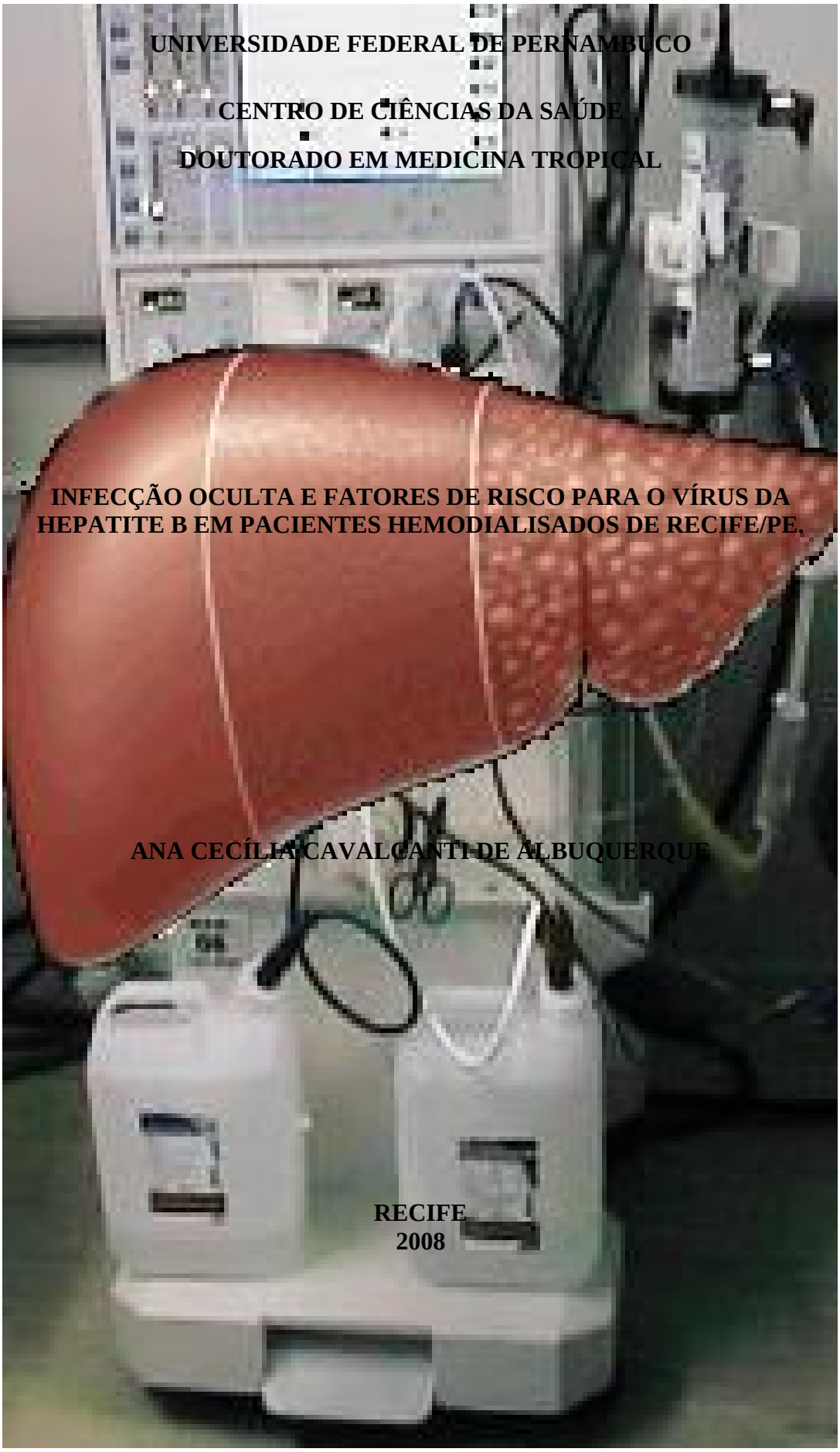

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

INFECÇÃO OCULTA E FATORES DE RISCO PARA O VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES HEMODIALISADOS DE RECIFE/PE.

ANA CECÍLIA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE

RECIFE
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ANA CECÍLIA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE

INFECÇÃO OCULTA E FATORES DE RISCO PARA O VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES HEMODIALISADOS DE RECIFE/PE.

Tese de doutorado apresentada ao colegiado da Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor (a) em Medicina Tropical.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Co-orientadora: Drª. Regina Célia Moreira

RECIFE
2008

Albuquerque, Ana Cecília Cavalcanti de
Infecção oculta e fatores de risco para vírus da hepatite B em pacientes hemodialisados de Recife-PE / Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque. – Recife : O Autor, 2008.
119 folhas ; il., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2008.

Inclui bibliografia e apêndices.

1. Hepatite B – Fatores de risco. I. Título.

616.36-002	CDU (2.ed.)	UFPE
616.362 3	CDD (22.ed.)	CCS2009-103

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

ANA CECÍLIA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE

No dia 19 de dezembro de 2008, às 08h00, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CCB/UFPE), os Professores: **o Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini (UEM – Membro Externo), o Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto (UFPE – Membro Interno), a Profª. Drª. Marli Tenório Cordeiro (LACEN-SES-PE – Membro Externo), a Profª. Drª. Terezinha Tenório da Silva (UFPE – Membro Externo) e a Profª. Drª. Vera Magalhães da Silveira (UFPE - Membro interno)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüíram a doutoranda **ANA CECÍLIA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE** sobre a sua Tese intitulada "**INFECÇÃO OCULTA E FATORES DE RISCO PARA O VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES HEMODIALISADOS DE RECIFE/PE**". Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini	Aprovado
Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto	Aprovado
Profª. Drª. Marli Tenório Cordeiro	Aprovada
Profª. Drª. Terezinha Tenório da Silva	Aprovada
Profª. Drª. Vera Magalhães da Silveira	Aprovada

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Profª. Drª Marli Tenório Cordeiro

Profª. Drª Terezinha Tenório da Silva

Profª. Drª Vera Magalhães da Silveira

"Olhar para trás, após uma longa caminhada, pode fazer perder a noção da distância que percorremos. Mas, se nos detivermos em nossa imagem, quando a iniciamos e ao término, certamente nos lembraremos de quanto nos custou chegar até o ponto final, e, hoje temos a impressão de que tudo começou ontem. E é por esse motivo que dizer adeus se torna complicado. Digamos, então, que nada se perderá. Pelo menos dentro da gente...."

João Guimarães Rosa

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra aos meus pais, Antonio Faustino e Nereuda Gomes pelo amor, incentivo, paciência, sabedoria,... É uma dádiva de Deus ser fruto desses seres humanos que estão sempre torcendo pelo meu desempenho e sucesso. Meu eterno agradecimento. E também à minha filha Beatriz e ao meu marido Edson Sena pela paciência, gratidão, amor, carinho, força e por terem tornado a minha vida mais doce, serena e simplesmente maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelo ar, pelo sol, pelas pessoas, pelas oportunidades e simplesmente por ter me dado coragem e discernimento diante da vida, das pessoas, dos compromissos e de um ideal.

Aos meus Irmãos Cynthia, Marco Antonio, Antonio Henrique e Rafael pelo apoio, incentivo, amor, carinho, compreensão e por fazerem parte do meu passado, presente e futuro.

À minha querida orientadora, Profª. Rosângela Coelho, pelos ensinamentos, confiança, amizade, dedicação, disposição do dia-a-dia, por nossas viagens.

À minha querida co-orientadora Regina Célia pelo apoio, profissionalismo, amizade, seriedade, dedicação.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami (LIKA) na pessoa do Diretor Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, por ter possibilitado a realização desta pesquisa.

À Ana Maria Rocha e Suellen Brás pela parceria na construção da base desse trabalho e que se não fosse à ajuda de vocês, com certeza, faltariam brilho no nosso estudo.

A todos do setor de Virologia do LIKA, principalmente a Veridiana, Tatiana, D. Celeste pela união e equipe de trabalho.

A Jefferson Almeida pela sua contribuição prática e intelectual..

À Dra. Júlia Fellipe, Diretora da Microbiologia Médica do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo; a Dra. Luiza Terezinha, ex-diretora do Departamento de Virologia e a Dra. Maria do Carmo, atual diretora do Departamento de Virologia pelo apoio e suporte.

Aos amigos: Marcílio Lemos, Isabel Oba, Ângela Spina, Cláudia Saraceni, Adriana Parise que fazem o setor de Hepatites Virais do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo pelo empenho, dedicação, amizade e competência para a realização desse estudo.

À minha turma de doutorado, representada pelas alunas Alba Eloi e Carolina Cunha, pelas nossas conquistas e aprendizados nos maravilhosos encontros do curso.

A todos da Pós-graduação em Medicina Tropical, principalmente a Dra Eloísa Ramos, Dra. Rosângela Coelho, Dr. Ricardo Ximenes, Jupira Pinho e Walter Leite pela confiança, empenho e por todas as orientações prestadas desde o início do curso.

À Associação Caruaruense do Ensino Superior (ASCES) no nome do Dr. Paulo Muniz, Diretor Presidente da Instituição, pelo apoio, compromisso e incentivo aos professores na evolução profissional.

A todos os professores e professoras da ASCES, pelo convívio harmonioso e incentivo mútuo.

Aos colegas do Departamento de Virologia do Laboratório Central de Pernambuco LACEN/FUSAM pelo inesquecível convívio e por fazerem parte, mesmo que distante, do meu eterno aprendizado.

A todos os profissionais das Unidades estudadas, principalmente ao Dr. Maviael Moraes e a auxiliar de Enfermagem Conceição, pela dedicação, índole e confiança nesse trabalho.

Aos meus queridos pacientes, que se não fosse a confiança de vocês, nada disso teria acontecido. Meu eterno agradecimento.

A Ulisses Montarroyos pela grande ajuda na análise estatística.

À amiga Ana Catarina Simonetti, pela grandiosa amizade, apoio, incentivo e empenho fornecido.

À CAPES através do seu programa de apoio aos bolsistas.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALT - Alanina aminotransferase
- Anti-HBc total – Anticorpo contra o antígeno do core do vírus da hepatite B
- Anti-HBs – Anticorpo contra o Antígeno de Superfície do vírus da hepatite B
- Anti-HBe – Anticorpo contra o Antígeno "e" do vírus da hepatite B
- anti-HCV – Anticorpo contra o vírus da hepatite C
- bp – Pares de base
- cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar
- cccDNA – DNA circular covalentemente fechado (covalently closed circular DNA)
- D.O - Densidade ótica
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DNA-HBV - Ácido desoxirribonucléico do vírus da hepatite B
- dNTP – Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
- ELISA – Ensaio Imunoenzimático
- FDA – Food and Drug Administration
- g - grama
- gp – Glicoproteína
- CHC – Carcinoma hepatocelular
- HB – Hepatite B
- HBV - Vírus da hepatite B
- HBsAg – Antígeno de Superfície do vírus da hepatite B
- HBeAg – Antígeno "e" do vírus da hepatite B
- HCV – Vírus da hepatite C
- HDV – vírus da hepatite delta
- HIV – vírus da imunodeficiência humana
- HNANB – Hepatite não-A e não-B
- IAL – Instituto Adolfo Lutz
- I.B. – Immunoblot
- IC 95% – Intervalo de Confiança de 95%
- IgG – Imunoglobulina G
- IgM – Imunoglobulina M

- L – Litro
- mL - Mililitro
- MHC I e II – Complexo de histocompatibilidade principal I e II
- mg/dL – Miligramas por decilitro
- mm^3 – Milímetros cúbicos
- ng – Nanograma
- nm – Nanômetro
- NCR – Região não codificadora
- ° C – Graus Celsius
- OR – odds ratio
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- ORF – Fase de leitura aberta
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- PNHV - Programa Nacional das Hepatites Virais
- RHV – Região hiper variável
- RNA – Ácido ribonucléico
- RNA-HCV – Ácido ribonucléico do vírus da hepatite C
- RT – Transcriptase reversa
- TA – Temperatura ambiente
- TMA – Amplificação mediada por transcrição
- TFNα - Fator de necrose tumoral alfa
- UI – Unidades internacionais

RESUMO

A exposição freqüente a sangue e derivados é uma importante rota para transmissão do vírus da hepatite B (HBV), portanto pacientes hemodialisados apresentam um alto risco para a aquisição do mesmo devido ao tratamento de rotina. Em muitos países, a transmissão do vírus da hepatite B tem sido controlada em centros de hemodiálise, devido à utilização das precauções universais, práticas de controle da infecção e vacinação freqüente nos pacientes susceptíveis. Todavia algumas unidades apresentam pacientes com infecção oculta para o HBV, variando de 0 a 58% em algumas regiões do mundo. Os objetivos desse trabalho foram identificar infecção oculta para o HBV e os fatores de riscos para a infecção em pacientes hemodialisados de 5 clínicas da cidade de Recife/PE, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007. A população estudada foi constituída por 780 pacientes, com média de idade de 50 ± 15,1 e de ambos os sexos. Os hemodialisados, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram submetidos a uma entrevista para aquisição de dados epidemiológicos. Foram coletados antes do tratamento hemodialítico, 10 mL de sangue pela fistula. As amostras foram encaminhadas em tempo hábil de 4 horas ao laboratório para processamento e armazenamento a - 80°C até o momento de realização dos testes. O ELISA foi realizado para pesquisa dos marcadores sorológicos (anti-HBc total, HBsAg e anti-HBs). Os soros que apresentaram negatividade para o anti-HBc total e HBsAg foram organizados em "pools". As amostras anti-HBc total positiva e os "pools" foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para pesquisa do DNA viral. As reações positivas foram seqüenciadas para a identificação do genótipo e para análise de mutação para a região S do vírus. As informações foram armazenadas e analisadas no Epi-info 6.0., para posterior análise univariada e multivariada das variáveis estudadas. A soroprevalência para o anti-HBc total, HBsAg e anti-HBs foi de 29,4% (229/780), 3,3% (26/780) e 66,2% (135/203), respectivamente e o DNA viral foi encontrado em 2,2% (17/780) das amostras. Em dois pacientes anti-HBc total + anti-HBs reagentes e em um paciente com anti-HBc total isolado foram encontrados o DNA-HBV, observando uma infecção oculta de 0,4% (3/752). O genótipo A foi encontrado em 81,25% (13/16), o genótipo D em 12,5% (2/16) e o genótipo F em 6,25% (1/16) das amostras HBsAg positivas. Os genótipos verificados nos pacientes com infecção oculta foram o A (2/3) e D (1/3). Nenhuma mutação foi encontrada nas seqüências virais analisadas. As variáveis sexo, idade, tempo de hemodiálise e quantidade de transfusões é que estão mais estreitamente associadas com a soropositividade para o anti-HBc total. Os marcadores sorológicos avaliam bem a infecção pelo HBV, porém deve-se ter sempre o respaldo de testes moleculares para a verificação de infecções ocultas, pois evidencia pacientes que para a clínica são considerados negativos e na verdade albergam o vírus, podendo disseminar o vírus aos demais.

Palavras-chaves: Prevalência, Vírus da hepatite B, Hemodialisados, Sorologia, PCR, Genótipo, Mutação.

ABSTRACT

Frequent exposure to blood and derivatives is an important transmission route for the hepatitis B virus (HBV). Thus, hemodialysis patients are at high risk of acquiring HBV. In many countries, hepatitis B transmission has been brought under control in hemodialysis centers through the use of universal precautions, infection control practices and frequent vaccination for susceptible patients. Nevertheless, some hemodialysis units have patients with occult HBV infection: the proportion ranges from 0 up to 58% in some regions of the world. The aim of the present study was to identify occult HBV infection and the risk factors for this infection among hemodialysis patients at five clinics in the city of Recife, Pernambuco, between August 2006 and August 2007. The study population (n = 780), of mean age 50 ± 15.1 and both sexes, was interviewed to seek these individuals' free and informed consent through signing a statement and subsequently for them to fill out a questionnaire. A mean of 10 ml of blood was taken through each patient's fistula prior to hemodialysis. The samples were promptly sent (within four hours) to the laboratory for processing and storage at - 80° C. The serum samples were subjected to ELISA to investigate serological markers (anti-HBc total, HBsAg and anti-HBs). Samples that were positive for anti-HBc total and had negative serum "pools" for anti-HBc total and HBsAg underwent the polymerase chain reaction to investigate viral DNA. Positive reactions were sequenced to identify the genotype and analyze virus S region mutations. The information was stored and analyzed using Epi-Info 6.0.. The seroprevalence of anti-HBc total, HBsAg and anti-HBs was 29.4% (229/780), 3.3% (26/780) and 66.2% (135/203), respectively, and viral DNA was found in 2.2% (17/780) of the samples. HBV-DNA was found in two patients who were positive for anti-HBc total + anti-HBs and in one positive for anti-HBc total alone, thus showing an occult infection rate of 0.4% (3/752). The genotypes found were A (81.25%; 13/16), D (12.5%; 2/16) and F (6.25%; 1/16) in the HBsAg positive samples. The genotypes found in patients with occult infection were the A (2 / 3) and D (1 / 3). No mutations were found in the viral sequences analyzed. The variables of age, length of time on dialysis, sex and quantity of transfusions were the ones most closely associated with seropositivity for anti-HBc total. The serological markers evaluated HBV infection well, but always need the backing of molecular tests in order to check on occult infection. These tests are able to diagnose patients who clinically are considered negative but in reality host the virus, and who have the ability to spread it to other patients.

Key Words: Prevalence, Hepatitis B virus, Hemodialysis, Serology, PCR, Genotype, Mutation

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1-Apresentação 14

2- Revisão da literatura 16

2.1- Características Gerais do VHB 16

2.2- Aspectos clínicos e laboratoriais da hepatite B 19

2.3- Aspectos epidemiológicos da hepatite B 23

2.4- Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B 27

2.4.1- Aspectos epidemiológicos da Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B 28

2.4.2- Mecanismos fisiopatogênicos da Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B 31

2.4.2.1- Fatores Imunológicos 32

2.4.2.2- InterferênciaViral 34

2.4.2.3- Mutações do HBV 35

2.5- Relevância da infecção Oculta para o VHB 38

3- Formulação da questão da pesquisa 41

4- Objetivos 42

4.1- Objetivo geral 42

4.2- Objetivos específicos 42

Artigo I – Versão português/Submetido à Virus Reviews & Research

Resumo 44

Introdução 45

Material e Métodos 47

Resultados 50

Discussão 55

Referências 60

Artigo I – Versão Inglês/Submetido à Virus Reviews & Research

Abstract..... 66
Introduction..... 67
Material e Methods..... 69
Results.....72
Discussion 74
References.....78
Tables 82

Artigo II - Versão português/submetido ao Journal of Medical Virology

Resumo 86
Introdução 87
Material e Métodos 88
Resultados 92
Discussão 93
Referências 96

Artigo II - versão Inglês/submetido ao Journal of Medical Virology

Abstract.....102
Introduction.....103
Material e Methods.....104
Results..... 107
Discussion 108
References..... 111
Table 116

Conclusões 117
Recomendações/Perspectivas 118
Apêndices.....119

Apêndices

Termo de consentimento livre e esclarecido para menores e maiores de 21 anos

Questionários/formulários

“Instruções aos autores” para submissão de cada um dos periódicos selecionados para submissão

Referências de citações contidas na Apresentação/Revisão da Literatura/Métodos da primeira parte da Tese

1 - Apresentação

O interesse pelos vírus surgiu bem antes de iniciar o curso de Mestrado quando da realização de uma Especialização em Virologia no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. Entre os diversos vírus estudados como: vírus da imunodeficiência humana (HIV), Herpesvírus e vírus das hepatites, estes últimos foram os que mais chamaram atenção, não só pela magnitude das doenças, como também pela epidemiologia molecular do vírus da hepatite B (HBV) e do vírus da hepatite C (HCV).

A escolha do tema para o Mestrado baseou-se na experiência vivenciada durante a especialização, devido à participação no projeto envolvendo os aspectos sorológicos e moleculares do HCV em pacientes hemodialisados de São Paulo. Ao retornar à Pernambuco foi despertado o interesse em pesquisar o HCV em hemodialisados no Recife, considerando a falta de dados sobre o vírus nessa população.

Para a tese do Doutorado decidimos continuar os estudos nessa população considerando algumas características, como: os pacientes freqüentam regularmente às mesmas unidades onde são cadastrados; a falta às sessões do tratamento hemodialítico implica em danos relacionados principalmente ao aumento de toxinas na corrente sangüínea e não há quase recusa em participar do projeto, uma vez que os pacientes acreditam que a pesquisa trará benefícios futuros. Portanto visamos determinar o perfil sorológico, epidemiológico e molecular da hepatite B em hemodialisados.

Na elaboração do projeto de Doutorado pensou-se em investigar dez clínicas da Cidade do Recife, porém devido aos altos custos que teríamos com a pesquisa, o número foi então reduzido para 5 unidades de hemodiálise. Os diretores médicos das clínicas a serem estudadas foram visitados e alguns deles mostraram-se surpresos em estudarmos o perfil

sorológico e molecular do HBV naquela população, dizendo que existe uma vacina eficaz. Era como se nós estivéssemos querendo estudar um tema que não fosse mais relevante para a saúde pública. Argumentamos que na realidade pretendíamos identificar a infecção oculta para o HBV na referida população, baseando-se em alguns trabalhos de prevalência na literatura internacional e pela falta de dados brasileiros sobre o tema.

Ressalta-se que a existência de uma vacina eficaz para hepatite B leva uma falsa idéia de que haja uma diminuição da circulação do vírus, entretanto o DNA viral tem sido encontrado mesmo em pacientes hemodialisados com doses completas da vacina (MINUK et al. 2004).

Estudos moleculares permitem o seqüenciamento viral, fornecendo os genótipos do HBV de uma população. No Brasil, os genótipos A, D e F são os que mais circulam. Assim interessou-nos pesquisar se nos pacientes hemodialisados encontraríamos os mesmos genótipos.

Conhecer o perfil epidemiológico da população poderá trazer informações importantes sobre a transmissão do vírus. Sabe-se que apesar das várias recomendações governamentais e institucionais para reduzir a disseminação do HBV em pacientes hemodialisados, o vírus ainda circula nas unidades, porém deve-se lembrar que existem outras vias de infecção, as quais os pacientes são expostos, como por exemplo, a via sexual (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2004).

Diante do exposto, o presente estudo foi pioneiro no Brasil em identificar nos hemodialisados a infecção oculta pelo HBV e em Pernambuco determinar a prevalência baseado nos achados sorológicos e virológicos dessa infecção no período de agosto de 2006 a agosto de 2007.

2.0 - Revisão da Literatura

2.1- Características Gerais do HBV

A hepatite B é uma doença conhecida desde a Grécia antiga passando pela teoria que relacionava a icterícia a fenômenos obstrutivos até o encontro de necrose hepatocelular difusa em necropsias. Somente a partir de 1939, com o advento da biópsia, associou-se a doença hepática a alterações inflamatórias dos hepatócitos (FOCACCIA et al. 1997). Entretanto a sua etiologia só foi elucidada a partir dos estudos de Blumberg et al. (1965), que encontraram no soro de um aborígene australiano, um antígeno que reagia com soros de hemofílicos e de outros pacientes politransfundidos, denominando-se então, antígeno Austrália (AU). Posteriormente, esse agente etiológico foi mais bem caracterizado morfologicamente, sendo então identificado como vírus da hepatite B (HBV).

O HBV pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Ortho-hepadnavírus,* que compreende um pequeno número de vírus que compartilham uma série de características, como o tropismo pelas células hepáticas, e um genoma constituído de uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla (GANEM et al. 1996).

O nucleocapsídeo possui simetria icosaédrica e é constituído pela proteína do core (HBcAg) e pelo genoma (TIOLLAIS et al. 1985).

O HBV possui um dos menores genomas entre os vírus que infectam o homem e possui aproximadamente 3.200 pares de bases (pb) (GANEM et al. 1996). Na sua totalidade o genoma é codificante, apresentando quatro fases de leitura aberta designadas de pré-S/S, pré-C/C, P e X (figura 1).

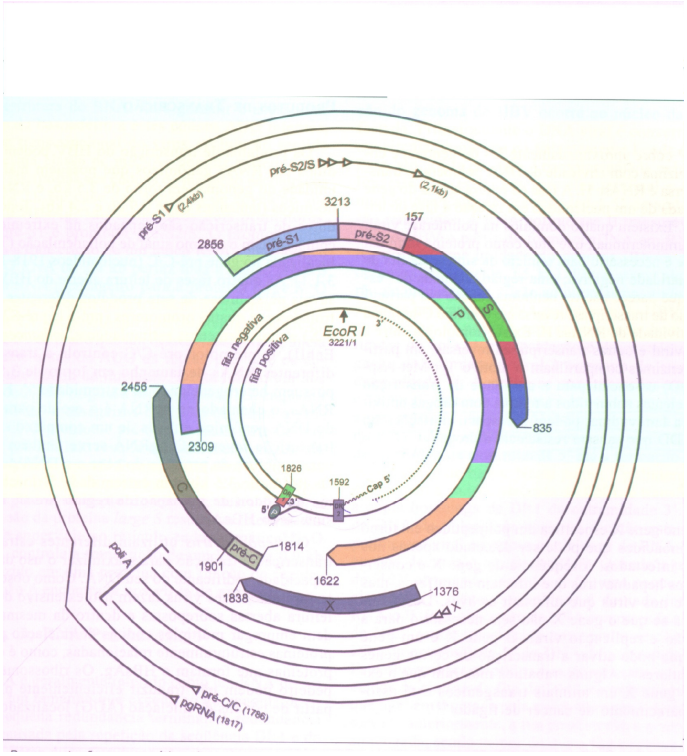

Figura 1. Organização do genoma do HBV.
Fonte: Tratado de Hepatites Virais, 2ª. edição, Roberto Focaccia, pag. 109

O gene Pré-S/S codifica as proteínas que formam o HBsAg, e o pré-C/C é responsável pela síntese do HBcAg e do antígeno *e* (HBeAg). O gene P codifica a polimerase viral e a região X é responsável pela síntese de uma proteína regulatória, chamada proteína X. O HBV produz mais proteína por nucleotídeo do que qualquer outro vírus conhecido (GOMES 2007).

O gene S é dividido em três sítios de iniciação, o que levará à formação de três diferentes proteínas de superfície: a não glicosilada p24 (proteína de cadeia curta ou S), a glicosilada gp33 (proteína de cadeia média ou pré-S2) e a não glicosilada p39 (proteína de cadeia longa ou pré-S1). Entre esses peptídeos, a p24 é predominante e representa o principal antígeno de superfície e que vai induzir a formação do anticorpo Anti-HBs (GOMES 2007).

O HBeAg é traduzido a partir de um único códon de iniciação da região pré-C. O produto é translocado para o retículo endoplasmático, onde é processado por clivagem nas duas extremidades, resultando na formação do HBeAg com 159 aminoácidos. O códon de

iniciação para o HBcAg esta localizado a 87 nt após o sítio de iniciação da região pré-core. O HBeAg e HBcAg são traduzidos a partir de dois RNAs distintos e ambos possuem mais de uma unidade do genoma (GOMES 2007).

A região P se estende por cerca de 80% do genoma viral e codifica uma enzima que além de apresentar atividade de DNA polimerase, apresenta também atividade de transcriptase reversa e RNAse H (GOMES 2007). Existe homologia entre a polimerase viral e outras transcriptases reversas, em particular essas enzimas compartilham o motivo Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD) essencial para a atividade de transcrição reversa (BARTHOLOMEUSZ et al. 1997).

A replicação genômica ocorre através de um molde de RNA intermediário. Uma proteína da região X (HBX) é necessária à replicação viral e atua como um transativador da transcrição dos genes virais. Acredita-se que o HBx também exerça um papel central na etiologia do carcinoma hepatocelular (CHC), não sendo sempre necessária a presença de cirrose na gênese deste tumor, como é o caso da infecção crônica pelo HCV (BROOKS et al. 2000, SILVA 2003, GOMES 2007).

Durante a biossíntese viral são produzidas partículas infectantes e não infectantes do HBV (figura 2).

