

**BRIGIDA HELENA DA SILVA MENEGHELLO**

**A HEPATITE B NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO  
PRETO: ESTUDO DE GENÓTIPOS E SUBGENÓTIPOS  
CIRCULANTES**

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

**Área de Concentração:** Pesquisa Laboratorial em Saúde Pública

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina Célia Moreira

**SÃO PAULO**

**2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Meneghello, Brigida Helena da Silva

A hepatite B na região de São José do Rio Preto: estudo de genótipos e subgenótipos circulantes/ Brigida Helena da Silva Meneghello, São Paulo. – 2018.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Regina Célia Moreira

1. Hepatite B crônica/epidemiologia.
2. Genótipo
3. Resistência a medicamentos.
4. Mutação.

SES/CCD/CD-376/2018

## **Agradecimentos**

A Deus, minha fonte de inspiração e força, que sempre se faz presente em minha vida, conduz e ilumina meu caminho, e me presenteia com suas bênçãos. Nunca me deixou cair, desistir ou duvidar diante de uma dificuldade, tocando meu coração com sua serenidade e sabedoria. Agradeço imensamente por sempre olhar por mim e permitir que eu realize meus sonhos.

A minha família, pelo apoio incondicional, credibilidade nos meus atos e no meu potencial, por terem me educado com paciência, respeito e humildade, e ajudado a me tornar a pessoa que sou hoje.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina Célia Moreira, minha orientadora, pela oportunidade que me concedeu, a qual permitiu meu crescimento profissional e aprimoramento dos meus conhecimentos científicos, e pela dedicação e disposição no desenvolvimento do estudo.

Ao Marcilio Figueiredo Lemos, por ter me recebido e acolhido com tamanho carinho e atenção; pelos ensinamentos, estímulo e confiança no meu trabalho; pela contribuição no estudo, sempre com momentos de descontração apesar das dificuldades. Em pouco tempo se tornou um amigo muito especial e querido, que levarei por toda a vida.

A Adriana Parise Compri, Vanessa Cristina Martins Silva e Isabel Takano Oba, por igualmente me receberem tão bem, sempre dispostas a ajudar e colaborar no estudo, e que também se tornaram grandes amigas.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Israelita Albert Einstein pela colaboração no desenvolvimento deste estudo.

Aos colegas Gabriela Cabral dos Santos, Giselle Ibetete Silva López Lopes, João Leandro de Paula Ferreira e Giselle Romero Soldi, pela imensa ajuda na execução de partes deste estudo e por estarem sempre dispostos a ajudar e esclarecer minhas dúvidas.

A Márcia Maria Costa Nunes Soares por toda ajuda e estímulo, pela confiança em mim e no meu trabalho, pela condução na vida profissional, sempre um exemplo de persistência e perseverança. Por ter permitido que eu participasse de seus projetos, e não ter medido esforços para que eu chegasse até aqui. Agradeço também a amizade, que eu levarei para a vida toda, a convivência diária, e seus ensinamentos valiosos, não só profissionais.

A Amanda Fidelis de Oliveira, pela surpreendente dedicação em me ajudar no desenvolvimento do estudo, por ter colaborado e auxiliado no levantamento de informações fundamentais para o trabalho. Muito obrigada pela imensa ajuda, e amizade de todos os dias.

Ao João Caetano Filho, pela ajuda no laboratório e convivência cheia de momentos de descontração, que torna meus dias mais leves.

A Denise Maria Bussoni Bertollo, por toda ajuda no decorrer da escrita desta dissertação, com dicas valiosas, e por sempre me ouvir e trocar experiências sobre o curso de pós-graduação e as dificuldades enfrentadas.

A todos os amigos do CLR-IAL São José do Rio Preto, pela força e interesse no meu sucesso, sempre dispostos a ajudar.

A CAPES pela bolsa de estudo e auxílio financeiro, fundamentais para que eu pudesse me manter e concluir o estudo.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, bem como aos excelentes professores, pela oportunidade e ótimo conhecimento que adquiri durante o desenvolvimento do meu estudo, fundamentais para conclusão deste trabalho.

