB, Han SH et al. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003; 125: 444-51.

Clemens SAC, Fonseca JC, Azevedo T, Cavalcanti A, Silveira TR, Castilho MC et al. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33 (1): 1-10.

Conde SRSS, Mória LJP, Barbosa MSB, Amaral ISA, Miranda ECBM, Soares MCP et al. Prevalência de genótipos e de mutantes pré-core A1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica, em uma população da Amazônia oriental. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37 (suppl II): 33-9.

Cooskley WG, Powell LW, Mstilis SP, Mackay IR, Barker LF. Hepatitis B antigen and antibody in active chronic hepatitis and other liver diseases in Australia. A multicenter collaborative study. *Am J Dig Dis* 1975; 20(2): 110-4.

Couroucé-Pauty AM, Drouet J, Muller JY. HBs antigen genotypes. *Bibl. Haematol* 1976; 42: 89-127.

Couroucé-Pauty AM, Lemaire JTM et al. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. *Vox Sang* 1978; 35(5): 304-8.

Couroucé-Pauty AM, Falcon A, Soulier JP. Distribution of HbsAg subtypes in the world. *Vox Sang* 1983; 44: 197-211.

[CVE] Centro de Vigilância Epidemiológica. Vacina contra a Hepatite B, São Paulo, 2006.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen- associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1(7649): 695-8.

Davis JP. Experience with hepatitis A and B vaccines. *Am J Med* 2005; 118 (suppl 10A): 7S-15S.

Decker RH. Diagnosis of acute and chronic hepatitis B. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, editors. *Viral hepatitis: Scientific basis and clinical management*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998. p. 201-15.

De Cock KM, Aschcavai M, Govindarajan S, Redeker AG. Evaluation of anti-HBc IgM estimation by radioimmunoassay for anti-HBc on column separated IgM. *Ann Clin Lab Sci* 1987; 17(1): 27-31.

Doganci T, Uysal G, Kir T, Bakirtas A, Kuyucu N, Doganci L. Horizontal transmission of hepatitis B virus in children with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11(3): 418-20.

Dumpis U, Holmes EC, Mendy M, Hill A, Thursz M, Hall A et al. Transmission of hepatitis B virus infection in Gambian families revealed by phylogenetic analysis. *J Hepatol* 2001; 35: 99-104.

Evans AA, London WT. Epidemiology of hepatitis B. In: Zuckerman *Viral Hepatitis: Scientific basis and clinical management*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998. p. 107-14.

Erol S, Ozkurt Z, Ertek M, Tasyaran A. Intrafamilial transmission of hepatitis B virus in the eastern Anatolian region of Turkey. *Euro J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 345-9.

Ferreira MS. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33 (4): 389-400.

Ferreira CT, Silveira TR. Viral hepatitis prevention by immunization. *J Pediatr (Rio J)* 2006; 82: (3 Suppl): S55-S66.

Focaccia R, Conceição OJG, et al. Estimated prevalence of viral hepatitis on the general population of the municipality of Sao Paulo, measured by plasmatic markers through samples collect from stratified, randomized an residence-based population survey. *Braz. J Infect Dis* 1998; 2: 268-83.

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

Frias FR, Buti M, Jardí R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, Guardia J. Hepatitis B vírus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995; 22: 1641-7.

Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Chuang WL, Imezaki F, Saisho H, Omata M. The two different states of hepatitis B virus DNA in a symptomatic carriers HBe-antigen-positive versus anti-HBe-positive a symptomatic carriers. *Digestive Diseases and Sciences* 1998; 43: 368-76.

Ganem D, Schneider RJ. Hepadnaviridae and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001. p. 2703-2737.

Germanidis G, Pawlotsky JM. In: Focaccia R. *Tratado de hepatites Virais*. São Paulo, Atheneu; 2002. p.175-87.

Glebe D. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 82-90.

Gomes SA. *Genoma Viral*. In: Focaccia R. *Tratado de hepatites Virais*. São Paulo, Atheneu; 2002. p. 119-25.

Gonçales Junior FL, Gonçalves NDSL. *Imunodiagnóstico*. In: Focaccia R. *Tratado de hepatites Virais*. São Paulo, Atheneu; 2002. p-167-72.