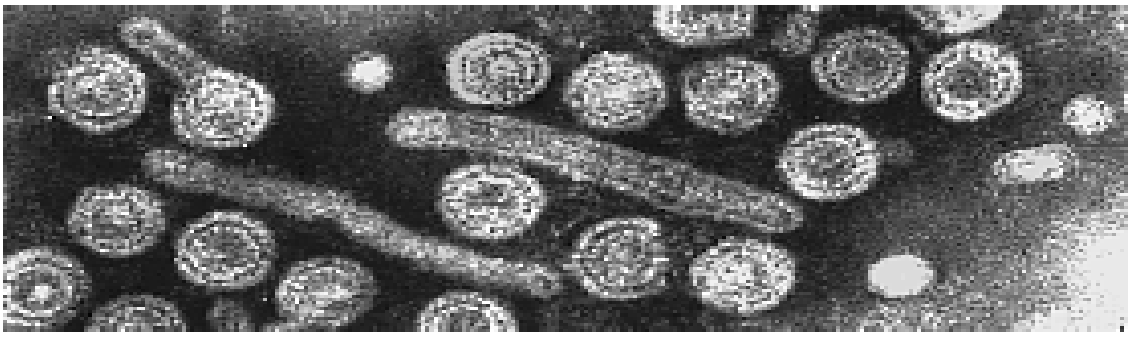

Figura 2 – Fotomicroscopia eletrônica do HBV, mostrando partículas de Dane (infectantes, esférica, 42 nm) e partículas não infectantes (tubulares).

A figura 2 mostra partículas virais completas, também chamadas partículas de Dane, infectantes, esférica, com diâmetro de aproximadamente, 42 nm e compostas de um envelope externo protéico que apresenta o antígeno de superfície (HBsAg).

As partículas não infectantes são esféricas ou filamentosas, apresentam um diâmetro de 22 nm, sendo estas últimas de comprimento variável. As partículas não infectantes são compostas exclusivamente de HBsAg e são encontradas em grande quantidade (em torno de 10^{13} por mL) no soro de indivíduos infectados (GOMES 2007).

O HBsAg possui diversos determinantes antigênicos, denominados: “a”, “d”, “y”, “w” e “r”, que através de suas combinações permitiu a classificação em nove subtipos diferentes: *ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- e adrq+* (COUROUCE-PAUTY et al. 1978). Esses subtipos são importantes para investigação de casos com múltiplas exposições, sendo fundamentais em estudos epidemiológicos (BROOKS et al. 2000, SILVA 2003).

Em relação às variantes do HBV foram classificados seis genótipos denominados pelas letras do alfabeto de A-F, por comparação das seqüências nucleotídicas do gene pré-S/S (NORDER et al. 1992) ou do genoma completo (NORDER et al. 1994). Estes genótipos não estão necessariamente correlacionados com os subtipos. No entanto, todas as cepas ayw4 e adw4 conhecidas até o presente se agrupam nos genótipos E e F, respectivamente. Os genótipos A e B geralmente abrigam cepas adw e o genótipo C, cepas adw, adr e ayr.

2.2- Aspectos clínicos e laboratoriais da hepatite B

O indivíduo, uma vez infectado, pode evoluir para três formas: recuperação completa com desenvolvimento da imunidade, após infecção aguda sintomática ou assintomática; estado de portador crônico, com diversas formas de acometimento clínico e a hepatite

fulminante. A idade do indivíduo infectado é importante quanto à evolução da hepatite B, constituindo o principal fator da forma evolutiva da doença. Quanto mais jovem a criança, maior a chance de se tornar portadora, ou seja, 25% das crianças infectadas antes dos 07 anos tornar-se-ão portadoras crônicas. E após esta idade, exibirão padrão epidemiológico semelhante aos adultos, com 5% a 10% tornando-se portadores crônicos (BEASLEY et al. 1982, COURSAGET et al. 1987, GONÇALES et al. 1996, LEE et al. 1997, FERREIRA et al. 2000). A hepatite crônica pode ser classificada, do ponto de vista histológico, em graus de atividade inflamatória e de fibrose (BEDOSSA et al. 1996).

Em relação ao diagnóstico laboratorial da hepatite B, os parâmetros hematológicos e bioquímicos são úteis como adjuvantes. Todavia é necessária a confirmação pelos métodos sorológicos específicos, que buscam identificar no soro os antígenos (HBsAg e HBeAg) e os anticorpos (anti-HBc total, anti-HBc IgM, anti-HBs e anti-HBe) presente nesta infecção. Estes marcadores aparecem e desaparecem do soro de acordo com a fase evolutiva da infecção, e podem ser correlacionados temporalmente com a ocorrência de sinais clínicos como: a icterícia e com as elevações e quedas dos níveis das aminotransferases séricas (ALT e AST) (JÚNIOR & GONÇALES 2007).

O HBsAg é detectável rotineiramente por ensaio imunoenzimático (ELISA), antes do início dos sinais clínicos e bioquímicos da doença, ou seja, pode ser detectado de 2 a 6 semanas, atingindo o pico durante a fase aguda, declinando a níveis indetectáveis em 3 a 6 meses. A identificação deste marcador revela infecção atual, porém sua persistência por mais de 06 meses indica estado de portador ou infecção crônica pelo HBV (PINHO et al. 1995, JÚNIOR & GONÇALES 2007).

O anti-HBs é o anticorpo específico contra o HBsAg, que também é detectável pelo ELISA e comporta-se como um anticorpo IgG típico. Eleva-se após o desaparecimento do

HBsAg, permanecendo elevado durante anos, conferindo proteção e geralmente significa o término da infecção aguda. Este é o princípio da vacinação, que emprega o HBsAg não infeccioso, obtido através de técnicas de DNA recombinante, para obtenção do anti-HBs. Existe porém, na infecção aguda, o período chamado de janela imunológica, onde não se detecta o HBsAg no soro e ainda não há níveis detectáveis do anti-HBs. Por outro lado, quando é detectado o HBsAg e o anti-HBs, concomitantemente, pode-se pensar em três possibilidades: reação falso positiva de um dos testes; formação de imuno-complexos e infecções por diferentes subtipos do HBV (PINHO et al. 1995, JÚNIOR & GONÇALES 2007).

O anti-HBc total engloba as classes de anticorpos IgM e IgG, não indica imunidade para o HBV e na fase de janela imunológica, o diagnóstico para HB somente poderá ser feito pela pesquisa desse marcador. O anti-HBc IgM é o primeiro anticorpo a aparecer sendo importante para o diagnóstico de infecção recente pelo HBV. A não detecção deste marcador após o encontro do anti-HBc total positivo, significa que só há presença de IgG, indicando que o indivíduo entrou em contato com o vírus. Este marcador permanece detectável em amostra sérica por toda a vida do indivíduo. Há uma estimativa que 10 a 20% de indivíduos com marcadores para o HBV apresentam o anti-HBc total como único marcador, isto é, anti-HBc total isolado. Isso pode ser visto em quatro diferentes situações: infecção pelo HBV resolvida após desaparecimento do HBsAg, todavia o anti-HBs permanece indetectável (período de janela imunológica); perda do anti-HBs muitos anos após a recuperação, resultado falso-positivo ou em casos de infecção oculta para o HBV com baixo nível de replicação (HOOFNAGLE et al. 1991, HU 1994, Lee 1997, CHAN & LOK 1999, GROB et al. 2000, BRECHOT et al. 2001).

O HBeAg é um marcador de replicação viral, geralmente indicando doença ativa e altos níveis de infectividade. É um antígeno solúvel e em geral não é utilizado com finalidade diagnóstica, sendo detectado no soro pelo ELISA logo após o HBsAg, nos primeiros 3 meses da doença aguda. O anti-HBe é o anticorpo específico contra o HBeAg, indica que a infecção está se resolvendo, mesmo que o HBeAg ainda esteja presente. Nas infecções agudas e crônicas sua presença informa que a doença está inativa e que o vírus não está se multiplicando nos hepatócitos. No entanto, em pacientes infectados com mutantes pré-core do HBV ou em imunodeprimidos, essa associação pode ser desfeita e a replicação pode ocorrer na presença do anti-HBe (PINHO et al. 1995, JÚNIOR & GONÇALES 2007).

Os métodos moleculares, apesar de não serem utilizados rotineiramente, são importantes na detecção, quantificação e seqüenciamento do DNA-HBV. A identificação do genoma viral no soro é proporcional à carga viral presente na amostra. O diagnóstico molecular é aplicado para monitorar a infecção pelo HBV e a resposta ao tratamento antiviral. Diversas técnicas e testes comerciais, como: Amplificação Mediada pela Transcrição (TMA); hibridização; técnicas baseadas na amplificação do sinal e do alvo (PCR) foram desenvolvidas para a verificação e quantificação do DNA-HBV em fluidos corporais (GERMANIDIS & PAWLOTSKY 2007).

A PCR é útil para diagnosticar pacientes com mínimos níveis virêmicos e em casos especiais, onde as demais provas não comprovam a infecção pelo HBV ou em casos de suspeita de mutação (SITNIK et al. 2004). A PCR *in house* para a pesquisa do DNA-HBV apresenta limite de detecção variando de 10 a 300 cópias/mL, comumente é mais sensível do que os testes comerciais disponíveis. Além disso, a imunohistoquímica pode ser utilizada para a pesquisa do HBcAg e HBsAg no tecido hepático (GONÇALES et al. 2003, JÚNIOR & GONÇALES 2007).

2.3- Aspectos epidemiológicos da hepatite B

A infecção pelo HBV constitui um grande problema de saúde pública mundial, onde se estima que cerca de dois bilhões de pessoas já tiveram contato com o vírus (OMS). Aproximadamente 350 milhões são portadores crônicos e apresentam um alto risco para o desenvolvimento de cirrose e hepatocarcinoma (KIFFER et al. 2007).

A presença do HBsAg em todos os fluidos corporais torna possível sua transmissão por diversas vias, como: parenteral, sexual, vertical e iatrogênica. As principais formas de contágio são: transfusão de sangue ou derivados; uso de drogas intravenosas; acidentes com agulhas, principalmente entre profissionais da área de saúde; relações sexuais; transmissão perinatal; transplante de órgãos ou tecidos e lesões de pele (KIFFER et al. 2007).

Os casos crônicos de hepatite B correspondem a cerca de 1% da população brasileira. A maioria das pessoas desconhece seu estado de portador e constitui um elo importante na cadeia da transmissão do HBV (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003). A prevalência da infecção crônica pelo HBV tem ampla variação no mundo, distinguindo-se áreas de endemicidade elevada, como: África, Ásia, áreas da América Latina e leste da Europa, com prevalência superior a 8%; intermediária no sul e leste da Europa, Japão, Índia e partes da Ásia, América do Sul e Central, que apresentam de 2 a 7% e regiões de baixa endemicidade com prevalência inferior a 2%, na Austrália, América do norte e parte do oeste da Europa (SILVEIRA et al. 1999, TANAKA et al. 2000, FERREIRA et al. 2000).

No Brasil, de acordo com o Programa Nacional das Hepatites Virais (PNHV), em estudo de base populacional, verificou que no Nordeste do Brasil, na faixa etária dos 20 aos 69 anos, 13,1% (192/1466) da população já teve contato com o HBV. Destes, 0,89% desenvolveram a doença e 0,55% passaram para o quadro de hepatite crônica.

A hepatite B é considerada uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST), embora o vírus esteja em pequena quantidade no sêmen, fluido vaginal e saliva. A infecção quando acomete mulheres em idade fértil poderá transmitir o vírus aos seus descendentes. Oliveira et al. (2001) encontraram uma soroprevalência para os marcadores anti-HBc total, HBsAg e anti-HBs em pacientes atendidos nas clínicas de IST da Universidade Federal Fluminense no Rio de Janeiro de 13%, 3.4% e 8.5%, respectivamente.

A exposição parenteral representa um fator de risco para a infecção pelo HBV, uma vez que uma maior concentração do vírus é encontrada no sangue, portanto hemofílicos, usuários de drogas e hemodialisados são bem afetados (KIFFER et al. 2007). Martins et al. (2004) analisaram 102 hemofílicos do Estado de Goiás e encontraram uma prevalência global de 43,7% para infecção pelo HBV. No estado do Rio de Janeiro foi encontrado uma prevalência do HBsAg, anti-HBc and anti-HBs de 7,8; 55,8 e 24,7%, respectivamente, em uma população de usuários de drogas (IDUs) (OLIVEIRA et al. 1999).

Alguns fatores de risco podem levar ao aumento da prevalência do HBV em pacientes hemodialisados como: tempo de hemodiálise, número de unidades de sangue transfundidas, idade, realização do tratamento em mais de uma clínica, número de pacientes por unidade de diálise, tipo de equipamento de diálise, higiene e esterilização dos equipamentos, número de vezes de reutilização dos filtros dos dialisadores, número de pacientes por profissionais, nível de escolaridade, sexo e história de hepatite (TELES et al, 1998; BUSEK et al, 2002; CARRILHO et al, 2004). Todavia a transmissão da hepatite B em centros de hemodiálise tem sido controlada em alguns países, devido à utilização das precauções universais, práticas de controle da infecção e vacinação freqüente em pacientes susceptíveis (WONG et al. 2005).

A soroprevalência para o HBsAg em pacientes hemodialisados varia entre diferentes localidades e apresenta uma correlação com a endemicidade do vírus na população geral da

região (WONG et al. 2005). Assim as prevalências encontradas foram: 0,8% no Canadá, 0,9% nos USA, 1,6% no Japão, 10% em Hong Kong, 11,8% na Arábia Saudita, 16,8% em Taiwan (OGUCHI et al. 1992, CHEN et al. 1996, LEUNG et al. 2000, ALMAWI et al. 2004, MINUK et al. 2004, TOKARS et al. 2004).

No Brasil, a infecção pelo HBV continua a ser um importante problema em unidades de hemodiálise, cuja prevalência do HBsAg varia de 2,4 a 12% em Goiás; 4% em Tocantins; 4,4% em Belo Horizonte; 10% em Santa Catarina; 14,1% em Porto Alegre; 7,8 a 28% em São Paulo; 20% em Salvador (PARANÁ et al. 1991, PINHO et al. 1994, CENDOROGLO NETO et al. 1995, TELES et al. 1998, MATTOS et al. 1999; BUSEK et al. 2002, SOUZA et al. 2003, CARRILHO et al. 2004, FERREIRA et al. 2006).

Pacientes hemodialisados geralmente apresentam uma carga viral menor que 10^4 cópias/mL. Fatores que resultam em baixa replicação viral do HBV, apesar da imunodeficiência causada pela uremia, permanecem desconhecidos. A passagem do genoma viral pelos dialisadores utilizados durante o tratamento poderia ser a explicação, como também o aumento de interferon ou outras citocinas durante o procedimento hemodialítico, tem sugerido as causas dessa observação (FABRIZI et al. 2008). Prevalências de 76,5% (62/81) e 88,2% (30/34) do DNA-HBV encontradas em pacientes HBsAg positivos, podem disseminar o vírus se a unidade não utilizar as precauções universais (TELES et al. 1998, CARRILHO et al. 2004, Ministério da saúde 2004).

O meio mais efetivo de prevenção da hepatite B é a vacinação recomendada para pacientes hemodialisados susceptíveis desde 1982 (JUNGERS et al, 1982). Todavia, ainda encontram-se pacientes sem vacinação completa, como um estudo realizado em Goiânia, onde somente 10% (28/282) dos hemodialisados tinham sido vacinados (TELES et al, 1998).

A distribuição dos genótipos e subtipos do HBV varia em diferentes áreas geográficas (MAGNIUS & NORDER 1995, ARAUZ-RUIZ et al. 1997, ORITO et al. 2001, LIU et al. 2002, MELLO et al. 2007). Manifestações clínicas e a resposta terapêutica podem diferenciar em função dos diferentes genótipos do HBV (KAO et al, 2002).

No Brasil poucos dados são referidos sobre os genótipos, porém sabe-se que o A, D e F são os que mais circulam neste país. Um estudo realizado com isolados provenientes do Pará, Recife, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, foram encontrados os genótipos A, D e F (MELLO et al. 2007). Sitnik et al. (2004) estudaram 103 amostras de pacientes com hepatite B crônica de diferentes regiões do Brasil e encontraram as seguintes freqüências: A (49,5%), B (2,9%), C (13,6%), D (24,3%) e F(9,7%) e os subtipos: adw, ayw, adr e adw4.

Há poucos estudos referentes à genotipagem em pacientes hemodialisados. No Brasil estudos realizados nos Estados de Santa Catarina, Goiás e Tocantins mostraram uma distribuição dos genótipos A, D e F (TELES et al. 1999, TELES et al. 2001, SOUZA et al. 2003, CARRILHO et al. 2004, FERREIRA et al. 2006). Já na Indonésia o genótipo B foi encontrado em todos os pacientes hemodialisados de uma unidade de um hospital em Surabaya (LUSIDA et al. 2003).

O estudo realizado em Santa Catarina encontrou os genótipos A, D e F tanto em pacientes hemodialisados quanto em profissionais de saúde que cuidavam dos mesmos. Esses dados sugerem uma possível transmissão nosocomial entre pacientes e profissionais ou vice-versa (CARRILHO et al, 2004).

2.4- Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B

Após uma infecção aguda pela HBV adquirida na vida adulta, cerca de 90-95% dos indivíduos obtêm resolução da infecção, normalização das aminotransferases, soroconversão do HBeAg para o anti-HBe e, finalmente, soroconversão do HBsAg para o anti-HBs. Desta forma, a negativação sérica do HBsAg associada ao surgimento do anticorpo anti-HBs são classicamente reconhecidos como marcadores de clareamento viral. Este desfecho é chamado de "infecção resolvida pelo HBV" e os indivíduos que desenvolvem este perfil sorológico são freqüentemente considerados como "curados", não merecendo cuidados médicos específicos posteriores. Entretanto, vários estudos têm demonstrado que a recuperação de um episódio de hepatite B aguda ou mesmo a resposta virológica induzida por terapia antiviral podem não resultar em eliminação completa do HBV, havendo persistência de DNA viral de quantidade detectável por ensaios baseados em técnica de PCR de alta sensibilidade. O cccDNA pode permanecer na forma de epissoma no núcleo dos hepatócitos e voltar a replicar em um dado momento do tempo (HU 2002, RAIMONDO et al. 2006). A presença de DNA-HBV em amostras séricas ou de tecido hepático em pacientes com HBsAg negativo tem sido chamada de infecção oculta pelo HBV. Esta condição, também chamada de "infecção latente pelo HBV", "infecção silenciosa pelo HBV" ou ainda "infecção HBsAg negativa pelo HBV", já foi descrita em populações de perfis variados, desde indivíduos normais (população geral e doadores de sangue) até portadores de carcinoma hepatocelular (GROB et al. 2000, BRECHOT et al. 2001, CONJEEVARAN & LOK 2001, HU 2002, TORBENSON & THOMAS 2002).

2.4.1- Aspectos Epidemiológicos da Infecção Oculta pelo HBV

A inexistência de estudos de prevalência em populações não selecionadas, a diversidade de sensibilidades e a ausência de padronização das técnicas de Biologia Molecular utilizadas nos diversos estudos contribuem sobremaneira para que a real prevalência da infecção oculta pelo HBV não seja conhecida. Fato comum a estas informações é a maior freqüência do DNA-HBV em fragmentos obtidos por biópsia hepática do que em amostras séricas (OHKOSH et al. 1991, RUIZ et al. 1992, SHITANI et al. 2000, GONÇALES et al. 2003, POLLICINO et al. 2004, TORBENSON et al. 2004, WAGNER et al. 2004, HUI et al. 2006). Além disso, os estudos são igualmente concordantes em demonstrar que a infecção oculta pelo HBV cursa com baixos níveis de DNA-HBV, em geral, inferiores a 10^4 cópias/mL no soro e ao redor de 0,01 a 0,1 cópia/hepatócito (WEINBERGER et al. 2000, BRÉCHOT et al. 2001). Assim, a prevalência da infecção oculta pelo HBV é dependente do tipo de material analisado e da sensibilidade do ensaio utilizado. Da mesma forma, aumenta na proporção direta da endemicidade da infecção crônica pelo HBV na região estudada, assim como varia significativamente em função do tipo de subgrupo avaliado (menor em pré-doadores de sangue e maior em indivíduos com indícios de hepatopatia ou infectados pelo HCV ou HIV (KAO et al. 2002, RAIMONDO et al. 2006).

Alguns estudos relatam a existência do DNA-HBV em pacientes soronegativos para o HBsAg, com o perfil de anti-HBc isolado, com anti-HBc + anti-HBs reagentes e sem marcador sorológico (WANG et al, 1991; NANDI & BANERJEE, 1992; SÁNCHEZ-QUIJANO et al, 1993; JAMELKA et al, 1994; JILG et al, 1995; GOMES et al, 1996; LEWIS-XIMENEZ et al, 2001; ARRAES et al, 2003, MINUK et al. 2004). Entre indivíduos com hepatite crônica HBsAg negativa, o DNA-HBV pode ser identificado em 3,5 a 70% dos

casos (média de 40%), com maior freqüência na presença de anti-HBc positivo com ou sem anti-HBs do que entre pacientes com sorologia negativa para HBV (média de 43% vs. 37%) (LIANG et al. 1991, PORCHON et al. 1992, FUKUDA et al. 1996, ATTALLAH et al. 1998, BERASAIN et al. 2000, CHEMIN et al. 2001, CHAUDHURI et al. 2004). Estudos envolvendo portadores de carcioma hepatocelular HBsAg negativos detectaram a presença de infecção oculta pelo HBV em mais de 50% dos pacientes com anti-HBc positivo e em aproximadamente um terço dos indivíduos sem marcadores sorológicos de contato prévio com HBV (PATERLINI et al. 1990, COURSAGET et al. 1991, RUIZ et al. 1992, BRÉCHOT et al. 1998, SHIOTA et al. 2000, YOTSUYANAGI et al. 2000, POLLICINO et al. 2004). Ainda no campo das hepatologias de etiologia indeterminada, 0 a 80% das amostras de soro e 0 a 50% dos fragmentos de tecido hepático, provenientes de pacientes com hepatite aguda idiopática, com ou sem insuficiência hepática aguda, têm o DNA-HBV detectável por PCR (WRIGHT et al. 1992, FERAY et al. 1993, UCHIDA et al. 1997).

Outro contexto clínico em que a infecção oculta pelo HBV foi pesquisada diz respeito à persistência de DNA-HBV detectável após a aparente resolução da infecção aguda ou após a perda do HBsAg em portadores crônicos. Estudos com longos períodos de seguimento demonstraram que cerca de 65% dos indivíduos que haviam resolvido espontaneamente a infecção aguda pelo HBV, possuíam DNA-HBV detectável no soro 10 a 30 anos depois (YOTSUYANAGI et al. 1998). Já entre aqueles portadores crônicos do HBV que clarearam o HBsAg, de forma espontânea ou induzida por terapia antiviral, o DNA-HBV pode ser identificado em 28% e 94% das amostras de soro e tecido hepático, respectivamente (ADACHI et al. 1992, LORIOT MA et al. 1997, HUO et al. 1998, GANDHI et al. 2000, KATO et al. 2000, AHN et al. 2005).

A infecção oculta pelo HBV não é restrita àqueles com doença hepática, podendo ser encontrada na ausência de sinais clínicos ou laboratoriais de hepatopatia. Estudos que avaliam amostras populacionais aleatórias e pré-doadores de sangue evidenciaram taxas de positividade do DNA-HBV que variaram entre 0 a 58% e 0 a 50% respectivamente (SHIN et al. 1990, COURSAGET et al. 1991, PÃO et al. 1991, CHABAUD et al. 1993, JILG et al. 1995, JURINKE et al. 1998, NOBORG et al. 2000, SÛNBÛL et al. 2000, WEINBERGER et al. 2000). Neste contexto, a infecção oculta pelo HBV praticamente se restringe a indivíduos com HBsAg negativo, anti-HBc positivo com ou sem anti-HBs, à exceção de alguns casos descritos em indivíduos com sorologia negativa (MINUK et al. 2004).

Indivíduos infectados pelo HCV ou pelo HIV, freqüentemente envolvidos em exposições parenterais, encontram-se sob risco aumentado de contato com o HBV e, portanto, poder-se-ia esperar que a prevalência da infecção oculta pelo HBV fosse elevada nestes subgrupos. De fato, cerca de 40% dos indivíduos com hepatite C crônica, com ou sem carcinoma hepatocelular, possuem o genoma viral do HBV detectável, principalmente na presença de anti-HBc total positivo. Pacientes infectados com HCV apresentam um percentual de 25,4% (16/63) e 11,8% (15/127) do DNA-HBV em pacientes apresentando anti-HBc total isolado e anti-HBc total + anti-HBs, respectivamente. Pacientes com HCV apresentando hepatocarcinoma foi encontrado um percentual de 22% (11/50) de DNA-HBV, com hepatite crônica em 14,5% (16/110) e em cirróticos, 8,0% (4/50) (KAO et al. 2002). Neste mesmo estudo, pacientes anti-HCV negativos, considerados como grupo controle saudáveis, porém apresentando marcadores para o HBV, verificou-se 25% (2/8) em pacientes anti-HBc total isolado e 15,9% (13/82) em pacientes anti-HBc total + anti-HBs.

Já entre indivíduos HIV positivo, o DNA-HBV foi detectado em 0 a 60% dos indivíduos com anti-HBc isolado, principalmente na presença de infecção dupla com HCV

(HOFER et al. 1998, NÚÑEZ et al. 2002, GONÇALES JÚNIOR et al. 2003, WAGNER et al. 2004, NEAU et al. 2005). A significância clínica do anti-HBc total isolado no soro não está clara em pacientes hemodialisados como também em populações que não realizam tratamento hemodialítico (FABRIZI et al. 2005).

A infecção oculta para o HBV em pacientes hemodialisados varia de 0 a 58% (CABRERIZO et al, 1997, BESISIK et al. 2003, MINUK et al. 2004, FABRIZI et al. 2005, GORAL et al. 2006, KANBAY et al. 2006, SIAGRIS et al. 2006).

Estudos têm avaliado pacientes hemodialisados para identificar prevalência da infecção oculta pelo HBV, todavia implicações clínicas dessa infecção permanecem desconhecidas (HU 2002). Fabrizi et al. (2005) não encontraram pacientes com infecção oculta, todavia verificaram 20,8% de pacientes com anti-HBc total isolado. Minuk et al (2004) ao analisarem 241 pacientes hemodialisados de um centro do Canadá encontraram uma soronegatividade para o HBsAg em 239 pacientes, entretanto 09 (3.8%) apresentaram positividade para o DNA-HBV com carga viral variando de $6,5 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^4$ cópias/mL.

2.4.2- Mecanismos fisiopatogênicos da Infecção Oculta pelo HBV

A fisiopatogenia da infecção oculta pelo HBV é ainda apenas parcialmente compreendida sendo, provavelmente, multifatorial. Não é sabido se a presença de replicação residual do HBV traduz de fato um evento de relevância biológica ou se reflete meramente um epifenômeno cuja detecção tornou-se possível com o advento de novas técnicas de biologia molecular altamente sensível. Fatores poderiam estar envolvidos no desenvolvimento da infecção oculta pelo HBV, tais como a integração de seqüências de DNA-HBV no DNA cromossômico do hospedeiro; infecção de células mononucleares periféricas; formação de

imunocomplexos HBsAg/anti-HBs; mutações genótipo-específicas do HBV; etilismo e outros ainda não identificados (PATERLINI et al. 1990, JOLLER-JEMELKA et al. 1994, GANNE-CARRIÉ et al. 1995, YOTSUYANAGI et al. 1998, WEINBERGER et al. 2000, HU 2002).

Fatores imunológicos, interferência viral e mutações do HBV são alguns dos mecanismos possivelmente implicados (RAIMONDO et al. 2006).

2.4.2.1- Fatores Imunológicos

O desfecho da infecção aguda pelo HBV – resolução ou cronificação – depende da cinética da interação vírus-hospedeiro, a qual é determinada, fundamentalmente, pela intensidade e qualidade da resposta imune do hospedeiro, inata e adaptativa, humoral e celular (HU 2002).

