UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL

PREVALÊNCIA DO DNA DO VÍRUS DA HEPATITE B EM DOADORES DE SANGUE ANTI-HBC POSITIVOS EM MANAUS- AMAZONAS

LORENA DOS SANTOS VÁSQUEZ

MANAUS
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL

LORENA DOS SANTOS VÁSQUEZ

PREVALÊNCIA DO DNA DO VÍRUS DA HEPATITE B EM DOADORES DE SANGUE ANTI-HBC POSITIVOS EM MANAUS – AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração "Diagnóstico e Controle".

Orientadora: Profª Drª Dagmar Kiesslich

MANAUS
2007

Vásquez, Lorena dos Santos
V999p Prevalência do DNA do vírus da hepatite B em doadores de sangue anti-HBC positivos em Manaus-AM. / Lorena dos Santos Vásquez . 2007
70 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Dagmar Kiesslich
Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Hepatite B. 2. vhb dna. 3. anti-HBc. 4. anti-HBS. 5. anti-Delta. I. Kiesslich, Dagmar. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

LORENA DOS SANTOS VÁSQUEZ

PREVALÊNCIA DO DNA DO VÍRUS DA HEPATITE B EM DOADORES DE SANGUE ANTI-HBC POSITIVOS EM MANAUS – AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração "Diagnóstico e Controle".

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristovão Alves da Costa
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Profª Dra. Dagmar Kiesslich
Universidade Federal do Amazonas

Profª Dra. Gilberta Bensabath
Ministério da Saúde - FUNASA

Dedicatória

Aos meus pais, Gilder e Odete, que me acompanharam e me incentivaram em mais esta etapa de minha vida profissional, me dando força, exemplo e coragem para nunca desistir.

À minha querida Vó Terezinha que me incentivou em mais esta jornada e que por vontade de Deus não está aqui, mas sim ao Seu lado olhando por mim.

Aos meus irmãos, Bruno e Lívia dos Santos Vásquez, por compreenderem a minha ausência e por toda ajuda dedidaca.

Ao meu namorado, João Paulo Diniz Pimentel, por entender minha falta de tempo e principalmente pelo apoio, dedicação e amor dedicados a mim.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida;

À minha família que sempre esteve presente dando todo o apoio necessário para que pudesse vencer os obstáculos do dia-a-dia;

A professora, Dra Dagmar Kiesslich, pela dedicação, orientação e incentivo na minha formação científica;

Aos meus amigos da Fundação HEMOAM: Adriana, Mirian, Fabiana, Meyre, Graça e a todos os funcionários da Coleta, Recepção e LAC por toda ajuda dada;

Aos meus amigos do Balbina Mestrinho: Nilda, Fabiane, Fábio, Karlinha, Elizete, Renata, Francivaldo por todo apoio dado;

As minhas amigas da Nazira Daou, Sâmara e Rai pelo incentivo nas horas mais difíceis;

As minhas amigas do Laboratório de Pesquisa: Myuki e Sônia pelas palavras de apoio;

Aos professores do Mestrado em Patologia Tropical, em especial ao Dr. Nelson Fraiji, pela oportunidade em estar aqui;

A Fundação HEMOAM pela oportunidade e espaço que me foi dado para a realização deste projeto.

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e suas conseqüências são um dos maiores problemas mundiais de saúde pública. Estima-se que duas bilhões de pessoas já foram infectadas pelo VHB e mais de 350 milhões estão cronicamente infectadas, possuindo um grande risco de morrer por cirrose ou câncer no fígado. O vírus da hepatite B é transmitido especialmente através de fluidos corpóreos como o sêmen, saliva, suor, lágrima e leite materno. A forma mais freqüente de transmissão do VHB é a inoculação percutânea direta do vírus. Outra forma de transmissão é a perinatal que representa uma das vias mais eficazes de transmissão, e a que mais frequentemente leva a seqüelas. A hepatite B pode variar de uma doença aguda autolimitada até uma forma grave como a hepatite fulminante. Também pode evoluir para uma doença crônica resultando em uma cirrose hepática, ou ainda evoluir, nos portadores sadios, com uma baixa ou ausente agressão ao hepatócito. O estudo dos marcadores sorológicos é muito importante na detecção e acompanhamento de indivíduos com hepatite. Porém, em algumas situações os marcadores sorológicos não são suficientes para detectar uma atividade viral e nestas situações, os testes moleculares se mostram necessários para uma melhor compreensão. Este trabalho tem como objetivo verificar a prevalência do DNA do vírus da hepatite B em doadores de sangue reativos para anticorpos dirigidos contra o antígeno do core (anti-HBc), em Manaus- Amazonas. Foram estudados 140 doadores de sangue anti-HBc positivo associado ou não ao anti-HBs. Após a detecção de uma amostra anti-HBc positiva em duplicata, foi verificada a sorologia para anti-HBs. Para extração do DNA foi utilizado o kit QIamp DNA Blood da Uniscience. Foram utilizados dois pares de iniciadores; um par localizado na região de superfície e outro par de iniciadores localizados mais internamente. Entre os doadores de sangue estudados, 106 (75,7%) eram do sexo masculino e 34 (24,3%) do sexo feminino. A idade dos doadores de sangue anti-HBc reativos estudados variou de 20 a 68 anos; sendo que a média de idade destes doadores foi de 39,64 anos. Foram detectados 20 PCR positivos para VHB entre as 140 amostras estudadas, significando uma prevalência de 14,3% na população estudada. Dos 20 doadores reativos para VHB DNA, 12 eram anti-HBc e anti-HBs reativos e oito possuíam o anti-HBc como único marcador de VHB. Entre os 20 doadores com PCR Reativo, 5 foram anti-Delta reativos; destes 3 eram anti-HBc isolado e 2 eram anti-HBc/anti-HBs reativos. Ente os 5 doadores anti-delta reativos, um possuía VHD RNA.

Palavras Chave: Hepatite B, VHB DNA, anti-HBc, anti-HBs, anti-Delta.

ABSTRACT

The infection by hepatitis B virus (HBV) and its consequences are a major worldwide public health problem. It is estimated that two billion people have been infected with HBV and more than 350 million are chronically infected, with a great risk of death by cirrhosis or liver cancer. The hepatitis B virus is transmitted through fluids especially tangible as semen, saliva, sweat, tear and breast milk. The most frequent form of transmission of HBV is the direct percutaneous injection of the virus. Another form is perinatal transmission that represents one of the most effective ways of transmission, and the most often leads to sequels. Hepatitis B can change from one acute illness to a severe form as fulminant hepatitis. It can also evolve into a chronic illness resulting in cirrhosis, or, in carrying sound, with a low or absent aggression to hepatocity. The study of serologic markers is very important in the detection and monitoring of hepatitis. However, in some situations the serologic markers are not sufficient to detect a viral activity and in these situations, the molecular tests are needed to show a better understanding. This work aims to determine the prevalence of DNA of the hepatitis B virus in blood donors for reactive antibodies directed against the core antigen (anti-HBc), in Manaus, Amazonas. Were studied 140 donors of blood anti-HBc positive or not linked to anti-HBs. After the detection of a sample anti-HBc positive in duplicate, verified the serologic result for anti-HBs. For extraction of DNA was used kit QIamp DNA Blood of Uniscience. Two pairs of primers were used: a pair located in the region of surface and another pair of primers located more internally. Among the donors of blood studied, 106 (75.7%) were male and 34 (24.3%) female. The age of the donors of blood anti-HBc reactive studied ranged from 20 to 68 years; although the average age of donors was 39.64 years. Were detected 20 PCR positive for HBV among the 140 samples studied, meaning a prevalence of 14.3% in the population studied. Of the 20 donors positive for HBV DNA, 12 were anti-HBc and anti-HBs reactive and eight have the anti-HBc as the only marker of HBV. Among the 20 donors with PCR positive, 5 were anti-Delta reactive; these 3 were isolated anti-HBc and 2 were anti-HBc/anti-HBs reactive. Among the 5 donors anti-Delta reactive, a showed VHD RNA.

Keywords: Hepatitis B, HBV DNA, anti-HBc, anti-HBs, anti-Delta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

Quadro 1 - Regiões/Prevalência do VHB..... 18

Figura 1 - Distribuição Geográfica da Prevalência da Infecção pelo VHB, 2002 . 19

Figura 2 - Prevalência dos Marcadores Sorológcos do VHB em gestantes no Estado do Amazonas..... 21

Figura 3 - Partículas do vírus da Hepatite B 22

Figura 4 - Genoma do VHB..... 23

Figura 5 - Replicação do Vírus da Hepatite B 25

Figura 6 - Curso Sorológico da Hepatite B aguda..... 26

Figura 7 - Curso Sorológico da Hepatite B crônica..... 27

Figura 8 - Vírus da Hepatite Delta 30

Figura 9 - Distribuição geográfica da Prevalência da Infecção pelo VHD 31

Figura 10 - Fluxograma dos procedimentos do estudo 35

Figura 11 - Fluxograma do diagnóstico molecular do VHB..... 38

Quadro 2 - Iniciadores utilizados na PCR para VHB 39

Quadro 3 - Iniciadores utilizados na PCR para VHD 42

Gráfico 1 - Comparação dos resultados da PCR em relação à média de idade da população estudada 46

Figura 12 - Produto da PCR para DNA do VHB corrido em gel de agarose 47

Figura 13 - Produto da PCR para DNA do VHD corrido em gel de agarose 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos doadores anti-HBc reativos quanto ao sexo 45
Tabela 2 - Distribuição do resultado da PCR para VHB quanto ao sexo 46
Tabela 3 - Pacientes Anti-HBc reativos que possuem reatividade para Anti-HBs .. 47
Tabela 4 - Pacientes com PCR reativo para VHB em relação ao resultado de Anti-HBs 48
Tabela 5 - Sorologia para Anti-HDV em pacientes com PCR reativo para VHB .. 49
Tabela 6 - Presença do DNA do VHD em doadores anti-Delta Reativos 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
Anti-delta	Anticorpo contra o Vírus da Hepatite D
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do Core do Vírus da Hepatite B
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno E do Vírus da Hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B
Anti-HTLV I/II	Anticorpo contra o Vírus Linfotrópico de células T humanas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucléico Trifosfato
ELISA	Enzyme Linked Imunnesorbant Assay (Ensaio Imunoenzimático)
HBcAg	Antígeno nucléico do Vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno E do Vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do Vírus da hepatite B
HEMOAM	Fundação de hematologia e hemoterapia do Amazonas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NAT	Técnica de Ácido Nucléico
nM	Nanômetro
pb ou bp	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RNA	Acido Ribonucléico
RPM	Rotação por Minuto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VHD	Vírus da Hepatite D

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
1.1 Histórico 15
1.2 Transmissão 16
1.3 Epidemiologia 18
1.4 O vírus da hepatite B – VHB 22
1.5 Replicação do VHB 24
1.6 Marcadores virais 25
1.7 Triagem sorológica para hepatite B em bancos de sangue 27
1.8 Hepatite Delta 29
2 OBJETIVOS 32
2.1 Geral 32
2.2 Específicos 32
3. METODOLOGIA 33
3.1 Modelo de estudo 33
3.2 Universo de estudo 33
3.2.1 População de referência 33
3.2.2 População de estudo 33
3.2.3 Cálculo da amostra 34
3.2.4 Amostra 34
3.2.5 Critérios de inclusão e/ou exclusão 34
3.3 Procedimentos 35
3.3.1 Coleta 36
3.3.2 Diagnóstico Sorológico 36
3.3.2.1 Anti-HBc 36
3.3.2.2 Anti-HBs 37
3.3.2.3 Anti-delta 37
3.3.3 Diagnóstico Molecular do VHB 38
3.3.3.1 Extração do DNA 38
3.3.3.2 Oligonucleotídeos / iniciadores 39

3.3.3.3 Amplificação do DNA (PCR) 40
3.3.3.4 Detecção do produto amplificado 41
3.3.4 Diagnóstico Molecular do VHD 41
3.3.4.1 Extração do RNA do VHD 41
3.3.4.2 Síntese do cDNA 42
3.3.4.3 Determinação Qualitativa do VHD RNA 43
3.4 Considerações Éticas 43
3.5 Análise Estatística 44
4. RESULTADOS 45
5. DISCUSSÃO 50
6. CONCLUSÃO 59
REFERÊNCIAS BICLIOGRÁFICAS 60
APÊNDICE A 68
APÊNDICE B 69

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e suas conseqüências são um dos maiores problemas mundiais de saúde pública (CHWLA, 2005). Estima-se que duas bilhões de pessoas já foram infectadas pelo VHB e mais de 350 milhões estão cronicamente infectadas, possuindo um grande risco de morrer por cirrose ou câncer no fígado (WHO, 2000).

O vírus da hepatite B é transmitido especialmente através de fluidos corpóreos como o sêmen, saliva, suor, lágrima e leite materno. A forma mais freqüente de transmissão do VHB é a inoculação percutânea direta do vírus. Isto pode ocorrer em transfusões de sangue e hemoderivados, hemodiálise, injeção com agulhas e seringas contaminadas (principalmente no uso de drogas injetáveis), tatuagens, acupunturas, manipulações dentárias ou acidentes ocupacionais de pessoas da área de saúde, através da perfuração com agulhas contaminadas ou objetos cortantes. Outra forma de transmissão é a perinatal que representa uma das vias mais eficazes de transmissão, e a que mais frequentemente leva a seqüelas. (BEASLEY, 1977; 1981). O principal grupo de risco a ser infectado pelo VHB é composto por indivíduos que fazem transfusão, diálise, usuários de drogas injetáveis, profissionais da área da saúde que sofreram acidentes com objetos perfuro cortantes, e indivíduos homossexuais. (KHOURI, 2004).

A hepatite B pode variar de uma doença aguda autolimitada até uma forma grave como a hepatite fulminante. Também pode evoluir para uma doença crônica resultando em uma cirrose hepática, ou ainda evoluir, nos portadores sadios, com uma baixa ou ausente agressão ao hepatócito. Acredita-se que a evolução da hepatite B depende do tipo de resposta imune do indivíduo ou das variantes genômicas do vírus. (ALBERTI, 1993).

O estudo dos marcadores sorológicos é muito importante na detecção e acompanhamento de indivíduos com hepatite. Um exemplo na detecção desta doença, é a obtenção de um resultado positivo para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B – HBsAg - significando uma infecção recente e a detecção do anti-HBc (anticorpo contra o "core" do vírus da hepatite B) que indica uma infecção passada. Um resultado de HBeAg (antígeno "e" do vírus da hepatite B) positivo é indicativo de replicação viral e de anti-HBe (anticorpo contra o antígeno "e") de uma fase de recuperação. Quando se verifica um anti-HBs (anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B) positivo, as situações prováveis são a de cura de uma infecção ou a de que o indivíduo foi imunizado pela vacina.

Porém, em algumas situações, os marcadores sorológicos não são suficientes para detectar uma atividade viral. Este é o caso de indivíduos que são anti-HBc positivos, e mesmo com anticorpos neutralizantes (anti-HBs) possuem o DNA viral, mostrando uma possível transmissibilidade. Outra situação ocorre apenas com a detecção do anti-HBc, são os chamados "anti-HBc isolados", onde também pode ser detectado o DNA do VHB. (AGUIAR, 2001 ; ALHABABI, 2003; ARRAES, 2003; SILVA, 2005; WANG, 1991; 2002).