Guo WT, Wang J, Tam G, Yen TS, Ou JS. Leaky transcription termination produces larger and smaller than genome size hepatitis B virus X gene transcripts. *Virology* 1991; 181 (2): 630-6.

Hollinger FB. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick, JL, Monath, TP, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2001. p.2971-3036.

Huy TT, Ushijima H, Quang VX et al. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 2004; 85: 283-92.

Kao, J.H.; Chen, P.J.; Lai, M.Y. et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-9.

Kao, J.H. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristic. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(6): 643-50.

Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol* 1989a; 27(9): 1930-3.

Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N, Purcell RH. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989b; 86(1),312-6.

Kaspar RT, Klein A, Aharonson S. Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of disease severity. *Hepatology* 1992; 16: 13338-42.

Khoury MEI, Santos VA. Hepatitis B: epidemiological, immunological and serological considerations emphasizing mutation. *Rev Hosp Fac Med S Paulo* 2004; 59(4): 216-24.

Kiffer CRV, Viana GB, Cheinquer H. Epidemiologia. In: Focaccia R. *Tratado de hepatites Virais*. São Paulo, Atheneu; 2002. 127-32.

Kim YS, Ahn Y. Factors associated with intrafamilial transmission of hepatitis B virus in Korea. *J Korean Med Sci* 1993; 8(6): 395-404.

Kimbi G, Kramvis A, Kew MC. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *J Gen Virol* 2004; 85: 1211-20.

Kingham JGC, McGuire M, Paine DHD, Wright R. Hepatitis B in a hospital for the mentally subnormal in southern England. *British Medical Journal* 1978; 26: 594-6.

Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepatitis* 1999; 6: 415-27.

Kramvis A, Weitzmann L, Owiredo WK, Kew MC. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 2002; 83: 835-9.

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

Krugman S, Gocke DJ. Viral hepatitis. Vol. XV in the series *Major Problems in Internal Medicine*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1978.

Kwok S, Higushi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339:237-8.

Le Bouvier G. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis* 1971; 123: 671-5.

Lee W. Hepatitis virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-45.

Lee CM, Chen CH, Lu SN et al. Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38(1): 95-101.

Li JS, Tong SP, Wen YM, Vitvitski L, Zhang Q, Trepo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an anti-HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* 1993; 76: 5402-10.

Liang TJ. The molecular virology of hepatitis B virus. In: Schiff E, Hoofnagle JH (Editors). *Update on Viral Hepatitis. AASLD Postgraduate Course 2000.* p. 78-82.

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

Lin CL, Kao JH, Chen BF, Lai MY, Chen DS. Application of hepatitis B virus genotyping and phylogenetic analysis in intrafamilial transmission of hepatitis B virus. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1576-81.

Lindh M, Anderson AS, Gusdal A. Genotypes, n1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus: large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175: 1285-93.

Lindh M, Gonzales JL, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 1998; 72: 163-74.

Liu HF, Sokal E, Goubau P. Wide variety of genotypes and geographic origins of hepatitis B virus in Belgian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 32(3): 274-7.

Lobato C, Tavares-Neto J, Leite MR, Trepo C, Vitvitski L, Parvaz P et al. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. *Hepatology* 2006; 21: 863-8.

Lofgren B, Norfenfelt E. Evaluation of a new radioimmunoassay for detecting hepatitis B e antigen and its antibody. *J Med Virol* 1980; 5(4): 323-30.

Lok ASF, Chan HLY. Viral hepatitis B and D. In: O'Grady, J.C., Lake JR, Howdle PD (Editors). *Comprehensive Clinical Hepatology*. Hartcourt publishers limited, London, UK, 2000.

Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *AASLD Practice Guidelines* 2003; p. 1-25.

Lok AS. The maze treatments for hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2743-6.

Lu YQ, Han JX, Qi P, Xu W, Zu YH, Zhu B. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using efficient TaqMan probe and extraction of virus DNA. *World J Gastroenterol* 2006; 12(45): 7365-70.

Lurman A. Eine icterus Epidemic. *Berlin Klin. Wochensehr* 1855; 22: 20-3.

Mac Callum FO, Bauer DJ. Homologous serum hepatitis. *Lancet* ii 1947; 691-2.

Machado DJB. Tratamento da hepatite crônica B com lamivudina em transplantados renais [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.

Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 351-66.