O fígado é um órgão rico em células envolvidas na resposta imune inata, tais como células natural killer (NK), células T natural killer (NKT), macrófagos especializados (células de Kupffer) e células dendríticas. Estas células podem promover a lise de hepatócitos infectados e são capazes de produzir diversas citocinas pró-inflamatórias que exercem atividade inibitória direta não-citolítica sobre replicação viral. Assim, as células envolvidas na resposta imune inata são as responsáveis pela primeira etapa do controle viral, ainda no período de incubação. Nos casos em que o sistema imune obtém sucesso em controlar a infecção aguda pelo HBV e evita a persistência da infecção, o clareamento da maior parte dos vírions ocorre durante o período de incubação (REHERMANN et al. 1995). Em seguida, há uma amplificação do infiltrado inflamatório no parênquima hepático, fenômeno que coincide com indícios clínicos de injúria hepática aguda. Este infiltrado é resultante da ação de macrófagos e células dendríticas que, além de promoverem a ativação e manutenção da

resposta imune inata, produzem diversas citocinas capazes de recrutar e ativar um contigente adicional de células inflamatórias inespecíficas e antígeno-específicas (WILLIAMS & NAOUMOV 2007).

Uma terceira e importante função da resposta imune inata é a de iniciar a resposta imune adaptativa (antígeno-específica), através da criação de um ambiente propício de citocinas e quimiocinas, recrutamento de células inflamatórias linfomonucleares e expressão de antígenos virais por meio de moléculas de MHC classe I e II. A resposta imune adaptativa reconhece especificamente os hepatócitos infectados pelo HBV e induz e perpetua a memória imunológica HBV-específica. Portanto, em última análise, a imunidade adaptativa é responsável pelo controle definitivo da replicação viral na infecção pelo HBV e pela proteção contra a re-infecção (REHERMANN et al. 2003). Este controle associa a uma resposta imune intensa, policlonal e multiespecífica mediada por linfócitos T CD4+ e CD8+, direcionada às diversas proteínas do HBV. Os linfócitos T CD4+ promovem a ativação e a diferenciação dos linfócitos B para a produção de anticorpos HBV-específicos (resposta Th2, mediada por interleucinas 4,5 e 6) e ativam macrófagos, que passam a fagocitar os hepatócitos infectados (resposta Th1, mediada por interferon γ, TNFα e interleucina 2). Já os linfócitos CD8+, ativados pelos linfócitos CD4+ (resposta Th1) e pelas células dendríticas, atuam em três frentes: lise de hepatócitos infectados, indução de apoptose (por contato direto) e inibição da replicação e expressão gênica do HBV por mecanismos não-citolíticos, com a participação de TNFα e interferon γ (ANDO et al. 1994, GUIDOTTI et al. 1996, GUIDOTTI et al. 1999, JUNG & PAPE 2002, REHERMANN et al. 2003).

Após a resolução da hepatite B aguda, há uma redução drástica do número de linfócitos T CD4+ e CD8+ HBV-específicos, tanto no fígado quanto no sangue periférico. Entretanto, a responsividade das células restantes a uma eventual re-exposição a peptídeos

virais é preservada por várias décadas após a recuperação clínica e sorológica completa da infecção aguda, havendo rápida proliferação de clones de linfócitos T e produção de citocinas (PENNA et al. 1996, REHERMANN et al. 1996, MAINI et al. 1999). A manutenção da responsividade dos linfócitos CD4+ provavelmente decorre do estímulo antigênico contínuo, fornecido por antígenos virais retidos e apresentados por células dendríticas contidas em linfonodos regionais. Por outro lado, a ativação dos linfócitos CD8+ depende da apresentação de peptídeos derivados de proteínas de síntese endógena. Desta forma, a rápida resposta dos linfócitos CD8+ a um novo contato com antígenos do HBV vários anos ou décadas após a resolução do quadro agudo sugere a presença de partículas virais produzidas por transcrição ativa (REHERMANN 2003). Além disso, a persistência de pequenos níveis de DNA-HBV circulante correlacionou-se à intensidade da resposta imune induzida mediada por linfócitos T HBV-específicos (REHERMANN et al. 1996).

Assim, a persistência da replicação do HBV em pequena escala pode prover, de forma contínua, o mínimo estímulo necessário para a manutenção de linfócitos T HBV-específicos. Estas células, por conseguinte, juntamente com anticorpos dirigidos contra o HBV, poderiam controlar a replicação viral, prevenindo o recrudescimento da doença hepática (WILLIAMS & NAOUMOV 2007).

2.4.2.2- Interferência Viral

Nos últimos vinte anos, vários estudos sobre infecções múltiplas por vírus hepatotrópicos têm documentado a capacidade de um vírus exercer efeito inibitório sobre a atividade replicativa do(s) outro(s). É sabido que o HDV (Vírus da Hepatite D) exerce potente efeito inibitório sobre a replicação do HBV e, mais recentemente, postula-se que o HCV

possa também exercer ação supressora sobre a replicação do HBV, mantendo-se em níveis mínimos, permitindo o status de anti-HBc total isolado (HU 2002, RAIMONDO et al. 2006). Esta inibição já foi demonstrada em modelos animais (chimpanzés) e em estudos humanos, os quais detectaram níveis baixos de DNA-HBV e uma maior freqüência de clareamento do HBsAg (BROTMAN et al. 1993, MIMMS et al. 1993). Também estudos *in vitro* identificaram evidências moleculares da capacidade inibitória do HCV sobre a expressão de proteínas do HBV (SHIH et al. 1993, UCHIDA et al. 1997). Além disso, a infecção dupla HBV-HCV parece favorecer o surgimento de deleção específica em uma região do gene X, mutação este que não tem sido descrita em portadores de hepatite B crônica HBsAg-positiva (FUKUDA et al. 1996, UCHIDA et al. 1997, FUKUDA et al. 1999). Esta mutação também se associou a uma maior carga viral do HCV em indivíduos com infecção dupla HBV-HCV com HBsAg negativo, quando comparados àqueles com infecção apenas pelo HCV. Todavia, é improvável que esta mutação explique completamente a interferência do HCV sobre o HBV, considerando que cerca de 30% dos portadores daquela deleção também abrigam a variante nativa do HBV, o que deveria assegurar atividade replicativa próxima do habitual (FUKUDA et al. 1999).

2.4.2.3- Mutações do HBV

A variabilidade genética do HBV já foi detalhadamente descrita em indivíduos HBsAg positivo e tal variabilidade poderia ser igualmente aplicada aos portadores de infecção oculta pelo HBV (BRÉCHOT et al. 2001, LOCARNINI et al. 2003). Mutações nas regiões S, pré-S1 e pré-S2 têm sido associadas com prejuízo da capacidade replicativa, diminuição da infectividade das partículas virais e redução da expressão do HBsAg, o que poderia justificar

os níveis baixos de DNA-HBV tipicamente encontrados em portadores da infecção oculta e a ausência de HBsAg detectável pelos métodos atualmente utilizados (MELEGARI et al. 1994, HOU et al. 1995, CARMAN et al. 1997, WEINBERGER et al. 2000, MINUK et al. 2004, CHAUDHURI et al. 2004). Além das mutações S/pré-S, uma deleção específica de oito nucleotídeos na região distal da fase de leitura aberta do gene X do HBV tem sido identificada em portadores crônicos do HCV com infecção oculta pelo HBV (BARONE 2007).

É fundamental ressaltar, entretanto, que outros estudos demonstraram que a maioria das infecções HBsAg negativa se associava a variantes nativas do HBV (MARUSAWA et al. 2000, WAGNER et al. 2004). Além disso, as dificuldades técnicas inerentes à manipulação de cargas virais baixas dificultam a amplificação de seqüências genômicas completas do HBV, o que inviabiliza a avaliação do impacto real destas mutações no contexto da infecção oculta pelo HBV (BRÉCHOT et al. 2001, Hu 2002).

Mutantes pré-core foram primeiramente descritos na Itália, envolvendo casos negativos para o HBeAg, porém positivos para HBsAg, anti-HBc, anti-HBe e DNA-HBV (em níveis mais baixos que indivíduos HBeAg positivos), bem como com HBcAg detectável no fígado. Estes casos são particularmente comuns na bacia mediterrânea e no extremo Oriente. Encontrou-se, nesses pacientes, mutação na região pré-core do genoma viral (posições 1896/1899), que origina um códon de terminação, abortando a síntese do HBeAg. Tais casos são geralmente mais graves, talvez devido ausência do papel modulador de resposta imune desempenhado pelo HBeAg evoluindo para hepatite crônica ativa intensa, com presença de anticorpos anti-HBe e DNA-HBV no soro (BRUNETTO et al. 1990). Outra variante foi encontrada em um indivíduo homossexual, soropositivo para HIV, que não produziu anti-HBc, mas positivo para HBsAg, HBeAg e níveis muito elevados de DNA-HBV. Com o seqüenciamento do genoma viral, foram encontradas mutações nas regiões pré-

core e core, com a produção de um antígeno diferente do nucleocapsídeo viral (BHAT et al. 1990).

Em amostras de crianças nascidas de mães soropositivas para o HBsAg, o seqüenciamento do genoma do HBV permitiu identificar uma mutação na posição 587, que altera a antigenicidade da proteína S, permitindo o escape do vírus face aos anticorpos neutralizantes (CARMAN et al. 1990). Essas variantes com mutações em regiões antigênicas neutralizantes do HBsAg são muito importantes, pois além de escaparem aos esquemas de profilaxia preconizados, podem não ser detectadas pelos "kits" comerciais que utilizam anticorpos dirigidos contra este epítopo.

Sitnik et al. (2004) analisando as seqüências de suas amostras encontraram mutações na região do epítopo "a" em dois pacientes asiáticos. Uma amostra do genótipo B tinha uma mutação T126S, previamente associada com a resistência a Imunoglobulina para hepatite B (HBIg) e uma outra do genótipo C, tinha uma mutação que estava associada com a resistência à vacina. O mutante do gene S (G145R) também apresenta importância em diversos países, pois sua presença vem sendo descrita em locais com maior freqüência de uso de HBIg. Esse mutante apresenta grande capacidade de escape imunológico, já que não expressa o HBsAg (KIFFER et al. 2007).

A determinação das mutações devido à alta diversidade de determinantes antigênicos do HBV é de grande importância em centros de hemodiálise. Sitnik et al. (2000) ao analisarem a seqüência do DNA-HBV dos 17 pacientes hemodialisados que soroconverteram para o HBsAg em um período de 03 anos, foi encontrada uma similaridade de 100% entre os isolados. A similaridade encontrada em uma mesma unidade sugere fortemente uma contaminação pela mesma cepa viral, conseqüentemente, uma transmissão nosocomial. Esses achados representam um importante avanço na epidemiologia do HBV e estudos semelhantes

a este, em outras regiões do Brasil, devem ser realizados. Minuk et al. (2004) encontraram 09 pacientes hemodialisados HBsAg negativos (3,8%) que apresentavam o DNA-HBV, 07 (78%) apresentavam mutações (sG145R). Quatro deles apresentavam o anti-HBs positivo com doses completas da vacina e 03 não apresentavam nenhum marcador sorológico.

As especificidades d/y e w/r são causadas por mutações pontuais que levam as substituições de aminoácidos K/R nas posições 122 e 160 da seqüência da proteína S. Raros mutantes possuem asparagina (N) na posição 160, com ausência de especificidade w/r. Outro mutante sem especificidade d/y foi também encontrado. Este mutante, entretanto, possui o aminoácido glutâmico (E) e alanina (A) nas posições 144 e 145, indicando que outros aminoácidos, além da posição 122, influenciam também a especificidade d/y. A divergência das seqüências do genoma completo dentro de um mesmo genótipo é de aproximadamente 8%, semelhante à encontrada em diferentes subtipos (GOMES 2007).

Pacientes submetidos à terapia com drogas antivirais, como a lamivudina, podem apresentar mutações no sítio catalítico da polimerase do HBV (YMDD) que causam resistência às drogas (BARONE 2007).

2.5- Relevância da infecção Oculta para o HBV

Os primeiros indícios de existência da infecção oculta pelo HBV surgiram há mais de duas décadas, quando da observação de casos de hepatite B aguda pós-transfusional a partir de doadores com HBsAg negativo e anti-HBc positivo (HOOFNAGLE et al. 1978, LANDER et al. 1978) .

Embora a existência da infecção oculta pelo HBV tenha sido documentada há vários anos, a importância clínica desta entidade não foi ainda completamente compreendida.

Existem indícios de que a infecção oculta pelo HBV possa exercer papel patogênico em diversos contextos clínicos, de forma direta ou em ação sinérgica com outros agentes. A transmissibilidade do HBV a partir de portadores de infecção oculta não se restringe à via transfusional, tendo sido também observada em casos de hepatite B após transplante hepático com utilização de enxertos provenientes de doadores HBsAg negativo e anti-HBc positivo (CHAZOUILLÈRES et al. 1994, UEMOTO et al. 1998). O risco de aquisição do HBV após transplante renal com doador portador de HBV oculto parece ser menor do que aquele associado ao transplante hepático (WACHS et. 1995).

A infecção oculta pelo HBV é relevante em imunossuprimidos (HU 2002). Nestes indivíduos, condições intrinsecamente imunossupressoras ou agentes citotóxicos podem promover a reativação da replicação viral, propiciando o recrudescimento da doença hepática. Embora a reativação da hepatite B crônica em imunodeprimidos com infecção oculta pelo HBV seja menos freqüente e menos grave do que em indivíduos previamente HBsAg positivo, casos de insuficiência hepática aguda já foram descritos neste contexto (PERRILHO 2001).

A infecção oculta pelo HBV está freqüentemente implicada nas hepatites agudas idiopáticas e hepatopatias crônicas criptogênicas. A apresentação destas condições exibe gravidade variável, tendo sido descritos casos de hepatites agudas benignas, de insuficiência hepática aguda, relatos de fibrose hepática progressiva e cirrose (BERASAIN et al. 2000, CHEMIN et al. 2001).

O impacto da infecção oculta pelo HBV em portadores da infecção crônica pelo HCV tem sido alvo de vários estudos. A similaridade das formas de transmissão favorece a ocorrência da co-infecção. Em torno de 22 a 96% dos portadores crônicos do HCV apresentam evidências sorológicas de contato prévio com o HBV (GONÇALES JÚNIOR et

al. 1993, HOPE et al. 2001, KAO et al. 2002, TORBENSON et al. 2004, WEDEMEYER et al. 2004, SIAGRIS et al, 2006, GORAL et al. 2006, KANBAY et al. 2006). A ação inibitória do HCV sobre a expressão genômica do HBV, falado anteriormente, reduz títulos de HBsAg, interferindo a resposta imune humoral HBV-específica e mantendo cargas virais baixas do HBV.

3 - Formulação da questão da pesquisa

Existe infecção oculta pelo vírus da hepatite B em pacientes hemodialisados em clínicas de diálise de Recife-PE, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007? E quais os fatores de risco associados à infecção pelo vírus da hepatite B nos pacientes estudados.

4. OBJETIVOS

4.1- Objetivo geral

Identificar infecção oculta e fatores de risco para o vírus da Hepatite B em pacientes hemodialisados provenientes de 5 centros de Recife/PE, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007.

4.2- Objetivos específicos

- Determinar a freqüência dos marcadores sorológicos do HBV (anti-HBc total, HBsAg e anti-HBs) nos pacientes hemodialisados;
- Identificar a freqüência do DNA-HBV em todos os pacientes;
- Determinar os genótipos mais prevalentes nas seqüências virais estudadas;
- Observar a presença de mutações no genoma viral;
- Verificar associação entre a positividade para o HBV em relação à presença de pelo menos 01 marcador (anti-HBc total e HBsAg) e pelo DNA-HBV com variáveis independentes relacionadas ao paciente: variáveis biológicas, variáveis de possível infecção parenteral e variável sexual.

Artigo I submetido à Virus Reviews & Research

Perfil da infecção pelo Vírus da Hepatite B em diferentes unidades de hemodiálise em Recife/Pernambuco/ Brasil.

Ana C.C. de Albuquerque[1], Maria R.C.D. Coêlho[1,2], Marcílio F. Lemos[3], Ana M.R. Cruz[1], Suellen C.M. Braz[1], Regina C. Moreira[3].

[1] Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rego, N°. 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP.: 50670-901.

[2] Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Prof. Moraes Rego, N°. 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP.: 50670-901.

[3] Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Av. Dr Arnaldo, N°. 355, Cerqueira César, São Paulo-SP, CEP.: 01246-902.

Endereço para correspondência:

Rua Saldanha Marinho n. 1479/302

Maurício de Nassau Caruaru-PE

CEP: 55014-330

Tel. 81-9979 0410

e-mail: anaceciliaprofa@yahoo.com.br

RESUMO

Pacientes hemodialisados apresentam alto risco em adquirir a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Os objetivos desse trabalho foram determinar o perfil sorológico, molecular e fatores de risco para o HBV em hemodialisados de 5 clínicas de Recife/PE, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007. A população estudada (n = 780) foi submetida à entrevista, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta sangüínea foi realizada pela fistula do paciente antes do tratamento hemodiálitico. As amostras de soro foram submetidas ao ELISA para pesquisa do anti-HBc total, HBsAg e anti-HBs. Em todas as amostras HBsAg reagentes foi realizada à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para pesquisa do DNA viral. As amostras DNA positivas foram seqüenciadas para a identificação do genótipo. As informações foram armazenadas e analisadas no Epi-info 6.0. As soroprevalências para o anti-HBc total, HBsAg e anti-HBs foi de 29,4% (229/780), 3,3% (26/780) e 66,5% (135/203), respectivamente. Das 26 amostras HBsAg reagentes, 14 (53%) mostraram-se positivas para o DNA-HBV, sendo encontrados os genótipos A e F. As variáveis idade, sexo, tempo de hemodiálise e número de transfusões mostraram associação estatisticamente significante com o HBV, corroborando com outros estudos brasileiros. A circulação do HBV nas unidades de diálise ainda é freqüente em clínicas de hemodiálise, mesmo com medidas de controle da infecção e vacinação para a hepatite B. Ressalta-se ainda que as precauções universais devam ser seguidas de forma rígida para que se possa minimizar cada vez mais a circulação do vírus nas clínicas de hemodiálise.

Palavras-chaves: Prevalência, fatores de risco, Vírus da hepatite B, hemodialisados, genótipo, PCR, Recife, Brasil.

INTRODUÇÃO

A exposição parenteral é uma das principais vias de transmissão para o Vírus da Hepatite B (HBV), portanto pacientes hemodialisados que apresentam maior contato do seu sangue com as máquinas e filtros reutilizados no seu tratamento, apresentam alto risco para a aquisição viral (Ferreira et al. 2006). Em geral a incidência da infecção pelo HBV em pacientes em hemodiálise está diminuindo ao longo dos anos, devido à pesquisa do HBsAg e anti-HBc total em doadores de sangue; ao do uso da eritropoietina recombinante humana, à vacinação para hepatite B e pela implementação de medidas de controle da infecção (Wong et al. 205). Apesar de todo esse controle, a hepatite B ainda continua a ocorrer em pacientes hemodialisados, sendo um importante problema de saúde pública (Boulaajaj et al. 205, Chattopadhyay et al. 205, Ferreira et al. 2006, Yakaryilmaz et al. 2006, Thanachartwet et al. 2007).

A epidemiologia do HBV entre pacientes hemodialisados em países menos desenvolvidos não é bem conhecida. A freqüência do HBsAg varia de 2 a 20% em países como: Marrocos, Brasil, Arábia Saudita, Tailândia, Índia, Turquia e Romênia (Teles et al. 1998, Vladution et al. 2004, Busek et al. 2002, Souza et al. 2003, Almawi et al. 2004, Quadi et al. 2004, Carrilho et al. 2004, Boulaajaj et al. 205, Ferreira et al. 2006, Yakaryilmaz et al. 2006, Thanachartwet et al. 2007).

Alguns fatores de risco podem contribuir para o aumento da prevalência do HBV nesses pacientes, como: tempo de hemodiálise, número de unidades de sangue transfundidas, nível de escolaridade, sexo, tratamento em mais de uma unidade e transplante renal (Cendoroglo et al. 1995, Teles et al. 1998, Busek et al. 2002, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006).

Estudos têm revelado que os genótipos do HBV podem está associado com a atividade da doença, prognóstico e resposta ao tratamento, todavia a distribuição dos mesmos em hemodialisados não tem sido bem documentada (Fabrizi et al. 2008).

Os objetivos deste estudo foram: determinar o perfil sorológico e molecular dos marcadores para o vírus da hepatite B em pacientes de 5 unidades de diálise em Recife, Pernambuco, Brasil; verificar o genótipo do vírus e investigar os fatores de risco para o HBV.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de Estudo – Foi realizado um corte transversal que investiga uma população em um dado momento do tempo.

População – Foram estudados 780 hemodialisados atendidos sistematicamente em 5 unidades de diálise no período de agosto de 2006 a agosto de 2007.

Definição das variáveis - Um questionário padronizado foi utilizado para coletar informações como: sexo, idade, tempo de hemodiálise, realização de transplante renal, vacinação referida para hepatite B, realização e número de transfusão sangüínea ou hemoderivados, ter ou não tatuagem, uso de droga intravenosa e intranasal, uso de preservativo e realização de hemodiálise em mais de uma clinica.

Centros de Diálise – Para manter em anonimato as clínicas estudadas, as mesmas foram identificadas por letras do alfabeto de A a E, com uma média de pacientes que realiza hemodiálise por mês de 45, 40, 248, 300 e 250, respectivamente. Cada paciente realiza o tratamento três vezes por semana com duração de quatro horas. Nos centros A e B é realizada em dois turnos e nos centros C, D e E em três. Os pacientes HBsAg reagentes realizam o tratamento em salas separadas dos demais e os filtros (dialisadores) são reprocessados em salas separadas dos pacientes não reagentes.

Amostras séricas – Em média 10 mL de sangue foram coletados pela fístula dos pacientes antes do tratamento hemodiálitico e encaminhados em tempo hábil de 04 horas ao Setor de Virologia do LIKA/UFPE para serem processados e armazenados a - 20°C e -70°C. As amostras de soro dos 780 pacientes foram separadas em três alíquotas, uma para testes sorológicos, outra para a PCR e a terceira reservada para repetições e contraprovas.

Sorologia para HBsAg, anti-HBc total e Anti-HBs - As amostras de 780 pacientes foram analisadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa do anti-HBc total e para o HBsAg. As amostras anti-HBc total reagentes e HBsAg não reagentes ou indeterminadas foram pesquisadas para o anti-HBs. Kits comerciais do fabricante Monolisa plus da BioRad foram utilizados, seguindo todas as instruções.

PCR – Para a amplificação da região S do HBV, foi utilizada a nested-PCR, conforme descrito por Kaneko et al. (1989), com algumas modificações (Sitnik et al. 2004). A detecção do DNA-HBV foi realizada nas amostras séricas HBsAg reagentes e indeterminadas. O DNA viral foi extraído com fenol e isotiocianato de guanidina e a região S foi amplificada por meio de iniciadores FHBS1 (5 `- GAG CTC TCT AGA GTG GTG GAC TTC - 3`) e RHBS1 (5 `- AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA - 3`) na primeira rodada da reação. A segunda amplificação foi realizada utilizando os iniciadores FHBS2 (5 `- CGT GGT GGA CTC CTT TCA ATT TTC - 3`) e RHBS2 (5 `- CCG ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC -` 3). As amostras que apresentaram um resultado da PCR negativa pela região S do vírus foram testadas utilizando iniciadores para região do Core**,** 2032R (5` - CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT – 3') e 1763 (5` - GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC GTA TAA - 3`) na primeira PCR. Para a segunda amplificação, os iniciadores 1778-E (5` -

GAC GAA TTC CAT TGA CCC GTA TAA AGA ATT - 3`) e 2017R-B (5` - ATG GGA TCC CTG GAT GCT GCC TCT TCC AAA - 3`) foram utilizados. Amostras de água destilada foram inseridas como controle de possíveis contaminações das reações.

Reação de Seqüenciamento - As amostras foram seqüenciadas pelo produto da nested-PCR, de acordo com o método de Sanger et al. (1977), utilizando a ABI Prism BigDye Terminator ™ Kit (PE Aplicada biossistemas, Foster City, Califórnia, E.U.A.), em seqüenciador automático ABI Prism 377. A genotipagem foi analisada por comparação das seqüências obtidas com outras seqüências conhecidas de diferentes genótipos do HBV depositadas no GeneBank, utilizando o Edit Seq MegAlign e programas do pacote DNAstar (LaserGene, Inc.). A classificação dos genótipos foi confirmada pela ferramenta Genotying disponível no site do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi) (Rozanov et al. 2004).

Análise estatística – Para a análise univariada foi utilizado o teste do X^2 para verificar a distribuição da freqüência do anti-HBc total entre diferentes grupos. Para a análise multivariada foi utilizada a regressão logística que avalia a significância obtida na análise univariada em relação às variáveis estudadas. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Todos os cálculos foram realizados utilizando o STATA (Cary 1989).

Considerações éticas – A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob o Registro CEP/CCS/UFPE N° 069/06.

RESULTADOS

Dos 780 pacientes entrevistados, 58,1% eram do sexo masculino e com média de idade de 50 ± 15,1. Estratificados por faixas etárias, observou-se que 26,9% tinham 60 anos ou mais.

A soroprevalência para o anti-HBc total e HBsAg foi de 29,4% (229/780) e 3,3% (26/780), respectivamente (tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos hemodialisados de 5 clínicas em Recife-PE, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007, segundo alguns marcadores sorológicos para a hepatite B.

Marcadores sorológicos	N	%	IC[a](95%)
Anti-HBc			
Positivo	229	29.4	26.2 – 32.7
Negativo	551	70.6	67.3 – 73.8
HBsAg			
Positivo	26	3.3	2.18 – 4.84
Negativo	752	96.4	94.7 – 97.5
Indeterminado	02	0.3	0.08 – 1.04
Total	780	100.0	

a:Intervalo de confiança

A tabela 2 mostra que dos 203 pacientes que apresentavam um resultado anti-HBc total positivo e HBsAg negativo, 66,5% produziram o anti-HBs.

Tabela 2. Distribuição do marcador anti-HBs em pacientes hemodialisados anti-HBc total positive e HBsAg negativos em 5 clínicas de Recife, Pernambuco, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007.

Anti-HBs	N	%	IC(95%)
Positivo	135	66.5	59.5 – 72.9
Negativo	43	21.2	15.8 – 27.4
Indeterminado	25	12.3	8.1 – 17.4
Total	203	100.0	

Foram encontrados 5,5% (43/780) dos pacientes com anti-HBc total isolado. Das 26 amostras HBsAg reagentes, 14 (53,8%) foram DNA-HBV positivo, as quais foram seqüenciadas e os genótipos encontrados foram A e F.

A tabela 3 mostra os resultados da análise univariada que apresentaram uma associação estatisticamente significante com a soropositividade para o marcador anti-HBc total.

Os homens têm um risco 1,84 vezes maior que as mulheres para aquisição do marcador anti-HBc total.

Em relação à variável idade de forma contínua, a associação foi significante com uma OR de 1,017, ou seja, a cada aumento de um ano de idade há um aumento de 1,7% no risco de infecção pelo HBV.

Tabela 3: Distribuição dos hemodialisados de 5 clínicas de Recife, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007, segundo a faixa etária, sexo, tempo de hemodiálise, número de transfusões sangüíneas e/ou hemoderivados, vacinação para hepatite B e a soropositividade para o anti-HBc total.