Os testes moleculares, para a detecção do VHB, se mostram necessários diante das situações expostas acima. Sendo estes fundamentais para que haja uma melhor triagem sorológica em bancos de sangue de regiões endêmicas como é o caso do nosso Estado, visto que nos municípios do interior do Estado a taxa de indivíduos anti-HBc positivos chega a 50%, atingindo um valor de 80% em indivíduos maiores de 50 anos (BRAGA, 2005).

Este trabalho estudou os casos dos doadores de sangue em Manaus que possuíam em seu resultado de sorologia o marcador anti-HBc como positivo, onde se avaliou a presença do DNA do vírus da hepatite B nestes doadores.

1.1 Histórico da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB)

Um dos primeiros relatos de icterícia infecciosa veio da Alemanha em 751, em uma carta escrita pelo Papa Zacharias a São Bonifácio, arcebispo de Mainz. Rokitansky em 1842 descreveu a icterícia devido à necrose do fígado. Virchow, em 1865, sugeriu que a forma de icterícia passageira benigna, vista geralmente em pessoas novas era devido a uma inflamação catarral com muco. Ele propôs o nome de "Icterícia Catarral". Em 1890, Flindt sugeriu que a lesão inicial era uma degeneração do parênquima hepático e, em 1912, Cockayne chegou à mesma conclusão. A confirmação seguiu particularmente dos escandinavos Lindstedt, Ehrstron, Wallgren, Eppinger e um mais tarde Stilzer em 1876; Frolich ,em 1879, mostrou a primeira evidência de degeneração hepatocelular em estágios adiantados da doença. Eles demonstraram conclusivamente que a icterícia catarral e a hepatite epidêmica eram manifestações da mesma doença. (DESHPANDE, 1971).

Nos séculos XVIII e XIX, a hepatite infecciosa era uma doença de importância militar, com várias descrições de epidemias. Porém, a primeira descrição da hepatite pelo vírus B foi feita em 1885, por Lurman apud Gardner (1950), ao estudar um surto da doença em um grupo de 1289 trabalhadores de um estaleiro. Naquele grupo foi usada uma vacina antivariólica, preparada com linfa humana glicerinada. Num período variável, de poucas semanas a alguns meses, 191 homens tornaram-se ictéricos.

Yeogt, na Alemanha, foi o primeiro a demonstrar a infectividade desta doença em voluntários. Roholm e Iversen, em 1939, desenvolveram uma técnica de biópsia do fígado e Dible, McMichael, Sherlock na Inglaterra e Axenfeld e Brass, na Alemanha, utilizaram o conhecimento com grande sucesso. (DESHPANDE, 1971).

Blumberg et al. (1965) publicaram o que viria a ser uma das mais importantes revelações sobre as hepatites virais, que foi o encontro no soro, proveniente de um aborígine

australiano, de um antígeno que reagia com soros de pacientes hemofílicos. Este antígeno foi batizado de antígeno Austrália e hoje é conhecido como antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). Dane et al. (1970) detectaram o vírion completo do VHB.

Bensabath et al. (1973) realizaram estudos pioneiros na detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) no Brasil.

No início da década de 80, estava disponível uma vacina preparada com o plasma de portadores do vírus da hepatite B. Três anos após, com um milhão de vacinados, a avaliação demonstrou eficácia e segurança, não sendo evidenciada a transmissão de qualquer agente infeccioso, inclusive o HIV. A observação demonstrou efeitos colaterais muito discretos, predominando basicamente reação local.

Novas pesquisas permitiram a produção de vacinas por técnicas de DNA recombinante, de menor custo e menores efeitos colaterais. Assim, a imunização contra a hepatite B tornou-se um dos objetivos dos organismos de saúde, sendo incorporada aos programas de vacinação.

1.2 Transmissão

O vírus da hepatite B é transmitido especialmente através de fluidos corpóreos como o sêmen, saliva, suor, lágrima e leite materno. O portador do VHB é um potencial transmissor da infecção e o contato interpessoal é uma importante fonte de transmissão deste vírus. (AGUIAR, 1996; BEASLEY, 1977)

A transmissão perinatal representa uma das vias mais eficazes de transmissão, e a que mais frequüentemente leva a seqüela. (BEASLEY, 1977; 1981). A transmissão vertical se torna maior quando a mãe possui os marcadores HBsAg e HBeAg positivos. Há três possíveis modos de transmissão mãe-filho: a transmissão transplacentária ou intra-uterina, a

transmissão durante o parto e a transmissão pelo leite materno. (SEVENS, 1979; XU, 1985; WANG, 2003). Em recém-nascidos e crianças menores de um ano, que adquirirem a infecção pelo VHB, o risco de que esta infecção se torne crônica é de 90%. Para crianças com idade entre um e cinco anos, o risco diminui para em torno de 30%, e para crianças maiores de cinco anos e para adultos, o risco fica em torno de 2%. (HYAMS, 1995; LAI 2003).

A forma mais freqüente de transmissão do VHB é a inoculação percutânea direta do vírus. Isto pode ocorrer em transfusões de sangue e hemoderivados, hemodiálise, injeção com agulhas e seringas contaminadas (principalmente no uso de drogas injetáveis), tatuagens, acupunturas, manipulações dentárias ou acidentes ocupacionais de pessoas da área de saúde, através da perfuração com agulhas contaminadas ou objetos cortantes. (BEASLEY, 1977; 1981).

O principal grupo de risco a ser infectado pelo VHB é composto por indivíduos que fazem transfusão, diálise, usuários de drogas injetáveis, profissionais da área da saúde que sofreram acidentes com objetos perfuro cortantes e indivíduos homossexuais. (KHOURI, 2004).

Nos Estados Unidos e no oeste da Europa, a prevalência de hepatite B em usuários de drogas representa 23% dos casos desta doença. (MARGOLIS, 1991). A freqüência de transmissão transfusional do VHB na Inglaterra entre os anos de 1993-2001 foi de 1 em 260.000. (SOLDAN, 2003). Na China, a freqüência encontrada foi de 1 em 17.501. (SHANG, 2007). No Canadá, o risco de transmissão transfusional encontrado foi de 1 em 153.000. (O` BRIEN, 2007).

1.3 Epidemiologia

A infecção pelo VHB é considerada alta onde a prevalência do HBsAg é superior a 7%, ou onde 60% ou mais da população tem evidência sorológica de infecção prévia. São considerados como de endemicidade intermediária as áreas aonde a prevalência de HBsAg vai de 2 a 7%, com menos de 60% da população apresentando histórico sorológico. E onde a prevalência do HBsAg é menor do que 2%, e a prevalência total de infectados previamente é inferior a 10% a endemicidade é baixa (Quadro 1) (CHÁVEZ, 2003; KHOURI, 2004).

Quadro 1

Regiões/ Prevalência do VHB

ENDEMICIDADE	%	LOCAIS
Alta	HBsAg > 7% Anti-HBc > 60%	África, parte da América do Sul, Sudeste da Ásia, China, partes do Oriente Médio e ilhas do Pacífico
Média	HBsAg – 2 a 7% Anti-HBc < 60%	Leste europeu e os países europeus do Mediterrâneo, parte da América do Sul, Oriente Médio e Rússia.
Baixa	HBsAg < 2% Anti-HBc < 10%	América do Norte, Europa Ocidental, Japão e a Austrália

Fonte: Adaptado de Mast et al., 2004

Figura 1 – Distribuição Geográfica da prevalência da infecção crônica Pelo VHB, 2002

Em estudo realizado em Londres, por Alhababi et al. (2003), foi encontrado um percentual de 8,9% de anti-HBc positivos. Resultados inferiores foram achados por Chistensen et al. (2001) na Dinamarca, onde a prevalência de doadores anti-HBc positivos foi apenas 0,7%.

No Brasil, a prevalência de VHB é bastante heterogênea, e isto pode ser observado no trabalho realizado por Clemens et al. (2000), no qual se verificou a prevalência nas regiões Sudeste, Sul, Norte e Nordeste. Foi observada uma maior taxa de anti-HBc positivo na região Norte, que correspondeu a 21,4% da população analisada; a região Sul foi a segunda maior prevalência observada, onde o valor encontrado foi de 7,6%. Na região Sudeste, observou-se uma taxa de 5,5%; e a menor taxa mostrada foi na região Nordeste de 1,2%. Neste mesmo estudo, a soroprevalência encontrada de anti-HBc por faixa etária mostrou um valor de 3,1% em crianças de um ano de idade e que houve um aumento significativo na taxa de infecção de adolescentes para adultos jovens, onde a prevalência na faixa etária de 21-30 anos foi de 12,3%, e na faixa etária de 31-40 anos foi de 16,6%.

No Estado de Santa Catarina, Chávez et al. (2003) encontraram uma prevalência de 25% de hepatite B. Em trabalho realizado por Largura et al. nos anos de 1995 e 1996 nos municípios de Cascavel, Londrina, Curitiba e Maringá em doadores de sangue, observaram-se as seguintes prevalências: Cascavel (33,8% e 31,2% em 1995 e 1996), Londrina (12,6% e 10% em 1995 e 1996), Curitiba (10% e 7,8% em 1995 e 1996) e Maringá (5,3% e 3,8% em 1995 e 1996).

Aguiar (2001), estudando doadores de sangue do Centro de Hematologia (Hemosul), na cidade de Campo Grande – Mato Grosso do Sul, encontraram uma prevalência para HBsAg de 0,7% e para anti-HBc de 9,4%.

Em Ribeirão Preto, Miranda et al. (2000) encontraram uma prevalência de HBsAg de 0,3% e 13,9% de Anti-HBc em indivíduos submetidos a exames de sangue em unidades de saúde. Gaze et al. (2002) estudaram a prevalência de hepatite A e B em Macaé - Rio de Janeiro, e observaram uma prevalência de anti-HBc de 15,3% na população.

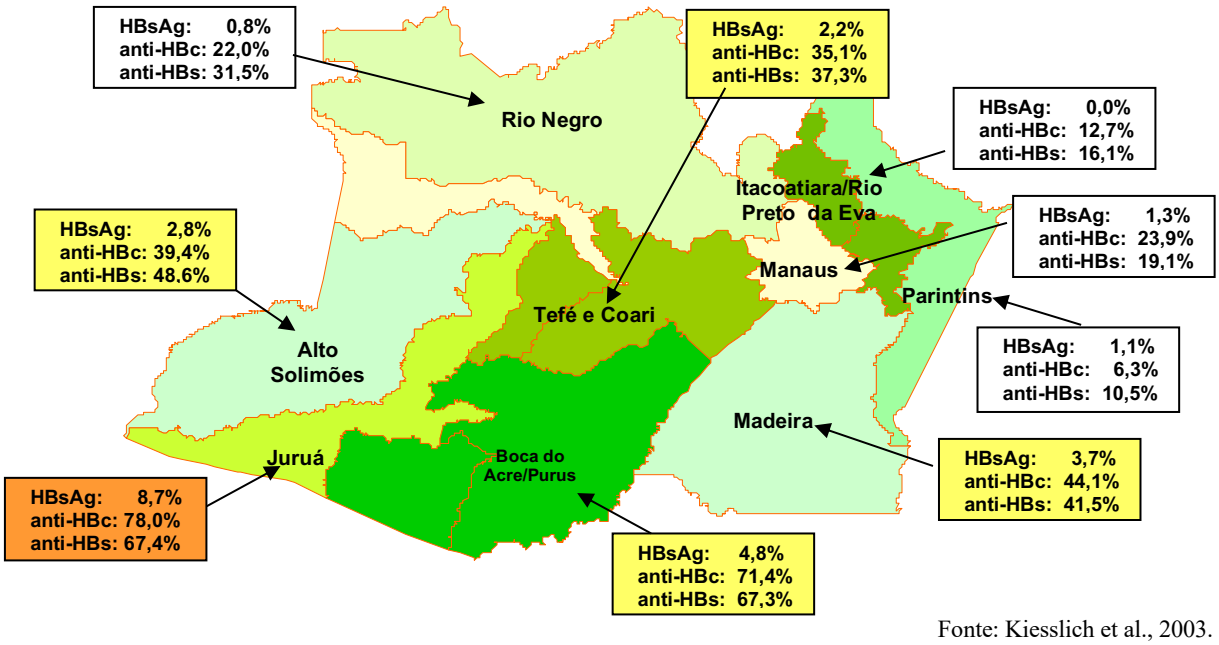
Arraes et al. (2003) observaram uma prevalência em 1000 doadores de sangue em Recife, e encontraram 120 doadores positivos para anti-HBc, correspondendo a 12% da população estudada.

Braga et al. (2005) realizaram uma pesquisa no município de Lábrea – Amazonas, e verificaram uma taxa de HBsAg de 3,3%. A taxa de prevalência do anti-HBc encontrada foi de 49,9%, apresentando gradiente crescente em relação à idade, chegando a níveis bastante elevados (80%) em indivíduos com mais de 50 anos.

Em trabalho realizado por Brasil et al. (2003), avaliando a prevalência de marcadores para o vírus da hepatite B em contatos domiciliares no Estado do Amazonas, foram estudados 97 casos índices e 258 familiares. Na análise dos contatos, observou-se uma elevada proporção de familiares com marcadores de infecção pregressa (51,6%), como também indicadores de infecção ativa (12%) e uma alta prevalência entre os irmãos (23,6%).

O estudo, desenvolvido por Braga et al. (2001), incluiu 688 indivíduos de 7 grupos indígenas do Estado do Amazonas e encontrou uma taxa de portadores crônicos do HBsAg de 9,7%. A taxa de prevalência de infecção passada, indivíduos anti-HBc reativos, encontrada foi de 54,5%.

Kiesslich et al. (2003) realizaram um trabalho de prevalência em 1.460 gestantes no interior do Estado do Amazonas, e observaram um índice de 3,2% de HBsAg positivos, um valor de 38,3% de anti-HBc positivos e 40,6% de anti-HBs. A sub-região onde foi encontrado o maior índice de HBsAg foi a do Rio Juruá. Quanto à prevalência do anti-HBc, as sub-regiões com maiores taxas foram a do Rio Juruá e a do Purus, e em relação ao anti-HBs, observou-se uma maior prevalência também no Rio Juruá e no Purus.



Fonte: Kiesslich et al., 2003.

Figura 2 – Prevalência dos marcadores sorológicos do VHB em gestantes no Estado do Amazonas

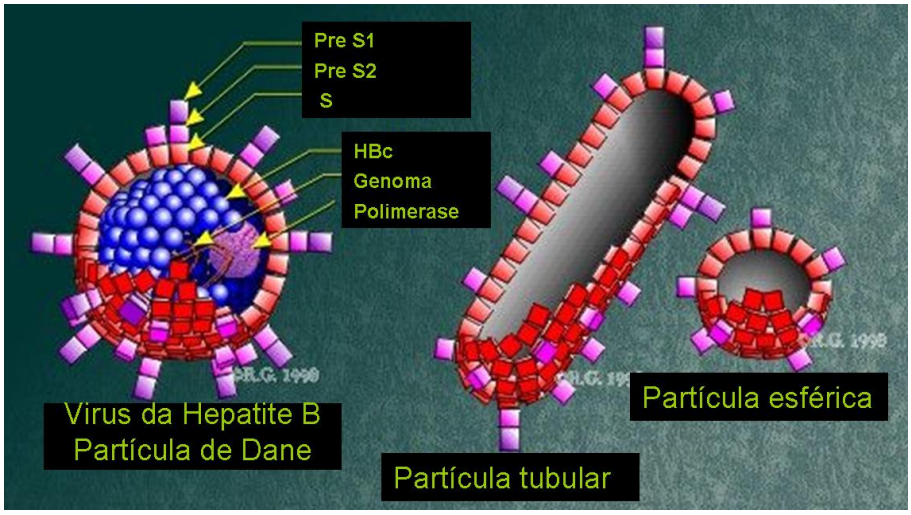
Embora a distribuição da infecção pelo vírus da hepatite B não seja homogênea, variando entre distintas localidades de uma mesma área, ou entre aglomerados humanos e populações rurais, as taxas de indivíduos expostos, ou portadores, mostram que a região

amazônica apresenta níveis de endemicidade superiores aqueles encontrados nas demais regiões brasileiras (BENSABATH et al., 1987).