Mancini-Bourgine M, Fontaine H, Scott-Algara D, Pol S, Brechot C, Michel ML. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Hepatology* 2004; 40: 874-82.

Mangia A, Chung YH, Hoofnalge JH, Birkenmeyer L, Mushawar I, Di Bisceglie A. Pathogenesis of chronic liver disease in patients with chronic hepatitis B virus infection without serum HbeAg. *Digestive Diseases and Sciences* 1996; 41: 2447-52.

Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 84-92.

Mbayed VA, Lopez JL, Telenta PFS, Palacios G, Badia L, Ferro A et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. *J Clin Microbiol* 1998; 3362-5.

Mbayed VA, Barbini I, Lopez JL, Campos RH. Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus (HBV) genotype F including Argentine isolates. *Arch Virol* 2001; 146: 1803-10.

Mello CEB, Mendes CGF, Pernambuco CD. Diagnóstico imunossorológico das Hepatites virais. In: *Gastroenterologia Hepatites*. José Galvão Alves. 1ªed. Editora Rubio. 2001. p: 13-42.

Memorandum prepared by Medical Officers of the Ministry of Health. Homologous serum jaundice. *Lancet* 1943;1:83–88.

Mimms L. Hepatitis B virus escape mutants: "pushing the envelope" of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1995; 21 (3): 884-7.

Ministério da Saúde - Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, 1999-2000.

Ministério da Saúde – Programa Nacional de hepatites Virais. Avaliação da assistência as hepatites virais no Brasil. Brasília; 1-61; 2002.

Motta-Castro ARC, Yoshida CFT, Lemos ERS, Oliveira JM, Cunha RV, Ximenes LLL et al. Seroprevalence of hepatitis B virus infection among an afro-descendant community in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98 (1): 13-7.

Moraes MT, Gomes AS, Niel C. Sequence analysis of the pre-S/S gene of hepatitis B virus strains genotypes A, D and F isolated in Brazil. Arch Virol 1996; 114: 1767-73.

Ni YH, Chang MH, Wang KJ, Hsu HY, Chen HL, Kao JH et al. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2004a; 127: 1733-8.

Ni YH, Chang MH, Hsu HY, Tsuei DJ. Longitudinal study on mutation profiles of core promoter and precore regions of the Hepatitis B virus genome in children. Pediatric Research 2004b; 56(3): 396-9.

Niitsuma H, Ishii M, Saito Y, Miura M, Kobayashi K, Hitoshi O, et al. Prevalence of precore-defective mutant of hepatitis B virus in HBV carriers. J Med Virol 1995; 46: 397-402.

Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnius LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. J Gen Virol 1992; 73: 1201-8.

Norder H, Hammas B, Lee SD et al. Genetic relatedness of hepatitis B viral strain of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. J. Gen. Virol 1993; 74: 1341-8.

Norder H, Arauz-Ruiz P, Blitz L, Pujol FH, Echevarria JM, Magnusius LO. The T (1858) variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of the two major genotype F hepatitis B virus clades. *J Gen Virol* 2003; 84: 2083-7.

Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 1987; 61: 3030-4.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69: 2575-83.

Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang* 1968; 15 (5): 374-85.

Oon CJ, Lim GK, Ye Z, Goh KT, Tan KL, Yo SL et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variants in Singapore. *Vaccine* 1995; 13 (8): 699-702.

Orito E, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirol* 2003; 46(6): 408-12.

Oselka GW, Kiss MHB. Estudos sobre prevalência do antígeno da hepatite B (AgHB) em crianças, em São Paulo. *Rev Hosp Fac Med S Paulo* 1978; 33 (3): 149-57.

Ott MJ, Arruda M. Hepatitis B vaccine. *J Pediatr Health Care* 1999; 13: 211-6.

Passos ADC, Gomes UA, Figueiredo JFC, Nascimento MMP, Oliveira JM, Gaspar AMC et al. Influência da migração na prevalência de marcadores sorológicos de hepatite B em comunidade rural. 1- Análise da prevalência segundo local de nascimento. Rev Saúde Pública 1993; 27(1): 30-5.

Patwardahan A, Jamjute P. Foetal immunoprophylaxis with hepatitis B vaccine could be a cost-effective approach towards eradication in the high-risk population: PH2-02. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40: 678.

Paraná R, Almeida D. HBV epidemiology in Latin América. J Clin Virol 2005; S130-S133.