Variáveis	Anti-HBc total					
	n	%	n	%	OR[a] (IC)[b]	p-valor
Faixa etária						0,0004
Menor de 30	07	9,7	65	90,3	1,0	-
De 30 a 39	36	25,2	107	74,8	3,12 (1,24 – 8,20)	0,0076
De 40 a 49	58	36,5	101	63,5	5,33 (2,18 – 13,7)	0,0000
De 50 a 59	58	29,1	141	70,9	3,82 (1,57 – 9,71)	0,0009
60 e mais	70	33,8	137	66,2	4,74 (1,97 – 11,9)	0,0000
Sexo						
Feminino	73	22,3	255	77,7	1,0	-
Masculino	156	34,5	296	65,5	1,84 (1,31 – 2,59)	0,0002
Tempo de hemodiálise						
Menos de 5 anos	15	24,2	329	75,8	1,0	-
5 anos e mais	124	35,8	222	64,2	1,75 (1,26 – 2,42)	0,0003
Número de transfusões						0,0004
Não fez	64	26,1	181	73,9	1,0	-
De 1 a 5	115	27,5	303	72,5	1,07 (0,74 – 1,56)	0,6974
De 6 a 10	13	43,3	17	56,7	2,16 (0,93 – 5,01)	0,0479
11 e mais	24	54,5	20	65,5	3,39 (1,67 – 6,90)	0,0001
Vacina para hepatite B						0,0000
Não	54	62,1	33	37,9	1,0	-
Sim	129	22,7	440	77,3	0,18 (0,11 – 0,30)	0,0000
Não sabe	46	37,1	78	62,9	0,36 (0,20 – 0,66)	0,0003

idade (contínua): OR = 1,017 (1,007 – 1,028) p = 0,001
a:Odds Ratio
b: intervalo de confiança

Avaliando o tempo de hemodiálise verifica-se uma associação estatisticamente significante, no qual pacientes que realizam o tratamento em um tempo acima ou iguais há 5 anos, têm um risco de infectar-se de 1,75 vezes maior do que os pacientes que faz em menos tempo.

Considerando a variável transfusão sangüínea ou hemoderivados constata-se que, pacientes que realizaram este procedimento até 5 vezes em sua vida, não apresentaram uma associação estatisticamente significante com a soropositividade para o anti-HBc total, por outro lado a partir de 06 transfusões foi observada associação estatisticamente significante, com um risco 2,16 vezes maior do que em até 5 transfusões.

A vacinação para hepatite B referida pelos pacientes mostrou ser um fator de proteção, com um "odds ratio" de 0,18, ou seja, proteção de 82%.

Em relação ao uso de droga injetável e cocaína, apenas 1 e 2 pacientes, respectivamente, faziam uso das mesmas, não sendo possível o cálculo da associação. Em relação ao teste de associação com as demais variáveis, como: presença de tatuagem ($p = 0,370$), uso de preservativo ($p = 0,742$), realização de transplante renal ($p = 0,453$) e tratamento de hemodiálise em mais de uma clinica ($p = 0,179$), não mostrou associação estatisticamente significante.

Para a análise multivariada foi aplicado o modelo composto pelas variáveis que apresentaram uma associação com a soropositividade para anti-HBc total com significância abaixo de 20% ($p < 0,200$). Assim, permaneceram no modelo final as variáveis: idade, sexo, tempo de diálise e número de transfusões. O modelo não modificou as associações encontradas na análise univariada, ajustando assim as odds ratio de acordo com as outras variáveis que compuseram o modelo (tabela 4).

Tabela 4: Modelo final da regressão logística entre a idade, sexo, tempo de hemodiálise, número de transfusão sangüínea e/ou hemoderivados e a soropositividade para o anti-HBc total em hemodialisados de 5 clínicas de Recife, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007.

Variáveis	OR	IC(95%)	p-valor
Idade	1,02	1,01 – 1,03	**0,000**
Tempo de diálise			
< 5 anos	1,0	-	-
≥ 5 anos	1,62	1,15 – 2,29	**0,006**
Sexo			
Feminino	1,0	-	-
Masculino	2,13	1,50 – 3,5	**0,000**
Número de transfusões			
Não fez	1,0	-	-
De 1 a 5	1,19	0,82 – 1,73	0,346
6 a 10	2,82	1,23 – 6,41	**0,014**
11 e mais	4,04	2,00 – 8,19	**0,000**

a:Odds Ratio
b: Intervalo de confiança

DISCUSSÃO

A pesquisa determinou uma prevalência global de contato com o HBV de 29,4%, semelhante a outros estudos no Brasil, que encontraram prevalências em pacientes hemodialisados variando de 29,8 a 55,7% (Cendoroglo et al. 1995, Teles et al. 1998, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006). Esses dados mostram que as unidades, mesmo com a implantação da vacina, devem seguir uma conduta rígida contra a disseminação do HBV nas unidades de diálise, visto que ainda é grande a sua circulação.

A soroprevalência para o HBsAg submetidos à hemodiálise varia entre as diferentes localidades e apresenta uma correlação com a endemicidade do vírus na população geral da região (Wong et al. 205). A freqüência do HBsAg encontrada na pesquisa foi semelhante aos achados do Brasil cujas prevalências variam de 2,4 a 12% (Teles et al. 1998, Busek et al. 2002, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006).

O paciente que apresenta apenas o anti-HBc total isolado, reflete um contato prévio com o vírus, porém ainda não apresenta o anticorpo neutralizante para o vírus. Este marcador foi encontrado em 5,5% das amostras corroborando com alguns trabalhos de prevalência realizados em algumas regiões brasileiras, que variam de 2,0% a 6,7% (Teles et al. 1998, Souza et al. 2003, Carrilho at al. 2004, Ferreira et al. 2006). Todavia em outras regiões como, no Nordeste e Sudeste da Itália, foi encontrada uma prevalência de 20,8% de pacientes com anti-HBc total isolado (Fabrizi et al. 205).

Segundo Júnior & Gonçales (2007), a presença do anti-HBc total isolado deve-se ao baixo nível virêmico, a perda do anti-HBs muitos anos após a recuperação ou por resultado falso-positivo.

Todas as amostras que apresentaram esse marcador tiveram suas análises repetidas para verificar erro metodológico, porém os resultados permaneceram os mesmos.

É de fundamental importância a pesquisa de outros marcadores como o anti-HBe e a pesquisa do DNA-HBV para avaliar o prognóstico dos pacientes, uma vez que os mesmos são considerados pela unidade soronegativos, porém podem albergar o vírus e disseminá-lo para a unidade (Júnior & Gonçales 2007, Fabrizi et al. 2008).

Por outro lado, o Ministério da Saúde (2004) não preconiza a inclusão do anti-HBc total na rotina dos exames laboratoriais semestrais em pacientes hemodialisados. Por isso muitas vezes não é de conhecimento do paciente e nem mesmo da unidade, o contato prévio com o HBV.

Todos os pacientes ao entrar na unidade são testados para o HBsAg e anti-HBs, caso ele seja positivo para o anti-HBs, não é realizada a vacinação. Contudo, se o paciente não apresentar positividade para estes anticorpos, é administrado quatro doses da vacina, de acordo com o fluxograma próprio para os pacientes hemodialisados (Wong et al. 205).

O anti-HBs foi realizado apenas nos pacientes que apresentaram o anti-HBc total reagente com HBsAg não reagente. Desses 66,5% apresentaram os anticorpos neutralizantes para o vírus, portanto como geralmente não é do conhecimento do paciente e da unidade a presença do anti-HBc total, o anti-HBs produzido fica reconhecido como sendo da vacinação.

Os pacientes que referiram ter tomado a vacina para hepatite B apresentaram um efeito protetor para o anti-HBc total, pois o OR foi menor que 1. Todavia àqueles que informaram não ter tomado a vacina, também mostraram um OR semelhante. Isso pode ser explicado pela prática comum de vacinação nos pacientes que integram às unidades, porém muitas vezes não é de conhecimento dos mesmos.

Doze pacientes HBsAg reagentes (46,1%) não apresentaram positividade para a pesquisa do DNA-HBV utilizando iniciadores para região do gene S do vírus. A escolha dos iniciadores baseou-se nos achados de Sitnik et al. (2004), os quais mostraram que o uso de iniciadores para região S do vírus têm a mesma eficiência dos iniciadores para a região do Core, além disso eles permitem distinguir os genótipos. Os pacientes que apresentaram negatividade para PCR utilizando iniciadores para região S mostrou o mesmo resultado quando usado os iniciadores para região do Core. Técnicas moleculares têm sido esclarecedoras para investigar as características do HBV em pacientes hemodialisados. A carga viral nesses pacientes tende ser baixa e estável ao longo do tempo, por isso pode influenciar na detecção do DNA pelos testes utilizados (Fabrizi et al. 2003, Fabrizi et al. 2008).

O ideal seria realizar um monitoramento pesquisando o antígeno e do HBV (HBeAg) nesses pacientes para avaliar o prognóstico da infecção, pois se o HBsAg persistir por mais de 03 meses, a pesquisa do DNA-HBV e a detecção do HBeAg devem ser realizadas para verificar a atividade replicativa do vírus (Júnior & Gonçales 2007, Fabrizi et al. 2008).

Os resultados encontrados corroboraram com a literatura que verificaram prevalências da soropositividade para HBsAg com DNA-HBV negativo de 11,8% a 58% (Teles et al. 1998, Fabrizi et al. 2003, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006 e Moutinho et al. 2006).

Os genótipos A e F identificados foram semelhantes com alguns estudos brasileiros (Teles et al. 1999, Teles et al. 2002, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006). Carrilho et al. (2004) encontraram os genótipos A, D e F tanto em pacientes hemodialisados quanto em profissionais de saúde que cuidavam dos mesmos. Esses dados sugerem uma possível transmissão nosocomial entre pacientes e profissionais ou vice-versa. Todavia os genótipos A

e F foram encontrados exclusivamente em pacientes hemodialisados. O presente estudo verificou apenas um paciente com o genótipo F, semelhante aos achados de Teles et al. (2002) e Ferreira et al. (2006).

Poucos estudos reportam os fatores de risco associados ao HBV em pacientes hemodialisados. Na pesquisa, a análise multivariada revelou que as variáveis sexo, idade, tempo de hemodiálise e número de transfusões estão mais estreitamente associadas ao HBV.

Os resultados em relação ao sexo concordaram com os achados de Ferreira et al. (2006), que mostraram um risco de 1,8 para aquisição do HBV em homens. Por sua vez, Carrilho et al. (2004) também encontraram uma associação, embora próximo do nível de significância, ou seja, um valor de p= 0,06.

O tempo de hemodiálise mostra-se estatisticamente associado com marcadores para o HBV em diversos trabalhos (Cendoroglo et al. 1995, Teles et al. 1998, Busek et al. 2002, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006). O estudo observou que os pacientes que apresentam tempo de hemodiálise igual ou superior a 5 anos, têm um risco de 1,62 mais chances de adquirir o HBV, em relação aos que realizam em menos tempo. Esse dado foi semelhante aos encontrados por Carrilho et al. (2004) os quais verificaram que os pacientes hemodialisados apresentam um risco mensal de 1,47 de adquirir o vírus. Entretanto outros trabalhos têm mostrado que este risco varia entre as unidades. Teles et al. (1998) e Ferreira et al. (2006) encontraram respectivamente um risco de 10,1 e 2,6 vezes mais chances de adquirir o HBV nos pacientes, que realizavam o tratamento no período igual ou superior a 03 anos. Provavelmente, a diferença do risco encontrado em 2006 por Ferreira et. al, se deva ao fato das precauções universais serem mais aceitas e seguidas nas unidades nestes últimos anos.

A pesquisa mostrou que o risco da infecção pelo HBV é maior, à medida que o número de transfusões aumenta. Todavia esse achado não foi encontrado nos trabalhos de literatura brasileira consultada.

As unidades de diálise deveriam preocupar-se também com o risco dos hemodialisados adquirirem o HBV por outras vias de contágio, uma vez que a hepatite B é considerada uma infecção sexualmente transmissível (IST). Orientações do âmbito sexual devem ser fornecidas aos pacientes e seus parceiros no intuito de evitar esse meio de transmissão. Embora a pesquisa não tenha encontrado associação entre a soropositividade para o anti-HBc total e o não uso de preservativo, 29,2% dos pacientes foram positivos para este marcador e não usavam preservativos.

A pesquisa mostrou que a prevalência do HBsAg nas unidades estudadas foi baixa quando comparada com outros estudos brasileiros. Todavia foi encontrado paciente que já tinham entrado em contato com o vírus e que não era de conhecimento para o paciente. A determinação dos genótipos circulantes nas unidades é de suma importância, pois favorece a epidemiologia molecular e pode ajudar na monitorização da infecção. A associação do tempo de hemodiálise com a soropositividade para o anti-HBc total sugere uma transmissão nosocomial. Portanto, ressalta-se, que as precauções universais devam ser seguidas de forma rígida para reduzir cada vez mais a circulação do vírus nas unidades de diálise.

REFERÊNCIAS

Almawi WY, Qadi AA, Tamim H, Ameen G, Bu-Ali A, Arrayid S, Abou Jaoude MM 2004. Seroprevalence of hepatitis C virus and hepatitis B virus among dialysis patients in Bahrain and Saudi Arabia. Transplant. Proc. 36:1824-1826.

Busek SU, Babá EH, Filho HAT, Pimenta L, Salomão A, Oliveira RC, Oliveira GC 2002. Hepatitis C and Hepatitis B virus infection in different Hemodialysis Units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Men. Inst. Oswaldo Cruz *97: 775*-778.

Boulaajaj K, Elomary Y, Elmaliki B, Madkouri B, Zaid D, Benchemsi N 205. Prevalence of hepatitis C, hepatitis B and HIV infection among hemodialysis patients in Ibn-Rochd university hospital, Casablanca. Nephrol Ther 1:274-284.

Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Moreira R, Bertolini D, Melo IM, Lemos MF, Bassit L, Cardoso RA, Dos Santos GR, Da Silva LC 2004. Hepatitis B virus infection in Hemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. BMC Public Health 04: 1-11.

Cary NC 1989. SAS/STAT User's. In: Statistical Analysis System Institute, 4 ed., New York Press.

Chattopadhyay S, Rao S, Das BC, Singh NP, Kar P 205. Prevalence transfusion-transmitted virus infection in patients on maintenance hemodialysis from New Delhi, India. Hemodial Int 9:362-366.

Cendoroglo Neto M, Manzano SIR, Canziani ME, Silva AEB, Cirenza MLF, Sesso RC, Ajzen H, Draibe AS 1995. Environmental transmission of hepatitis B and hepatitis C viruses within the hemodialysis unit. Artif Organs 19: 251-255.

Fabrizi F, Lunghi G, Alongi G, Bisegna S, Campolo G, Mangano S, Limido A, Pagliari B, Tettamanzi F, Ponticelli C 2003. Biological dynamics of hepatitis B virus load in dialysis population. Am J. Kidney Dis. 41:1278-1285.

Fabrizi F, Messa PG, Lunghi G, Aucella F, Bisegnas S, Mangano S, Villa M, Barbisoni F, Rusconi E, Martin P 205. Occult hepatitis B virus Infection in dialysis patients: a multicentre survey. Aliment Pharmacol Ther 21: 1341-1347.

Fabrizi F, Messa PG, Martin P 2008. Hepatitis B Infection and the Dialysis Patient. Seminars in Dialysis 21: 440-446.

Ferreira RC, Teles AS, Dias MA, Tavares VR, Silva AS, Gomes AS, Yoshida CFT, Martins RMB 2006. Hepatitis B Virus infection profile in Hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes. Mem Inst Oswaldo Cruz 101:689-692.

Júnior FLG & Gonçales NSL 2007. Diagnóstico Laboratorial da Hepatite B. In: R. Focaccia (eds) Tratado de Hepatites Virais, 2 ed., Atheneu Press, pages 153-158

Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH 1989. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. J. Clin. Microb 27: 1930-1933..

Ministério da Saúde 2004. Resolução – RDC n° 154, de 15 de Junho de 2004, Diário Oficial da União 110 – E, Seção I.

Moutinho RS, Perez RM, Median-Pestana JO, Figueredo MS, Koide S, Lopes Alberto F, Silva AEB, Ferraz MLG 2006. Low HBV DNA levels in end-stage renal disease patients with HBeAg negative chronic hepatitis B. J Med Virol 78:1284-1288.

Qadi AA, Tamim H, Ameen G, Bu-Ali A, Al-Arrayed S, Fawaz NA, Almawi W Y 2004. Hepatitis B And Hepatitis C Virus Prevalence Among Dialysis Patients In Bahrain And Saudi Arabia: A Survey By Serologic And Molecular Methods. Ajic, V. 32, P. 493-495.

Rozanov M, Plikat U, Chappey C, Kochergin A, Tatusova T 2004. A web-based genotyping resource for viral sequences. Nucleic Acids Research 32: w654-w659).

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

Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, Silva LC, Carrilho FJ 2004. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. J Clin Microbiol 42: 2455-2460.

Souza K P, Luz JÁ, Teles AS, Carneiro MA, Oliveira LA, Gomes AS, Dias MA, Gomes AS, Yoshida CF, Martins RM 2003. Hepatitis B and C in the hemodialysis unit of Tocantins, Brazil: serological and molecular profiles. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 599-603.

Thanachartwet V, Phumratanapaprin W, Desakorn V, Sahassananda D, Wattanagoon Y, Chaiprasert A, Aimpum P, Supaporn T 2007. Viral hepatitis infections among dialysis patients: Thailand registry report. Nephrology 12:399-45.

Teles AS, Martins RM, Silva AS, Gomes DMF, Cardoso DDP, Vanderborght BOM, Yoshida CFT 1998. Hepatitis B virus infection profile in central Brazilian hemodialysis population. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 40: 1-12.

Teles SA, Martins RMB, Vanderborght B, Stuyver L, Gaspar AMC, Yoshida CFT 1999. Hepatitis B Virus: Genotype and Subtypes in Brazilian Hemodialysis Patients. Artif Organs 23: 1074-1078.

Teles SA, Martins RM, Gomes AS, Gaspar AM, Araújo NM, Souza KP, Carneiro MA, Yoshida CF 2002. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. J Med Virol. 68: 41-49.

Vladution DS, Cosa A, Neamtu A, State D, Braila M, Gherman M, Patiu IM, Dulau-Florea I 2000. Infections with hepatitis B and C viruses in patients on maintenance dialysis in Romania and in former communist countries: yellow spots on a blank map? J Viral Hepat 7: 313-319.

Yakaryilmaz F, Gurbuz OA, Guliter S, Mert A, Songur Y, Karakan T, Keles H 2006. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. Ren Fail 28:729-735.

Wong PN, Fung TT, Mak SK, Lo KY, Tomg GM, Wong Y, Loo CK, Lam EK, Wong AK 205. Hepatitis B Virus infection in dialysis patients. Jornal of Gastroenterology and Hepatology 20: 1641-1651.

HEPATITIS B VIRUS INFECTION PROFILE IN DIFFERENT HEMODIALYSIS UNITS IN RECIFE, PERNAMBUCO, BRAZIL.

Ana CC de Albuquerque[1], Maria RCD Coêlho[1,2], Marcílio F Lemos[3], Ana MR Cruz[1], Suellen CM Braz[1], Regina C Moreira[3].

[1] Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rego, N°. 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP.: 50670-901.

[2] Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Prof. Moraes Rego, N°. 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP.: 50670-901.

[3] Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Av. Dr Arnaldo, N°. 355, Cerqueira César, São Paulo-SP, CEP.: 01246-902.

Endereço para correspondência:
Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque
Rua Saldanha Marinho, n. 1479 apt.: 302,
Bairro: Maurício de Nassau
Caruaru-PE
CEP: 55014-330
Tel. +55-21-81-9979 0410
E-mail: anaceciliaprofa@yahoo.com.br

ABSTRACT

Patients under hemodialysis are considered at high risk to acquire hepatitis B virus (HBV) infection. The aim of this study was to determine the serological and molecular profile and risk factors for the HBV among hemodialysis patients in five clinics in Recife, Pernambuco, between August 2006 and August 2007. The study population (n = 780) was interviewed after signing a free and informed consent statement and the blood collection through the patient's fistula prior to hemodialysis. Serum samples underwent ELISA to investigate anti-HBc total, HBsAg and anti-HBs. The samples that were HBsAg-positive were subjected to the PCR to investigate viral DNA. The DNA-positive samples were sequenced to identify the genotype. The information was stored and analyzed in Epi-Info 6.0. The seroprevalences of anti-HBc total and HBsAg were 29.4% (229/780) and 3.3% (26/780), respectively. The anti-HBs were tested in anti-HBc positive and HBsAg negative or indeterminate and was found 66,5% (135/203). Among the 26 HBsAg-positive samples, 14 (53%) were positive for HBV DNA; genotypes A and F were found. The variables of sex, age, length of time on dialysis and number of transfusions showed statistically significant association with HBV, thus corroborating other Brazilian studies. Even with the implementation of HBV infection control measures and vaccinations, dialysis units still present widespread virus circulation. All units need to rigidly follow the universal precautions, so that the virus circulation in these places can increasingly be minimized.

Key Words: prevalence – risk factors – hemodialysis – hepatitis B virus – hemodialysis - genotypes – PCR – Recife – Brazil.

INTRODUCTION

Parenteral exposure is one of the transmission routes for the hepatitis B virus (HBV) and therefore hemodialysis patients whose blood has greater contact with the machines and reusable filters, that are used for their treatment, present a high risk of acquiring this virus (Ferreira et al. 2006). The general incidence of HBV infection among hemodialysis patients has been decreasing because test blood donors for HBsAg and anti-HBc total, use of human recombinant erythropoietin, HBV vaccination and implementation of infection control measures (Wong et al. 205).

Hepatitis B is an important public health problem and, even with all these controls, cases among hemodialysis patients continue to occur (Boulaajaj et al. 205, Chattopadhyay et al. 205, Ferreira et al. 2006, Yakaryilmaz et al. 2006, Thanachartwet et al. 2007).

The epidemiology of HBV among hemodialysis patients in the less-developed world is not well known. The frequency of HBsAg ranges from 2 to 20% in countries as Morocco, Brazil, Saudi Arabia, Thailand, India, Turkey and Romania. (Teles et al. 1998, Vladution et al. 2000, Busek et al. 2002, Souza et al. 2003, Quadi et al. 2004, Carrilho et al. 2004, Boulaajaj et al. 205, Ferreira et al. 2006, Yakaryilmaz et al. 2006, Thanachartwet et al. 2007).

Studies have revealed that HBV genotype may be associated with disease activity, prognosis and treatment response; however the distribution of genotypes in dialysis population has not been addressed to date (Fabrizi et al. 2008).

Risk factors may contribute towards increasing the prevalence of HBV, for example: length of time on hemodialysis, number of blood units transfused, schooling level, sex, treatment in more than one unit or kidney transplantation (Cendoroglo et al. 1995, Teles et al. 1998, Busek et al. 2002, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006).

The aims of the present study were: to determine the serological and molecular profile of HBV markers among hemodialysis patients at five units in the city of Recife, Pernambuco, Brazil; to identify HBV genotypes and to investigate associations between the anti-HBc total marker and the variables studied.

MATERIAL AND METHODS

Type of study – A cross-sectional study was carried out to analyze the prevalence to HBV and risk factors in this population.

Population – A population of 780 hemodialysis patients from 5 clinics in Recife-PE was analyzed between August 2006 and August 2007. All patients of 5 units were targeted for research, but the consent to participate in the study was provided by 780 patients.

Definition of the variables – A standardized questionnaire was used to gather information such as: sex, age, length of time on hemodialysis, kidney transplantation, reported vaccination against hepatitis B, blood and blood product transfusion and number of times, tattooing, intravenous and intranasal drug administration, condom use and hemodialysis performed in other clinics.

Dialysis centers – To maintain the anonymity of the clinics studied, they have been identified by means of letters of the alphabet. The mean numbers of patients who were undergoing hemodialysis at these clinics every month were: A (45), B (40), C (248), D (300) and E (250). Each patient was receiving treatment three times a week. At centers A and B, treatment was performed in two shifts and in centers C, D and E in three shifts. Each shift comprised one four-hour period of treatment. The HBsAg-positive patients received their treatment, and the filters (dialyzers) for these patients were processed, in rooms that were separate from where the HBsAg-negative patients were treated.

Serum samples – Blood samples were taken from 780 patients. These samples were separated into three aliquots, one for serological tests and another for PCR, while the third was held in reserve for repetitions and countersample tests. The serum samples were stored at -20°C and -70°C.

HBsAg, anti-HBc total and anti-HBsAg serological tests – Serum samples were analyzed by means of immunoenzymatic assaying (ELISA) to investigate anti-HBc total and HBsAg. The anti-HBc total-positive and HBsAg-negative and indeterminate samples were investigated for anti-HBs. All tests were conducted in accordance with the manufacturer's instructions for the Monolisa Plus kits (BioRad).

PCR – The Nested PCR was performed as described by Kaneko et al. (1989), with some modifications (Sitnik et al. 2004). HBV DNA detection using PCR was performed on HBsAg-positive and indeterminate samples. The DNA was extracted from serum using a solution of phenol and guanidine isothiocyanate. The primers FHBS1 (5' - GAG CTC TCT AGA GTG GTG GAC TTC – 3') and RHBS1 (5' - AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA – 3') were used for the first round of amplification. For the second amplification, the primers FHBS2 (5' - CGT GGT GGA CTC CTT TCA ATT TTC – 3') and RHBS2 (5' - CCG ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC – 3') were used. The samples that presented a PCR result that was negative for the S region of the virus underwent a second test using primers for the core region, 2032R (5` - CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT – 3') and 1763 (5` - GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC GTA TAA - 3`) at first PCR. For second amplification, the primers 1778-E (5` - GAC GAA TTC CAT TGA CCC GTA TAA AGA ATT - 3`) and 2017R-B (5` - ATG GGA TCC CTG GAT GCT GCC TCT TCC AAA –

3`) were used. Water samples were used as negative controls for each reaction, in order to exclude possible occurrence of cross-contamination.

Sequencing reaction – The samples were sequenced using the PCR product, in accordance with the method of Sanger et al. (1977), using the ABI Prism BigDye Terminator™ Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA), in an ABI Prism 377 automatic sequencer. The genotyping was analyzed by comparing the sequences obtained with other known sequences from different HBV genotypes kept in the Gene Bank, using Edit Seq MegAlign and software in the DNAstar package (LaserGene, Inc.). The genotype classification was confirmed by means of the Genotyping tool, which is available on the NCBI website: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi) (Rozanov et al. 2004).

Statistical analysis – For univariate analysis, the X^2 test was used to verify distribution of anti-HBc total frequency between different groups. For multivariate analysis, logistic regression was used to evaluate the significance obtained in the univariate analysis, in relation to the study variables. This procedure made it possible to evaluate the contribution of each variable towards the diagnosis of HBV infection. The significance level established was 5%. All the calculations were performed using STATA (Cary 1989).

Ethical matters – The protocol for this study was submitted to and was granted approval by the research ethics committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco under registration number CEP/CCS/UFPE 069/06. The patients studied accepted to participate and signed the term of free and informed consent.

RESULTS

Among the 780 patients interviewed, 58.1% were male and the mean age was 50 ± 15.1. Stratification into age groups, observed that 26.9% were 60 years old or over.

The seroprevalences of anti-HBc total and HBsAg were 29.4% (229/780) and 3.3% (26/780), respectively (Table 1). The anti-HBs were detected in 66.5% (135/203) (Table 2).

The anti-HBc total alone was founded in 5,5% (43/780) patients. Among HBsAg-positive samples, 53.8% (14/26) were HBV DNA-positive. These samples were sequenced and genotypes A and F were found.

The table 3 shows the results of the univariate analysis that were statistically significant associations with seropositivity for the anti-HBc total marker.

The risk of acquiring total anti-HBc marker in male was 1.84 times greater than the risk among the female gender. Applying age as a continuous variable, its association with seropositivity for anti-HBc total was significant, with an odds ratio of 1.017, i.e. for every one-year increase in age, there was a 1.7% increase in the risk of HBV infection. Patients who had been undergoing this treatment for five years or more had a risk of acquiring the virus that was 1.75 times greater than the risk among patients who had been on hemodialysis for shorter times.

Situations in which patients had undergone blood or blood product transfusion up to five times during their lifetimes did not show a statistically significant association with seropositivity for anti-HBc total. But from six transfusions onwards, the association was significant, with a risk of infection 2.16 times greater than in cases with up to five transfusions.

Reported vaccination against hepatitis B had a protective effect against seropositivity for total anti-HBc with an odds ratio of 0.18, i.e. protection of 82%, if considered that HBV exposure occurred after vaccination (table 3).