1.4 O vírus da Hepatite B – VHB:

O VHB pertence a família *Hepadnaviridae* e ao gênero *Ortohepadnavirus* (KHOURI, 2004). É também conhecido como partícula de Dane e possui 42 nm de diâmetro, sendo constituído por um envoltório lipídico que contém o antígeno de superfície (HBsAg) e um núcleo central denso (core) (FOCACCIA, 1997).

Três formas de partículas são observadas: partículas completas infecciosas - são esféricas, possuem 42nm de diâmetro, são compostas de um envelope externo protéico que constitui o antígeno de superfície e o nucleocapsídeo constituído pela proteína do core e pelo genoma viral, partículas não infecciosas que se dividem em esféricas e cilíndricas - constituídas exclusivamente de HBsAg. (TRIOLLAIS, 1985)



Adaptado de : www.globalserve.net/ robertg/HBV/hbvparts.htm. Acesso em: 25/11/2005

Figura 3 – Partículas do vírus da hepatite B

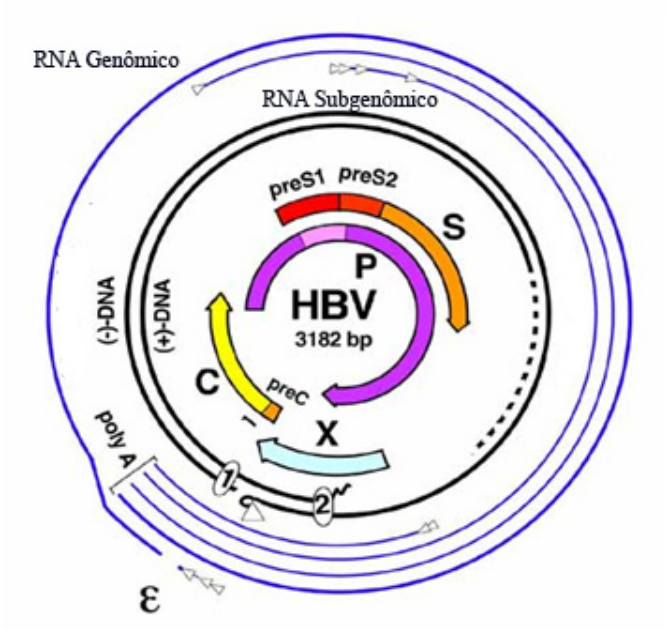
O DNA do VHB é circular, com uma cadeia parcialmente duplicada e com um genoma composto de aproximadamente 3.200 pares de base; possuindo em seu genoma quatro estruturas distintas: os genes S, C, P e X. (AGUIAR, 1996).

- Gene S: É constituído por três regiões: S, pré-S2 e pré-S1; onde a região S representa o principal antígeno de superfície (HBsAg) que vai induzir a formação do anticorpo Anti-HBsAg.

- Gene C: É precedido da região pré-C e codificam a proteína do nucleocapsídeo (core) e antígeno HBe.

- Gene P: Codifica a DNA polimerase que também possui função de transcriptase reversa.

- Gene X: Codifica o antígeno HBx; é necessário para a replicação e transativação transcricional dos genes virais e tem um possível papel no desenvolvimento do hepatocarcinoma celular.



Fonte: Adaptado de http://www.molecular-virology.uni-hd.de/EN/HBV/HBV.HTM. Acesso em: 19/11/2005

Figura 4 – Genoma do VHB

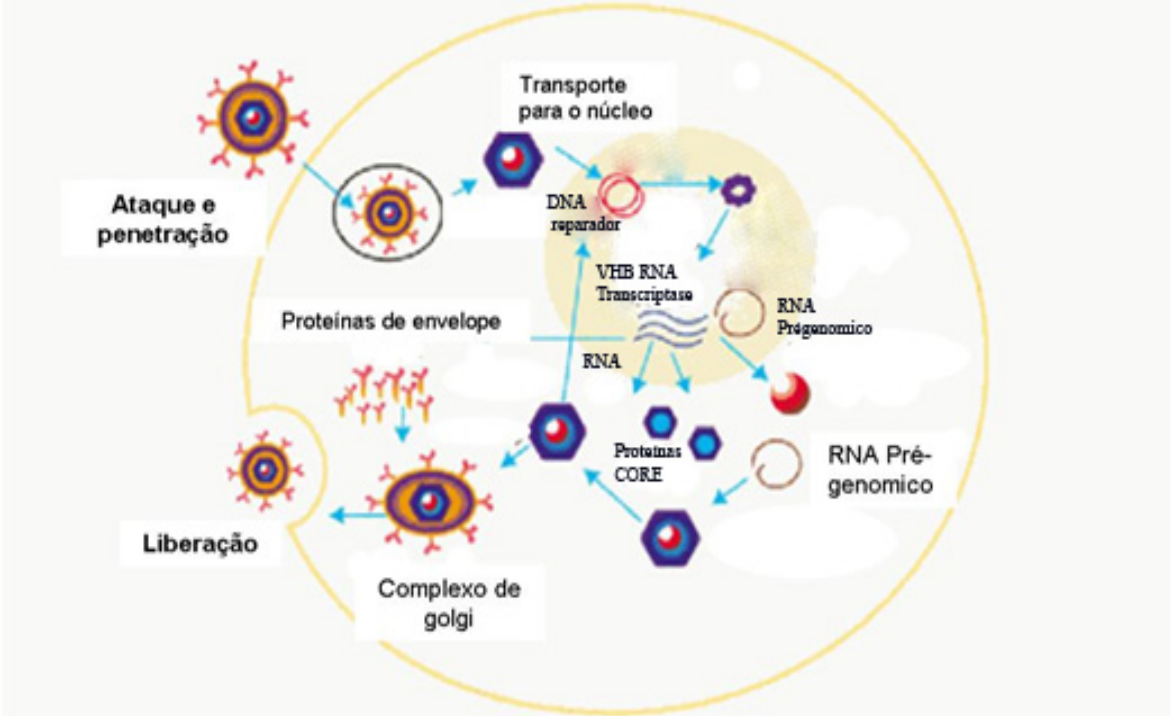
1.5 Replicação do VHB

Após a contaminação/ infecção pelo vírus da hepatite B, ocorre a ligação do vírus às células hepáticas (hepatócitos). Esta etapa da replicação ocorre através da ligação da região pré-S2 do VHB ao hepatócito. Esta região se liga à albumina sérica humana, esta ligação permite que o vírus penetre via receptores de albumina no hepatócito. (FOCACCIA, 1997)

Ao penetrar no hepatócito, o VHB perde seu envoltório e o DNA do VHB chega ao núcleo do hepatócito através da ação da DNA polimerase, que perde sua disposição circular e se converte em um DNA super helicoidal. A partir deste DNA, será produzido um RNA pré-genoma que servirá de molde para a transcrição reversa.

Enquanto isso, no citoplasma, estão sendo sintetizadas as proteínas do core, as quais vão encapsular o RNA pré-genoma e a DNA polimerase. No citoplasma, vai ocorrer a transcrição reversa do pré-genoma, sendo então sintetizada a cadeia longa do DNA viral.

O pré-genoma, que produziu a cadeia longa é destruído por ação enzimática. A DNA polimerase produzirá outra cadeia complementar de DNA – viral (cadeia curta), e este capsídeo será envolvido pelo envelope externo do vírus e esta estrutura viral completa deixará a célula. (FOCACCIA, 1997)



Adaptado de: www.prn.org/frms!vol6/num1/locarnini. Acesso em: 30/11/2005

Figura 05 – Replicação do Vírus da Hepatite B

1.6 Marcadores virais:

No processo de replicação do VHB nos hepatócitos, são sintetizadas partículas virais que induzem a produção de anticorpos. Estes antígenos e seus respectivos anticorpos são utilizados como marcadores da infecção viral; são eles:

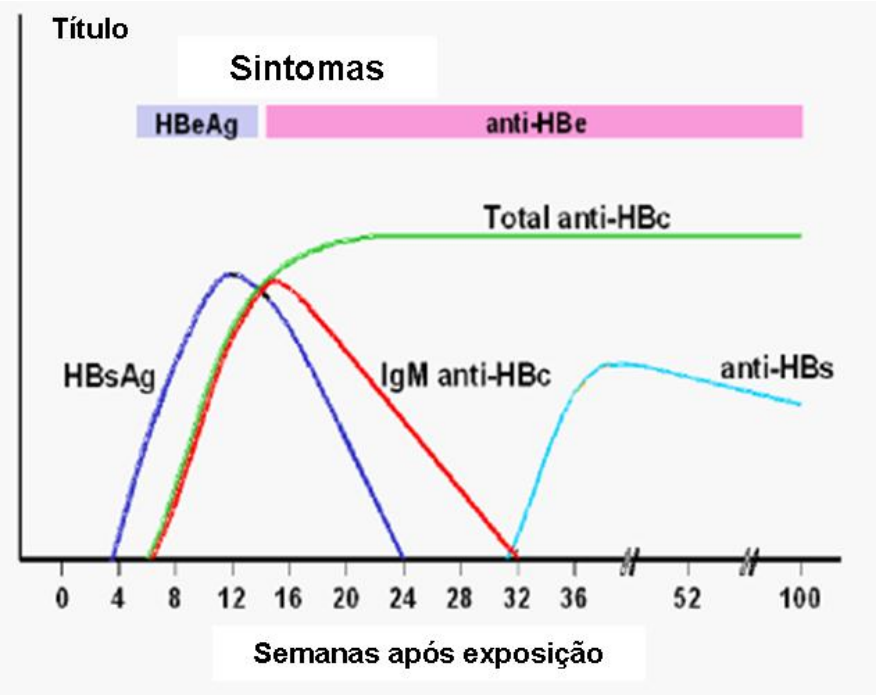
- HBsAg: É o primeiro marcador sorológico a ser detectado no soro; aparecendo antes da manifestação dos sintomas e desaparecendo após aproximadamente 3 a 6 meses do momento do aparecimento dos sintomas. Porém, se for detectado após 6 meses caracteriza o estado de portador crônico.(AGUIAR, 1996; KHOURI, 2004).

- HBeAg: Seu aparecimento no soro está relacionado com a replicação viral e a ação da DNA-polimerase. É encontrado durante a fase aguda, juntamente com outros marcadores, especialmente o HBsAg, e desaparece com a cura. (SUCUPIRA, 1997; KHOURI, 2004).

- Anti-HBc: Primeiro anticorpo a ser detectado, permanecendo positivo por muitos anos. A persistência deste anticorpo torna-o um melhor indicador de infecção passada. (ALENCAR, tese).

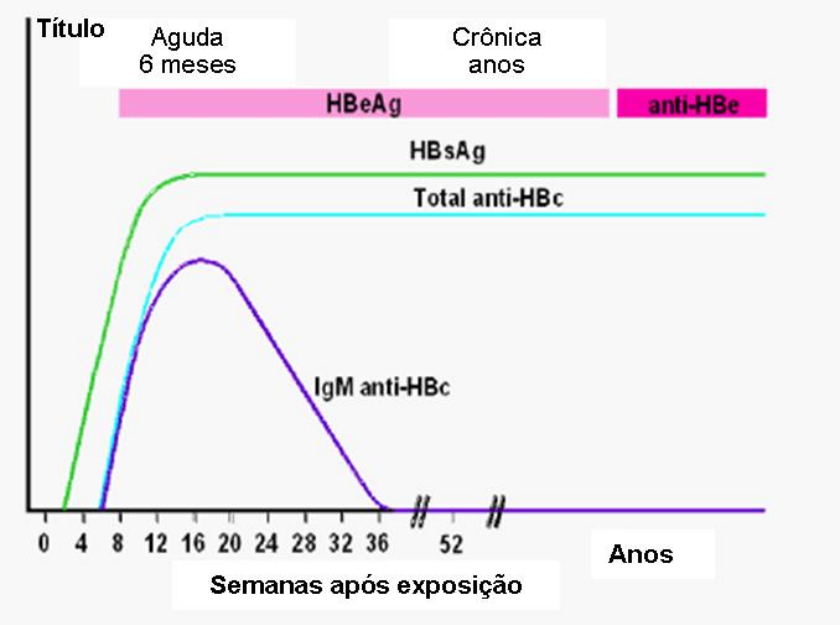
- Anti-HBs: Também chamado de anticorpo neutralizante, é considerado marcador de cura e imunidade. Em geral, aparece mais tardiamente no curso da infecção aguda, algumas semanas após o desaparecimento do HBsAg. Este anticorpo, embora dirigido apenas contra o envoltório do VHB, confere imunidade; e neste fato baseia-se a vacinação com HBsAg purificado para a indução de Anti-HBs.(SUCUPIRA, 1997).

- Anti-HBe: É detectado no soro logo após a diminuição dos níveis de HBeAg, indicando que esta doença está evoluindo para a cura e que ocorreu parada da replicação viral.(KHOURI, 2004; FOCACCIA, 1997).



Fonte: Adaptado de www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/hep_3/slide_3.htm. Acesso em: 19/11/2005

Figura 6 - Curso sorológico da hepatite B aguda



Fonte: Adaptado de WWW.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/hep_3/slide_3.htm. Acesso em: 19/11/2005

Figura 7 – Curso sorológico da hepatite B crônica

1.7 Triagem Sorológica para hepatite B em Bancos de Sangue:

A segurança transfusional visa reduzir os riscos infecciosos e imunológicos para os receptores de sangue e hemoderivados. A estratégia dessa segurança se inicia na captação de doadores e continua com a triagem clínica e sorológica, com realização de testes para detecção de antígenos e anticorpos relacionados com infecções transmitidas pelo sangue.

Alguns eventos melhoraram a qualidade do sangue e dos hemoderivados; como a lei nº 1.075 de março de 1950 que introduziu a doação voluntária de sangue. A lei nº 7.649 de 25 de janeiro de 1988 estabeleceu a obrigatoriedade do cadastramento dos doadores de sangue bem como a realização de exames laboratoriais no sangue coletado, visando prevenir a propagação de doenças como hepatite B, sífilis, doença de Chagas, malária e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

A Portaria nº 1.376/ novembro de 1993, do Ministério da Saúde, definiu normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e hemoderivados,

obrigando a determinação ABO, Rh(D), antígeno D fraco (Du) e dos testes para identificação das hepatites B e C, doença de Chagas, sífilis, Aids, dos anticorpos anti-HTLV I/II e anti-HBc. Recomendam ainda a realização de testes para exclusão de malária, falcização e hemoglobinas anormais. A introdução do teste de detecção para o anti-HBc se deu a partir desta lei, pois até então apenas a detecção do HBsAg como marcador do VHB era realizada.