Perrenoud BAF. Mortes por hepatite viral aguda grave no município de São Paulo: subsídio à vigilância epidemiológica. [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Publica da USP; 1995.

Petersen KM, Bulkow LR, McMahon BJ, Zanis C, Getty M, Peters H, et al. Duration of hepatitis B immunity I low risk children receiving hepatitis B vaccination from birth. Pediatr Infect Dis J 2004; 23: 650-5.

Pinho JRR, Santos CA, Gonzales CLM, Bassit L, Barreto CC, Sáez-Alquezar H et al. Detection of hepatitis B virus DNA by the polymerase chain reaction in anti-HBe positive chronic hepatitis B patients. Rev Inst Trop São Paulo 1993; 35(6): 515-20.

Poland GA. Evaluating existing recommendations for hepatitis A and B vaccination. Am J Med 2005; 118 (suppl 10A): 16S-20S.

Prevention of hepatitis A through active and passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 1999; 48(RR-12): 1-37.

Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc Natl Acad Sci U S A 1968; 60 (3): 814-21.

Ranger-Rogez S, Denis F. Hepatitis B mother to child transmission. Exprt Rev. Anti-infective Ther 2004; 2(1): 133-45.

Rezende REF, Fonseca BAL, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Pinho JRR, Bertolini DA, Martinelli ALC. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. J Clin Virol 2005; 32: 53-9.

Ribeiro NCR, Campos GS, Angelo ALD, Braga EL, Santana N, Gomes MMS, Pinho JRR, De Carvalho WA, Lyra LGC, Lyra AC. Distribution of hepatitis B vírus genotypes among patients with chronic infection. Liver International 2006; 26: 636-42.

Rizzetto M, Volpes R, Smedile A. Response of precore mutant chronic hepatitis B infection to lamivudine. J Med Virol 2000; 61: 398-402.

Rozanov M, Plikat U, Chappey C, Kochergin A, Tatusova T. A web-based genotyping resource for viral sequences. Nucleic Acids Research 2004; 32 (W654-W659).

Ruiz-Moreno M, Leal A, Millán A. HBV e Gravidez. In: Focaccia R. Tratado de hepatites Virais. São Paulo, Atheneu; 2002. p-155-65.

Salkic NN, Zildzic M, Muminhodzic K, Pavlovic-Calic N, Zerem E, Ahmetagic S et al. Intrafamilial transmission of hepatitis b in Tuzla region of Bosnia and Herzegovina. Eur J Gastroenterol Hepatol 2007; 19: 113-8.

Sanger F, Nichlen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 1977; 74:5463-5.

Satapathy SK, Garg S, Chauhan R, Malhotra V, Sakhuja P, Sharma BC et al. Profile of chronic hepatitis b virus in children in India: experience with 116 children. *Hepatology* 2006; 21: 1170-6.

Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepatitis* 2005; 12: 111-24.

Shete PB, Daum RS. Real versus theoretical: assessing the risks and benefits of post partum the hepatitis B vaccine birth dose. *Pediatrics* 2002; 109: 701-3.

Schiff ER. Introduction. *Am J Med* 2005; 118 (suppl 10A): 1S-6S.

Shiraki K. Perinatal transmission of hepatitis B virus and its prevention. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 (suppl): E11-5.

Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83 (3): 566-70.

Silva, L.C. Conceito, tipos de hepatites por vírus e evolução dos conhecimentos. In: Silva LC. *Hepatites agudas e crônicas*. 2ª ed. São Paulo: Savier; 1995. p.1-8.

Silveira TR, Da Fonseca JC et al. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. *Rev Panam Salud Publica* 1999; 6(6): 378-83.

Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6): 2455-60.

Sitnik R. Padronização de reações de sequenciamento para caracterização do vírus da hepatite B: genótipos, subtipos, mutantes na região pré-core, promotor basal do core, epitopo "a" e resistência aos antivirais. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Souto, FJD, Santo GAE, Philippi JC, Pietro BRC, Azevedo RB, Gaspar AMC. Prevalência e fatores associados a marcadores do vírus da hepatite B em população rural do Brasil central. Rev Panam Salud Publica 2001; 10 (6): 388-94.

Stuyler L, De Genddt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. J. Gen. Virol 2000; 81: 67-74.

Sugauchi F, Orito E, Ichida T et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. J Virol 2002; 76: 5985-92.

Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA et al. Epidemiological and sequence differences between two genotypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. J Gen Virol 2004b; 85: 811-820.

Sugauchi F, Kumada H, Sakugawa H et al. Two subgenotypes of genotype B (Ba and Bj) of hepatitis B virus in Japan. Clin Infect Dis 2004a; 38: 1222-8.

Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K et al. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. J Gen Virol 1995; 76 (12): 3159-64.

Takegoshi K, Zhang W. Hepatitis B virus infections in families in which the mothers are negative but the fathers are positive for HBsAg. *Hepatology Research* 2006; 36: 75-7.

Tanaka J. Hepatitis B epidemiology in Latin America. *Vaccine* 2000; 18 (suppl I): S17-S19.

Telenta PFS, Poggio GP, Lopez JL, Gonzales J, Lemberg A, Campos RH. Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol* 1997; 187:3-5.

Teles SA, Martins RM, Vanderborght B, Stuyer L, Gaspar AM and Yoshida CF. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. *Artif Organs* 1999; 23: 1074-8.

Tiollais P, Pourcel C, Ejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317(6037): 489-95.

Treinin M, Laub O. Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol Cell Biol* 1987; 7 (1): 545-8.

Triki H, Said N, Ben Salah A, Arrouji A, Ben Ahmed F, Bouguerra A, Hmida S, Dhahri R, Dellagi K. Seroepidemiology of hepatitis B, C and delta viruses in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91(1): 11-4.

Tu H, Xiong SD, Trepo C, Wen YM. Frequency of hepatitis B virus e-minus mutants varies among patients from different areas of China. *J Med Virol* 1997; 51: 85-9.

Tur-Kaspa R, Klein A, Aharonson S. Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with range of liver disease severity. *Hepatology* 1992; 16: 1338-42.

Ucmak H, Kokoglu OF, Delik M, Ergun UG. Intra-familial spread of hepatitis B virus infection in eastern Turkey. *Epidemiol Infect* 2007; 21: 1-6 (Epub ahead of print).

Viana S, Paraná R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the Western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73 (4): 808-14.

Welzel TM, Miley WJ, Parks TL, Goedert JJ, Whitby D, Conde BAO. Real – Time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *J Clin Microbiol* 2006; 3325-33.

Westland C, Delaney W, Yang H et al. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adenfovir dipivoxil. *Gastroenterology* 2003; 125: 107-16.

Wintermeyer P, Gerner P, Gehring S, Karimi A, Wirth S. Prevalence of hepatitis B virus precore stop codon mutations in chronically infected children. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (4): 2235-8.

Yao GB. Importance of perinatal versus horizontal transmission of hepatitis B virus in China. *Gut* 1996; 38 (suppl 2): 539-42.

Yuh CH, Chang YL, Ting LP. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol* 1992; 66 (7): 4073-84.

Zampino R, Lobello S, Chiamonte M, Venturi-Pasini C, Dumpis U, Thursz M, Karayiannis P. Intra-familial transmission of hepatitis B virus in Italy: phylogenetic sequence analysis and amino-acid variation of the core gene. *J Hepatol* 2002; 36: 248-53.

Zervou EK, Gatselis KN, Xanthi E, Ziciadis K, Gerorgiadou SP, Dalekos GN.
Intrafamilial spread of hepatitis B infection in Greece. Eur J Gastroenterol
Hepatol 2005; 17: 911-5.

ANEXOS

ANEXO 1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

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

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

.....
.....

PESQUISADOR:

CARGO/FUNÇÃO

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL

UNIDADE DO HCFMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(O recém-nascido pode sentir dor durante o procedimento, no entanto estará sendo medicado com analgésicos para evitar que isto aconteça)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA :

ANEXO 1

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

1. justificativa e os objetivos da pesquisa: serão utilizados dois métodos de aspiração da canula que se encontra na traqueia. Como ainda não existe uma certeza de qual a melhor forma de aspiração da criança que se encontra no respirador devido a sua doença pulmonar, este estudo que utilizará um método aberto (com desconexão da canula do respirador) e outro fechado (sem desconexão da canula do respirador) nos fornecerá dados que nos indicaram qual a melhor forma para aspiração da canula.
2. O seu filho estará sendo monitorizado para verificar a medida do oxigênio no sangue, a frequência do coração e a pressão arterial. Se ele apresentar alterações estas serão anotadas e se interromperá o procedimento. A criança não sentirá dor pois estará medicada para evitar este sintoma.
3. benefícios que poderão ser obtidos : diminuição dos episódios de queda de oxigênio no sangue, dos episódios de diminuição da frequência cardíaca, e menor alteração da pressão arterial.
4. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: NA

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

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para explicar eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

ANEXO 1

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

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 2.....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Legível)

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome

ANEXO 2

Famílias segundo grau de parentesco, gênero, perfil sorológico, marcadores sorológicos e genótipo.