With regard to drug use, only one patient use injectable drugs and two patients used cocaine, and thus no calculations on these associations were possible. Tattooing ($p = 0.370$), condom use ($p = 0.742$), kidney transplantation ($p = 0.453$) and undergoing hemodialysis in more than one center ($p = 0.179$) did not present statistically significant associations.

The multivariate model was composed of the variables that presented associations with seropositivity for hepatitis B with a significance level of less than 20% ($p < 0.200$). The variables of age, sex, length of time on dialysis and number of transfusions remained in the final model. The model did not modify the associations found in the univariate analysis, and thus the odds ratio was adjusted according to the other variables that made up the model (Table 4).

DISCUSSION

The present study found an overall HBV prevalence of 29.3%. This data corroborates with the findings from other studies conducted in Brazil, which ranged from 29.8 to 55.7% among hemodialysis patients (Cendoroglo et al. 1995, Teles et al. 1998, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006). These numbers show, even with the advent of the vaccine, that the hemodialysis units need to avoid the virus dissemination in itself.

The seroprevalence for HBsAg among hemodialysis patients varies between different localities and presents a correlation with the endemicity of the virus among the general population of the region (Wong et al. 205). In Brazil, the prevalence of HBsAg ranges from 2.4 to 12% (Teles et al. 1998, Busek et al. 2002, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006). From present study found 5,5% of the patients with anti-HBc total alone, i.e., these patients no longer presented the surface antigen of the virus, although they presented an immunological footprint that reflected previous contact. These patients would not yet be immune to the virus. Anti-HBc total-positive found alone may be caused by low-levels viremia, loss of anti-HBs many years after recovery, or a false positive result (Júnior & Gonçales 2007). The prevalence of total anti-HBc alone in Brazilian regions varies between 2 to 6.7% (Teles et al. 1998, Souza et al. 2003, Carrilho at al. 2004, Ferreira et al. 2006). On the other hand, in other localities of the world, such as northeastern and southeastern Italy, it was higher prevalence - 20.8% (Fabrizi et al. 205).

In this research, the samples positives of anti-HBc total alone were retested to check the possibility of methodological error, but the result remained the same. It is important to investigate other markers like anti-HBe to analyze the prognosis and the presence of HBV

DNA in these patients. Although such patients are considered seronegative, they may host the virus and spread it to the hemodialysis unit.

On entering the hemodialysis unit, all patients are tested for HBsAg and anti-HBs. If they are positive for anti-HBs, vaccine doses are not administered. On the other hand, if these patients are negative, they receive doses in accordance with the flow diagram for hemodialysis patients and, subsequently, their production of antibodies is checked in other laboratory analyses (Wong et al. 205).

The test for anti-HBs was performed on the patients that were anti-HBc total-positive but HBsAg-negative, and was found in 66.5% (135/203). However, it was not of the knowledge of unit or patient the presence of anti-HBc total, therefore the anti-HBs produced becomes known as a product from immunization. The information from patients about their vaccination history of hepatitis B presented a protective effect, with the odds ratio less than one. Nevertheless, the patients who denied vaccination against hepatitis B also showed odds ratio less than one. This may constitute memory bias about vaccination history.

The use of primers for the S and Core regions shows similar efficiency. Moreover the S region primers can distinguish the genotypes (Sitnik et al. 2004). The HBV viral load in these patients tends to be low and stable over time and this may consequently to influence on DNA detection in the tests (Fabrizi et al. 2008). In this study it was observed that twelve HBsAg-positive patients did not present positive findings by PCR (S and Core regions). The ideal would be to carry out monitoring through investigating HBeAg and HBV DNA in these patients to assess level of active viral replication. The results found corroborated with literature which showed HBsAg seropositivity in hemodialysis patients without detectable serum HBV DNA were 11.8% to 58% (Teles et al. 1998, Fabrizi et al. 2003, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006 e Moutinho et al. 2006).

The genotypes A and F found in this present study were similar as the other Brazilian studies. Carrilho et al. (2004) found genotypes A, D and F, all in hemodialysis patients and in the health professionals who were caring for them, suggesting a nosocomial transmission. Nonetheless, this study found only genotypes A and F among hemodialysis patients. A single patient present genotype F in according to Teles et al. (2002) and Ferreira et al.(2006).

There are few studies reporting the risk factors associated with HBV. Multivariate analysis from this work revealed that gender, age, length of time on hemodialysis and the number of transfusions presented statistically significant association with HBV. Male gender presented a statistically significant association in according to Ferreira et al. (2006) with risk of 1.8 for acquiring HBV. Although Carrilho et al. (2004) founded an association close to the significance level ($p = 0.06$).

The length of time on hemodialysis has been shown to be statistically associated with markers for HBV in several studies (Cendoroglo et al. 1995, Teles et al. 1998, Busek et al. 2002, Souza et al. 2003, Carrilho et al. 2004, Ferreira et al. 2006). The present study demonstrated that patients who had been on hemodialysis for five or more years had a greater risk in acquiring B hepatitis than those among patients with shorter periods. Carrilho et al. (2004) observed a risk of 1.47 for acquiring the virus every month. And others two studies conducted in Goiás found risks of acquiring HBV that were 10.1 and 2.6 times greater among patients who underwent treatment over periods of three years or more (Teles et al. 1998, Ferreira et al. 2006).

Although, it was not found in others Brazilian studies, this showed that the risk of acquiring HBV is higher when the number of blood transfusions increases.

Considering that 29.2% of the hemodialysis patients positive for the anti-HBc total marker were not using condoms. Therefore, it is important to point out that need to given sexual orientation, because hepatitis B is a sexually transmittable infection (STI).

In conclusion, the HBsAg prevalence in hemodialysis studies was low compared with another Brazilian studies. The findings that length of time hemodialysis is associated with anti-HBc total seropositivity suggest nosocomial transmission. All units need to rigidly follow the universal precautions, for reduce viral circulation.

REFERENCES

Busek SU, Babá EH, Filho HAT, Pimenta L, Salomão A, Oliveira RC, Oliveira GC 2002. Hepatitis C and Hepatitis B virus infection in different Hemodialysis Units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Men. Inst. Oswaldo Cruz 97: 775-778.

Boulaajaj K, Elomary Y, Elmaliki B, Madkouri B, Zaid D, Benchemsi N 205. Prevalence of hepatitis C, hepatitis B and HIV infection among hemodialysis patients in Ibn-Rochd university hospital, Casablanca. Nephrol Ther 1:274-284.

Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Moreira R, Bertolini D, Melo IM, Lemos MF, Bassit L, Cardoso RA, Dos Santos GR, Da Silva LC 2004. Hepatitis B virus infection in Hemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. BMC Public Health 04: 1-11.

Cary NC 1989. SAS/STAT User's. In: Statistical Analysis System Institute, 4 ed., New York Press, pages .

Chattopadhyay S, Rao S, Das BC, Singh NP, Kar P 205. Prevalence transfusion-transmitted virus infection in patients on maintenance hemodialysis from New Delhi, India. Hemodial Int 9:362-366.

Cendoroglo Neto M, Manzano SIR, Canziani ME, Silva AEB, Cirenza MLF, Sesso RC, Ajzen H, Draibe AS 1995. Environmental transmission of hepatitis B and hepatitis C viruses within the hemodialysis unit. Artif Organs 19: 251-255.

Fabrizi F, Lunghi G, Alongi G, Bisegna S, Campolo G, Mangano S, Limido A, Pagliari B, Tettamanzi F, Ponticelli C 2003. Biological dynamics of hepatitis B virus load in dialysis population. Am J. Kidney Dis. 41:1278-1285.

Fabrizi F, Messa PG, Lunghi G, Aucella F, Bisegnas S, Mangano S, Villa M, Barbisoni F, Rusconi E, Martin P 205. Occult hepatitis B virus Infection in dialysis patients: a multicentre survey. Aliment Pharmacol Ther 21: 1341-1347.

Fabrizi F, Messa PG, Martin P 2008. Hepatitis B Infection and the Dialysis Patient. Seminars in Dialysis 21: 440-446.

Ferreira RC, Teles AS, Dias MA, Tavares VR, Silva AS, Gomes AS, Yoshida CFT, Martins RMB 2006. Hepatitis B Virus infection profile in Hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes. Mem Inst Oswaldo Cruz 101:689-692.

Júnior FLG & Gonçalves NSL 2007. Diagnóstico Laboratorial da Hepatite B. In: R. Focaccia (eds) Tratado de Hepatites Virais, 2 ed., Atheneu Press, pages 153-158.

Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH 1989. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. J. Clin. Microb 27: 1930-1933.

Moutinho RS, Perez RM, Median-Pestana JO, Figueredo MS, Koide S, Lopes Alberto F, Silva AEB, Ferraz MLG 2006. Low HBV DNA levels in end-stage renal disease patients with HBeAg negative chronic hepatitis B. J Med Virol 78:1284-1288.

Qadi AA, Tamim H, Ameen G, Bu-Ali A, Al-Arrayed S, Fawaz NA, Almawi W Y 2004. Hepatitis B And Hepatitis C Virus Prevalence Among Dialysis Patients In Bahrain And Saudi Arabia: A Survey By Serologic And Molecular Methods. Ajic, V. 32, P. 493-495.

Rozanov M, Plikat U, Chappey C, Kochergin A, Tatusova T 2004. A web-based genotyping resource for viral sequences. Nucleic Acids Research 32: w654-w659).

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

Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, Silva LC, Carrilho FJ 2004. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. J Clin Microbiol 42: 2455-2460.

Souza K P, Luz JÁ, Teles AS, Carneiro MA, Oliveira LA, Gomes AS, Dias MA, Gomes AS, Yoshida CF, Martins RM 2003. Hepatitis B and C in the hemodialysis unit of Tocantins, Brazil: serological and molecular profiles. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 599-603.

Thanachartwet V, Phumratanapaprin W, Desakorn V, Sahassananda D, Wattanagoon Y, Chaiprasert A, Aimpum P, Supaporn T 2007. Viral hepatitis infections among dialysis patients: Thailand registry report. Nephrology 12:399-45.

Teles AS, Martins RM, Silva AS, Gomes DMF, Cardoso DDP, Vanderborght BOM, Yoshida CFT 1998. Hepatitis B virus infection profile in central Brazilian hemodialysis population. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 40: 1-12.

Teles SA, Martins RM, Gomes AS, Gaspar AM, Araújo NM, Souza KP, Carneiro MA, Yoshida CF 2002. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. J Med Virol. 68: 41-49.

Vladution DS, Cosa A, Neamtu A, State D, Braila M, Gherman M, Patiu IM, Dulau-Florea I 2000. Infections with hepatitis B and C viruses in patients on maintenance dialysis in Romania and in former communist countries: yellow spots on a blank map? J Viral Hepat 7: 313-319.

Yakaryilmaz F, Gurbuz OA, Guliter S, Mert A, Songur Y, Karakan T, Keles H 2006. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. Ren Fail 28:729-735.

Wong PN, Fung TT, Mak SK, Lo KY, Tomg GM, Wong Y, Loo CK, Lam EK, Wong AK 205. Hepatitis B Virus infection in dialysis patients. Jornal of Gastroenterology and Hepatology 20: 1641-1651.

TABLES

Table 1. Serological markers for hepatitis B among the hemodialysis population at five clinics in Recife, Pernambuco, between August 2006 and August 2007.

Serological markers	N	%	IC[a](95%)
Anti-HBc total			
Positive	229	29.4	26.2 – 32.7
Negative	551	70.6	67.3 – 73.8
HBsAg			
Positive	26	3.3	2.18 – 4.84
Negative	752	96.4	94.7 – 97.5
Indefinite	02	0.3	0.08 – 1.04
Total	780	100.0	

a: Confidence interval

Table 2. Distribution of the anti-HBs in anti-HBc total positive and HBsAg negative hemodialysis patients at five clinics in Recife, Pernambuco, between August 2006 and August 2007.

Anti-HBs	N	%	IC(95%)
Positive	135	66.5	59.5 – 72.9
Negative	43	21.2	15.8 – 27.4
Indefinite	25	12.3	8.1 – 17.4
Total	203	100.0	

Table 3. Variables associated to hepatitis B virus infection in 5 hemodialysis units Distribution of hemodialysis units of Recife, Pernambuco, between August 2006 and August 2007.

Variables	Anti-HBc total					
	Positive		Negative			
	n	%	n	%	OR[a] (IC)[b]	p-valor
Sex						
Female	73	22.3	255	77.7	1.0	-
Male	156	34.5	296	65.5	1.84 (1.31 – 2.59)	0.0002
Age group						0.0004
≤ 30	07	9.7	65	90.3	1.0	-
30 - 39	36	25.2	107	74.8	3.12 (1.24 – 8.20)	0.0076
40 - 49	58	36.5	101	63.5	5.33 (2.18 – 13.7)	0.0000
50 - 59	58	29.1	141	80.9	3.82 (1.57 – 9.71)	0.0009
60 and more	70	33.8	137	66.2	4.74 (1.97 – 11.9)	0.0000
Time of hemodialysis						
< 5 years	15	24.2	329	75.8	1.0	-
≥ 5 years	124	35.8	222	64.2	1.75 (1.26 – 2.42)	0.0003
Number of transfusions						0.0004
Did not	64	26.1	181	73.9	1.0	-
1 - 5	115	27.5	303	72.5	1.07 (0.74 – 1.56)	0.6974
6 - 10	13	43.3	17	56.7	2.16 (0.93 – 5.01)	0.0479
11 and more	24	54.5	20	65.5	3.39 (1.67 – 6.90)	0.0001
Hepatitis B vaccination						0.0000
No	54	62,1	33	37,9	1.0	-
Yes	129	22.7	440	77.3	0.18 (0.11 – 0,30)	0.0000
Don't know	46	37.1	78	62.9	0.36 (0.20 – 0.66)	0.0003

* idade (contínua): OR = 1,017 (1,007 – 1,028) p = 0,001
a:Odds Ratio
b: Confidence interval

Table 4. Model finished of the multiple logistic regression between the age, sex, length of time on hemodialysis, number of transfusions and seropositivity to anti-HBc total in the hemodialysis patients at 5 centers in Recife, between August 2006 and August 2007.

Variables	OR[a]	IC[b](95%)	p-valor
Sex			
Female	1.00	-	-
Male	2.13	1.50 – 3.5	**0.000**
Age	1.02	1.01 – 1.03	**0.000**
Time of hemodialysis			
< 5 years	1.0	-	-
≥ 5 years	1.62	1.15 – 2.29	**0.006**
Number of transfusion			
Did not	1.0	-	-
1 - 5	1.19	0.82 – 1.73	0.346
6 - 10	2.82	1.23 – 6.41	**0.014**
11 and more	4.04	2.00 – 8.19	**0.000**

a:Odds Ratio

b: Confidence interval

Artigo II submetido ao Journal of Medical Virology

Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B em pacientes hemodialisados de Recife, Pernambuco, Brasil.

Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque[1], Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho [1,2], Marcílio Figueiredo Lemos[3], Regina Célia Moreira[3].

[1] Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rego, N°. 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP.: 50670-901.

[2] Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Prof. Moraes Rego, N°. 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP.: 50670-901.

[3] Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Av. Dr Arnaldo, N°. 355, Cerqueira César, São Paulo-SP, CEP.: 01246-902.

Endereço para correspondência:

Rua Saldanha Marinho n. 1479/302

Maurício de Nassau Caruaru-PE

CEP: 55014-330

Tel. 81-9979 0410

e-mail: anaceciliaprofa@yahoo.com.br

RESUMO

A persistência do genoma do Vírus da Hepatite B (HBV) em indivíduos com o antígeno de superfície para o HBV (HBsAg) negativo, caracteriza-se como infecção oculta. A alta diversidade de determinantes antigênicos do HBV gera uma preocupação em centros de hemodiálises, pois em alguns casos podem ocorrer mutações como supressão na expressão do gene S. O objetivo desse trabalho foi identificar infecção oculta pelo vírus da Hepatite B em pacientes hemodialisados de 5 clínicas de Recife/PE/Brasil, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007. A população estudada foi de 752 pacientes, com uma média de idade de 50 ± 15,1 e de ambos os sexos. A coleta sangüínea foi realizada pela fistula do paciente antes do tratamento hemodiálitico e as amostras foram encaminhadas em tempo hábil de 04 horas ao laboratório para processamento e armazenamento a - 80° C. O DNA-HBV foi analisado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) "*in house*" e as amostras positivas foram seqüenciadas para a identificação do genótipo e pesquisa de mutação. A infecção oculta foi identificada em 0,4 % (3/752) das amostras, sendo 33,3% (1/3) para o genótipo A e 66,7% para o D. Nenhuma mutação foi observada nas seqüências virais analisadas. A infecção oculta encontrada na pesquisa mostra a importância de estudos moleculares, uma vez que, pacientes considerados HBsAg negativos podem albergar o vírus disseminando-o para os demais pacientes.

Palavras-chaves: Infecção Oculta, Vírus da Hepatite B, hemodialisados, PCR, Genótipo, Mutação.

INTRODUÇÃO

O vírus hepatotrófico da família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*, espécie vírus da hepatite B (HBV) constitui uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes hemodialisados (Fabrizi et al. 2008). A relevância clínica da infecção oculta pelo HBV, ou seja, HBsAg ausente com presença do DNA-HBV no soro ou tecido hepático, permanece não esclarecida, havendo apenas dados de prevalência em algumas regiões (Fabrizi et al.205). Dados sobre a freqüência da infecção oculta no Brasil são escassos, todavia esse número varia de 0 a 58% em pacientes hemodialisados em outras regiões do mundo (Oesterreicher et al. 1995, Cabrerizo et al. 1997, Besisik et al. 2003, Minuk et al. 2004, Fabrizi et al. 205, Goral et al. 2006, Kanbay et al. 2006, Siagris et al. 2006).

A infecção oculta para o HBV está associada em alguns casos com a presença de vírus mutantes. Uma modificação na expressão do gene S do HBV, pode torna o marcador HBsAg indetectável nas técnicas utilizadas (Raimondo et al. 2006). Pacientes hemodialisados que apresentam este tipo de infecção podem disseminar o HBV para outros pacientes e profissionais, por isso técnicas moleculares para a pesquisa sérica do DNA-HBV deveriam ser implantadas (Minuk et al. 2004). Os objetivos deste estudo foram: pesquisar a infecção oculta para o vírus da hepatite B; genotipar o HBV e identificar a presença de mutações nessa região em pacientes hemodialisados de 5 Clínicas da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de Estudo – Foi realizado um corte transversal descritivo para investigar uma determinada população em um dado momento do tempo.

População – Foram estudados 752 hemodialisados atendidos sistematicamente em 5 unidades de diálise, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007.

Centros de Diálise – Para manter em anonimato as clínicas estudadas, as mesmas foram identificadas por letras do alfabeto de A a E, com uma média de pacientes que realiza hemodiálise por mês de 45, 40, 248, 300 e 250. Cada paciente realiza o tratamento três vezes por semana com duração de quatro horas. Nos centros A e B é realizada em dois turnos e nos centros C, D e E em três. Os pacientes HBsAg reagentes realizam o tratamento em salas separadas dos demais e os filtros (dialisadores) são reprocessados em salas separadas dos pacientes não reagentes.

Amostras séricas – Um total de 752 amostras de sangue foi coletado pelos auxiliares de enfermagem das unidades estudadas e encaminhadas em tempo hábil de quatro horas ao setor de Virologia do LIKA, para precessamento e armazenamento do soro. O sangue de cada paciente foi obtido antes do tratamento hemodialítico, para evitar inativação da Taq polimerase pelo anticoagulante utilizado. Os soros foram armazenados a - 80 °C.

Preparação dos "Pools" - As amostras que apresentarem um resultado de anti-HBc total reagente foram analisadas individualmente 201 soros que apresentavam o anti-HBc total positivo. As 551 amostras restantes, que não apresentaram marcador de infecção, foram organizadas em 55 "pools" com 10 amostras em cada.

PCR – Para a amplificação das regiões S e do Core do HBV, foi utilizada a técnica da nested-PCR, conforme descrito por Kaneko et al. (1989), com algumas modificações (Sitnik et al. 2004). O DNA viral foi extraído com fenol e isotiocianato de guanidina e a região S foi amplificada por meio de iniciadores FHBS1 (5 `- GAG CTC TCT AGA GTG GTG GAC TTC - 3`) e RHBS1 (5 `- AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA - 3`) na primeira rodada da reação. A segunda amplificação foi realizada utilizando os iniciadores FHBS2 (5 `- CGT GGT GGA CTC CTT TCA ATT TTC - 3`) e RHBS2 (5 `- CCG ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC -` 3). As amostras que apresentaram um resultado da PCR negativa pela região S do vírus foram testadas utilizando iniciadores para região do Core**,** 2032R **(**5` - CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT – 3') e 1763 **(**5` - GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC GTA TAA - 3`) na primeira PCR. Para a segunda amplificação, os iniciadores 1778-E (5` - GAC GAA TTC CAT TGA CCC GTA TAA AGA ATT - 3`) e 2017R-B (5` - ATG GGA TCC CTG GAT GCT GCC TCT TCC AAA - 3`) foram utilizados. Amostras de água destilada foram inseridas como controle de possíveis contaminações das reações.

Seqüenciamento Reação - Para a caracterização de cepas virais, as amostras foram seqüenciadas por PCR, de acordo com o método de Sanger et al. (1977) utilizando a ABI Prism BigDye Terminator ™ Kit (PE Aplicada biossistemas, Foster City, Califórnia, E.U.A.), em seqüenciador automático ABI Prism 377.

Análise das seqüências - A classificação dos genótipos foi realizada pela comparação do alinhamento das seqüências de aminoácidos obtidas a partir das seqüências de nucleotídeos do gene S do estudo, com seqüências já conhecidas dos diferentes genótipos do HBV depositadas no Genbank. Para esta análise foram utilizados os programas EditSeq e Megalign do pacote DNAstar (Lasergene Inc., Madison, WI, EUA). A classificação dos genótipos foi confirmada pela ferramenta Genotying disponível no site do NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi) (Rozanov et al. 2004).

Mutação para o HBV - Mutações para a Região S foram pesquisadas utilizando os programas EditSeq e Megalign do pacote DNAstar (Lasergene Inc., Madison, WI, EUA).

Análise estatística – Os dados foram analisados pelo Epi-info 6.0 e foi realizada a análise descritiva da infecção oculta, a partir da tabela de distribuição da freqüência absoluta e relativa.

Considerações éticas - A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob o Registro CEP/CCS/UFPE N° 069/06.

RESULTADOS

A infecção Oculta foi encontrada em 0,4% (3\752) dos pacientes, utilizando os iniciadores para região S (tabela 1).

Tabela 1. Prevalência da infecção oculta nos hemodialisados de 5 clínicas de Recife, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007, segundo a positividade para o DNA-HBV.

DNA-HBV	N	%
Positivo	03	0,4
Negativo	749	99,6
Total	**752**	**100**

Os soros que foram retestados com iniciadores para região do core, não mostraram positividade.

As amostras HBV-DNA positivas foram seqüenciadas e os genótipos A e D foram encontrados em 33,3% (1/3) e 66,7% (2/3), respectivamente. Nos "pools" das amostras soronegativas para os marcadores sorológicos não foi identificado DNA-HBV.

O perfil sorológico dos pacientes com a infecção oculta foi: 02 pacientes com anti-HBc total + anti-HBs reagentes e 01 paciente com anti-HBc total isolado.

Não foi encontrada mutação para região S do vírus nas amostras DNA-HBV positivas.

DISCUSSÃO

A infecção oculta para o HBV foi pesquisada em várias populações principalmente àquelas que apresentam fatores de risco para a infecção.

No Japão 45% de usuários de drogas e 51% de hemofílicos foram DNA-HBV positivos e HBsAg não reagentes; em pacientes Iranianos HIV positivos esse percentual variou de 0 a 89% e nos africanos portadores de hepatocarcinoma a prevalência da infecção oculta foi de 75,7% (Hofer et al. 1998, Nunez et al. 2002, Goncales et al. 2003, Santos et al. 2003, Torbenson et al. 2004, Toyoda et al. 2004, Filippini et al. 2006).

Em pacientes hemodialisados esse número varia de 0 a 58% em países como Canadá, Turquia, Itália, Grécia e Espanha (Cabrerizo et al. 1997, Besisik et al. 2003, Minuk et al. 2004, Fabrizi et al. 205, Goral et al. 2006, Kanbay et al. 2006, Siagris et al. 2006).

No Brasil há uma falta de dados da infecção oculta para o HBV em pacientes hemodialisados, portanto este estudo mostra resultados pioneiros em Pernambuco.

O número de pacientes com infecção oculta para o HBV em um estudo pode ser influenciada pela sensibilidade da técnica de biologia molecular utilizada, características virológicas e tamanho da amostra da população estudada (Fabrizi et al. 2005).

Trabalhos mostram que quanto maior a sensibilidade da PCR utilizada, maiores são as chances de detectar o DNA viral, mesmo na presença de cargas virais baixas (Kao et al. 2002, Germanidis & Pawlotsky 2007). A técnica utilizada no presente trabalho com iniciadores para região S, mostrou ter a mesma sensibilidade da PCR realizada com iniciadores para região do Core, além de permitir distinguir os genótipos do vírus (Sitnik et al. 2004). O limite de detecção para o DNA-HBV por esta técnica é de: 300 cópias/mL.

A alta diversidade de determinantes antigênicos do HBV gera preocupação em centros de hemodiálises. Pacientes podem apresentar mutação na região S do vírus, como a do tipo sG145R, na qual ocorre uma modificação no determinante antigênico "a" e com isso o anti-HBs não consegue neutralizar o vírus. Casos isolados de mutantes com variação nessa região têm sido selecionados tanto por vacinação como por imunoprofilaxia em transplantados (Barone 2007). Nos pacientes com infecção oculta não foi encontrado mutação na região S do vírus. Entretanto isso pode ser explicado pela formação de imunocomplexo HBsAg-anti-HBS, levando a uma diminuição deste marcador (Hu 2002).

Trabalhos mostram que pacientes com anti-HBc total e/ou anti-HBs positivos podem apresentar infecção oculta. Minuk et al. (2004), estudando hemodialisados do Canadá verificaram infecção oculta em 3,8% (09/239) dos pacientes, desses 04 eram anti-HBs positivo e 03 não apresentavam marcador sorológico. Entretanto, segundo alguns autores, há uma maior chance de encontrar infecção oculta em pacientes com marcadores de infecção prévia para o HBV, do que em soronegativos (Fukuda et al. 1996, Attallah et al. 1998, Berasain et al. 2000, Chemin et al. 2001, Chaudhuri et al. 2004).

Poucos trabalhos identificam os genótipos do HBV em pacientes hemodialisados com infecção oculta. Nesse estudo, os genótipos encontrados foram A e D, sendo semelhantes aos achados de Weinberger et al. (2000), com freqüência de 61% e 53% para os genótipos A e D, respectivamente. Esses mesmos genótipos foram relatados também em doadores de sangue com infecção oculta para o HBV (Candotti et al. 2008).

A infecção oculta encontrada foi baixa, todavia corroborou com outros estudos. Os marcadores sorológicos avaliam bem a infecção pelo HBV, porém deve-se ter sempre o respaldo de testes moleculares para a verificação de possíveis infecções ocultas e dos

genótipos do vírus. A identificação de pacientes com infecção oculta para o HBV deve ser ampliada a outras clínicas do Estado, como também em outras regiões, para que medidas como a utilização da PCR, possam ser inseridas nas precauções universais adotadas rotineiramente nas clínicas de hemodiálise.

REFERÊNCIAS

Attallah AM,Hussein M,Tabll A,el-Dosoki E,el-Sadany M,el-Ghawalby N. 1998. High prevalence of hepatitis B viral DNA in cirrhotic patients without surface antigen.Trans R Soc Trop Med Hyg 92: 516-517.

Barone AA. 2007. Vírus Mutantes do HBV. Significado Clínico e Abordagem Terapêutica. In: Focaccia R, editor. Tratado de Hepatites Virais, 2ª. Ed. Atheneu, p. 139-142.

Berasain C, Betés M, Panizo A, Et Al. 2000. Pathological And Virological Findings In Patients With Persistent Hypertransaminasemia Of Unknown Aetiology. Gut 47:429-435.