Alguns trabalhos mostraram a importância da introdução do anti-HBc na triagem sorológica em bancos de sangue, como o trabalho publicado por Kojima et al. (1977), onde foi estudada a associação entre os marcadores sorológicos da infecção por hepatite B e a presença do VHB no fígado. Neste estudo foram avaliados 31 pacientes portadores de cirrose hepática, que possuíam resultado de anti-HBc positivo, e foi observado que em 18 casos onde os títulos de anti-HBc eram mais altos, foi detectada a presença de HBsAg e/ou HBcAg no fígado; o que não foi observado em pacientes com títulos mais baixos de anti-HBc. Outro estudo desenvolvido por Tabor et al. (1981) veio mostrar a necessidade de utilização do anti-HBc em doadores de sangue. Este estudo se propôs a determinar a prevalência de marcadores sorológicos da hepatite B entre candidatos a doação de sangue que possuíam ou não história de hepatite ou de transfusão sanguínea. O anti-HBc foi detectado em 30 candidatos a doação, que possuíam história previa de hepatite sem a presença de nenhum outro marcador avaliado (HBsAg e anti-HBs); já no grupo de candidatos a doação sem história prévia de hepatite, o número de anti-HBc positivo foi de quatro candidatos.

A Resolução nº 343/2002, do Ministério da Saúde, determina a obrigatoriedade da realização de exames laboratoriais de alta sensibilidade em todas as doações, para identificação das doenças transmissíveis pelo sangue. Estes exames são necessários para que haja uma maior segurança nas transfusões realizadas, principalmente em regiões de endemicidade maior, onde o risco de transmissão pode ser mais alto.

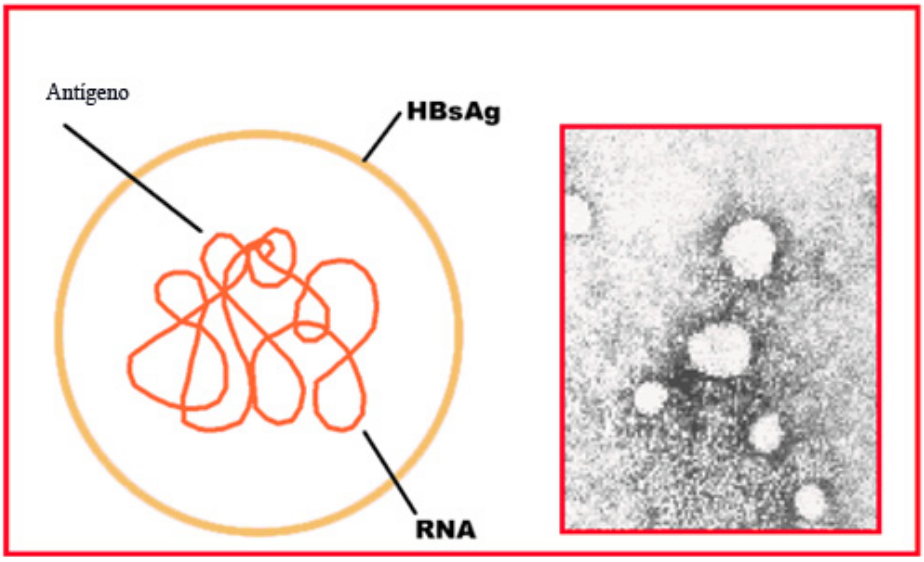
Os resultados encontrados com os métodos moleculares mostram que a sua implantação é necessária. Izuka et al. (1992) realizaram um estudo em doadores de sangue no qual avaliaram a relação entre os títulos de anti-HBc e o DNA do VHB, na ausência de HBsAg, e detectaram 12 resultados positivos para o DNA do VHB, em 175 unidades de bolsas com anti-HBc isolado em títulos elevados. E o DNA do VHB foi negativo nas 119 unidades com títulos baixos de anti-HBc isolado. Arraes et al. (2003) estudaram a relação do DNA do VHB com outros marcadores sorológicos da hepatite B, em 1000 doadores de sangue de Recife, e verificaram 10 casos de HBsAg positivo com a presença do DNA do VHB; e dois casos de resultados positivos para o DNA do VHB em doadores que eram anti-HBc e anti-HBs positivos sem HBsAg. Yoshikawa et al. (2005) analisaram a detecção do VHB DNA, em doadores de sangue japoneses, em estágios precoce e tardio da infecção, e observaram que foi detectado VHB DNA nos dois estágios da doença. Em estudo realizado por Silva et al. (2005), em doadores de sangue de uma região de baixa prevalência, foi encontrado VHB DNA em cinco amostras o que correspondeu a 3,3%; e que destas, três eram anti-HBc e anti-HBs positivas e duas possuíam apenas como resultado positivo o anti-HBc.

1.8 Hepatite Delta:

O vírus da hepatite Delta (VHD) foi descoberto em 1977 em um grupo de pacientes italianos cronicamente infectados pelo VHB e que desenvolveram episódios de doença hepática aguda (RIZZETTO et al., 1977). O VHD possui notável poder de dominância e supressão sobre outros agentes virais, observando-se seu efeito dominante na coinfecção com o VHB (SAGNELLI et al. 1997).

O VHD apresenta também efeito inibitório sobre a síntese dos antígenos virais do VHB durante a superinfecção, particularmente sobre o antígeno de superfície (HBsAg) e o antígeno central (HBcAg) (RIZZETTO et al, 1977).

O genoma do VHD é formado por um RNA circular de hélice simples de 1,7 kb dobrado em forma de bastão. Também no interior do vírion, encontra-se o antígeno da hepatite D (HDAg), ambos são revestidos externamente pelo HBsAg (NEGRO et al., 1995).

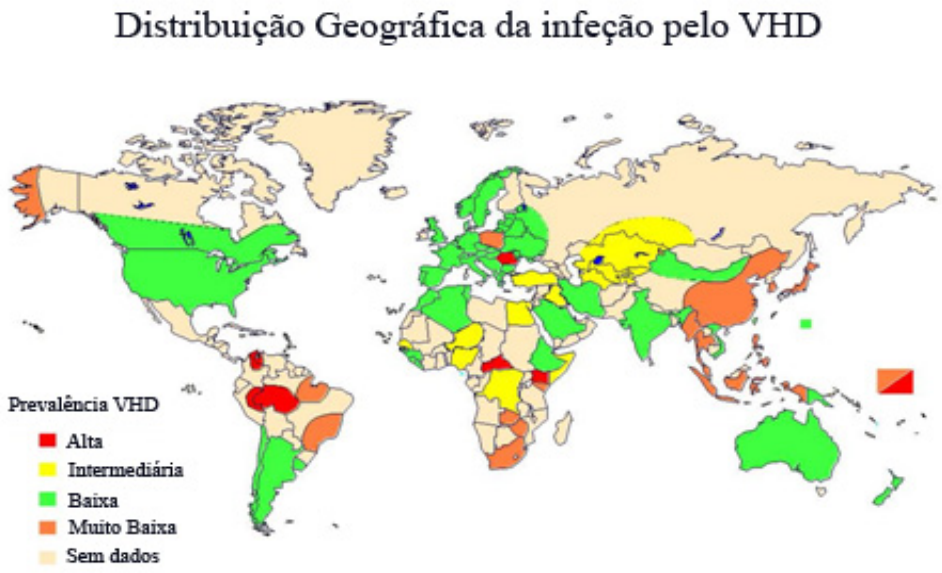


Adaptado de: www.evunixuevora.pt/trabalhos/2000/virol00_HEPATITES.htm

Figura 8 – Vírus da Hepatite Delta

Mais de 350 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo VHB, possuindo um grande risco de morrer por cirrose ou câncer no fígado, e aproximadamente 20 milhões de pessoas estão também infectadas pelo VHD (RADJEF et al., 2004). Indivíduos superinfectados possuem um maior risco de desenvolver hepatite fulminante do que os que possuem apenas o VHB. As infecções crônicas pelo VHD estão associadas com um processo mais rápido de danos hepáticos quando comparados a indivíduos infectados pelo VHB (FARCI, 2003).

O VHD é endêmico em algumas regiões do mundo, como na América do Sul: determinadas áreas do Brasil, da Colômbia e da Venezuela.



Fonte: Retirado de www.evunixuevora.pt/trabalhos/2000/virol00_HEPATITES.htm

Figura 9 – Distribuição geográfica da prevalência da infecção pelo VHD.

A transmissão do VHD ocorre principalmente por via parenteral, contudo, em determinadas áreas do norte da América do Sul, a transmissão do VHD poderia ocorrer por exposição inaparente, principalmente relacionada com erupções da pele causadas por picadas de inseto ou através das mucosas (FONSECA, 1993; HADLER et al., 1983). A transmissão perinatal, depende da infectividade do VHB, ocorrendo em mães portadoras de VHB com sinais sorológicos de replicação viral (FONSECA, 1993) A análise da seqüência do genoma do VHD revelou evidências da transmissão do VHD entre casais, sugerindo que a transmissão do VHD por via sexual possa ocorrer (WU et al., 1995).

Após a contaminação pelo VHD, o período de incubação é de aproximadamente 35 dias. O primeiro marcador a ser detectado no soro é o HDAg e ele revela a fase mais precoce da infecção. No diagnóstico sorológico da hepatite D aguda, destaca-se a detecção da fração IgM anti-HD. Nas formas crônicas, o diagnóstico sorológico baseia-se na detecção da fração IgM anti-HD ou IgG anti-HD com altos títulos. O encontro do RNA VHD no soro ou tecido hepático, através de técnicas de biologia molecular, indica alta infectividade.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar a prevalência do DNA do vírus da hepatite B em doadores de sangue reativos para anticorpos dirigidos contra o antígeno do core (anti-HBc), em Manaus- Amazonas.

2.2 Específicos

2.2.1 Verificar a prevalência de VHB DNA em doadores de sangue anti-HBc positivos e anti-HBs positivos.

2.2.2 Verificar a prevalência de VHB DNA em doadores de sangue com anti-HBc como marcador único.

2.2.3 Associar as variáveis como idade e sexo com a presença do VHB DNA.

2.2.4 Verificar a prevalência de anti-delta em doadores anti-HBc reativos com VHB DNA.

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo de Estudo

O estudo realizado foi do tipo transversal, e realizado em candidatos a doação de sangue que procuraram a Fundação HEMOAM. Participaram do estudo, doadores de sangue que possuíram resultado positivo para anti-HBc, realizado em duplicata, após triagem sorológica e que concordaram em participar do estudo, após prévia explicação deste por um responsável.

Em 2005, a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas – FHEMOAM detectou aproximadamente 2000 doações anti-HBc positivas em Manaus.

3.2 Universo de estudo

3.2.1 População de Referência

O presente estudo teve como alvo os doadores de sangue atendidos na Fundação HEMOAM.

3.2.2 População de Estudo

Foram estudados os doadores de sangue anti-HBc positivos e anti-HBs positivos e doadores com anti-HBc isolado. Os resultados de anti-HBc e anti-HBs foram obtidos do

laboratório de Sorologia da Fundação HEMOAM localizado na cidade de Manaus, Amazonas.

3.2.3 Cálculo da Amostra

O tamanho mínimo da amostra foi calculado, estimando-se uma prevalência de 5% de anti-HBc na população de doadores (HEMOAM) e uma freqüência mínima de 10% de DNA do VHB em doadores anti-HBc reativos.

Para um intervalo de confiança de 95%, com uma precisão de 5%, foi estimada uma população de 130 doadores de sangue anti-HBc reativos.

3.2.4 Amostra

Foram coletadas 140 amostras de doadores anti-HBc reativos que procuraram a Fundação HEMOAM.

3.2.5 Critérios de Inclusão e/ou Exclusão

Os candidatos que tiveram o perfil estudado, que era possuir resultado reativo para anti-HBc, testado em duplicata após a triagem sorológica à que todos os doadores de sangue são submetidos; foram incluídos no estudo desde que sua amostra apresentasse as informações como número da bolsa, iniciais ou nome do doador, data de nascimento e município de procedência. Amostras de doadores com sorologia reativa para HBsAg, anti-HIV I e II, HTLV I e II, Sífilis, Chagas, anti-HCV foram excluídas do estudo.

3.3 Procedimentos

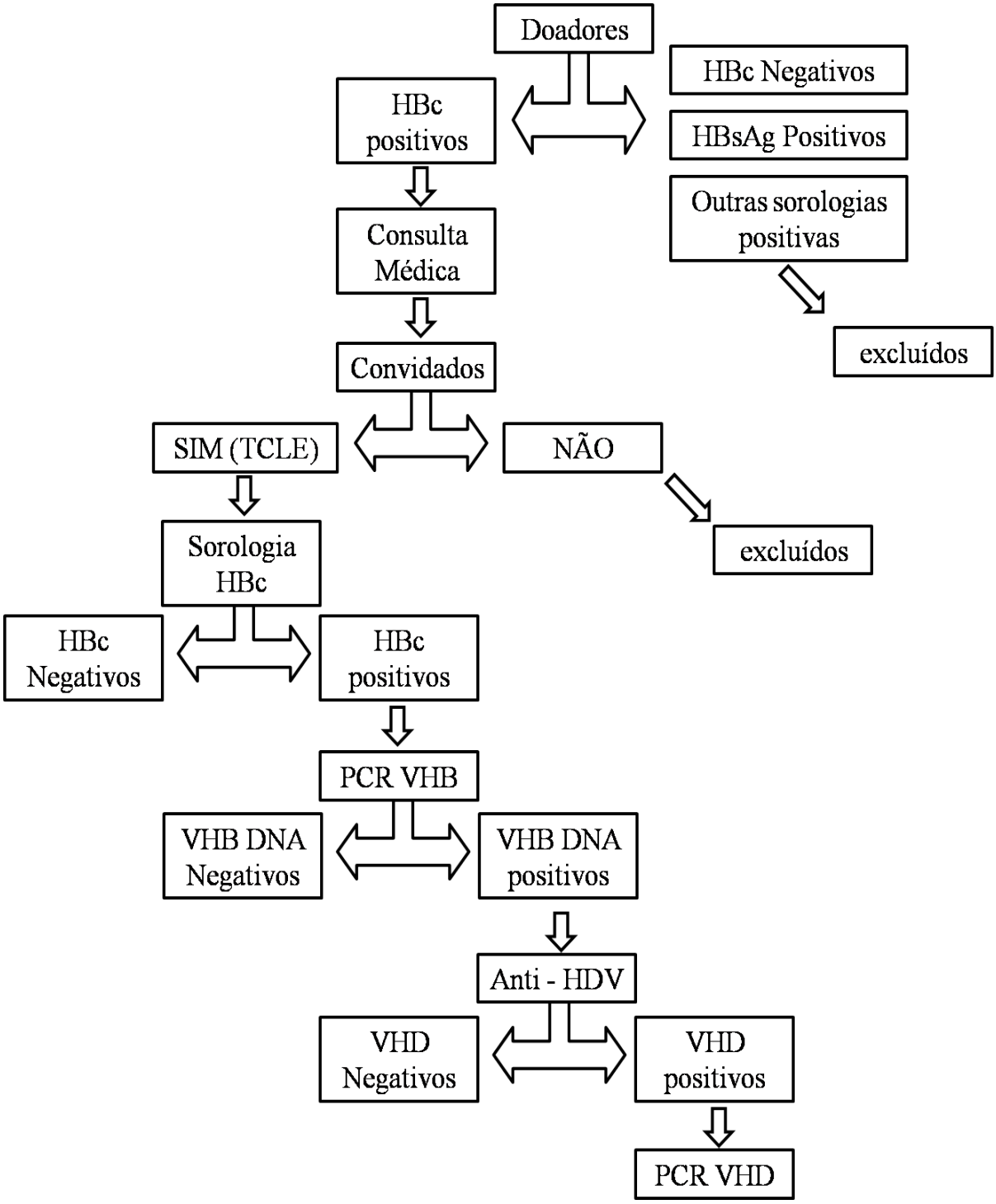


Figura 10 – Fluxograma dos procedimentos do estudo.