Família	ICR	Parentesco	Gênero	Perfil Sorológico	AgHBs	Anti-HBc	Anti-HBs	Genótipo
1	6	pt	M	crônico	R	R		A
	105	mãe	F	crônico	R	R		NP
2	114	pt 1	M	crônico	R	R		D
	32	mãe	F	crônico	R	R		D
	33	pt 2	M	crônico	R	R		D
	110	pt 3	F	crônico	R	R		D
3	42	pt 1	F	crônico	R	R		A
	180	mãe	F	crônico	R	R		A
	44	pt 2	M	crônico	R	R		A
4	66	pt	M	crônico	R	R		D
	67	mãe	F	crônico	R	R		D
5	75	pt	F	crônico	R	R		D
	76	mãe	F	crônico	R	R		D
6	132	pt	M	crônico	R	R		A
	111	mãe	F	crônico	R	R		A
7	119	pt 1	F	crônico	R	R		C
	120	mãe	F	crônico	R	R		NP
	185	pai	M	crônico	R	R		NP
	80	pt 2	F	crônico	R	R		C
8	152	pt 1	M	crônico	R	R		D
	153	mãe	F	crônico	R	R		D
	177	pt 2	F	crônico	R	R		D
9	162	pt	F	crônico	R	R		D
	163	mãe	F	crônico	R	R		D
10	31	pt	F	crônico	R	R		D
	36	mãe	F	crônico	R	R		D
11	122	pt	M	crônico	R	R		A
	123	pai	M	crônico	R	R		A
12	53	pt	M	crônico	R	R		A
	54	pai	M	crônico	R	R		A

pt- Paciente; IP- Infecção passada; R- Reagente; NR- Não Reagente; NP- Não processado.

Continuação anexo 2

Família	ICR	Parentesco	Gênero	Perfil Sorológico	AgHBs	Anti-HBc	Anti-HBs	Genótipo
13	6	pt 1	F	crônico	R	R		A
	87	mãe	F	crônico	R	R		NP
	200	pai	M	crônico	R	R		D
	99	pt 2	M	crônico	R	R		A
14	201	pt 1	F	crônico	R	R		A
	202	mãe	F	crônico	R	R		A
	203	pt 2	F	crônico	R	R		A
15	206	pt	F	crônico	R	R		A
	207	mãe	F	crônico	R	R		A
16	77	pt 1	F	crônico	R	R		D
	3	mãe	F	crônico	R	R		NP
	2	pt 2	F	crônico	R	R		D
	96	pt 3	M	crônico	R	R		D
	78	marido pt1	M	IP	NR	R	R	
	79	filho pt 1	M	crônico	R	R		D
17	121	pt	F	crônico	R	R		D
	131	mãe	F	IP	NR	R	R	
18	28	pt	M	crônico	R	R		D
	29	mãe	F	IP	NR	R	R	
19	49	pt	M	crônico	R	R		A
	50	mãe	F	IP	NR	R	R	
	51	irmão 1	F	IP	NR	R	R	
	52	irmão 2	M	IP	NR	R	R	
20	108	pt	M	crônico	R	R		D
	109	mãe	F	IP	NR	R	R	
21	192	pt	M	crônico	R	R		A
	191	mãe	F	IP	NR	R	R	
	209	pai	M	IP	NR	R	R	
22	197	pt	M	crônico	R	R		A
	198	mãe	F	IP	NR	R	R	
	199	pai	M	IP	NR	R	R	

pt- Paciente; IP- Infecção passada; R- Reagente; NR- Não Reagente; NP- Não processado.