Besisik F, Karaca C, Akyuz F, Horosanli S, Onel D, Badur S, Sever MS, Danalioglu A, Demir K, Kaymakoglu S, Cakaloglu Y, Okten A. 2003. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. J hepatol 38: 506-510.

Cabrerizo M, Bartolome J, Sequera P De, Caramelo C, Carreno V. 1997. Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff. Am Soc Nephrol 8:1443-1447.

Candotti D, Grabarczyk P, Ghiazza P, Roig R, Casamitjana N, Iudicone P, Schmidt M, Bird A, Crookes R, Brojer E, Miceli M, Amiri A, Li C, Allain JP. 2008. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or genotype D strains**.** J Hepatol 49: 537-547.

Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Et Al. 2004. Occult Hepatitis B Virus Infection In Chronic Liver Disease: Full-Length Genome And Analysis Of Mutant Surface Promoter. Gastroenterology 127-1356-1371.

Chemin I, Zoulim F, Merle P, Et Al.2001. High Incidence Of Hepatitis B Infections Among Chronic Hepatitis Cases Of Unknown Aetiology. J Hepatol 34:447-454.

Fabrizi F, Messa PG, Lunghi G, Aucella F, Bisegnas S, Mangano S, Villa M, Barbisoni F, Rusconi E, Martin P. 205. Occult hepatitis B virus Infection in dialysis patients: a multicentre survey. Aliment Pharmacol Ther 21: 1341-1347.

Fabrizi F, Messa PG, Martin P. 2008. Hepatitis B Infection and the Dialysis Patient. Seminars in Dialysis 21: 440-446.

Filippini P, Coppola N, Pisapia R, Scolasstico C, Marroco C, Zaccariello A, et al 2006. Impact of occult hepatitis B virus infection in HIV patients naïve for antiretroviral therapy. AIDS. 20:1253-1260.

Fukuda R, Ishimura N, Kushiyama Y, Et Al. Hepatitis B Virus With X Gene Mutation Is Associated With The Majority Of Serologically “Silent” Non-B, Non-C Chronic. 1996. Hepatitis. Microbiol Immunol 40:481-488.

Germanidis G and Pawlotsky JM. 2007. Detecção do DNA viral: métodos de qualificação. In: Focaccia R. Tratado de Hepatites Virais, 2 Ed., Atheneu Editora, p.159-170.

Goncales Jr FL, Pereira JS, Da Silva C, Thomaz GR, Pavan MH, Fais VC, et al 2003. Hepatitis B virus DNA in sera of blood donors and of patients infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. Clin Diagn Lab Immunol. 10:718-720.

Goral V, Ozkul H, Tekes S, Sit D, Kadiroglu AK. 2006. Prevalence of occult HBV infection in hemodialysis patients with chronic HCV. World J Gastroenterol 12: 3420-3424.

Hofer M, Joller-Jemelka Hl, Grob Pj, Et Al. 1998. Frequent Chronic Hepatitis B Virus Infection In Hiv-Infected Patients Positive For Antiboby To Hepatitis B Core Antigen Only. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17:6-13.

Hu K-Q. 2002. Occult Hepatitis B Virus Infection And Its Clinical Implications. J Viral Hepat 9:243-257.

Kanbay M, Gur G, Akcay A, Selcuk H, Yilmaz U, Arslan H, Boyacioglu S, Ozdemir FN. 2006. Is hepatitis C vírus positivity a contributing factor to occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients? Dig Dis Sci 51: 1962-1966.

Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. 1989. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. J. Clin. Microb 27: 1930-1933.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. 2002. Occult Hepatitis B Virus Infection and Clinical Outcomes of Patients with Chronic Hepatitis C. Journal of Clinical Microbiology 40:4068-4071.

Minuk G Y, Sun DF, Greenberg RG, Zhang M, Hawkins K, Uhanova J, Gutkin A, Bernstein K, Giulivi A, Osiowy C. 2004. Occult Hepatitis B virus infection in a North American Adult Hemodialysis Patient Population. Hepatology 40: 1072-1077.

Nunez M, Rios P, Perez-Olmeda M, Soriano V. 2002. Lack of occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients. AIDS 16: 2099-2101.

Oesterreicher C, Hammer J, Koch U, Pfeffel F, Sunder-Plassmann G, Petermann D, MÃller C. 1995. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis**.** Kidney Int 4: 1967-71.

Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G 2006. Occult hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology. (article in press).

Rozanov M, Plikat U, Chappey C, Kochergin A, Tatusova T 2004. A web-based genotyping resource for viral sequences. Nucleic Acids Research 32: 654-659).

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

Santos EA, Yoshida CF, Rolla VC, Mendes JM, Vieira IF, Arabe J, et al 2003. Frequent Occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 22:92-98.

Siagris D, Christofidou M, Triga K, Pagoni N, Theocharis GJ, Goumenos D, et al 2006. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with chronic HCV infection. J Nephrol 19: 327-333.

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

Torbenson M, Kannangai R, Astemborski J, Et Al. 2004. High Prevalence of Occult Hepatitis B In Baltimore Injection Drug Users. Hepatology 39:51-57.

Toyoda H, Hayashi K, Murakami Y, Honda T, Katano Y, Nakano I, et al 2004. Prevalence and clinical implications of Occult Hepatitis B viral infection in hemophilia patients in Japan. J Med Virol. 73:195-199.

Weinberger Km, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High Genetic Variability Of The Group-Specific A-Determinant Of Hepatitis B Virus Surface Antigen (Hbsag) And The Corresponding Fragment Of The Viral Polymerase In Chronic Virus Carriers Lacking Detectable Hbsag In Serum. 2000. J Gen Virol 81:1165-1174.

Occult Hepatitis B virus infection in hemodialysis in Recife, Pernambuco, Brazil

Occult HBV infection in hemodialysis.

Ana Cecília C. de Albuquerque[1], Maria Rosângela C.D. Coêlho[1,2], Marcílio F. Lemos[3], Regina C. Moreira[3].

[1] Virolgy Division, the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Pernambuco, PE, Brazil.

[2] Fisiology and Pharmacolgy Departament (UFPE), Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil Pernambuco, PE, Brazil.

[3] Hepatitis virus Division, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, SP, Brazil.

Address correspondence to: Ana Cecília Cavalcanti

Saldanha Marinho Street, number: 1479 Apartment: 302, Maurício de Nassau

Caruaru, PE, Brazil CEP: 55014-330 Tel. +55-21-81-9979 0410

E-mail: anaceciliaprofa@yahoo.com.br

ABSTRACT

Persistence of the genome for the hepatitis B virus (HBV) in individuals who are negative for the surface antigen for HBV (HBsAg) reflects occult infection. The high diversity of antigen determinants of HBV is of great importance in hemodialysis centers. The aim of this study was to identify occult HBV infection among hemodialysis patients at five clinics in the city of Recife, Pernambuco, between August 2006 and August 2007. The study population (n = 752), of mean age 50 ± 15.1 years and both sexes, underwent blood collection through the patient's fistula prior to hemodialysis. The samples were promptly sent (within four hours) to the laboratory for processing and storage at - 80° C. They were investigated for HBV-DNA by means of the in-house PCR technique. Subsequently, the positive samples were sequenced to identify the genotype and investigate any mutations. The occult infection was found in 0.4% (3/752). The genotypes A (33.3%; 1/3) and D (66.7; 2/16) were found in this population. No mutations in S region were found. The study corroborated the findings from other studies in the literature. Molecular studies on HBV have fundamental importance, since they show patients who clinically are considered negative but in reality host the virus, and who have the ability to spread it to other patients.

Key Words: Occult Infection, Hepatitis B virus, Hemodialysis, PCR, Genotype, Mutation.

INTRODUCTION

The hepatitis B virus (HBV), a species of hepatotrophic virus in the genus *Orthohepadnavirus*, *Hepadnaviridae* family, is the major cause of morbidity and mortality in hemodialysis patients (Fabrizi et al. 2008). The clinical significance of occult HBV infection, i.e. absence of HBsAg with presence of HBV-DNA in serum or liver tissue, remains controversial. Prevalence data is only available for certain regions (Fabrizi et al. 205). The occult infection rate ranges from 0 to 58% among hemodialysis patients (Oesterreicher et al. 1995, Cabrerizo et al. 1997, Besisik et al. 2003, Minuk et al. 2004, Fabrizi et al. 205, Goral et al. 2006, Kanbay et al. 2006, Siagris et al. 2006).

Determination of any mutations caused by the high diversity of certain antigens for HBV is of great importance in hemodialysis centers (Stinik et al. 2004). In some cases, occult HBV infection is associated with mutant viruses that give rise to suppression of S gene expression, such that the HBsAg marker becomes undetectable to the techniques that are used (Raimondo et al. 2006). Hemodialysis patients who present occult HBV infection may spread the virus to other patients and health professionals and, therefore, tests to investigate HBV-DNA for all patients are an important precaution (Minuk et al. 2004).

The aims of the present study were to identify occult HBV infection among hemodialysis patients at five hemodialysis units in the city of Recife, Pernambuco, Brazil; to genotype the viral DNA in positive samples, using primers for the S region of the virus; and to identify the presence of any mutations in the viral genome.

MATERIAL AND METHODS

Type of study – A cross-sectional study was carried out to investigate a population at moment of the time.

Population – A population of 752 hemodialysis patients with negative HBsAg was analyzed, between August 2006 and August 2007.

Dialysis centers – The study was conducted in five dialysis units in the city of Recife, in northeastern Brazil, between August 2006 and August 2007. To maintain the anonymity of the clinics studied, they have been identified by means of letters of the alphabet. The mean numbers of patients who were undergoing hemodialysis at these clinics every month were: A (45), B (40), C (248), D (300) and E (250). Each patient was receiving treatment three times a week. At centers A and B, treatment was performed in two shifts and in centers C, D and E in three shifts. Each shift comprised one four-hour period of treatment. The HBsAg-positive patients received their treatment, and the filters (dialyzers) for these patients were processed, in rooms that were separate from where the HBsAg-negative patients were treated.

Serum samples – A total of 752 serum samples was evaluated to investigate the genetic material of the virus. The blood was obtained from each patient before hemodialysis, in order to avoid inactivation of the Taq polymerase through the anticoagulant that was used. The 230 serum samples were evaluated individually because they presented a marker for HBV, while the remaining 551 were organized into pools because they did not present any marker for

previous contact with the virus. Fifty-five pools of ten samples each were produced. The samples were stored at - 80 °C.

Preparation of "Pools" - Samples that show a result of anti-HBc total reagent were individually analyzed 201 sera that had anti-HBc total positive. The remaining 551 samples, which showed no markers of infection, were organized into 55 "pools" with 10 samples each.

PCR – For amplification S and C regions of HBV were used the nested-PCR as described by Kaneko et al. (1989), with some modifications (Sitnik et al. 2004). HBV- DNA detection using PCR was performed on 26 HBsAg-positive samples. The DNA was extracted from serum using a solution of phenol and guanidine isothiocyanate. The primers FHBS1 (5' - GAG CTC TCT AGA GTG GTG GAC TTC – 3') and RHBS1 (5' - AAA TKG CAC TAG TAA ACT GAG CCA – 3') were used for the first round of amplification. For the second amplification, the primers FHBS2 (5' - CGT GGT GGA CTC CTT TCA ATT TTC – 3') and RHBS2 (5' - CCG ARG AGA AAC GGR CTG AGG CCC – 3') were used. The samples that presented a PCR result that was negative for the S region of the virus underwent a second test using primers for the core region, 2032R (5` - CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT – 3') and 1763 (5` - GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC GTA TAA - 3`) at first PCR. For second amplification, the primers 1778-E (5` - GAC GAA TTC CAT TGA CCC GTA TAA AGA ATT - 3`) and 2017R-B (5` - ATG GGA TCC CTG GAT GCT GCC TCT TCC AAA - 3`) were utilized. Water samples were used as negative controls for each reaction, in order to exclude possible occurrences of cross-contamination.

Sequencing reaction – To characterize the virus strains, the samples were sequenced using the PCR product, in accordance with the method of Sanger et al. (1977), using the ABI Prism BigDye Terminator™ Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA), in an ABI Prism 377 automatic sequencer.

Sequence analysis – The genotypes were classified by comparing the alignments of the amino acid sequences that were obtained from the nucleotide sequences of the S gene in this study with other known sequences from different HBV genotypes kept in the Gene Bank, using Edit Seq MegAlign and software in the DNAstar package (LaserGene, Inc.). The genotype classifications were confirmed by means of the Genotyping tool, which is available on the NCBI website: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi) (Rozanov et al. 2004).

HBV Mutation - Mutations of the S region were investigated in the amino acid sequences obtained from the loci 100, 122, 123, 126, 129, 130, 133, 141, 142, 144, 145 and 149. For this analysis, the EditSeq and Megalign software from the DNAstar package was used (Lasergene Inc., Madison, WI, USA).

Statistical analysis - The data were analyzed by Epi-Info 6.0 and occult HBV infection descriptive analysis was performed using table absolute and relative distribution frequency.

Ethical matters – The protocol for this study was submitted to and was granted approval by the research ethics committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco under registration number CEP/CCS/UFPE 069/06.

RESULTS

Occult infection was found in 0.4% (3/752) of the patients utilizing primers S region (table 1). Samples there were no positive when re-tested with primers core region.

The HBV-DNA-positive samples were sequenced and the genotypes A and D were found in 33,3% (1/3) and 66,7% (2/3), respectively on the analysis viral sequences. HBV-DNA was not found in the pools of HBV-seronegative samples.

The patients who presented occult infection had the following profiles of serological markers for HBV: two patients were positive for anti-HBc total + anti-HBs and one patient was positive for anti-HBc total alone.

No mutations relating to S region were found in the HBV-DNA-positive samples.

DISCUSSION

Occult HBV infection has already been investigated in several populations, particularly in groups with risk factors for this infection.

In Japan, 45% of drug users and 51% of hemophiliacs were found to be HBV-DNA-positive and HBsAg-negative; the percentage ranged from 0 to 89% among HIV-positive Iranian patients and Among African patients with liver cancer, 75.7% were found to present occult HBV infection (Hofer et al. 1998, Nunez et al. 2002, Goncales et al. 2003, Santos et al. 2003, Torbenson et al. 2004, Toyoda et al. 2004, Filippini et al. 2006).

Among hemodialysis patients, this figures ranged from 0 to 58% in countries such as Canada, Turkey, Italy, Greece and Spain (Cabrerizo et al. 1997, Besisik et al. 2003, Minuk et al. 2004, Fabrizi et al. 2005, Goral et al. 2006, Kanbay et al. 2006, Siagris et al. 2006).

There is a lack of data on occult HBV infection in Brazil in hemodialysis patients, therefore this study shown pioneering results in Pernambuco.

The number of patients with occult HBV infection found in any given study may be influenced by the sensitivity of the molecular biology technique used, virological characteristics and population sample size studied (Fabrizi et al. 2005).

The greater the sensitivity of the PCR technique used is, the greater the chance of detecting viral DNA will be, even with low viral loads (Kao et al. 2002, Germanidis & Pawlotsky 2007). The PCR for investigating HBV-DNA that was used in the present study was initially performed using primers for the S region, since PCR on this region had been shown to have the same efficiency as PCR on the core region, as well as making it possible to distinguish between viral genotypes (Sitnik et al. 2004). For samples that had been shown to be negative for the S region, PCR was performed using primers for the core region. However,

there was no increase in the percentage of positive findings of HBV-DNA. The detection limit for HBV-DNA in the tests used was 300 copies/ml.

The high diversity of antigenic determinants for HBV is of concern for hemodialysis centers because patients who are negative for HBsAg may carry HBV-DNA because of mutations (Carrilho et al. 2004). For example, with type sG145R, the antigenic determinant "a" of HBV is lost and thus, anti-HBs is unable to neutralize the virus. Isolated cases of mutants with variation in this region have been selected either by vaccination or by immunoprophylaxis in transplanted (Barone 2007). In the present study, no mutations were found in the S region in the amino acid sequences analyzed. Therefore these results can to be explained because antibody response usually facilitates HBV clearance, but persistent circulating HBV-containing immune complex may cause a status of HBsAg negative viraemia (Hu 2002).

Studies shown among the patients with anti-HBc total and/or anti-HBs positives can to present occult infection. Minuk et al. (2004), who found that 3.8% (9/239) of the hemodialysis patients at an urban center in Canada presented occult infection. Of these, four were positive for anti-HBs and three did not present any serological marker. However there is a greater chance of finding occult infection in patients with previous markers for HBV infection than in seronegative individuals (Fukuda et al. 1996, Attallah et al. 1998, Berasain et al. 2000, Chemin et al. 2001, Chaudhuri et al. 2004).

Few studies have identified the genotyping among hemodialysis patients around the world. The findings of genotypes A and D in the present study was similar to the results from Weinberger et al. (2000), who find an frequency of 61% and 53% to A and D genotypes, respectively. These same genotypes were related in blood donors with occult HBV infection (Candotti et al. 2008).

In conclusion, the occult HBV infection was low, however corroborated with another studies. The serological markers evaluated HBV infection well, but always needed the backing of molecular tests in order to check on possible mutations and genotypes of the virus. Identification of patients with occult HBV infection needs to be expanded to other clinics in the State, and also to other regions, so that measures such as the use of PCR can be implemented in the universal precautions adopted routinely in these health establishments.

REFERENCES

Attallah AM,Hussein M,Tabll A,el-Dosoki E,el-Sadany M,el-Ghawalby N. 1998. High prevalence of hepatitis B viral DNA in cirrhotic patients without surface antigen.Trans R Soc Trop Med Hyg 92: 516-517.

Barone AA. 2007. Vírus Mutantes do HBV. Significado Clínico e Abordagem Terapêutica. In: Focaccia R, editor. Tratado de Hepatites Virais, 2ª. Ed. Atheneu, p. 139-142.

Berasain C, Betés M, Panizo A, Et Al. 2000. Pathological And Virological Findings In Patients With Persistent Hypertransaminasemia Of Unknown Aetiology. Gut 47:429-435.

Besisik F, Karaca C, Akyuz F, Horosanli S, Onel D, Badur S, Sever MS, Danalioglu A, Demir K, Kaymakoglu S, Cakaloglu Y, Okten A. 2003. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. J hepatol 38: 506-510.

Cabrerizo M, Bartolome J, Sequera P De, Caramelo C, Carreno V. 1997. Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff. Am Soc Nephrol 8:1443-1447.

Candotti D, Grabarczyk P, Ghiazza P, Roig R, Casamitjana N, Iudicone P, Schmidt M, Bird A, Crookes R, Brojer E, Miceli M, Amiri A, Li C, Allain JP. 2008. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or genotype D strains. J Hepatol 49: 537-547.

Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Et Al. 2004. Occult Hepatitis B Virus Infection In Chronic Liver Disease: Full-Length Genome And Analysis Of Mutant Surface Promoter. Gastroenterology 127-1356-1371.

Chemin I, Zoulim F, Merle P, Et Al.2001. High Incidence Of Hepatitis B Infections Among Chronic Hepatitis Cases Of Unknown Aetiology. J Hepatol 34:447-454.

Fabrizi F, Messa PG, Lunghi G, Aucella F, Bisegnas S, Mangano S, Villa M, Barbisoni F, Rusconi E, Martin P. 205. Occult hepatitis B virus Infection in dialysis patients: a multicentre survey. Aliment Pharmacol Ther 21: 1341-1347.

Fabrizi F, Messa PG, Martin P. 2008. Hepatitis B Infection and the Dialysis Patient. Seminars in Dialysis 21: 440-446.

Filippini P, Coppola N, Pisapia R, Scolasstico C, Marroco C, Zaccariello A, et al 2006. Impact of occult hepatitis B virus infection in HIV patients naïve for antiretroviral therapy. AIDS. 20:1253-1260.

Fukuda R, Ishimura N, Kushiyama Y, Et Al. Hepatitis B Virus With X Gene Mutation Is Associated With The Majority Of Serologically “Silent” Non-B, Non-C Chronic. 1996. Hepatitis. Microbiol Immunol 40:481-488.

Germanidis G and Pawlotsky JM. 2007. Detecção do DNA viral: métodos de qualificação. In: Focaccia R. Tratado de Hepatites Virais, 2 Ed., Atheneu Editora, p.159-170.

Goncales Jr FL, Pereira JS, Da Silva C, Thomaz GR, Pavan MH, Fais VC, et al 2003. Hepatitis B virus DNA in sera of blood donors and of patients infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. Clin Diagn Lab Immunol. 10:718-720.

Goral V, Ozkul H, Tekes S, Sit D, Kadiroglu AK. 2006. Prevalence of occult HBV infection in hemodialysis patients with chronic HCV. World J Gastroenterol 12: 3420-3424.

Hofer M, Joller-Jemelka Hl, Grob Pj, Et Al. 1998. Frequent Chronic Hepatitis B Virus Infection In Hiv-Infected Patients Positive For Antiboby To Hepatitis B Core Antigen Only. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17:6-13.

Hu K-Q. 2002. Occult Hepatitis B Virus Infection And Its Clinical Implications. J Viral Hepat 9:243-257.

Kanbay M, Gur G, Akcay A, Selcuk H, Yilmaz U, Arslan H, Boyacioglu S, Ozdemir FN. 2006. Is hepatitis C vírus positivity a contributing factor to occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients? Dig Dis Sci 51: 1962-1966.

Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. 1989. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. J. Clin. Microb 27: 1930-1933.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. 2002. Occult Hepatitis B Virus Infection and Clinical Outcomes of Patients with Chronic Hepatitis C. Journal of Clinical Microbiology 40:4068-4071.

Minuk G Y, Sun DF, Greenberg RG, Zhang M, Hawkins K, Uhanova J, Gutkin A, Bernstein K, Giulivi A, Osiowy C. 2004. Occult Hepatitis B virus infection in a North American Adult Hemodialysis Patient Population. Hepatology 40: 1072-1077.

Nunez M, Rios P, Perez-Olmeda M, Soriano V. 2002. Lack of occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients. AIDS 16: 2099-2101.

Oesterreicher C, Hammer J, Koch U, Pfeffel F, Sunder-Plassmann G, Petermann D, MÃller C. 1995. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis**.** Kidney Int 4: 1967-71.

Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G 2006. Occult hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology. (article in press).

Rozanov M, Plikat U, Chappey C, Kochergin A, Tatusova T 2004. A web-based genotyping resource for viral sequences. Nucleic Acids Research 32: 654-659).

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

Santos EA, Yoshida CF, Rolla VC, Mendes JM, Vieira IF, Arabe J, et al 2003. Frequent Occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 22:92-98.

Siagris D, Christofidou M, Triga K, Pagoni N, Theocharis GJ, Goumenos D, et al 2006. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with chronic HCV infection. J Nephrol 19: 327-333.

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

Torbenson M, Kannangai R, Astemborski J, Et Al. 2004. High Prevalence of Occult Hepatitis B In Baltimore Injection Drug Users. Hepatology 39:51-57.

Toyoda H, Hayashi K, Murakami Y, Honda T, Katano Y, Nakano I, et al 2004. Prevalence and clinical implications of Occult Hepatitis B viral infection in hemophilia patients in Japan. J Med Virol. 73:195-199.

Weinberger Km, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High Genetic Variability Of The Group-Specific A-Determinant Of Hepatitis B Virus Surface Antigen (Hbsag) And The Corresponding Fragment Of The Viral Polymerase In Chronic Virus Carriers Lacking Detectable Hbsag In Serum. 2000. J Gen Virol 81:1165-1174.

TABLE

Table I. Occult HBV infection frequency in hemodialysis in five clinics, between August 2006 and August 2007, according to HBV-DNA positivity.

HBV-DNA	**N**	**%**
Positive	03	0,4
Negative	749	99,6
Total	752	100

Conclusões

- O vírus da hepatite B ainda circula em algumas clínicas de hemodiálise;
- A endemicidade do HBsAg é intermediária;
- A infecção oculta foi observada na população estudada;
- Não houve mutação na região S do HBV;
- Os genótipos encontrados foram o A, D e F, semelhante à população geral;
- O sexo, idade, tempo de hemodiálise e número de transfusões é que está mais estreitamente associada com a soropositividade para o anti-HBc total.

Recomendações/Perspectivas

Seria relevante se o trabalho fosse estendido para outras unidades de diálise da região e cidades vizinhas para se ter uma melhor estimativa do estado.

O estudo mostrou que ainda deve haver uma preocupação quanto à circulação do vírus em unidade de hemodiálise mesmo com o advento da vacina. A realização dos marcadores sorológicos para o HBV avalia de forma satisfatória os pacientes dentro das unidades de hemodiálise. Todavia o respaldo de técnicas moleculares poderia evidenciar pacientes com infecção oculta.

Diante dos achados na literatura seria relevante avaliar a infecção oculta para o HBV em relação aos pacientes portadores de infecção pelo HCV nas unidades estudadas.

Os resultados de trabalhos epidemiológicos são importantes para avaliar o perfil do HBV em clínicas de diálise. Assim, se forem observados resultados fora dos padrões habituais, mudanças podem ser realizadas, a fim de melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

APÊNDICES

TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa:

Infecção Oculta e Fatores de riscos para o Vírus da Hepatite B em pacientes hemodialisados de Recife-PE.

Pesquisador responsável :Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque

Rua Saldanha Marinho, n. 1479/302 M. de Nassau, fone: 9979 0410.

Conselho Regional de Biomedicina : 0718

Eu, paciente abaixo assinado, realizo tratamento de hemodiálise na clínica estudada e concordo em participar voluntariamente desta pesquisa sobre a análise da infecção pelo vírus da hepatite B em pacientes hemodialisados. Sei que a razão deste estudo é saber se eu tenho hepatite B e se eu tiver saber o tipo do vírus.

Admito ter sido esclarecido sobre as perguntas feitas e do procedimento onde será retirada uma amostra de 10 ml de sangue de uma veia, para saber se tenho ou não o vírus da hepatite B. Estou ciente de que o sangue será retirado da fístula que já está instalada no momento anterior ao tratamento, tornando zero o risco de contaminação. O sangue será coletado pelos profissionais da unidade estudada. Sei que essa pesquisa irá me ajudar, pois saberei se eu tenho ou não a hepatite B e se eu tiver saberei o tipo desse vírus através de um exame feito em São Paulo. Sei que saber o tipo desse vírus irá me ajudar no tratamento do mesmo. Fui informado que, quando da apresentação dos resultados da pesquisa, não serão vinculados dados que possam me identificar como participante da mesma. Sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga qualquer prejuízo para mim.

Os resultados serão publicados em revistas científicas.

Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento.

Recife, de de 2006.

Assinatura do paciente Testemunhas

Assinatura do Pesquisador Testemunhas

TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa:

Infecção Oculta e Fatores de riscos para o Vírus da Hepatite B em pacientes hemodialisados de Recife-PE.

Pesquisador responsável : Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque

Rua Saldanha Marinho, n. 1479/302 M. de Nassau, fone: 9979 0410.

Conselho Regional de Biomedicina : 0718

Eu, paciente abaixo assinado menor de 21 anos, realizo tratamento de hemodiálise na clínica estudada e concordo em participar voluntariamente desta pesquisa sobre a análise da infecção pelo vírus da hepatite B em pacientes hemodialisados. Sei que a razão deste estudo é saber se eu tenho hepatite B e se eu tiver saber o tipo do vírus.

Admito ter sido esclarecido sobre as perguntas feitas e do procedimento onde será retirada uma amostra de 10 ml de sangue de uma veia, para saber se tenho ou não o vírus da hepatite B. Estou ciente de que o sangue será retirado da fístula que já está instalada no momento anterior ao tratamento, tornando zero o risco de contaminação. O sangue será coletado pelos profissionais da unidade estudada. Sei que essa pesquisa irá me ajudar, pois saberei se eu tenho ou não a hepatite B e se eu tiver saberei o tipo desse vírus através de um exame feito em São Paulo. Sei que saber o tipo desse vírus irá me ajudar no tratamento do mesmo. Fui informado que, quando da apresentação dos resultados da pesquisa, não serão vinculados dados que possam me identificar como participante da mesma. Sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga qualquer prejuízo para mim.