3.3.1 Coleta

Após a detecção de uma amostra anti-HBc reativa em duplicata, foi verificada a sorologia para anti-HBs. Após a explicação do projeto por um profissional responsável e da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelo participante (Apêndice A), foi obtida uma amostra de sangue de 10 mL por punção venosa colhida em tubo a vácuo com gel separador (Vacutainer ®).

3.3.2 Diagnóstico sorológico

3.3.2.1 Anti-HBc

É um teste imunoenzimático baseado num princípio de inibição competitiva. Os poços das tiras da microplaca são revestidos com o antígeno do "core" do VHB. O anticorpo para o HBcAg interligado à enzima peroxidase de rábano (HRP) serve de conjugado. A amostra e os controles tanto positivos quanto negativos são incubados nos poços juntamente com o conjugado. Quando a amostra não contém anti-HBc, forma-se um complexo de anticorpos marcados em uma fase sólida de HBcAg/anti-HBc. Após a lavagem e a incubação com tetrametilbenzidina (TMB), ocorrerá o desenvolvimento da cor azul. A reação da enzima é interrompida adicionando-se uma solução de ácido sulfúrico, que muda a cor para amarelo. Quando não houver o anti-HBc na amostra, desenvolve-se uma cor intensa. No entanto, caso a amostra contenha anti-HBc, compete com o conjugado de anticorpos marcados para o antígeno anti-HBc da fase sólida e não se forma qualquer coloração após a adição do substrato.

3.3.2.2 Anti-HBs

É um teste imunoenzimático baseado num princípio de sanduíche. Com a adição de uma amostra ou controle apropriado que contenha anti-HBs, os complexos imunes são formados com interação dos anticorpos da amostra e o HBsAg da fase sólida. Após a incubação, a amostra é aspirada e os poços são lavados em tampão fosfato. Seguidamente, é adicionado o conjugado de HBsAg (peroxidase de rábano acoplada ao HBsAg) e forma-se um complexo de ligação da fase sólida de HBsAg/anti-HBs/enzima marcada. Após a lavagem e a incubação com o substrato TNB (tetrametilbenzidina) ocorrerá o desenvolvimento da cor azul que, quando a reação é interrompida com ácido sulfúrico, muda de cor para amarelo. Quando o anti-HBs estiver presente na amostra, desenvolve-se uma cor intensa.Contudo, se a amostra não contiver anti-HBs após a adição do substrato não se forma coloração.

3.3.2.3 Anti-delta:

O método imunoenzimático para determinação qualitativa dos anticorpos anti-Delta é um teste competitivo simultâneo, baseado na técnica de ELISA. Os anticorpos anti-Delta presentes na amostra e os anticorpos anti-HD-HRP (anticorpos anti-Delta conjugados a peroxidase de rábano) competem por uma quantidade limitada de HDAg em fase sólida. Portanto, o conjugado enzimático está ligado de modo inversamente proporcional à quantidade de anticorpos anti-HD presente nas amostras ou nos controles. A atividade enzimática é medida pela adição de uma solução incolor de cromógeno/substrato. A ação da enzima no cromógeno/substrato produz uma coloração que é medida por um fotômetro.

3.3.3 Diagnóstico Molecular do VHB

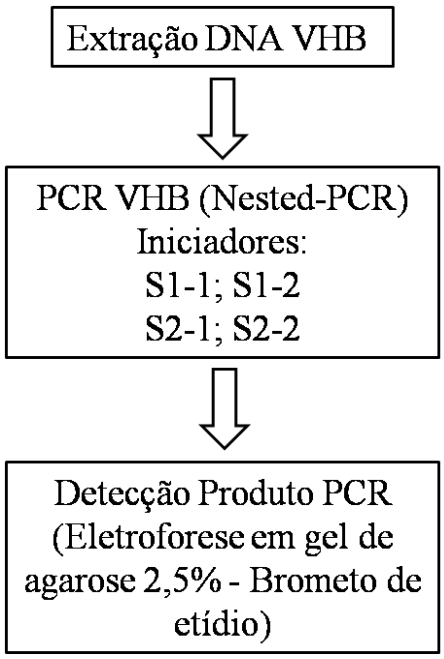


Figura 11 - Fluxograma do diagnóstico molecular do VHB

3.3.3.1 Extração do DNA:

A extração foi realizada a partir do soro dos pacientes que corresponderam aos critérios de inclusão. Para a extração, adicionou-se 200µL de soro a 20µL de Protease em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 200 µL de Tampão AL e homogeneizou-se em vortex por 15 segundos. Após um período de incubação de 10 minutos a 56ºC, o tubo foi centrifugado rapidamente e foi adicionado 200 µL de etanol PA, seguiu-se de homogeneização em vortex por 15 segundos e uma rápida centrifugação. O material foi transferido cuidadosamente para o frasco com a coluna e centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm. O frasco com o filtrado foi desprezado e um novo frasco foi adicionado. Acrescentou-se 500 µL de Tampão AW1 e o frasco foi centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm. O frasco com o

filtrado foi desprezado novamente e um novo frasco foi adicionado. Adicionou-se 500 µL de Tampão AW2 e centrifugou-se por 3 minutos a 14000 rpm. O frasco com o filtrado foi descartado e adicionado um tubo de microcentrífuga, seguiu-se de uma centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm para retirar o excesso de etanol. O tubo de microcentrífuga foi trocado por um novo e foi acrescentado 50 µL de Tampão AE, que foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente (15º a 25º C) e centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm. A coluna foi descartada e o frasco com o filtrado foi guardado a -20º C para o diagnóstico molecular. Em cada extração foi incluído um controle positivo (amostra positiva para o VHB-DNA) e um controle negativo.

3.3.3.2 Oligonucleotídeos / Iniciadores

Foram utilizados dois pares de iniciadores; um par cujo alvo foi o gene localizado na região de superfície (S1-1 e S1-2) e outro par de iniciadores localizados mais internamente (S2-1 e S2-2). Na primeira etapa da reação do "Nested PCR", foram utilizados os iniciadores da região de superfície em 35 ciclos dando origem a um produto de 513 pares de base. Na segunda etapa, os iniciadores mais internos foram usados em 28 ciclos perfazendo um produto final de 233 pares de base. (IIZUKA et al, 1992; YOSHIKAWA et al., 2005).

Quadro 2

Iniciadores utilizados na PCR para VHB

Iniciador	**Sentido**	**Seqüência**	**Tamanho**	**Posição no Genoma**
S1-1	Senso	TCGTGTTACAGGCGGGGTTT	20 nt	192-211
S1-2	Anti-senso	CGAACCACTGAACAAATGGC	21 nt	685-704
S2-1	Senso	CAAGGTATGTTGCCCGTTTG	20 nt	455-474
S2-2	Anti-senso	GGCACTAGTAAACTGAGCCA	20 nt	668-687

3.3.3.3 Amplificação do DNA (PCR)

Nesta etapa, foi amplificado 5µL de DNA, previamente extraído, em 45µL dos outros componentes da reação (mistura da reação ou "mix") que são: 20mM de Tris-HCl pH 8,4, 50mM de KCl, 2mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada desoxinucleotídio trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2,5 unidades de *Taq* polimerase (GibcoBRL). Após a adição da *Taq* polimerase, a reação ocorreu em um termociclador (Eppendorf) em repetidos ciclos onde ocorreu variação de temperatura.

A primeira etapa da amplificação correspondeu a etapa onde as fitas de DNA foram desnaturadas e para isso ocorreu um aumento da temperatura a 94ºC, cada ciclo nesta etapa correspondeu a um minuto. Nesta etapa de desnaturação, ocorreram 35 ciclos a 94ºC.

Ocorreu um resfriamento, onde a temperatura atingiu 55ºC e durou um minuto e meio. Nesta fase, ocorreu a ligação dos iniciadores a cadeia de DNA previamente desnaturada.

Na terceira etapa conhecida como etapa de elongação, a temperatura novamente se elevou até atingir 72ºC (temperatura ótima para que a *Taq* polimerase começasse a sua atividade). Houve a extensão da cadeia complementar de DNA, e para que obtivéssemos um maior número de cópias, a elongação final durou sete minutos. Após a primeira amplificação, o produto da reação permaneceu a 4ºC por tempo variável. Na segunda amplificação, uma alíquota de 5µL do produto da primeira amplificação foi amplificado. Passando novamente pela etapa de desnaturação a 94ºC com 28 ciclos, pela etapa de anelamento dos iniciadores a 55ºC por um minuto e meio e pela etapa de elongação final com duração de sete minutos. Após esta etapa, o produto da reação também permaneceu a 4ºC.

Cada análise foi realizada em duplicata em momentos diferentes e os resultados finais foram obtidos pela concordância entre as duas análises. Foram consideradas negativas as amostras que não apresentaram produto amplificado em nenhuma das duas reações. Foram consideradas positivas as amostras que possuíram produto amplificado nas duas reações; e

nos casos de resultados discordantes entre as duas reações, o procedimento foi repetido desde a extração.

3.3.3.4 Detecção do produto amplificado

Após a etapa de amplificação, o produto obtido foi analisado. Foi retirado 7 µL do produto amplificado e adicionado 2 µL de tampão de corrida com azul de bromofenol. O marcador de peso molecular utilizado foi o Marcador de 100 pares de base (GibcoBRL). A eletroforese foi realizada em gel de agarose na concentração de 1,5%, utilizando tampão TBE 1X, com voltagem de 50 volts.

Após a eletroforese, que utilizou o gel preparado com brometo de etídio, a visualização foi feita em um transluminador UV e o registro foi feito em um sistema de foto-documentação.

3.3.4 Diagnóstico Molecular do VHD

3.3.4.1 Extração do RNA do VHD

Foi utilizado o protocolo de extração do kit comercial QIAamp RNA (QIAGEN), conforme a instrução do fabricante.

Adicionou-se 560 µL de tampão AVL preparado contendo o carreador RNA em 140 µL de soro. Incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 560 µL de etanol (96-100%). Em seguida, 630 uL desta solução foi transferido para tubo contendo a coluna de purificação, e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o filtrado, trocou-se a coluna para um novo tubo e transfiriu-se mais 630 uL para a coluna de purificação, e centrifugou-se 8.000 rpm por 1 minuto. Descartado o filtrado, a coluna foi lavada com tampão 500 uL de tampão AW1 e centrifugou-se a 8.00 rpm por 1 minuto.

Descartou-se o filtrado, e realizou-se nova lavagem com 500 uL de tampão AW2 e centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 minutos. Para eluir o extrato, foi realizado uma dupla eluição, usou-se 2 vezes 40 µL de Tampão AVE e armazenou-se a -70 C.

Quadro 3

Iniciadores utilizados na PCR para VHD

Nome	**Seqüência**	**Posição Genoma**
5414	GAG ATG CCA TGC CGA CCC GAA GAG	883-906
5415	GAA GGA AGG CCC TCG AGA ACA AGA	1288-1265

3.3.4.2 Síntese do cDNA

O extrato de RNA foi transferido para um tubo de 0,5 mL e submetido a desnaturação por 3 minutos .Cerca de 1 ug de RNA foi adicionado a 10 ul de reação de transcrição reversa contendo 4,5 ug/uL de primer anti-sense de primer randômico (Invitrogen Life Technologies), 0,1mM de DTT (Invitrogen Life Technologies), 200 mM de cada desoxinucleotideo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Invitrogen Life Technologies , 10 unidades de inibidor ribonuclease (RNaseOUTTM Invitrogen Life Technologies), 200 unidades de Transcriptase reversa. Esta solução contendo o material a ser transcrito foi submetida a repetidos ciclos de variação de temperatura, em um termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient), que consistiu de 1 ciclo de 37 ºC por 15 minutos ; 1 ciclo de 42ºC por 15minutos; 1 ciclo de 95ºC por 5 minutos e 1 ciclo de 72 ºC por 7 minutos e 4 ºC por tempo indeterminado.

Nesta etapa, o RNA viral presente na alíquota através da ação da transcriptase reversa foi totalmente transcrito em DNA complementar (cDNA). O cDNA sintetizado foi então adicionado diretamente ao tampão de amplificação.

3.3.4.3 Determinação qualitativa do VHD RNA (Amplificação do cDNA)

Um total de 10 uL de cDNA foi amplificado em 40 uL da mistura da reação, contendo 20 mM de Tris-HC(pH 8.0), 50 mM de KCl, 50 mM de MgCl2, 10 mM de cada desoxinucleotideo trifosfato(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) , 25 pmoles de oligonucleotídeos 5414 e 5415, 5 unidades de *Taq* Polimerase. Esta solução contendo o material a ser amplificado foi submetida a repetidos ciclos de variação de temperatura, em um termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) que consistiu de 1 ciclo de 95ºC por 5 minutos para desnaturação; 35 ciclos de 94ºC por 2 minutos, 55ºC por 1 minuto, 72ºC por 1 minuto, 1 ciclo de 72ºC por 5 minutos e 4ºC por tempo indeterminado O produto final obtido deveria produzir um fragmento de aproximadamente 405 pares de base.

Para cada reação da PCR foram incluídos um controle positivo e um controle negativo.

3.4 Considerações éticas

Este estudo somente foi iniciado após a aprovação no Comitê de Ética da Fundação HEMOAM, obedecendo às diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos, a Resolução 196 de 10 de outubro de 1996.

3.5 Análise Estatística

Os resultados das variáveis (identificação do doador, número da bolsa, data do nascimento, data da coleta, município, microrregião, sexo, idade, resultado dos testes sorológicos e molecular) foram armazenados em um banco de dados do programa EPI Info versão 3.4.1 para Windows.

Os dados foram apresentados através de tabelas e gráficos onde se calculou as freqüências absolutas simples e relativas para os dados categóricos e médias, mediana e desvio-padrão (DP) para os dados quantitativos.

Para analisar a associação entre as variáveis categóricas em relação ao resultado da PCR foi utilizada a Estatística de Teste Qui-quadrado com correção de Yates e na comparação das médias de idade, o teste t de Student.

4. RESULTADOS

Foram avaliados 140 doadores de sangue anti-HBc reativos, que fizeram sua doação na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM em Manaus, Amazonas, e que procuraram esta Fundação para uma consulta médica por alteração em seu resultado de sorologia, no período de março de 2006 a março de 2007. Os pacientes foram selecionados por demanda espontânea conforme procuravam a Instituição.

As informações quanto ao resultado de sorologia reativo para anti-HBc destes doadores de sangue foram obtidas junto ao Sistema de Atendimento ao Doador – SAD. Assim como os resultados sorológicos de anti-HBs realizados no Laboratório de Sorologia desta Fundação.

Entre os doadores de sangue estudados, 106 (75,7%) eram do sexo masculino e 34 (24,3%) do sexo feminino, como se pode observar na tabela 1.