Continuação anexo 2

Família	ICR	Parentesco	Gênero	Perfil Sorológico	AgHBs	Anti-HBc	Anti-HBs	Genótipo
23	27	pt	M	crônico	R	R		D
	211	pai	M	IP	NR	R	R	
24	100	pt	M	crônico	R	R		A
	101	pai	M	IP	NR	R	R	
25	55	pt	M	crônico	R	R		D
	215	mãe	F	IP	NR	R	R	
26	219	pt	F	crônico	R	R		D
	218	mãe	F	IP	NR	R	R	
27	204	pt	M	crônico	R	R		D
	205	mãe	F	IP	NR	R	R	
28	15	pt	M	crônico	R	R		D
	16	mãe	F	IP	NR	R	R	
	59	pai	M	IP	NR	R	R	
	61	irmão	F	IP	NR	R	R	
29	139	pt	M	crônico	R	R		NP
	140	mãe	F	IP	NR	R	R	
	40	irmão	F	IP	NR	R	R	
30	8	pt	M	crônico	R	R		A
	10	mãe	F	crônico	R	R		A
	11	irmão	F	IP	NR	R	R	
31	35	pt 1	M	crônico	R	R		D
	30	mãe	F	IP	NR	R	R	
	34	pt 2	F	crônico	R	R		NP
32	37	pt 1	F	crônico	R	R		A
	107	mãe	F	crônico	R	R		A
	60	pai	M	IP	NR	R	R	
	39	pt 2	F	crônico	R	R		NP
	38	pt 3	F	crônico	R	R		A
33	56	pt 1	F	crônico	R	R		A
	58	mãe	F	IP	NR	R	R	
	57	pt 2	F	crônico	R	R		A

pt- Paciente; IP- Infecção passada; R- Reagente; NR- Não Reagente; NP- Não processado.

Continuação anexo 2

Família	ICR	Parentesco	Gênero	Perfil Sorológico	AgHBs	Anti-HBc	Anti-HBs	Genótipo
34	62	pt	M	crônico	R	R		D
	64	mãe	F	crônico	R	R		D
	63	pai	M	IP	NR	R	R	
35	113	pt 1	F	crônico	R	NR		A
	112	pt 2	F	Crônico	R	R		A
	115	mãe	F	crônico	R	R		A
	65	pai	M	IP	NR	R	R	
36	94	pt	F	crônico	R	R		D
	95	mãe	F	crônico	R	R		NP
	220	tia	F	IP	NR	R	R	
37	46	pt	M	crônico	R	R		D
	48	mãe	F	crônico	R	R		NP
	47	pai	M	IP	NR	R	R	
38	137	pt	M	crônico		R		A
	156	mãe	F	IP	NR	R	R	
	138	pai	M	crônico	R	R		A
	155	irmão	M	crônico	R	NR		NP
	104	avó paterna	F	IP	NR	R	R	
	154	Prima paterna	F	crônico	R	NR		NP
39	43	pt 1	F	crônico	R	R		A
	102	mãe	F	crônico	R	R		A
	133	pt 2	M	crônico	R	R		A
	103	irmão	M	IP	NR	R	R	
40	212	pt	M	crônico	R	R		A
	214	mãe	F	crônico	R	R		A
	213	pai	M	IP	NR	R	R	
41	167	pt	F	crônico	R	R		D
	169	mãe	F	crônico	R	R		D
	168	pai	M	IP	NR	R	R	
42	26	pt	F	crônico	R	R		D
	136	avó	F	vacinado	NR	NR	R	

pt- Paciente; IP- Infecção passada; R- Reagente; NR- Não Reagente; NP- Não processado.