## RESUMO

As Hepatites virais representam um grave problema de saúde pública no mundo, pelo número de indivíduos atingidos, pelas formas graves e mortalidade. Aproximadamente um terço da população mundial atual já se expôs ao vírus da hepatite B, e estima-se que 248 milhões de pessoas estejam infectadas cronicamente. No Brasil, a região Sudeste apresenta o maior número de casos notificados para essa enfermidade, com maiores taxas de notificação no Estado de São Paulo. São José do Rio Preto, localizada no noroeste Paulista, está entre as três regiões com maiores taxas migratórias do estado com intensa circulação e flutuação da população, e possui muitos pacientes em tratamento da Hepatite B, de diversas localidades. Considerando que nesta Região nenhum estudo sobre os aspectos epidemiológicos e moleculares dessa infecção viral foi realizado, este estudo teve o objetivo de investigar os genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B circulantes, além de avaliar a presença de mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos, e as características epidemiológicas dos pacientes. Foram incluídas no estudo 127 amostras de soro ou plasma de portadores do HBV, de diferentes Unidades de Saúde da Região Administrativa de São José do Rio Preto, coletadas no período de setembro de 2015 a janeiro de 2018. O DNA do HBV foi extraído das amostras, amplificado por *nested* PCR (regiões S/Pol), e os fragmentos obtidos na amplificação foram sequenciados em sequenciador automático. A identificação dos genótipos/subgenótipos e a pesquisa de mutações foram realizadas com sucesso em 126 amostras, após análise das sequências obtidas. Os genótipos encontrados foram A (51,6%; 65/126), B (0,8%; 1/126), C (0,8%; 1/126), D (37,3%; 47/126), E (0,8%; 1/126), e F (8,7%; 11/126); com relação aos subgenótipos, uma grande diversidade foi observada: A1 (40,5%), A2 (11,1%), B1 (0,8%), C1 (0,8%), D1 (1,6%), D2 (5,6%), D3 (28,6%), D4 (1,6%), F2a (7,1%) e F4 (1,6%). Os genótipos A e D foram predominantes, sendo os subgenótipos A1 e D3 os mais prevalentes. Entre os pacientes que fazem tratamento, cepas do HBV com mutações de resistência (rtM204V/I/S) associadas ou não a mutações compensatórias (rtL180M, rtV173L) foram identificadas em 13,9% (5/36) das amostras analisadas; mutações de resistência parcial ao Entecavir (rtM204V/I/S) ou potencialmente associadas com resistência ao Adefovir (rtV214A, rtL217R, rtQ215S, rtN238T e rtP237H) em 13,9% (5/36) e 19,4% (7/36) dos pacientes, respectivamente. Já no grupo de pacientes não submetidos a tratamento, 1,1% (1/90) das amostras apresentou mutação de resistência (rtM204V) e resistência parcial ao Entecavir, além de mutação (rtA181T) que confere resistência parcial *in vitro*, mas que não implica em resistência *in vivo* ao Tenofovir; uma amostra (1,1%) apresentou mutação compensatória (rtV/F/L/M207I), que em geral aparece após outras variantes primárias de resistência à Lamivudina; e 26,7% (24/90) das amostras apresentaram mutações de potencial resistência ao Adefovir (rtV214A, rtL217R, rtP237H, rtN238T, rtQ215S, rtI233V). Todas as amostras analisadas eram de portadores crônicos do HBV, com presença de cirrose em 4,7% (6/127), e coinfeções com HIV e/ou HCV 12,6% (16/127). A grande diversidade de

genótipos/subgenótipos observada reflete a intensa migração que ocorre para a região estudada, em virtude de sua importância como um centro de referência em saúde. Entre as cepas do HBV, com mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos, o perfil de mutações que confere potencial resistência ao adefovir parece ser o mais disseminado nesta população, porém, resistência total à lamivudina e emtricitabina; e resistência parcial ao entecavir foram observadas em metade dos pacientes em tratamento com perfil de resistência. Todos esses dados demonstram a importância da Hepatite B na região de São José do Rio Preto, e comprovam a necessidade de uma vigilância sempre ativa, para o manejo efetivo dos pacientes HBV crônicos, a fim de reduzir a mortalidade e morbidade associadas a essa infecção viral.