Tabela 1

Distribuição dos doadores anti-HBc reativos quanto ao sexo

Sexo	n	%
Masculino	106	75,7
Feminino	34	24,3
Total	140	100

Entre os doadores do sexo masculino, 17 (16%) tiveram resultado Reativo na PCR para VHB, e entre as do sexo feminino, 03, ou seja, 8,8% apresentaram PCR Reativo para VHB, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2

Distribuição do resultado da PCR para VHB quanto ao sexo

Sexo	**PCR**				Total
	Reativo		Não reativo		
	n	%	n	%	
Masculino	17	16	89	84	106
Feminino	3	8,8	31	91,2	34
Total	20	14,3	120	85,7	140

p-valor = 0,445 (χ^2_{Yates})

A idade dos doadores de sangue anti-HBc reativos estudados variou de 20 a 68 anos; sendo que a média de idade destes doadores foi de 39,64 (DP=10,80) com mediana de 40 anos.

A média de idade entre os indivíduos estudados com PCR positivo foi de 39,65 (DP= 13,18) com mediana de 35,5 anos e dos indivíduos com PCR negativo foi de 40,01 (DP 10,40) com mediana de 40,0 anos. Utilizando o teste t de Student não foi observada diferença estatística significante (p-valor= 0,889), como pode ser melhor observado no gráfico 1.

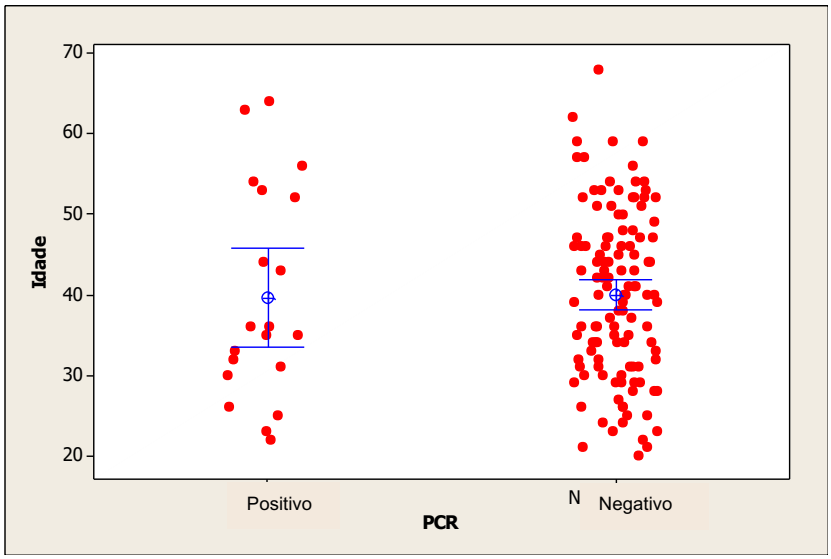


Gráfico 1 – Comparação dos resultados da PCR em relação à média de idade da população estudada.

Dos 20 resultados reativos, 18 eram de doadores provenientes do Estado do Amazonas: Manaus (7), Canutama (1), Borba (1), Carauari (2), Coari (2), Fonte Boa (1), Humaitá (1), Lábrea (2), Manacapuru (1) e um doador era proveniente do Rio Grande do Sul e o outro de Maranhão.

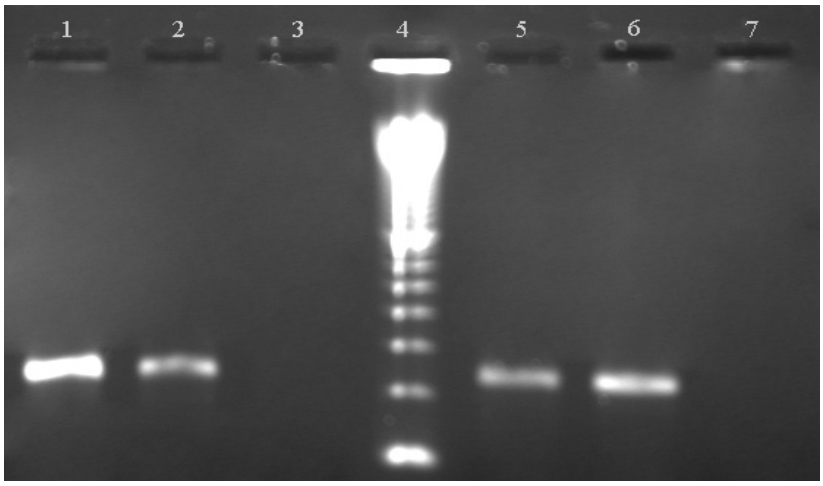
Entre os 140 doadores anti-HBc reativos, 101 (72,1%) possuíam sorologia reativa também para anti-HBs, e 39 (27,9%) possuíam o anti-HBc como único marcador sorológico de hepatite B.

Tabela 3

Pacientes Anti-HBc reativos que possuem reatividade para Anti-HBs

	Anti-HBc	
Anti-HBs	Reativo	%
Reativo	101	72,1
Não reativo	39	27,9
Total	140	100

Foram detectados 20 PCR positivos para VHB entre as 140 amostras estudadas, significando uma prevalência de 14,3% na população estudada.



LEGENDA

1 – Amostra Positiva
2 – Amostra Positiva
3 – Amostra Negativa
4 – Marcador (100pb)
5 – Amostra Positiva
6 – Controle Positivo
7 – Controle Negativo

Figura 12- Produto da PCR para DNA do VHB corrido em gel de agarose.

Entre os 101 doadores Anti-HBc/Anti-HBs reativos, 12 (11,9%) possuíam DNA do VHB e dos 39 doadores que possuíam o anti-HBc como único marcador, 8 (20,5%) possuíam o DNA do VHB como descrito na tabela 4.

Tabela 4

Pacientes com PCR reativo para VHB em relação ao resultado de Anti-HBs

Anti-HBs	**PCR**				Total
	Reativo		Não reativo		
	n	%	n	%	
Reativo	12	11,9	89	88,1	101
Não Reativo (HBc isolado)	8	20,5	31	79,5	39
Total	20	14,3	120	85,7	140

p-valor = 0,299 (χ^2_{Yates})

Entre os 20 doadores com PCR Reativo, 05 (25,0%) eram anti-Delta reativos. Destes, 3 eram anti-HBc isolado e 2 possuíam anti-HBc e anti-HBs reativos. Dos três doadores peretncentes ao padrão anti-HBc isolado, 2 eram de Carauari e 1 de Lábrea. Os dois doadores anti-HBc/anti-HBs reativos eram procedentes de Borba e Coari. Entre os indivíduos com PCR Reativo e anti-Delta reativo, 4 eram do sexo masculino e 1 do sexo feminino.

Tabela 5

Sorologia para Anti-HDV em pacientes com PCR reativo para VHB

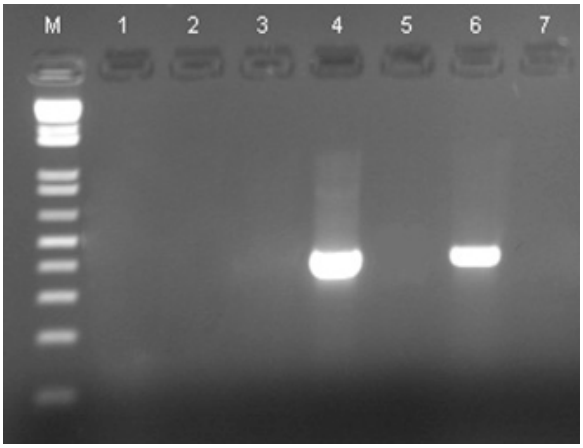
Anti-Delta	**PCR**	
	Reativo	
	n	%
Reativo	5	25
Não Reativo	15	75
Total	20	100

Entre os cinco doadores de sangue com resultado reativo para anti- delta, apenas um (20%) foi positivo no PCR para VHD, como mostra a tabela 6.

Tabela 6

Presença do DNA do VHD em doadores anti-Delta Reativos

PCR VHD	**Anti-Delta**	
	Reativo	
	n	%
Reativo	1	20
Não Reativo	4	80
Total	5	100



LEGENDA

M – Marcador (100 pb)
1 – Amostra Negativa
2 – Amostra Negativa
3 – Amostra Negativa
4 – Amostra Positiva
5 – Amostra Negativa
6 – Controle Positivo
7 – Controle Negativo

Figura 13 – Produto da PCR para RNA do VHD corrido em gel de agarose.

5. DISCUSSÃO

Desde os tempos mais antigos, relatos de 751, a hepatite B vem sendo descrita e estudada, mas somente em 1965, Blumberg et al. (1965) publicaram o que vinha a ser uma das mais importantes revelações sobre as hepatites virais, o encontro do antígeno de superfície do vírus da hepatite B. A esta descoberta, seguiu-se a determinação dos diversos marcadores sorológicos do VHB, e a correta interpretação desses marcadores passou a ter importância diagnóstica, assim como prognóstica e preditiva.

A infecção pelo VHB e suas conseqüências (hepatite crônica, cirrose, carcinoma hepatocelular) são um sério problema de saúde pública; por isso devemos conhecer, identificar e tentar controlar sua transmissão. Desta forma, este estudo tem grande valia na concepção de abordar a presença do DNA do VHB em doadores anti-HBc reativos.

Neste estudo foram avaliados 140 doadores de sangue, que possuíam anti-HBc positivo associado ou não ao anti-HBs. 24,3% do sexo feminino, 75,7% do sexo masculino. Em seu estudo, Khuns et al. (2004) verificaram que 61,5% dos doadores anti-HBc estudados eram do sexo masculino e 38,5% do sexo feminino. Jilg et al. (1995) encontraram uma prevalência menor de 57,9% no sexo masculino e 42,1% em indivíduos do sexo feminino.

A média de idade dos doadores de sangue anti-HBc reativos foi de 39,64 anos. Jilg et al. (1995) observaram uma média de idade de 52 anos em homens e 47 anos em mulheres.

Alguns estudos revelaram que após o desaparecimento do HBsAg, o DNA do VHB pode persistir por décadas no soro, ou mais frequentemente no fígado destes indivíduos. (YUKI et al., 2003).

Se a persistência do genoma do VHB contribui para o aparecimento de doenças hepáticas e se os doadores de sangue com infecção oculta pelo VHB podem ser infectantes através da transfusão, eles devem ser melhor investigados. (ZANETTI et al., 2006)

Neste estudo foi observada uma prevalência de 14,3% de DNA do VHB em doadores de sangue anti-HBc reativos. Zanetti et al. (2004) verificaram que aproximadamente 280000 doadores de sangue italianos foram submetidos ao teste de detecção do DNA do VHB pelo NAT (Teste de Ácido Nucléico), 45,5% usando a tecnologia Roche de mini-pools de 10-20 amostras, e 54,5% usando tecnologia Chiron, de testes individuais. Catorze doadores, ou seja, 50 por milhão foram positivos para o DNA do VHB com HBsAg negativo. Destes, 11 foram detectados entre 151676 doações testadas pelo PCR individual (72,5 por milhão) e 03 foram detectadas entre 126743 doações (23,7 por milhão) pelo método de mini pool. Todos os doadores eram anti-HBc IgG e anti-HBs positivos.

Dos 20 doadores reativos para o DNA do VHB estudados, 12 eram anti-HBc e anti-HBs reativos e 8 anti-HBc isolado. A proporção de indivíduos anti-HBc positivos com o DNA do VHB detectável varia de acordo com a população estudada. Por exemplo, anti-HBc isolado foi encontrado em 0,5% de doadores suíços e o DNA do VHB em 3,9% destas. (Grob et al., 2000), enquanto que na Alemanha, a prevalência foi de 0,2% e 7,4% respectivamente. (Grob et al., 2000). Na Venezuela, país com prevalência intermediária, com 4-5% de prevalência de anti-HBc em doadores, foi encontrado uma prevalência de 6% de DNA do VHB em doadores anti-HBc positivo/HBsAg negativo. (GUTIERREZ et al., 1999). Um estudo, nos Estados Unidos, mostrou 0,84% de positividade para anti-HBc e 3,7% para o DNA do VHB. (KLEINMAN et al., 2003).

Drosten et al. (2004), extraíram DNA de 160 amostras anti-HBc positivas/ HBsAg negativas e testaram por PCR. O DNA do VHB foi detectado em 20 soros (12,5%).

De 493.344 doadores de sangue no Canadá, 5.585 (1,13%) eram anti-HBc reativos. Destes, 29 eram positivos para o DNA do VHB e HBsAg negativos, sendo que 21 (72,4%) eram também anti-HBs positivos e 8 eram anti-HBc isolado. (O'BRIEN et al., 2007).

De 158 amostras anti-HBc isoladas testadas de doadores de sangue mexicanos, 13 (8,2%) foram positivas para o DNA do VHB, apenas após o segundo "round" da PCR. (GARCÍA-MONTALVO et al., 2005).

A prevalência da infecção oculta na Europa aumenta com o crescimento da endemicidade do VHB na população, sendo relativamente baixa no norte da Europa e mais alta no Mediterrâneo e Leste Europeu (ZANETTI et al., 2006).

De 2505 doadores libaneses triados, 56 (2,2%) eram anti-HBc isolados; destes, 7 eram positivos para o DNA do VHB. Todas as amostras pertenciam ao Genótipo D. (RAMIA et al., 2005).

No Paquistão, Bhatti et al. (2007) observaram que 167 de 966 (17,8%) doações HBsAg negativas foram positivas para anti-HBc, com ou sem outros marcadores virais. Todas as bolsas HBsAg positivas também foram reativas ou para HBeAg ou anti-HBe; e para o DNA do VHB. Adicionalmente, 5 HBsAg negativas e anti-HBc positivas foram positivas para o VHB DNA: anti-HBs positivo (1), anti-Hbe positivo (1), anti-HBe e anti-HBs (1), anti-HBc isolado (2).

Behbahani et al. (2006), em Shiraz- Iran, verificaram que 131 (110 homens e 21 mulheres) de 2000 HBsAg negativos foram positivos para anti-HBc, sendo 85 dos 131 anti-HBs positivos. O DNA do VHB foi detectado em 6 (7%) dos 85 pacientes com resultado positivo para o anti-HBs.

De 1169 amostras anti-HBc positivas de doadores de sangue no Quebec analisadas por Chevrier et al., 2007, 12 (1,02%) foram positivas para o DNA do VHB. Nove das doze amostras eram anti-HBc/anti-HBs positivas e 3 anti-HBc isolados (CHEVRIER et al., 2007).

Silva et al. (2005), ao pesquisar o DNA do VHB no soro de 150 doadores anti-HBc positivos, no Rio Grande do Sul, encontraram cinco amostras positivas; três delas possuíam anti-HBs e duas apenas o anti-HBc como marcador da infecção. Enquanto que Kupski et al. (2007) estudando 241 doadores de sangue anti-HBc no Rio Grande do Sul, não obtiveram nenhum resultado positivo para o DNA do VHB.

Largura et al. (1997) não detectaram DNA do VHB nos cinqüenta soros estudados em doadores de sangue do Paraná.

Arraes et al. (2003) estudaram 120 doadores anti-HBc positivo em Recife e verificaram uma prevalência de 2,5 % de DNA do VHB nestes doadores. Dos três doadores positivos para o DNA doVHB, dois possuíam anti-HBs.

Alhababi et al. (2003) estudaram 151 doadores apenas anti-HBc positivo e detectaram 6 amostras positivas para o DNA do VHB, correspondendo a 4% da população estudada.