Continuação anexo 2

Família	ICR	Parentesco	Gênero	Perfil Sorológico	AgHBs	Anti-HBc	Anti-HBs	Genótipo
43	97	pt	M	crônico	R	NR		A
	172	mãe	F	vacinado	NR	NR	NR	
44	4	pt	F	crônico	R	R		D
	45	mãe	F	vacinado	NR	NR	R	
45	117	pt	M	crônico	R	R		D
	118	mãe	F	vacinado	NR	NR	R	
	106	pai	M	vacinado	NR	NR	R	
46	12	pt	F	crônico	R	R		A
	13	mãe	F	crônico	R	R		D
	14	pai	M	vacinado	NR	NR	R	
47	194	pt	M	crônico	R	R		C
	195	mãe	M	crônico	R	R		C
	193	pai	M	crônico	R	R		NP
	196	irmão	M	vacinado	NR	NR	R	
48	82	pt 1	M	crônico	R	R		NP
	178	mãe	F	crônico	R	R		A
	83	pt 2	M	crônico	R	R		A
	84	irmão	M	vacinado	NR	NR	R	
49	72	pt	F	crônico	R	R		D
	71	avó	F	suscetível	NR	NR	NR	
50	187	pt	F	crônico	R	R		A
	188	mãe	F	suscetível	NR	NR	NR	
	190	pai	M	suscetível	NR	NR	NR	
	189	irmão	M	suscetível	NR	NR	NR	
51	21	pt 1	F	crônico	R	R		NP
	68	mãe	F	IP	NR	R	R	
	69	pt 2	M	crônico	R	R		A
	70	pt 3	M	crônico	R	R		A
	22	filho pt 1	M	vacinado	NR	NR	R	

pt- Paciente; IP- Infecção passada; R- Reagente; NR- Não Reagente; NP- Não processado.

Continuação anexo 2

Família	ICR	Parentesco	Gênero	Perfil Sorológico	AgHBs	Anti-HBc	Anti-HBs	Genótipo
52	160	pt 1	F	crônico	R	R		C
	161	mãe	F	crônico	R	R		C
	159	tia 1	F	IP	NR	R	R	
	157	tia 2	F	crônico	R	R		NP
	92	prima	F	vacinado	NR	NR	R	
	158	pt 2 (filho tia 1)	M	crônico	R	R		C
53	170	pt	F	crônico	R	R		D
	171	mãe	F	crônico	R	R		NP
	88	irmão 1	F	IP	NR	R	R	
	89	irmão 2	M	vacinado	NR	NR	R	
	90	irmão 3	F	IP	NR	R	R	
	91	irmão 4	F	IP	NR	R	R	
54	174	pt	M	crônico	R	R		D
	173	mãe	F	suscetível	NR	NR	NR	
	175	pai	M	crônico	R	R		NP
	176	irmão	M	IP	NR	R	R	
55	147	pt 1	M	crônico	R	R		D
	146	mãe	F	crônico	R	R		D
	142	pai	M	IP	NR	R	R	
	148	pt 2	M	crônico	R	R		D
	145	pt 3	F	crônico	R	R		D
	143	tia	F	crônico	R	R		D
	144	tio	M	vacinado	NR	NR	R	
	149	pt 4 (filho tia)	F	crônico	R	R		D
150	pt 5 (filho tia)	M	crônico	R	R		D	
56	7	pt	M	crônico	R	R		D
	98	mãe	F	IP	NR	R	R	
	9	pai	M	suscetível	NR	NR	NR	
57	17	pt	F	crônico	R	R		A
	18	mãe	F	IP	NR	R	R	
	19	pai	M	IP	NR	R	R	
	20	irmão	F	vacinado	NR	NR	R	

pt- Paciente; IP- Infecção passada; R- Reagente; NR- Não Reagente; NP- Não processado.

Continuação anexo 2

Família	ICR	Parentesco	Gênero	Perfil Sorológico	AgHBs	Anti-HBc	Anti-HBs	Genótipo
58	125	pt	M	crônico	R	R		D
	126	mãe	F	IP	NR	R	R	
	127	irmão 1	F	vacinado	NR	NR	R	
	128	irmão 2	M	IP	NR	R	R	
	129	irmão 3	M	IP	NR	R	R	
	130	irmão 4	M	vacinado	NR	NR	R	
59	5	pt	M	crônico	R	R		NP
	135	mãe	F	IP	NR	R	R	
	134	pai	M	IP	NR	R	R	
	165	irmão 1	F	vacinado	NR	NR	R	
	41	irmão 2	F	vacinado	NR	NR	R	
60	179	pt	M	crônico	R	R		D
	74	mãe	F	IP	NR	R	R	
	73	pai	M	vacinado	NR	NR	R	
61	181	pt	M	crônico	R	R		D
	184	mãe	F	suscetível	NR	NR	NR	
	182	pai	M	IP	NR	R	R	
	183	irmão 1	M	vacinado	NR	NR	R	
	186	irmão 2	M	IP	NR	R	R	

pt- Paciente; IP- Infecção passada; R- Reagente; NR- Não Reagente; NP- Não processado.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)