Os resultados serão publicados em revistas científicas.

Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento.

Recife, de 2006

Assinatura do paciente Testemunha

Assinatura do responsável pelo paciente Testemunhas

Assinatura do pesquisador

QUESTIONÁRIO

NÚMERO:

Data da entrevista:

Registro do Prontuário:

Qual o seu nome:

Qual o seu endereço:

Qual a data do seu nascimento:

Idade em anos:

(1- < 30 anos, 2- 30 a 39, 3- 40 a 49, 4- 50 a 59, 5- ≥ 60)

Sexo:

(1-masculino, 2-feminino.)

Qual o seu estado civil:

(1-solteiro, 2-casado, 3-separado, 4- viúvo)

Qual a sua ocupação:

Há quanto tempo faz diálise:

(1- < de 05 anos e 2- ≥ de 05 anos)

Já fez transplante renal?

(1-Sim, 2- Não)

Você é vacinado para Hepatite B?

(1- Sim, 2- Não, 3- Ignorado)

Você já recebeu transfusão sangüínea e/ou hemoderivados (plaquetas, fatores de coagulação,...):

(1- Sim, 2- Não)

Quantas:

(1- 1-5, 2- 6-10, 3- > 10, 4- Ignorado)

Já fez alguma tatuagem:

(1- Sim, 2- Não)

Você já usou ou usa droga injetável:

(1-Sim, 2- Não)

Cocaína intranasal com canudo:

(1-Sim, 2- Não)

Você usa preservativo (camisinha) nas práticas sexuais?

(1- Usa todas às vezes, 2 - usa às vezes, 3- não usa, 4- nunca teve relação)

Você sempre realizou hemodiálise nesta clínica?

(1-Sim, 2- Não)

RESULTADOS

SOROLOGIA (ELISA):

HBsAg:

anti-HBc total:

anti-HBs:

PCR:HBV-DNA:

SEQÜENCIAMENTO:

Genótipo:

Subtipo:

Mutação:

Referências

1- ADACHI H, KANEKO S, MATSUSHITA E, et al. Clearance Of HBsAg In Seven Patients With Chronic Hepatitis B. **Hepatology**, v. 16, p. 1334-37, 1992.

2- AHN SH, PARK YN, PARK JY, et al. Long-Term Clinical And Histological Outcomes In Patients Whit Spontaneous Hepatitis B Surface Antigen Seroclearance. **J Hepatol**., v. 42, p. 188-94, 2005.

3- ALTER MJ, FAVERO MS, MAYNARD JE. Impact of Infection control strategies on the incidence of dialysis-associated hepatitis in the United States. **J. Infect. Dis**., v. 153, p. 1149-51, 1986.

4- ANDO K, GUIDOTTI LG, WIRTH S, et al. Class I Restricted Cytotoxic T Lymphocytes Are Directly Cytopathic For Target Cells In Vivo. **J Immunol.**, v. 152, p. 3245-53, 1994.

5- ARAUZ-RUIZ P, NORDER H, VISONA KA, MAGNIUS LO. Genotype in HBV-infected patients of Hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. **J. Med. Virol**., v. 51, p. 305-12, 1997.

6- ARRAES, L. C.; XIMENES, R.; ANDRIEU, J. M.; LU, W.; BARRETO, S.; PEREIRA, L. M. M. B.; CASTELO, A.. The Biological Meaning Of Anti-Hbc Positive Result In Blood Donors: Relation To Hbv-Dna And To Other Serological Markers. **Rev. Inst. Med. S. Paulo**, v. 45, p. 137-40, 2003.

7- BHAT, R. A.; ULRICH, P. P.; VYAS, G. N.. Molecular Variant Of Hepatitis B Virus In A Persistently Infected Homosexual Man. **Hepatology**, v. 11, p. 271, 1990.

8- BARONE AA. Vírus Mutantes do VHB. Significado Clínico e Abordagem Terapêutica in: **Tratado de Hepatites Virais**, Focaccia R. 2ª. Ed. Atheneu, p. 139-142, 2007.

9- BARTHOLOMEUSZ A, GROENEN LC. Clinical experience with famciclovir against hepatitis B virus. **Intervirology**, v. 40, p. 337-42, 1997.

10- BEASLEY RP, HWANG LY, LIN CC. Incidence of hepatitis B virus infection in preschool children in Taiwan. **J Infect Dis**., v. 146, p. 198-204, 1982.

11- BEDOSSA P, POYNARD T. For The Metavir Cooperative Study Group. An Algorithm For The Grading Of Activity In Chronic Hepatitis C. **Hepatology**, v. 24, p. 289-93, 1996.

12- BERASAIN C, BETÉS M, PANIZO A, et al. Pathological and Virological Findings In Patients With Persistent Hypertransaminasemia Of Unknown Aetiology. **Gut**, v. 47, p. 429-35, 2000.

13- BLUMBERG BS, ALTER HJ, VISNICH S. A "new" antigen in Leukemia sera. **JAMA**, v. 191, p. 541-6, 1965.

14- BRÉCHOT C, JAFFREDO F, LAGORCE D, et al. Impact Of HBV, HCV And GBV-C/HGV On Hepatocellular Carcinomas In Europe: Results Of A European Concerted Action. **J Hepatol**., v. 29, p. 173-83, 1998.

15- BRÉCHOT C, THIERS V, KREMSDORF D, et al. Persistent Hepatitis B Virus Infection In Subjects Without Hepatitis B Surface Antigen: Clinically Significant Or Purely "Occult"? **Hepatology**, v. 34, p. 194-203, 2001.

16- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.. Vírus da Hepatite. In: Jawetz, Melnik E Adelberg – **Microbiologia Médica**, Tradução: Volux, P. J. 21ª Ed, Rio De Janeiro, Guanabara Koogan, p. 340-55, 2000.

17- BROTMAN B, PRINCE AM, HUIMA T, et al. Interference Between Non-A, Non-B And Hepatitis B Virus Infection In Chimpanzees. **J Med Virol**., v. 11, p. 191-205, 1993.

18- BRUNETTO, M.R.; STEMLER, M.; BONINO, F.; SCHODEL, F.; OLIVIERI, F.; RIZZETTO, M.; VERME, G.; WILL, H. A New Hepatitis B Virus Strain in Patients With Severe Anti-Hbe Positive Chronic Hepatitis B. J. **Hepatol**., v. 10, p. 258-61, 1990.

19- BUSEK SU, BABÁ EH, FILHO HAT, PIMENTA L, SALOMÃO A, OLIVEIRA RC, OLIVEIRA GC. Hepatitis C and Hepatitis B virus infection in different Hemodialysis Units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Men. **Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 775-8, 2002.

20- CABRERIZO M, BARTOLOME J, SEQUERA P DE, CARAMELO C, CARRENO V. Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff. **Am Soc Nephrol**., v. 8, p. 1443-7, 1997.

21- CARMAN, W. F.; ZANETTI, A. R.; KARAYIANNIS, P.. Vaccine-Induced Escape Mutant Of Hepatitis B Virus. **Lancet**, v. 336, p. 325-29, 1990.

22- CARMAN WF. The Clinical Significance Of Surface Antigen Variants Of Hepatitis B Virus. **J Virol Viral Hepatitis**, v. 4, p. 11-20, 1997.

23- CARRILHO FJ, MORAES CR, PINHO JRR, MOREIRA R, BERTOLINI D, MELO IM, LEMOS MF, BASSIT L, CARDOSO RA, DOS SANTOS GR, DA SILVA LC. Hepatitis B virus infection in Hemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. **BMC Public Health**, v. 04, p.1-11, 2004.

24- CENDOROGLO NETO M, MANZANO SIR, CANZIANI ME, SILVA AEB, CIRENZA MLF, SESSO RC, AJZEN H, DRAIBE AS. Environmental transmission of hepatitis B and hepatitis C viruses within the hemodialysis unit. **Artif Organs**, v. 19, p. 251-5, 1995.

25- CHABAUD M. DEPRIL LN, LE CANN P, et al. Detection Of Hepatitis B Virus DNA By Polymerase Chain Reaction In Vaccinated And Non-Vaccinated Senagalese Children. **Arch Virol**., v. 8, p. 123-31, 1993.

26- CHAUDHURI V, TAYAL R, NAYAK B, et al. Occult Hepatitis B Virus Infection In Chronic Liver Disease: Full-Length Genome And Analysis Of Mutant Surface Promoter. **Gastroenterology**, v. 127, p. 1356-71, 2004.

27- CHAZOUILLÈRES O, MAMISH D, KIM M, et al. "Occult Hepatitis B virus as source of infection in liver transplant recipients. **Lancet**, v. 343, p. 142-6, 1994.

28- CHEMIN I, ZOULIM F, MERLE P, et al. High Incidence Of Hepatitis B Infections Among Chronic Hepatitis Cases Of Unknown etiology. **J Hepatol**., v. 34, p. 447-54, 2001.

29- CHEN KS, LO SK, LEE N, LEU ML, HUANG CC, FANG KM. Superinfection with hepatitis C virus in hemodialysis patients with hepatitis B surface antigenemia: its prevalence and clinical significance in Taiwan. **Nephron**, v. 73, p. 158-64, 1996.

30- CONJEEVARAN HS, LOK AS. Occult Hepatitis B Virus Infection: A Hidden Menace? **Hepatology**, v. 34, p. 204-6, 2001.

31- COURSAGET P, YVOMET B, CHOTARD J. Age and sex related study of hepatitis B virus chronic carrier state in infants from an edemic area. **J Med Virol**., v. 22, 1-5, 1987.

32- COURSAGET P, LE CANN P, LEBOULLEUX D, et al. Detection Of Hepatitis B Virus DNA By Polymerase Chain Reaction In HBsAg Negative Senegalese Patients Suffering From Cirrhosis Or Primary Liver Cancer. **Fems Microbiol Lett**, v. 67, 35-8, 1991.

33- COUROUCE-PAUTY AM, LEMAIRE JM. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. **Vox Sang**, v. 35, 304-8, 1978.

34- FABRIZI F, MESSA PG, LUNGHI G, AUCELLA F, BISEGNAS S, MANGANO S, VILLA M, BARBISONI F, RUSCONI E, MARTIN P. Occult hepatitis B virus Infection in dialysis patients: a multicentre survey. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 21, p. 1341-7, 2005.

35- FERAY C, GIGOU M, SAMUEL D, et al. Hepatitis C Virus RNA And Hepatitis B Virus DNA In Serum And Liver Of Patients With Fulminant Hepatitis. **Gastroenterology**, v. 104, p. 549-55, 1993.

36- FERREIRA MS. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. **Rev Soc Bras Med Tropical**, v. 33, p. 389-400, 2000.

37- FERREIRA RC, TELES AS, DIAS MA, TAVARES VR, SILVA AS, GOMES AS, YOSHIDA CFT, MARTINS RMB. Hepatitis B Virus infection profile in Hemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 689-92, 2006.

38- FOCACCIA, R.; SOUZA, F.V DE.; CONCEIÇÃO, OJ.G. DA; SANTOS, E. B.. In: Veronesi, R. **Tratado De Infectologia**. v. 06, p.51-62, 1997.

39- FOCACCIA R, CONCEIÇÃO OJG, SETTE JR H. Estimated prevalence of viral hepatitis on the general population of the municipality of São Paulo, measured by plasmatic markers through samples collected from a stratified, randomized and residence-based population survey. **Braz J Infect Dis.**, v. 2, p. 268-83, 1998.

40- FUKUDA R, ISHIMURA N, KUSHIYAMA Y, et al. Hepatitis B Virus With X Gene Mutation Is Associated With The Majority Of Serologically "Silent" Non-B, Non-C Chronic Hepatitis. **Microbiol Immunol.**, v. 40, p. 481-8, 1996.

41- FUKUDA R, ISHIMURA N, NIIGAKI M, et al. Serologically Silent Hepatitis B Virus Coinfection In Patients With Hepatitis C Virus-Associated Chronic Liver Disease: Clinical And Virological Significance. **J Med Virol**., v. 58, 201-7, 1999.

42- GANDHI MJ, YANG GG, MCMAHON BJ. VYAS GN. Hepatitis B Virions Isolated With Antibodies To The Pre-S1 Domain Reveal Ocucult Viremia By Pcr In Alaska Native Hbv Carriers Who Have Seroconverted. **Transfusion**, v. 40, p. 910-6, 2000.

43- GANEM D. Hepadnaviridae: The viruses and the replication. In **Virology**. Fields BN, Knipe DM. editors. 3a. edn. p. 2703-3737.l. 1996.

44- GANNE-CARRIÃ N, KREMSDORF D, GARREAU F, THÃVENIN M, PETIT MA, NALPAS B, BRÃCHOT C. Effects of ethanol on hepatitis B virus Pre-S/S gene expression in the human hepatocellular carcinoma derived HEP G2 hepatitis B DNA positive cell line. **J Hepatol**., v. 23, p. 153-9, 1995.

45- GERMANIDIS G AND PAWLOTSKY JM. Detecção do DNA viral: métodos de qualificação. In: Focaccia R. **Tratado de Hepatites Virais**, 2 Ed., Atheneu Editora, p.159-170, 2007.

46- GUIDOTTI LG, ISHIKAWA T, HOBBS MV, et al. Intracellular Inactivation Of The Hepatitis B Virus By Cytotoxic T Lymphocytes. **Immunity**, v. 4, p. 35-6, 1996.

47- GUIDOTTI LG, ROCHFORD R, CHUNG J, et al. Viral Clearance Whithout Destruction Of Injected Cells During Acute Hbv Infections. **Science**, v. 284, p. 825-9, 1999.

48- GOMES, A. S.; YOSHIDA, C. F. T.; NIEL, C.. Detection Of Hepatitis B Virus Dna In Hepatitis B Surface Antigen-Negative Serum Polymerase Chain Reaction:Evaluation Of Different Primer Pairs And Conditions. **Acta Virol**., v. 40, p. 133-8, 1996.

49- GONÇALES JR FL. Hepatite B. In: Veronesi. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu p. 299-314, 1996.

50- GONÇALES JR JÚNIOR FL, PEREIRA JSF, SILVA C, et al. Hepatitis B Virus DNA In Sera Of Blood Donors And Of Patients Infected Whit Hepatitis C Virus And Human Immunodeficiency Virus. **Clin Diagn Lab Immunol**., v. 10, p. 718-20, 2003.

51- GOMES SA. Genoma Viral. In: Focaccia R. **Tratado de Hepatites Virais**, 2 Ed., Atheneu Editora, p. 107-113, 2007.

52- GORAL V, OZKUL H, TEKES S, SIT D, KADIROGLU AK. Prevalence of occult VHB infection in hemodialysis patients with chronic HCV. **World J Gastroenterol**., v. 12, p. 3420-4, 2006.

53- GROB P, JILG W, BORNHAK H, et al. Serological Pattern Anti-HBc Alone: Report On A Workshop. **J Med Virol**., v. 62, p. 450-5, 2000.

54- HOFER M, JOLLER-JEMELKA HL, GROB PJ, et al. Frequent Chronic Hepatitis B Virus Infection In Hiv-Infected Patients Positive For Antiboby To Hepatitis B Core Antigen Only. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**., v. 17, p. 6-13, 1998.

55- HOOFNAGLE JH, SEEFF LB, BALES ZB, ZIMMERMAN HJ. Type hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. **N Engl J Med**, v. 298, p. 1379-83, 1978.

56- HOU J, KARAYIANNIS P, WALTERS J, et al. A Unique Insertion In The S Gene Of Surface Antigen-Negative Hepatitis B Virus Chinese Carries. **Hepatology**, v. 21, p. 273-8, 1995.

57- HU K-Q. Occult Hepatitis B Virus Infection And Its Clinical Implications. **J Viral Hepat**, v. 9, p. 243-57, 2002.

58- HUO TI, WU JC, LEE PC, et al. Sero-Clearance Of Hepatitis B Surface Antigen In Chronic Carries Does Not Necessarily Imply A Good Prognosis. **Hepatology**, v. 28, p. 231-6, 1998.

59- HUI C-K, LAU E, WU E, Et Al. Fibrosis Progression In Chronic Hepatitis C Patients With Occult Hepatitis B Co-Infection. **J Clin Virol**., v. 35, p. 185-192, 2006.

60- JAMELKA, H. I. J.; WICKI, N. A.; GROB, P. J.. Detection Of Hbs Antigen In “Anti-Hbc Alone” Positive Sera. **J. Hepatol**., v. 21, p. 269-72, 1994.

61- JILG W, SIEGER E, ZACHOVAL R, SCHÄTZLE H. Individuals Whit Antibodies Against Hepatitis B Core Antigen As Only Serological Marker For Hepatitis B: High Percentage Of Carriers Of Hepatitis B And C Virus. **J Hepatol**., v. 23, p. 14-20, 1995.

62- JUNGERS, P.; DELAGNEAU, J. F.; PRUNET, P.; CROSNIER, J.. Vaccination against Hepatitis B in Hemodialysis Center. In: **Advances in Nephrology**. Chicago, Year Book Medical Publishers, p. 303-327, 1982.

63- JUNG M-C, PAPE GR. Immunology Of Hepatitis B Infection. **Lancet Infect Dis**., v. 2, p. 43-50, 2002.

64- JÚNIOR FLG & GONÇALES NSL. Diagnóstico Laboratorial da Hepatite B. In: R. Focaccia (eds) **Tratado de Hepatites Virais**, 2 ed., Atheneu p. 153-158, 2007.

65- JURINKE C, ZOLLNER B, FEUCHT HH, et al. Application Of Nested Pcr And Mass Spectrometry For DNA-Based Virus Detection: HBV-DNA Detected In The Majority Of Isolated Anti-HBc Positive Sera. **Genet Anal**., v. 14, p. 97-102, 1998.

66- KANBAY M, GUR G, AKCAY A, SELCUK H, YILMAZ U, ARSLAN H, BOYACIOGLU S, OZDEMIR FN. Is hepatitis C vírus positivity a contributing factor to occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients? **Dig Dis Sci**., v. 51, p. 1962-6, 2006.

67- KAO JH, CHEN PJ, LAI MY, CHEN DS. Occult Hepatitis B Virus Infection and Clinical Outcomes of Patients with Chronic Hepatitis C. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4068-71, 2002.

68- KATO Y, NAKAO K, HAMASAKI K, et al. Spontaneous Loss Of Hepatitis B Surface Antigen In Chronic Carriers, Based On A Long-Term Follow-Up Study In Goto Islands, Japan. **J Gastroenterol**., v. 35, p. 201-5, 2000.

69- KIFFER CRV, VIANA GB, CHEINQUER H. Epidemiologia. In: Focaccia R, **Tratado de Hepatites Virais**. 2ª. ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 115-120.

70- LANDER JJ, GITNICK GL, GELB LH, AACH RD. Anticore antibody screening of transfused blood. **Vox Sang**. v. 34, p. 77-80, 1078.

71- LEE WM. Hepatitis B vírus infection. **N Eng J Med**., v. 337, p. 1733-45, 1997.

72- LEUNG CB, HO YW, CHAU KF, CHOY BY, TSANG WK, LUI SF. Renal replacement therapy for chronic hepatitis B carrier: a subgroup analysis from the Hong Kong Renal Registry 1995-1999. **J. Nephrol.**, v. 2, p. 104-9, 2000.

73- LEWIS-XIMENEZ, L. L.; OLIVEIRA, J. M.; MERCADANTE, L. A.; DE CASTRO, L.; SANTA, C. W.; STUVER, S.; YOSHIDA, C. F.. Serological And Vaccination Profile Of Hemodialysis Patients During An Outbreak Of Hepatitis B Virus Infection. **Nephron**, v. 87, p. 19-26, 2001.

74- LIANG TJ, BARUCH Y, BEN-PORATH E, et al. Hepatitis B Virus Infection In Patients With Idiopathic Liver Disease. **Hepatology**, v. 13, p. 1044-51, 1991.

75- LIU HF, SOKAL E, GOUBAU P. Wide variety of genotypes and geographic origins of heapatitis B virus in Belgian children. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**., v. 32, p. 244-7, 2002.

76- LOCARNINI S, MCMILLAN J, BARTHOLOMEUSZ SZA. The Hepatitis B Virus And Commom Commom Mutants. **Semin Liver Dis**., v. 23, p. 5-20, 2003.

77- LORIOT MA, MARCELLIN P, WALKER F, et al. Persistence Of Hepatitis B Virus Dna In Serum And Liver From Patients With Chronic Hepatitis B After Loss Of HBsAg. **J Hepatol.**, v. 27, p. 251-8, 1997.

78- LUSIDA MI, SURAYAH, SAKUGAWA H, NAGANO-FUJII M, SOETJIPTO, MULYANTO, HANDAJANI R, BOEDIWARSONO, SETIAWAN PB, NIDOM CA, OHGIMOTO S, HOTTA H. Genotype and subtype analyses of hepatitis B virus (HBV) and possible co-infection of HBV and hepatitis C virus (HCV) or hepatitis D virus (HDV) in blood donors, patients with chronic liver disease and patients on hemodialysis in Surabaya, Indonesia. **Microbiol Immunol**., p. 969-75, 2003.

79- MAINI MK, BONI C, OGG GS, et al. Direct Ex Vivo Analysis Of Hepatitis B Virus-Specific CD8+ T Cells Associated Whit The Control Of Infection. **Gastroenterology**, v. 117, p. 1386-96, 1999.

80- MAGNIUS LO, NORDER H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequences variability of the S gene. **Intervirology**, v. 38, p. 24-34, 1995.

81- MARGOLIS HS, ALTER MJ, HADLER SC. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. **Semin Liver Dis**., v. 11, p. 84-9. 1991.

82- MARTINS RMB, TAVARES RS, BARBOSA AP, TELES SA, CARNEIRO MAS, LOPES CLR, SILVA AS, YOSHIDA CFT. Infecção pelo vírus da hepatite B em hemofílicos em Goiás: soroprevalência, fatores de riscos associados e resposta vacinal. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**., v. 26, p. 183-8, 2004.

83- MARUSAWA H, UEMOTO S, HIJIKATA M, et al. Latent Hepatitis B Virus Infection In Healthy Individuals Antibodies To Hepatitis B Core Antigen. **Hepatology**, v. 31, p. 488-95, 2000.

84- MATTOS AA, FLORES AL, CORAL GP, GOLDANI JC, LOSEKANN A, BECKER M, AQUIDAMINI S, FOSSATI L. Incidência dos marcadores virais para a hepatite B e resposta a vacinação em uma unidade de hemodiálise. **Gastroenterol Endosc Digest**., v. 18, p. 193-6, 1999.

85- MELEGARI M, BRUNO S, WANDS JR. Properties Of Hepatitis B Virus Pre-S1 Deletion Mutants. **Virology**, v. 199, p. 292-300, 1994.

86- MELLO FC, SOUTO FJ, NABUCO LC, VILLELA-NOGUEIRA CA, COELHO HS, FRANZ HC, SARAIVA JC, VIRGOLINO HA, MOTTA-CASTRO AR, MELO MM, MARTINS RM, GOMES SA. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiol**., v. 7, p. 103, 2007.

87- MIMMS LT, MOSLEY JW, HOLLINGER FB, et al. Effect Of Concurrent Acute Infection With Hepatitis C Virus On Acute Hepatitis B Virus Infection. **Bmj**, v. 307, p. 1095-97, 1993.

88- BRASIL. Ministério da Saúde. Hepatites Virais. O Brasil Está Atento. Série A. Normais E Manuais Técnicos. Editora Ms, P. 1-20, 2003.

89- BRASIL. Ministério da Saúde 2004. Resolução – RDC N° 154, De 15 de Junho de 2004, Diário Oficial da União 110 – E, Seção I.

90- MINUK, G. Y.; SUN, D. F.; GREENBERG, R. G.; ZHANG, M.; HAWKINS, K.; UHANOVA, J.; GUTKIN, A.; BERNSTEIN, K.; GIULIVI, A,; OSIOWY, C.. Occult Hepatitis B Virus Infection In A North American Adult Hemodialysis Patient Population. **Hepatology**, v. 40, p. 1072-7, 2004.

91- NANDI, J.; BENERJEE, K.. Detection Of Hepatitis B Virus DNA In Donor Blood By Polymerase Chain Reaction. **Nat Med J. India**, v. 5, p. 5-7, 1992.

92- NEAU D, WINNOCK M, JOUVENCEL AC, et al. Occult Hepatitis B Virus Infection In Hiv-Infected Patients Whit Isolated Antibodies To Hepatitis B Core Antigen : Aquitaine Cohort, 2002-2003. **Clin Infect Dis**., v. 40, p. 750-3, 2005.

93- NOBORG U, GUSDAL A, HORAL P, LINDH M. Levels Of Viraemia In Subjects With Serological Markers Of Past Or Chronic Hepatitis B Virus Infection. **Scand J Infect Dis**., v. 32, p. 249-52, 2000.

94- NORDER H, HAMMS B. 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**., v. 73, p. 1201-8, 1992.

95- NORDER H, COUROUCE AM. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**, v. 2, p. 489-503, 1994.

96- NÚÑEZ M, RIOS P, PÉREZ-OLMEDA M, SORIANO V. Lack Of "Occult " Hepatitis B Virus Infection In HIV-Infected Patients. **Aids**, v. 16, p. 2099-2101, 2002.

97- OGUCHI H, MIYASAKA M, TOKUNAGA S, HORA K, ICHIKAWA S, OCHI T, YAMADA K, NAGASAWA M, KANNO Y, AIZAWA T. Hepatitis virus infection (VHB and HCV) in Eleven Japanese hemodialysis units. **Clin Nephrol.**, v. 38, p. 36-43, 1992.

98- OHKOSH S. Detection Of HBV DNA In Non-A, Non-B Hepatic Tissues Using The Polymerase Chain Reaction Assay. **Gastroenterol JPN.**, v. 26, p. 728-33, 1991.

99- OLIVEIRA MLA, BASTOS FI, TELLES PR, YOSHIDA CFT, SCHATZMAYR HG, PAETZOLD U , PAULI G, SCHREIER E. Braz J Med Biol Res. 1999; 32:1107-1114.

100- OLIVEIRA LHS, SILVA IR, XAVIER BLS, CAVALCANTI SMB. Hepatitis B infection among patients attending a sexually transmitted diseases clinic in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 635-40, 2001.

101- ORITO E, ICHIDA T, SAKUGAWA H, SATA M, HORIIKE N, HINO K, OKITA K, OKANOUE T, LINO S, TANAKA E, SUZUKI K. Geographic distribution of hepatits B vírus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. **Hepatology**, v. 34, p. 590-4, 2001.

102- PAO CC, YAO DS, LIN CY, et al. Serum Hepatitis B Virus DNA In Hepatitis B Virus Seropositive And Soeronegative Patients Whit Normal Liver Function. **Am J Clin Pathol**., v. 95, p. 591-6, 1991.

103- PARANÁ R, COTRIM H, MASCARENHAS R, DUTRA M, LYRA L. Incidence of markers of hepatitis B and C in patients undergoing hemodialysis. **Acta hepatol**., p. 1-23, 1991.

104- PATERLINI P, GERKEN G, NAKAJIMA E, et al. Polymerase Chain Reaction To Detect Hepatitis B Virus Dna And Rna Sequences In Primary Liver Cancers From Patients Negative For Hepatitis B Surface Antigen. **N Engl J Med**., v. 323, p. 80-5, 1990.

105- PENNA A, ARTINI M, CAVALLI A, et al. Long Lasting Memory T Cell Responses Following Self-Limited Acute Hepatitis B. **J Clin Invest**, v. 98, p. 1185-94, 1996.

106- PERRILHO RP. Acute flares in chronic hepatitis B: the natural and unnatural history of na immunologically mediated liver disease. **Gastroenterolgy.** v. 120, p. 1009-22, . 2001.

107- PINHO JRR, FARES J, OBA IT, SIQUEIRA ML, MOREIRA RC, BARRETO CC, ALQUEZAR AS. Acompanhamento dos marcadores das hepatites B e C em uma unidade de diálise. **Rev Soc Bras Med Trop**., v. 27, p. 372, 1994.