Iizuka et al. (1992) detectaram 12 (6,9%) amostras positivas para o DNA do VHB nas 175 anti-HBc isoladas estudadas.

Wang et al. (1991) ao analisarem 206 doadores anti-HBc positivos, encontraram 9 doadores positivos para o DNA do VHB.

Dettke et al. (2001) identificaram uma amostra positiva para o DNA do VHB em um pool de 12 amostras de doadores de aférese com sorologia negativa para HBsAg na Áustria.

Vale ressaltar que a maioria dos doadores analisados com hepatite B oculta possui baixos níveis de DNA do VHB, sugerindo que a detecção é altamente dependente da sensibilidade do teste utilizado.

Sabendo-se que a ausência do HBsAg não indica necesariamente ausência do vírus, bem como a presença de anti-HBs e a normalização das funções hepáticas podem não indicar imunidade definitiva, fica claro que os perfis sorológicos podem não refletir a situação imuno-viral que lhes é tradicionalmente atribuída.

Evidências indicam que portadores de infecção oculta podem transmitir VHB em casos de transfusão de sangue e transplante de órgãos. (CHAZOUILLERES et al., 1994; DEGOS et al., 1988; HOOFNAGLE et al., 1978; THIERS et al., 1988).

O verdadeiro potencial de infectividade destas amostras ainda é desconhecido e pode depender se a quantidade de anti-HBs é suficiente para prevenir a infecção. Satake et al. (2005) da Cruz Vermelha Japonesa relataram que 2,5% do sangue HBsAg negativo, anti-HBc positivo e com baixos níveis de DNA do VHB podem transmitir infecção. Consequentemente, a triagem para anti-HBc oferece um suporte adicional de sangue seguro contra o VHB. Isto tem sugerido a implantação do mini pool-NAT para VHB e a descontinuação do uso do teste HBsAg mas não do anti-HBc (KLEINMAN et al., 2005). Em países de alta prevalência onde a triagem para anti-HBc causará grande descarte de bolsas, VHB NAT pode representar a única opção para realmente prevenir a transmissão do VHB juntamente com a triagem para HBsAg (DE FELICE et al., 2005).

Uma transfusão sanguínea segura ainda é o principal interesse e todos os esforços nesta direção têm fracassado para alcançar o risco residual zero na transmissão do VHB por transfusão. Nesta direção, Silva et al. (2005) revelaram importantes observações, como: 3,3% de positividade para o DNA do VHB em amostras de doadores de sangue anti-HBc positivos com altos títulos de anti-HBs. Na Arábia Saudita, de 26606 doações entre 2000-2003, a prevalência do anti-HBc isolado foi 3,2%, HBsAg 1,9% e 10,1% das doações eram anti-HBc e anti-HBs positivas. Devido a isto, as bolsas com anti-HBc e anti-HBs são utilizadas e as com anti-HBc isolado são desprezadas. (PANTHORA, 2005).

Além disso, em raros casos, o DNA do VHB pode ser o único marcador presente no sangue e/ou no fígado. Nesta situação, a carga viral é baixa e, consequentemente VHB NAT será necessário para detecção (ALLAIN, 2004).

Recentes estimativas sugerem que até 20% dos indivíduos com hepatite B oculta que possuem DNA do VHB detectado poderiam ser não reativos para anti - HBc ou qualquer outro marcador sorológico de exposição ao VHB (TORBENSON; THOMAS, 2002).

Wang et al. (2002) avaliaram 147 doações HBsAg negativas quanto a presença de DNA do VHB, 11 destas amostras foram positivas. Duas destas amostras positivas foram transfundidas e os pacientes que receberam estas doações se tornaram positivos para o DNA do VHB.

O estudo de Rakela et al. (1980) mostrou que 6 (14%) de 44 pacientes que receberam transfusão de doadores anti-HBc reativos desenvolveram hepatite B. Porém, quando se estudou este marcador associado anti-HBs, um índice menor que 1% foi encontrado.

A transmissão da hepatite em chimpanzés pode ocorrer com um inóculo contendo apenas 100 vírions do VHB (Prince et al. 1983). Foi também demonstrada a transmissão de hepatite em chimpanzés com soros HBsAg negativo contendo baixo número de cópias do DNA do VHB (WANDS et al., 1986; THIERS et al., 1988; LIANG et al., 1989,1990). Assim, mesmo que a carga viral das amostras seja baixa, elas ainda poderiam transmitir hepatite aos receptores.

Estes dados reforçam a pesquisa do anti-HBc na triagem sorológica de doadores de sangue. Tal pesquisa deve, portanto, ser realizada principalmente nas regiões endêmicas da hepatite B, onde a prevalência do DNA do VHB em amostras anti-HBc positivas é maior.

Pacientes com o perfil anti-HBc isolado podem possuir VHB e serem infectantes através de transfusão sanguínea. Esta situação mais a não detecção de HBsAg em indivíduos com DNA do VHB tem levado a pesquisa de variantes virais que possam justificar a ausência de HBsAg. Duas hipóteses tentam explicar estes resultados: A primeira baseia-se no baixo nível de HBsAg que pode não estar sendo detectado pelos testes comerciais, necessitando de testes mais sensíveis. A segunda, na presença de cepas mutantes, as quais não são

reconhecidas pelos anticorpos empregados nestes ensaios. (FEITELSON, 1995; FUKUDA, 1995, LASKUS, 1994).

Lelie e Heaton (2006) relataram que uma série de artigos descrevem o VHB como um vírus persistente e mostram que doadores de sangue, mesmo após recuperação e formação de anti-HBs, podem ainda ser uma fonte de infecção pós-transfusional. Esse perfil sorológico, aparentemente contraditório pode se dever a presença de vírus mutante (BLUM, 1993). Na maioria das partes do mundo, a prevalência e a incidência do VHB é maior que HCV e HIV.

A mais importante e mais bem documentada mutação é a troca da glicina da posição 145 pela arginina no nucleotídeo 587. Este mutante é estável e mantém a capacidade de se replicar em altos títulos por muitos anos (CARMAN et al., 1990). Este mutante também pode permanecer nos leucócitos de sangue periférico de indivíduos HBsAg negativos e ser transmitido horizontalmente entre os membros de uma família (CHAKRAVARTY et al., 2000).

As mutações mais relevantes parecem ser aquelas na substituição de aminoácidos: G145R, K141E e T131 e a inserção de três aminoácidos entre o 123 e 124; afetando a estrutura antigênica do HBsAg (SEDDIGH-TONEKABONI et al., 2000).

O padrão anti-HBc isolado é muito frequentemente associado ao HBsAg negativo com baixos níveis de DNA do VHB. As razões para a não detecção do HBsAg são a inibição da sua expressão pelo HCV ou coinfecção com HDV e/ou níveis de HBsAg sintetizados abaixo do limite de detecção dos testes, presença de imuno-complexos e a presença de HBsAg mutantes (WEBER, 2001, 2002).

Entre os 20 doadores estudados com PCR Positivo, 05, ou seja, 25% eram anti-Delta reativos. Destes, 3 eram anti-HBc isolado e 2 possuíam anti-HBc e anti-HBs reativos. E entre os cinco doadores de sangue com resultado reativo para anti- delta, apenas um (20%) foi positivo no PCR para RNA do VHD.

Viana et al. (2005) ao estudarem indivíduos no Acre observaram 3,3% de positividade para HBsAg, 61,5% para anti-HBc e 1,7% para anti- Delta. A infecção pelo VHD é uma das importantes causas de hepatite fulminante e pode agravar o curso clínico da infecção crônica da infecção pelo VHB para cirrose e insuficiência hepática (WU, 2006).

Uma peculiaridade relevante do estudo de Chen et al. (2002) foi a alta freqüência de VHD na ausência de HBsAg, observada em 28 indivíduos. Este resultado de VHD pode indicar uma infecção passada e resolvida. A replicação do VHB pode ter sido suprimida pelo VHD a tal ponto que os marcadores sorológicos, rotineiramente utilizados para o diagnóstico da infecção pelo VHB, se tornaram indetectáveis (CHULANOV et al., 2003; FONSECA, 2002).

Ghuman e Kaur (1995) detectaram marcadores de VHD em indivíduos sem qualquer marcador para VHB e sugeriram que a ausência de marcadores sorológicos para VHB não é suficiente para afastar infecção por VHD devido à interação entre esses dois vírus.

A infecção pelo VHB e VHD está sob controle nos países desenvolvidos, mas é um problema sério de saúde pública nos países em desenvolvimento (ERHARDT et al, 2003; DE PAULA et al, 2001). No caso específico da região amazônica, os dados indicam um aumento das hepatites B, D, e ambas são consideradas graves problemas de saúde pública, apesar políticas universais vacinação (RIBEIRO; SOUTO, 2000; MANOCK et al., 2000).

Se confirmada a presença de VHD em indivíduos sem marcadores sorológicos para VHB, este fato deve levar a mudanças na política de rastreio de doadores de sangue no Brasil, pois a triagem para VHD não está instituída em bancos de sangue, o que expõe os indivíduos, em especial os doentes com VHB, ao risco de transmitir esta infecção viral através de transfusões sanguíneas (VIANA et al, 2005).

O teste de amplificação de ácidos nucléicos (NAT) em doadores de sangue adicionado à triagem sorológica certamente reduzirá o risco residual de transmissão pós-transfusional do

VHB e ajudará a elucidar alguns padrões sorológicos como o anti-HBc isolado (NETO, 2001).

6. CONCLUSÃO:

6.1 A prevalência do DNA do VHB em doadores de sangue anti-HBc positivos é de 14,3%.

6.2 A média de idade entre doadores anti-HBc reativos com presença de VHB DNA foi de 39,65 anos; o que não mostrou diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo de doadores estudados com VHB DNA negativo;

6.3 Houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos em termos de reatividade para PCR, sendo o DNA do VHB mais frequente em indivíduos do sexo masculino;

6.4 A presença do anti-HBs não foi, em todos os casos, indicativa de ausência do Vírus da Hepatite B, mesmo sendo este anticorpo neutralizante e indicativo de imunidade;

6.5 A presença do RNA do VHD foi observada em um paciente dentre os 5 Anti-delta positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGUIAR, J.I.A. **HEPATITE B: Prevalência do anti-HBc e de fatores de risco em primodoadores de sangue do Hemosul de Campo Grande – MS**. Goiânia: Hemosul, 1996. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias), Universidade Federal de Goiânia, 1996.

AGUIAR, I.A. et al. Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen in blood donors in the middle west region of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.2, p. 185-187, fev, 2001.

ALENCAR, L.C.A. **Presença do Vírus da Hepatite B em doadores HBsAg negativos e Anti-HBc positivos: Associação com os marcadores sorológicos**. Recife: UNIFESP, 2000. Tese (Doutorado em Infectologia), Universidade Federal de São Paulo, 2000.

ALBERTI, A. Pathobiology of hepatitis B vírus infection and mechanism of action of interferon. **Progress in hepatology**, p. 41-46, 1993.

ALHABABI, F.; SALLAM, T.A.; TONG, C.Y.W. The significance of ani-HBc only in the clinical virology laboratory. **Journal of Clinical Virology**, v. 27, p.162-169, 2003.

ALLAIN, J.P. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. **Vox Sang,** v. 86, p. 83-91, 2004.

ARRAES, L.C. et al. The biological meaning of Anti-HBc positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.45, n.3, p. 137-140, mai./jun, 2003.

BEASLEY, R.P. et al. The « e » antigen and vertical trnasmission of hepatitis B surface antigen. **Amarican Journal of Epidemiology**, v.105, p. 94-98, 1977.

BEASLEY, R.P. et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus : a prospective study of 22.707 men in Taiwan. **The Lancet**, v. 2, p. 1129-1133, 1981.

BEHBAHANI, A.B. et al. Anti-HBc & HBV-DNA detection in blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen in reducing risk of transfusion associated HBV infection. **Indian J Med Res**, v. 123, p. 37-42. Jan, 2006.

BENSABATH, G; BOSHEL, J. Presença do antígeno Austrália (Au) em populações do interior do Estado do Amazonas, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.5, p.284-288, 1973

BENSABATH, G. et al. Caracteristicas serologicas Y epidemiologicas de la hepatitis virica aguda en la cuenca Amazonica del Brasil. **Bol. of Sanit. Panam.**, v.103, p. 351-362, 1987.

BHATTI, F.A. et al. Anti–hepatits B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. **Transfusion,** v. 47, p. 74-79, 2007.

BLUM, H.E. et al. Hepatitis B virus significance of naturally occuring mutants. **Intervirology**, v. 35, p. 40-50, 1993

BLUMBERG, B.S.; ALTTER, H.J.; VISNICH, S.A. A "new" antigen in leukemia sera. **JAMA**, V. 191, p. 541-546, 1965.

BRAGA, W.S.M. et al. Ocorrência da infecção eplo vírus da hepatite B (VHB) e delta (VHD) em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 349-355, jul/ago, 2001.

BRAGA, W.S.M. et al. Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e pelo plasmódio em Lábrea, Amazonas: estimativa da ocorrência de prováveis coinfecções. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.3, p. 218-223, mai./jun, 2005.

BRASIL, L.M. et al. Prevalência de os marcadores para o vírus da hepatite B em contatos domiciliares no Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 565-570, set/out, 2003.

CARMAN, W.F. et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. **Lancet**, v. 336, p. 325-329, 1990.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_3/slide_3.htm>. Acesso em: 19/11/2005.

CHAKRAVARTY, R. et al. Presence of hepatitis B surface antigen mutant G145R DNA in peripheral blood leukocytes of the family members of asymptomatic carrier and evidence ofits horizontal transmission. **Virus Res**, v. 90, p. 133-141, 2000.

CHÁVEZ, J.H.; CAMPANA, S.C.; HAAS, P. Panorama da hepatite B no Brasil e no Estado de Santa Catarina. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 14, n.2, p. 91-96, 2003.

CHAZOUILLERES, O. et al. Occult hepatitis B virus as a source of infection in liver transplant recipients. **Lancet**, v. 343, p. 142-146, 1994.

CHEN, Y.C. et al. Prognosis following spontaneous HBsAg seroclearence in chronic hepatitis B patients with or without concurrent infection. **Gastroenterology**, v. 123, p. 1084-1089, 2002.

CHEVRIER, M.C. et al. Detection and characterization of hepatitis B virus of anti-hepatitis B core antigen–reactive blood donors in Quebec with an in-house nucleic acid testing assay. **Transfusion**, v. 47, p.1794-1802, 2007

CHRISTENSEN, P.B. et al. Hepatitis B core antibodies in Danish blood donors : a surrogate marker of risk behaviour. **Vox Sanguinis**, v. 81, p. 222-227, 2001.

CHULANOV, V.P. et al. Kinetics of HBV DNA and HBsAg in acute hepatitis B patients with or without coinfection by other hepatitis viruses. **J Med Virol**, v. 69, p. 313-323, 2003.

CHWLA, Y. Hepatitis B vírus: Inactive carriers. **Virology Journal**, v. 2, n. 82, 2005.

CLEMENS, S.A.C. et al. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n.1, p. 1-10, jan/fev, 2000.

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA. Normas para pesquisa envolvendo seres humanos: (Res. CNS 196/96 e outra). Brasília: Ministério da Saúde, 138p, 2000.