108- PINHO, J.R.R.; BASSIT, L.; SÁEZ-ALQUÉZAR, A. Estrutura Dos Vírus Das Hepatites. In: Da Silva, L.C., Ed. Hepatites Agudas E Crônicas. **Sarvier**, São Paulo, P. 9-25, 1995.

109- POLLICINO T, SQUADRITO G, GERENZIA G, et al. Hepatitis B Vírus Maintains Its Prooncogenic Properties In The Case Of Occult HBV Infection. **Gastroenterology**, v. 126, p. 102-10, 2004.

110- PORCHON C, KREMSDORF D, POL S, et al. Serum Hepatitis V Virus RNA And Hepatitis B Virus Dna In Non-A, Non-B Post-Transfusional And Sporadic Chronic Hepatitis. **J Hepatol**., v. 16, p. 184-9, 1992.

111- BRASIL. Programa Nacional das Hepatites Virais (PNHV) 2005. Apresenta para comunicadores os resultados parciais do Inquérito Nacional de Hepatites Virais. Fonte: Agência Aids. Roche Brasil. Http://Www.Hepatites.Com.Br (Acessado Em 12/Mai/2008).

112- QADI, A. A.; TAMIM, H.; AMEEN, G., BU-ALI, A.; AL-ARRAYED, S.; FAWAZ, N. A.; ALMAWI, W. Y.. Hepatitis B and Hepatitis C Virus Prevalence Among Dialysis Patients In Bahrain And Saudi Arabia: A Survey By Serologic And Molecular Methods. **Ajic**, v. 32, p. 493-5, 2004.

113- RAIMONDO G, POLLICINO T, CACCIOLA I, SQUADRITO G. Occult hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology. (article in press), 2006.

114- REHERMANN B, FOWLER P, SIDNEY J, et al. The Cytotoxic Lymphocyte Response to Multiple Hepatitis B Virus Polymerase Epitopes During And After Acute Viral Hepatitis. **J Exp Med**., v. 181, p. 1047-58, 1995.

115- REHERMANN B, FERRARI C, PASQUINELLI C, et al. The Hepatitis B Virus Persists For Decades After Patient's Recovery From Acute Viral Hepatitis Despite Active Maintenance Of A Cytotoxic T-Lymphocyte Response. **Nat Med**., v. 2, p. 1104-8, 1996.

116- REHERMANN B. Immune Response In Hepatitis B Virus Infection . **Semin Liver Dis**., v. 23, p. 21-37, 2003.

118- RUIZ J, SANGRO B, CUENDE JL, et al. Hepatitis B And C Viral Infections In Patients With Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, v. 16, p. 637-41, 1992.

119- SANCHEZ-QUIJANO, A.; JAUREGUI, J. I.; LEAL, M.; PINEDA, J. A.; CASTILLA, A.; ABAD, M. A.; CIVEIRA, M. P.; GARCIA, F. P.; PRIETO, J.; LISSEN, E.. Hepatitis B Virus Occult Infection In Subjects With Persistent Isolated Anti-Hbc Reactivity. **J. Hepatol**., v. 17, p. 288-93, 1993.

120- SHIH CM, LO SJ, MIYAMURA T, et al. Suppression of Hepatitis B Virus Expression And Replication By Hepatitis C Virus Core Protein In Huh-7 Cells. **J Virol**., v. 67, p. 5823-32, 1993.

121- SHIN LN, SHEU JC, WANG JT, et al. Serum Hepatitis B Virus DNA In Healthy HBs-Ag-Negative Chinese Adults Evaluated By Polymerase Chain Reaction. **J Med Virol**., v. 32, p. 257-60, 1990.

122- SHIOTA G, OYAMA K, UDAGAWA A, et al. Occult Hepatitis B Virus Infection In HBs Antigen-Negative Hepatocellular Carcinoma In A Japanese Population: Involvement Of Hbx And P53. **J Med Virol**., v. 62, p. 151-8, 2000.

123- SHITANI Y, YOTSUYANAGI H, MORIKA K, et al. The Significance Of Hepatitis B Virus DNA Detected In Hepatocellular Carcinoma Of Patients With Hepatitis C. **Cancer**, v. 88, p. 2478-86, 2000.

124- SIAGRIS D, CHRISTOFIDOU M, TRIGA K, PAGONI N, THEOCHARIS GJ, GOUMENOS D, et al Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with chronic HCV infection. **J Nephrol**., v. 19, p. 327-33, 2006.

.

125- SILVA, L. R.. Vírus da Hepatite B. In: FERREIRA, C. T.; CARVALHO, E.; SILVA, L. R.. **Gastroenterologia e Hepatologia em Pediatria**, 1ª Ed., Rio De Janeiro, Medsi Editora Médica E Científica Ltda, p. 493-500, 2003.

126- SILVEIRA TR, DA FONSECA JC, RIVERA L et al. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. **Rev Panam Salud Publica**, v. 6, p.378-83, 1999.

127- SITNIK R, PINHO JRR, DA SILAV LC, FONSECA LEP, CARRILHO FJ, BERNARDINI AP. Hepatitis B Virus Genotypes And Pre Core Mutants in Chronic Hepatitis B Patients from São Paulo city, Brazil. **Hepatology**, v. 32, p. 587, 2000.

128- SITNIK, R.; PINHO, J.R.R.; BERTOLINI, D. A.; BERNARDINI, A. P.; SILVA, L.C.; CARRILHO, F.J.; BERNARDINI, A.P. Hepatitis B Virus Genotypes And Precore And Core Mutants In Brazilian Patients. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2455-60, 2004.

129- SOUZA K P, LUZ JÁ, TELES AS, CARNEIRO MA, OLIVEIRA LA, GOMES AS, DIAS MA, GOMES AS, YOSHIDA CF, MARTINS RM. Hepatitis B and C in the hemodialysis unit of Tocantins, Brazil: serological and molecular profiles. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 599-603, 2003.

130- SÛNBÛL M, LEBLEBICIOGLU H, ESEN SS, et al. Response To Hepatitis B Vaccine HBsAg/Anti-HBs Negative And Anti-HBc Positive Subjects. **Scand J Infect Dis**., v. 32, p. 315-6, 2000.

131- TANAKA J. Hepatitis B epidemiology in Latin America. **Vaccine**, v. 18, p. 17-19, 2000.

132- TELES AS, MARTINS RM, SILVA AS, GOMES DMF, CARDOSO DDP, VANDERBORGHT BOM, YOSHIDA CFT. Hepatitis B virus infection profile in central Brazilian hemodialysis population. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 40, p. 1-12, 1998.

133- TELES SA, MARTINS RMB, VANDERBORGHT B, STUYVER L, GASPAR AMC, YOSHIDA CFT. Hepatitis B Virus: Genotype and Subtypes in Brazilian Hemodialysis Patients. **Artif Organs**, v. 23, p. 1074-8, 1999.

134- TELES SA, MARTINS RM, GOMES AS, GASPAR AM, ARAÚJO NM, SOUZA KP, CARNEIRO MA, YOSHIDA CF. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. **J Med Virol**., v. 68, p. 41-9, 2002.

135- TIOLLAIS P, POURCEL C. The hepatitis B virus. **Nature**, v. 317, p. 489-95, 1985.

136- TOKARS JI, ALTER MJ, FAVERO MS. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States. **Asaio J**., v. 40, p. 1020-31, 1994.

137- TORBENSON M, THOMAS DL. Occult Hepatitis B. **Lancet Infect Dis**., v. 2, p. 479-86, 2002.

138- TORBENSON M, KANNANGAI R, ASTEMBORSKI J, et al, High Prevalence Of Occult Hepatitis B In Baltimore Injection Drug Users. **Hepatology**, v. 39, p. 51-7, 2004.

139- UCHIDA T, KANEITA Y, GOTOH K, et al. Hepatitis C Virus Is Frequently Coinfected With Serum Marker-Negative Hepatitis B Virus: Probable Replication Promotion Of The Former By The Latter As Demonstrated By In Vitro Cotransfection. **J Med Virol**., v. 52, p. 399-405, 1997.

140- UEMOTO S, SUGIYAMA K, MARUSAWA H, et al. Transmission of hepatitis B virus from hepatitis B core antibody-positive donors in living related liver transplantation. **Transplantation**, v. 65, p. 494-9, 1998.

141- WACHS ME, AMEND WJ, ASCHER NL, et al. The risk of transmission of hepatitis B from HBsAg (-), HBcAb (+), HBIgM (-) organ donors. **Transplatation**, v. 59, p. 230-4, 1995.

142- WAGNER AA, DENIS F, WEINBRECK P, et al. Serological Pattern "Anti-Hepatitis B Core Alone" In HIV Or Hepatitis C Virus-Infected Patients Is Not Fully Explained By Hepatitis B Surface Antigen Mutants. **Aids**, v. 18, p. 569-71, 2004.

143- WANG, J. T.; WANG, T. H.; SHEU, J. C.; SHIH, L. N.; LIN, J. T.; CHEN, D. S.. Detection Of Hepatitis B Virus Dna By Polymerase Chain Reaction In Plasma Of Volunteer Blood Donors Negative For Hepatitis B Surface Antigen. **J. Infect. Dis**., v. 163, p. 397-9, 1991.

144- WEINBERGER KM, BAUER T, BÖHM S, JILG W. High Genetic Variability Of The Group-Specific A-Determinant Of Hepatitis B Virus Surface Antigen (Hbsag) And The Corresponding Fragment Of The Viral Polymerase In Chronic Virus Carriers Lacking Detectable Hbsag In Serum. **J Gen Virol**., v. 81, p. 1165-74, 2000.

145- WILLIAMS R, NAOUMOV NV. Imunopatogênese. In: FOCACCIA R. editor. **Tratado de hepatites virais**. 2a. edição, Atheneu, p. 121-127, 2007.

146- WONG PN, FUNG TT, MAK SK, LO KY, TOMG GM, WONG Y, LOO CK, LAM EK, WONG AK. Hepatitis B Virus infection in dialysis patients. **Jornal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, p. 1641-51, 2005.

147- WRIGHT TL, MAMISH D, COMBS C, et al. Hepatitis B Virus and Apparent Fulminant Non-A, Non-B Hepatitis. **Lancet,** v. 339, p. 952-5, 1992.

148- YOTSUYANAGI H, YASUDA K, LINO S, et al. Persistent Viremia After Recovery From Self-Limited Acute Hepatitis B. **Hepatology**, v. 27, p. 1377-88, 1998.

149- YOTSUYANAGI H, SHINTANI Y, MORIYA K, et al. Virologic Analysis Of Non-B, Non-C Hepatocellular Carcinoma In Japan: Frequent Involvement Of Hepatitis B Virus. **J Infect Dis**., v. 181, p. 1920-8, 2000.

VIRUS Reviews and Research
Journal of the Brazilian Society for Virology

VOLUME 11, DECEMBER 2006

INSTRUCTIONS TO AUTHORS
Revised by December 2006

SCOPE OF THE JOURNAL

Virus Reviews & Research is published by the Brazilian Society for Virology and accept reviews, research papers and short communications dealing with all aspects of virology and related fields. Authoritative and clinical reviews of the current state of knowledge are preferred, although important historical analyses might be accepted. *Unevaluated compilations of the literature and annotated bibliographies do not fall within the scope of Virus Research.* Authors of Manuscripts of lectures delivered symposia and round tables are encouraged to evaluate the possibility of using such material for preparations of a review, as stated below

Manuscripts reach *Virus Reviews & Research* by one of three mechanisms. First, reviews are solicited by the editors from leading investigators in Brazil and abroad. Second, unsolicited reviews may be submitted in completed form. Third, full research papers and short communications, including results of original research which contribute significantly to knowledge in Virology will be accepted. All reviews and papers submitted will be evaluated by ad-doc scientists before publication. Preference will be given to manuscripts that develop new concepts or experimental approaches and are not merely repositories of scientific data. Methodological papers shall be considered for publication, provided they describe new principles or a significant improvement of existing methods. Submission of manuscripts implies that the same work has not been published and is not under consideration for publication elsewhere. Suggestions of subjects for review are welcome by the Editors.

General information

Manuscripts and all correspondence should be send to:

Dr. Hermann G. Schatzmayr
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz,
Avenida Brasil 4365,
21040-900 Rio de Janeiro, Brazil
Phone +55 21 2562.1707,
Faxes + 55 21 2260 4866 and + 55 21 3393 5111
E-mail: hermann@ioc.fiocruz.br
barth@ioc.fiocruz.br
denilde@ioc.fiocruz.br

Three complete copies of each manuscript, including abstract (250 words maximum, figures and tables, either in the original type script or as clear, clean photocopies, should be submitted. The name, e-mail, mailing address telephone and fax numbers of the

corresponding author should be indicated on the title page. All text should be double spaced. The reviews should be divided in abstract, text and references. The full papers should be divided in abstract, introduction, material and methods, results, discussion, references and acknowledgements.
The short communications should be divided in abstract, text, references and acknowledgements.

EDITORIAL POLICY

By submission of a manuscript to the journal, the authors guarantee that the manuscript or one with substantially the same content was not published previously and is not being considered or published elsewhere. All authors of a manuscript must have agreed to its submission and are responsible for its content, including appropriate citations and acknowledgments and must also have agreed that the corresponding author has the authority to act on their behalf on all matters pertaining to publication of the manuscript After acceptance of the paper, and electronic copy of the text in its final version should be send to the Journal, together with a letter signed by all authors, agreeing with the text, figures and tables of the final version of the paper.

Permissions

The corresponding author is responsible for obtaining permissions from both the original published and the original author [i.e., the copyright owner (s)] to reproduce figures, tables or text (in whole or in part) from previous publications The signed permissions must be submitted to Virus Reviews & Research, Journal of the Brazilian Society of Virology. All rights reserved. No part of the Journal may be reproduced in any form or by any electronic or mechanical means, including information storage and retrieval systems, without the publisher's written permission. For studies including human beings, a copy of a previous approval of the project by a formal Ethical Commission from a recognized organization like an University or a Research Institution, according to the principles embodied an the Declaration of Helsinki, should be provided with the manuscript. A formal consent of all persons included in the experiments and of the parents or guardians of children included in the experiments, must be forehand. For studies including animal experiments, a copy of a previous approval of the project by a formal Ethical Commission for animal experimentation must be provided with the manuscript. The authors assume fully and solely the responsibility for omissions or irregularities in these documents.

Manuscript format

All manuscripts should be submitted written in English. The Editor recommends that a manuscript should be read critically by someone fluent in English before it is submitted. Manuscripts in poor English will not be accepted. The paper should be organized in topics, as described. The name of the topics should be typed in capital letters (e.g. ABSTRACT, INTRODUCTION, etc). Abbreviations should follow the recommendations of the IUPAC-IUC Commission and the Metric System is to be used throughout.

The manuscript should be assembled in the following order with all pages numbered consecutively starting from the title page:

Title page. a) title; b) first name, initials of the middle names and last name (s) of author (s) (matched with superscript numbers identifying institutions) Ex: Antonio A.R. Barros; c) name and address, including zip code of institution(s) where work was done; d) name, complete mailing address, telephone number and fax number of author to whom correspondence and requests for reprints should be sent. No more that 6 key words should be included

Abstract. A concise statement not to exceed 25 words in a single paragraph double spaced should be written on a separate page following the title page. The abstract should briefly and clearly present the problem, experimental approval, new results as quantitative data and conclusions. Footnotes and undefined abbreviations should not be used. If a reference must be used, the full citation should given within the abstract. Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data to be appreciated by the reader, who may not have access to the full paper.

Footnotes. Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

Introduction. The introduction should provide the reader with sufficient information so that results reported in the paper can be properly evaluated without consulting the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

Material and Methods. This section should provide enough information for other investigators to repeat the work. Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification (s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

Results. The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. In some situations it may be desirable to combine Results and Discussion in a single section.

Discussion. The purpose of the Discussion is to interpret the results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text may be cited but not repeated in detail in the Discussion.

Acknowledgments. This sections is optional and follows the Discussion. If appropriate, briefly acknowledge financial support, fellowships and technical assistance.

References. References should be included in the text, with the surname of the author (s) and year in parentheses, Examples: (Pereira 1984) (Pereira & Santos 1986) (Pereira et al. 1988).

At the end of the paper a list of the references should be included and the following information must be given: last name and initials of all authors, year of publication, title of article, complete name of Journal or its official abbreviation in italic, volume and pages. If reference is a book, also give names and initials of editors, publisher and city. Papers accepted for publication may be cited in the reference list. The citation should be complete and should end with: (in press).

Examples: Rosenberg JK & Cloud SS 1996. Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J Am Vet Assoc* 189: 357.

Peter M, D'aprile PV, Cancelotti F 1973. Biological and physicalchemical properties of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Avian Pathology* 2: 135-152.

Rosenberg JK & Olson NO 1987. Viral arthritis. In: HJ Calnak, CW Barnes, WM Beard, HW Yoder (eds.) *Diseases of Poultry*, 9 ed., Lowa State University Press, pages 711-719.

Tables. Table should be numbered consecutively with Arabic numerals and grouped together after the References section. All tables must be cited in the text in numerical order and the approximate position of each indicated in the margin. Each table should be typed double spaced on a separate page (if exceptionally large or requiring special symbols or unusual treatment, the table should be submitted camera-ready). A descriptive title and legend, in the form as they appear in the Journal, should make tables understandable without reference to the text. Vertical and diagonal rules should not be used in tables; instead indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.

Figures. Arabic numbers should be used for numbering the Figures. Data in Tables should not be repeated in Figures. The legends of the Figures should be placed in a separate sheet.

Photographs and line drawings. Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the paper should be submitted. Photo prints must be of sufficient quality to ensure good reproduction. They should be numbered on the back and identified with the nominated author's name. They may in addition be submitted in electronic format using the following programs: Word of Windows, Excel, Corel, Adobe Photoshop. Legends of line drawings and photographs should not exceed the printing area. All elements in the drawing should be prepared to withstand reductions. Drawings and line figures should be drawn in black in on tracing paper and should be prepared as indicated for the photographs. Colored illustrations are not accepted (only by electronic submission, not for printing).

Short Communications. Short Communications are reports on a single subject which should be concise but definitive. Pairs or sequences of papers will not be allowed. The scope of this section is intended to be wide and to encompass methodology and experimental data on subjects of interest to the readers of the Journal. It should contain: an abstract of no more than 25 words, no more than 6 key words, a running title, text not exceeding 8 double-spaced typed pages of 25 lines, 55 letters and spaces (excluding references), a maximum of 2 figures or tables (or one figure and one table) and no more than 20 references. A Short Communication should not be divided into separate sections (Introduction, Methods, etc.). Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a Short Communication.

Instructions To Authors

INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

AIMS AND SCOPE. Journal of Medical Virology provides a means of rapid publication of original scientific papers on fundamental as well as applied research concerning viruses affecting humans. These include reports describing the characterisation, diagnosis, epidemiology, immunology and pathogenesis of human virus infection, as well as basic studies on virus morphology, genetics, replication and host-cell interactions.

MANUSCRIPTS should be submitted via the on-line system at http://mc.manuscriptcentral.com/jmv . Please note: This journal does not accept Microsoft WORD 2007 documents at this time. Please use WORD's "Save As" option to save your document as an older (.doc) file type. Authors may select an Editor to process the manuscript: Professor Arie J. Zuckerman, c/o Editorial Office, University College London Medical School, Royal Free Campus, Rowland Hill Street, London NW3 2PF, UK; or Dr Brian W.J. Mahy, c/o Mailstop C12, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, GA 30333, USA. Manuscripts should be typed double spaced throughout, with line numbering. Number all pages in sequence and begin each section on a new page. Manuscripts should be divided into the following sections:

TITLE PAGE. This should contain the complete title of the paper; the names, titles, and affiliations of all authors (lists of degrees and diplomas should not be included); the institution at which the work was performed; the name, address, telephone, and fax number for all correspondence; and a shortened title, not more than 40 characters, to be used as a running head.

ABSTRACT. This should be a factual condensation of the entire work and include statements of the problem, method of study, results, and conclusions. The abstract may not exceed 250 words.

KEY WORDS. Supply a list of three to six key words (without repeating words in the title), pertinent to the article, which will appear below the abstract and will be included in the index at the end of the volume.

VIRUS NOMENCLATURE. Each virus should be identified at least once, preferably in the Introduction or Materials and Methods section, using formal family, genus, and species terms, and where possible by using a precise strain designation term as developed by an internationally recognized specialty group or culture collection. Please note that the word type is not used before species designations that include a number. Formal terms used for virus families, genera, and species, should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., McGeoch, D.J., Maniloff, J., Mayo, M.A., Pringle, C.R., and Wickner, R.B. Virus Texonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Seventh ICTV Report, Academic Press. This volume also includes standard abbreviations for species. Once formal taxonomic names have been given in a paper, vernacular terms may be used.

Formal taxonomic nomenclature

In formal taxonomic usage, the first letters of virus order, family,subfamily, genus and species names are capitalized and the terms are printedin italics. Other words in the species name are not capitalized unless theyare proper nouns or parts of nouns, for example West Nile virus . Informal usage, the name of the taxon should precede the term for the taxonomicunit; for example: "the family Paramyxoviridae ," "the genus Morbillivirus ."The following represent examples of full formal taxonomic terminology:

1 Order Mononegavirales ,Family Rhabdoviridae , genus Lyssavirus , Species Rabies virus .

2 Family Poxviridae ,subfamily Chordopoxvirinae , genus Orthopoxvirus , species Vaccinia virus .

3 Family Picornaviridae ,genus Enterovirus , species Poliovirus .
4 Family Bunyaviridae ,genus Tospovirus , species Tomato spotted wilt virus .

Vernacular taxonomic nomenclature
In formal vernacular usage, virus order, family, subfamily, genusand species names are written in lower case Roman script; they are notcapitalized, nor are they printed in italics or underlined. In informal usage,the name of the taxon should not include the formal suffix, and the name ofthe taxon should follow the term for the taxonomic unit; for example "thepicornavirus family," "the enterovirus genus." One particular source ofambiguity in vernacular nomenclature lies in the common use of the same rootterms in formal family, genus or species names. Imprecision stems from notbeing able to easily identify in vernacular usage which hierarchical level isbeing cited. For example, the vernacular name "paramyxovirus" might refer tothe family Paramyxoviridae , the subfamily Paramyxovirinae , or onespecies in the genus Respirovirus , such as Human parainfluenza virus 1 .The solution in vernacular usage is to avoid ‘‘jumping’’ hierarchical levelsand to add taxon identification wherever needed. For example, when citing thetaxonomic placement of Human parainfluenza virus 1 , taxon identificationshould always be added: " Human parainfluenza virus 1 is a speciesin the genus Respirovirus , family Paramyxoviridae ." In thisexample, as is usually the case, adding the information that this virus isalso a member of the subfamily Paramyxovirinae and the order Mononegavirales isunnecessary.
It should be stressed that italics and capitals initial letters need to be used only if the species name refers to the taxonomic category. When the name refers to viral objects such as virions present in a preparation or seen in an electron micrograph, italics and capitals initial letters are not needed and the names are written in lower case Roman script. This also applies when the names are used in adjectival form, for instance tobacco mosaic virus polymerase. The use of italics when referring to the name of a species as a taxonomic entity signals that it has the status of an officially recognized species. The 7th ICTV Report (Van Regenmortel, M.H.V. et al., 1999, Academic Press) should be consulted to ascertain which names have been approved as official species names. When the taxonomic status of a new putative species is uncertain or its position within an established genus has not been clarified, it is considered a tentative species and its name is not written in italics although its initial letter is capitalized.

TEXT . It is essential that authors whose "first" language is not English should arrange for their manuscripts to be written in idiomatic English prior to submission. Authors may use either English or American style; for the former, consult the Oxford Shorter Dictionary; for the latter, consult Merriam-Webster’s. Manuscripts reporting the results of experimental investigations on human subjects must include a statement to the effect that procedures had received official institutional and ethical approval. Refer to patients by number (or, in anecdotal reports, by anonymous initials). The pronouns "we" and "our" should not be used. Split-infinitives should be avoided. Full names or identifiable designations should not be used in the text, tables, or illustrations. All measurements are to be in metric units. Avoid excessive use of acronyms and do not use unusual abbreviations. Species names should be in italics and have the first letter of the first word capitalized.All other words in the name should not be capitalized unless they are proper nouns or parts of nouns. Place acknowledgements as the last element of the text, before references.

REFERENCES . Wiley’s journal styles are now in EndNote. EndNote is a software product that we recommend to our Journal authors to help simplify and streamline the research process. Using EndNote’s bibliographic management tools, you can search bibliographic databases, build and organize your reference collection, and then instantly output your bibliography in any Wiley journal style. To download the reference style for this journal, or to purchase a copy of EndNote, go to the following URL: www.interscience.wiley.com/jendnotes

Technical Support: If you need assistance using EndNote, contact endnote@isiresearchsoft.com , or visit www.endnote.com/support

In the text, references with one or two authors should be cited with the author's or authors' surname(s) and year of publication in brackets; references with three or more authors should be cited with the first author's surname followed by "et al." and the year of publication in brackets. In the final list, they should be in alphabetical order, and chronologically for more than one reference with the same authorship. Each reference begins with the names of all authors and the year of publication. For references to journals give titles of articles in full, inclusive pagination, and journal titles spelled out (not abbreviated). For references to books, include all author's names, chapter titles (if any), editor (if any), book title, city of publication, publisher's name, and year of publication. Note the following examples:

Journal Articles:
Gordon MT, Bell SC, Mee AP, Mercer S, Carter SD, Sharpe PT. 1993. Prevalence of Canine Distemper Antibodies in the Pagetic Population. J Med Virol 40:313–317.

Books:
Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, editors. 2000. Principles and practice of clinical virology, 4th ed. Chichester and New York: John Wiley & Sons, Inc. 776 p.

Chapters in Books:
Lazinski DW, Taylor JM. 1993. Structure and function of the delta virus antigens. In: Hadziyannis SJ, Taylor JM, Bonino F, editors. Hepatitis delta virus—molecular biology, pathogenesis, and clinical aspects. New York: Wiley-Liss, Inc. p 35–44.

LEGENDS. A descriptive legend must accompany each illustration and must define all abbreviations used therein.

TABLES. Each table must have a title. They should be numbered in order of appearance with Roman numerals and be keyed into the text.

ILLUSTRATIONS. To ensure highest print quality, your figures must be submitted in TIF format according to the following minimum resolutions:

1200 dpi (dots per inch) for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.)

300 dpi for halftones (black and white photographs)

600 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines)

COLOR ART. In addition to the above resolution guidelines, color art must be submitted in CMYK colorspace. Do not submit color figures in RGB. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print.

UNACCEPTABLE FORMATS. Do not submit figures in the following formats: JPG, GIF, PSD, CRD, PCT, PPT, PDF, XLS, DOC, BMP, 123 (or other Lotus formats).

ALL MANUSCRIPTS submitted to the Journal of Medical Virology must be submitted solely to this journal, may not have been published in any part or form in another publication of any type, professional or lay, and becomes the property of the publisher. The publisher reserves copyright, and no published material may be reproduced or published elsewhere without the written permission of the publisher and the author. The journal will not be responsible for the loss of manuscripts at any time. All statements in, or omissions from, published manuscripts are the responsibility of the authors who will assist the editors by reviewing proofs before publication. Reprint order forms will

be sent with page proofs. No page charges will be levied against authors or their institutions for publication in the journal.

Disclosure of Conflicts of Interest. Authors must disclose in the manuscript any financial or other conflict of interest that might be construed to influence the contents of the manuscript, including the results or interpretation of publication. All sources of financial support for the study must be disclosed and acknowledged.

Experimental Ethics. In cases where a study involves the use of live animals or human subjects, authors must include in the approprate section of the manuscript a statement that all experiments were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. The institutional committees that have approved the experiments must be named.

Authors must also include a statement that informed consent was obtained for any experimentation with human subjects including human volunteers.

Such statements should be repeated in the text of the article under the “Materials and Methods” or “Patients and Methods” section.

(This experimental ethics policy has been informed by and adapted from the ethical guidelines authored by EuCheMS-the European Association for Chemical and Molecular Sciences. For more information, see http://www.euchems.org/Publications/index.asp.)

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