DANE, D..S.; CAMERON, C.H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patientes with Australia-antigen-associated hepatitis. **Lancet**, v.1, p. 695-698, 1970

DE FELICE, C. et al. Hepatitis B residual risk in transfusion. **Vox Sang**, v.89 Suppl, p. 82, 2005.

DEGOS, F. et al. Hepatitis B virus and hepatitis B related viral infection in renal transplant recipients. **Gastroenterology,** v. 94, p. 151-156, 1988.

DE PAULA, V.S. et al. Sero-prevalence of viral hepatitis in riverine communities from the Western region of Brazilian Amazon Basin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1123-1128, 2001.

DESHPANDE, R.S.; SHANTILAL, C.S.; JOYKUTTY, M.D. Infections hepatitis: study of 100 cases. **Current Medical Practice**, v.6, n.810, 1971.

DETTKE, M. et al. Detection of HBV DNA-positive HBsAg-negative platelet concentrate by routine PCR screening. **Transfusion,** v. 41, p. 1074. Aug, 2001.

DROSTEN, C. et al. Prevalence of hepatitis B virus DNA in anti-HBc-positive/ HBsAg-negative sera correlates with HCV but not HIV serostatus. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, p. 59-68, 2004.

ERHARDT, A. et al. Socioepidemiological data on hepatitis delta in a German university clinic: increase in patients from Eastern Europe and the former Soviet Union. **Gastroenterol**, v. 41, p. 523-526, 2003.

FARCI, P. et al. Delta hepatitis: an update. **J. Hepatol**, v. 39 (Sup. 1), p. S212-S219, 2003.

FEITELSON, M.A. et al. Precore and X region mutants in hepatitis B virus infections among renal dialysis patients. **J Viral Hepatitis**, v.2, p, 19-31, 1995

FOCCACCIA, R. Hepatites Virais. São Paulo: Editora Atheneu, 192p, 1997.

FONSECA, J.C.F. Hepatite Delta. In: Fonseca JCF (ed) Hepatite Delta. **Imprensa Universitária**, p. 1-66, 1993.

FONSECA, J.C. Hepatitis D. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, p. 181-190, 2002.

FUKUDA, R. et al. X gene and precore region mutations in the hepatitis B virus genome in persons positive for antibody to hepatitis B e antigen: Comparasion between asymptomatic "healthy"carriers and patients with severe chronic active hepatitis. **J Inf Dis**, v. 172, p. 1191-1197, 1995

GARCÍA-MONTALVO, B.M. et al. Hepatitis B virus DNA in blood donors with anti-HBc as a possible indicator of active hepatitis B virus infection in Yucatan, Mexico. **Transfusion Medicine**, v. 15, p. 371-378, 2005.

GARDNER, H.T. A note on the history of epidemic viral hepatitis in Germany. **Am J Medi**, v. 8, p. 561, 1950.

GAZE, R. et al. Soroprevalência das infecções pelos vírus das hepatites A e B em Macaé, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.18, n.5, p. 1251-59, 2002.

GROB, P. et al. Serological pattern 'anti-HBc alone': report on a workshop. **Journal of Medical Virology**, v. 62, p. 450–455, 2000.

GHUMAN, H.K.; KAUR, S. Delta-hepatitis. **Indian J Pediatr**, v. 62, p. 691-693, 1995.

GUNTHER, S. et al. Genetic variation in HBV infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 36 (1), p. S3-S11, 2006

GUTIERREZ, C. et al. Hepatitis B virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**,v. 6, p. 768–770, 1999.

HADLER, S.C. et al. Delta virus infection and severe hepatitis. An epidemic in the Yucpa indians of Venezuela. **Annals of Internal Medicine 100**, p. 339-344, 1983.

HOOFNAGLE, J.H. et al. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. **N Engl J Med,** v. 298, p. 1379-1383, 1978.

HYAMS, K.C. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. **Clinical Infection Disease**, v.20, p.992-1000, 1995.

IIZUKA, H. et al. Correlation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg. **Vox Sanguinis**, v.63, p. 107-111, 1992.

JILG, W. et al. Individuals with antibody against hepatitis B core antigen as the only serological marker for hepatitis B infection: high percentage of carriers of hepatitis B and C virus. **Journal of Hepatology**, v. 23, p. 14-20, 1995.

KHOURI, M.E.; SANTOS, V.A. Hepatitis B: Epidemiological, immunological and serological considerations emphasizing mutation. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v.59, n.4, p. 216-224, 2004.

KHUNS, M.C. et al. Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. **Transfusion**, v. 44, p. 1332-1339, 2004.

KIESSLICH, D. et al. Prevalência de marcadores sorológicos e moleculares do vírus da hepatite B em gestantes do Estado do Amazonas, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde: Revista do Sistema Único de Saúde**, v. 12, n. 3, p. 155-164, jul/set, 2003.

KLEINMAN, S.H. et al. Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening. **Transfusion**, v. 43, p. 696–704, 2003.

KLEINMAN, S.H. et al. Hepatitis B virus (HBV) DNA screening of blood donations in minipools with the COBAS AmpliScreen HBV test. **Transfusion**, v. 45, p. 1247-1257, 2005.

KOJIMA, M. et al. Correlation between titer of antibody to hepatitis B core antigen and presence of viral antigens in the liver. **Gastroenterology**, v.73, n. 4, p.664-667, 1977.

KUPSKI,C. et al. Serologic and Molecular Profile of Anti-HBc-Positive Blood Bank Donors in an Area of Low Endemicity for HBV. **Dig Dis Sci**, 2007.

LAI, C.L. et al. Viral hepatitis B. **The Lancet**, v.362, p. 2089-2094, dez, 2003

LARGURA, M.A.; PACHECO, M.; LARGURA, A. Ausência do HBV-DNA por PCR em soros de doadores com HBsAg negativo e anti-HBc positivo em região de alta prevalência de hepatite B. **Laes & Haes**, p. 106-128, 1997.

LASKUS, T. et al. Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region. **J Hepatol**, v. 20, p. 837-841, 1994.

LELIE, N., HEATON, A. Hepatitis B - A review of the role of NAT in enhancing blood safety. **Journal of Clinical Virology, v.** 36, Suppl. 1, 2006.

LIANG, T.J.; ISSEBACHER, K.J.; WANDS, J.R. Rapid infection of low levels hepatitis B related viral genome in serum. **J Clin Invest**, v. 84, p. 1367-1371, 1989.

LIANG, T.J.; BLUM, H.E.; WANDS, J.R. Characterization and biological properties of a hepatitis B virusmisolated from a patient without HBV serologic markers. **Hepatology**, v. 12, p. 204-212, 1990.

MANOCK, S.R. et al. An outbreak of fulminant hepatitis delta in the Waorani, an indigenous people of the Amazon basin of Ecuador. **Am J Trop Med Hyg**, v. 63, p. 209-213, 2000.

MARGOLIS, H.S.; ALTER, M.J.; HADLER, S.C. Hepatitis B: envolving epidemiology and implications for control. **Semin Liver Dis**, v. 11, p. 84-92, 1991.

MIRANDA, L.V.G. et al. Marcadores sorológicos de hepatite B em indivíduos submetidos a exames de sangue em unidades de saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 286-291, jun, 2000.

MOLECULAR VIROLOGY. Disponível em: <http://www.molecular-virology.uni-hd.de/EN/HBV/HBV.HTM.>. Acesso em: 19/11/2005

NEGRO, F.; RIZZETTO, M. Diagnosis of hepatitis delta virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 22, p. 136-139, 1995.

NETO, C.A. et al. Significance of isolated hepatitis B core antibody in blood donors from São Paulo. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 43,p. 203-208, 2001.

O`BRIEN, S.F. et al. Current incidence and estimated residual risk of transfusion-transmitted infections in donations made to Canadian blood services. **Transfusion**, v. 47, p. 316-325, fev, 2007

O'BRIEN, S.F. et al. Hepatitis B virus DNA–positive, hepatitis B surface antigen–negative blood donations intercepted by anti-hepatitis B core antigen testing: the Canadian Blood Services experience. **Transfusion**, v. 47, p. 1809-1815, 2007.

PANHOTRA, B.R., BAHRANI, A., HASSAN, Z.U. Epidemiology of antibody to hepatitis B core antigen screening among blood donors in Eastern Saudi Arabia: Need to replace the test by HBV DNA testing. **Saudi Med J**, v. 26, p. 270-273, 2005.

PRINCE, A.M.; STEPHAN, W.; BROTMAN, B. Beta-propilactone/ ultraviolet irradiation: A review of its effectiveness for inactivation of viruses in blood derivates. **Rev Infect Dis**, v. 5, p. 92-107, 1983.

RADJEF, N. et al. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of Afrian hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. **J. Virol**, v. 78, p. 2537-2544, 2004

RAKAELA, J. et al. Viral hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. **Gastroenterology**, v. 78, p. 1318, 1980.

RAMIA, S. et al. Frequency and significance of antibodies against hepatitis B core (anti-HBc) antigen as the only serological marker for hepatitis B infection in Lebanese blood donors. **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 695-699, 2005.

RIBEIRO, L.C.; SOUTO, F..J. Hepatite Delta no estado do Mato Grosso: apresentação de cinco casos. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, p. 599-602, 2000.

RIZZETTO, M. et al. Immunofluorescence detection of a new antigen/ antibody system (Delta/Anti-Delta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. **GUT**, v. 18, p. 997-1003, 1977.

SAGNELLI, E. et al. Decrease in HDV endemicity in Italy. **Journal of Hepatology**, v. 26, p. 20-24, 1997

SATAKE, S. et al. Lookback study for transfusion-related HBV infection in Japan. **Transfusion**, v. 45, Suppl:9A-10A, 2005

SEDDIGH-TONEKABONI, S. et al. Effect of variation in the common “a” determinant on the antigenicity oh hepatitis B surface antigen. **J Med Virol**, v. 60, p. 113-121, 2000.

SEVENS, C.E. et al. HBeAg and anti-HBe detections by radioimmunoassay: Correlation with vertical transmission of hepatitis B virus in Taiwan. **J Med Virol**, v. 3, p. 237-241, 1979.

SHANG, G. et al. Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Shenzhen, China, 2001 through 2004. **Transfusion**, v. 47, p. 529-539, mar, 2007

SILVA, C.M.D. et al. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. **Journal of Infection**, v. 51, p. 24-29, 2005

SOLDAN, K. et al. Estimation of the risk of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infentious donations entering the blood supplly in England 1993-2001. Vox Sanguinis, v. 84, p. 274-286, 2003.

SUCUPIRA, C.A.S. **Prevalência do DNA do HBV em amostras de doadores com AgHBs negativo e anti-HBc positivo**. São Paulo: USP, 1997. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, 1997.

TABOR, E. et al. Antibody to hepatitis B core antigen in blood donors with a history of hepatitis. **Transfusion**, v. 21, n.3, p. 366-371, mai/jun, 1981.

THIERS, V. et al. Transmission of hepatitis B from hepatitis B seronegative subjects. **Lancet**, p. 1273-1276, 1988.

TORBENSON, M.; THOMAS, D.L. Occult hepatitis B. **Lancet Infect Dis**, v. 2, p. 479-486, 2002.

TRIOLLAIS, P. et al. The hepatitis B virus. **Nature**, v. 317, p. 489-495, 1985.

VIANA, S. et al. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg**, v.73, p. 808-814, 2005.

WANDS, J,R. et al. Identification and transmission of hepatitis B virus- related variant. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 3, p. 6608-6612, 1986.

WANG, J.T. et al. Detection of hepatitis B vírus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. **The Journal of Infectious Diseaes**, v. 163, p. 397-399, fev, 1991.

WANG, J.T. et al. Transfusion-transmitted HBV infection in an endemic area: the necessity of more sensitive screening for HBV carriers. **Transfusion**, v.42, p. 1592-1597, dez, 2002.

WANG, Z. et al. Quantitative analyis of HBV DNA level and HBeAg titer in hepatitis B surface antigen positive mothers and their babies : HBeAg passage through the placenta and the rate of decay in babies, **J Med Virol**, v. 71, p. 360-366, 2003

WEBER, B. et al. Hepatitis B virus markers in isolated anti-HBc positive individuals. **J Med Virol**, v. 64, p. 312-319, 2001.

WEBER, B. The isolated anti-HBc reactiivity: nem developments. **J Lab Med**, v. 26, p. 451-458, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/ >. Acesso em: 30/10/2005.

WU, J.C. et al. Evidence of transmission of hepatitis delta virus to spouses from sequence alakysis of the viral genome. **Hepatology**, v. 22, p. 1656-1660, 1995.

YOSHIKAWA, A. et al. Hepatitis B NAT virus-positive blood donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the window period and kinetics of HBV DNA. **Vox Sanguinis**, v.88, p. 77-86, 2005.

YUKI N. et al. Longterm histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. **Hepatology,** v. 37, p. 1172-1179, 2003.

XU, Z.Y. et al. Prevention of perinatal acquisition of hepatitis B virus carriage using vaccine preliminary report of a random double-blind placebo-controlled and comparative trail. **Pediatrics**, v. 76, p. 713-718, 1985.

ZANETTI, A.R. et al. Changing patterns of hepatitis B infection in Italy and NAT testing for improving the safety of blood supply. **Journal of Clinical Virology,** v. 36, Suppl. 1, p. 51-55, 2006.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisadora: Lorena dos Santos Vásquez
Telefone para contato: 92-3655-0120

Concordo em participar da pesquisa sobre "Prevalência do DNA do vírus da hepatite B em doadores de sangue anti-HBc positivos no Estado do Amazonas", que é coordenada pela pesquisadora Lorena dos Santos Vásquez da Fundação HEMOAM. A FHEMOAM é um centro que trabalha com pesquisas em saúde de doadores de sangue. Se você não quiser participar deste estudo, não vai ter problema: não participa e pronto. Você não será prejudicado em nada. Mas pode pedir explicações. Também, se você aceitar participar do estudo, e não quiser mais continuar não tem problema. Não será obrigado a nada. Não terá despesa de nada porque não vai precisar gastar nada. Também, não vai receber nada, nem dinheiro, nem remédio, nem outra coisa. Seu nome vai ficar sigiloso. Tudo que você falar vai ser utilizado somente para essa pesquisa. Será coletado 10 ml de sangue, isso não implicará em risco para a sua saúde, uma vez que o material usado é descartável. Apenas o desconforto da agulha poderá ser sentido. No caso de ser detectada infecção pelo vírus da hepatite B, você será investigado quanto à presença de alterações no fígado (com exames de sangue e imagem), para acompanhamento médico. A qualquer momento, você pode telefonar para mim (pesquisadora) para perguntar ou dizer alguma coisa.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido as informações necessárias de forma clara, eu concordo em participar projeto exposto acima:

_____

(assinatura do pesquisador ou representante)

_____

(assinatura do participante)

Impressão dactiloscópica

APÊNDICE B – Ficha do doador

"PREVALÊNCIA DO DNA DO VÍRUS DA HEPATITE B EM DOADORES DE SANGUE ANTI-HBC POSITIVOS NO ESTADO DO AMAZONAS"

Nº: _____

FICHA DO DOADOR

1) Nome:_____

2) Data da coleta: _____

3) Número da bolsa: _____

4) Data do Nascimento: _____

5) Idade: _____

6) Município de procedência: _____

7) Sexo: _____

TESTES	RESULTADOS		OBS
	DO	CO	
Anti-HBc 1			
Anti-HBc 2			
Anti-HBs			
Anti-Delta			
PCR 1			
PCR 2			

OBS:

_____

_____

_____