Palavras-chave: Hepatite B crônica/epidemiologia, Vírus da Hepatite B, Genótipo, Resistência a medicamentos, Mutação, São José do Rio Preto.

## ABSTRACT

Viral Hepatitis represents a serious public health problem in the world, due to the number of individuals affected, serious forms and mortality. Approximately one-third of the world's population has already been exposed to the hepatitis B virus, and it is estimated that 248 million people are chronically infected. In Brazil, the Southeast region has the highest number of cases reported for this disease, with the highest reporting rates in the State of São Paulo. São José do Rio Preto, located in northwest State, is among the three regions with the highest migratory rates of the state with intense circulation and population fluctuation, and has many patients under treatment of Hepatitis B, from several locations. Considering that in this Region no study on the epidemiological and molecular aspects of this viral infection was carried out, this study aimed to investigate circulating genotypes and subgenotypes of the hepatitis B virus, in addition to evaluating the presence of resistance mutations to nucleos(t)ides analogues, and the epidemiological characteristics of the patients. The study included 127 serum or plasma samples from HBV carriers from different Health Units of the Administrative Region of São José do Rio Preto collected from September 2015 to January 2018. HBV DNA was extracted from samples, amplified by nested PCR (S/Pol regions), and the fragments obtained in the amplification were sequenced in an automated sequencer. Identification of genotypes and subgenotypes and mutation screening were performed successfully in 126 samples after analysis of the sequences obtained. The genotypes were A (51.6%, 65/126), B (0.8%, 1/126), C (0.8%, 1/126), D (37.3%, 47/126), E (0.8%, 1/126), and F (8.7%, 11/126); with respect to the subgenotypes, a great diversity was observed: A1 (40.5%), A2 (11.1%), B1 (0.8%), C1 (0.8%), D1 (1.6%), D2 (5.6%), D3 (28.6%), D4 (1.6%), F2a (7.1%) and F4 (1.6%). Genotypes A and D were predominant, with subgenotypes A1 and D3 being the most prevalent. Among the patients undergoing treatment, strains of HBV with resistance mutations (rtM204V/I/S) associated or not to compensatory mutations (rtL180M, rtV173L) were identified in 13.9% (5/36) of the analyzed samples; mutations of partial resistance to Entecavir (rtM204V / I / S) or potentially associated with Adefovir resistance (rtV214A, rtL217R, rtQ215S, rtN238T and rtP237H) in 13.9% (5/36) and 19.4% (7/36) of the patients, respectively. Already in the group of non-treated patients, 1.1% (1/90) of the samples presented resistance mutation (rtM204V) and partial resistance to Entecavir, in addition to a mutation (rtA181T) conferring partial resistance in vitro, but not implies in vivo resistance to Tenofovir; one sample (1.1%) presented compensatory mutation (rtV/F/L/M207I), which usually appears after other primary variants of resistance to Lamivudine; and 26.7% (24/90) of the samples showed mutations of potential resistance to Adefovir (rtV214A, rtL217R, rtP237H, rtN238T, rtQ215S, rtI233V). All the samples analyzed were chronic carriers of HBV, with cirrhosis present in 4.7% (6/127), and HIV and/or HCV coinfections in 12.6% (16/127). The great diversity of genotypes/subgenotypes observed reflects the intense migration that occurs in the studied region, due to its importance as a reference center in health. Among strains of HBV, with mutations of resistance to nucleos(t)ide analogs,

the profile of mutations conferring potential resistance to adefovir seems to be the most widespread in this population, but total resistance to lamivudine and emtricitabine and partial resistance to entecavir were observed in half of the patients under treatment with resistance profile. All these data demonstrate the importance of Hepatitis B in the region of São José do Rio Preto and demonstrate the need for an active surveillance for the effective management of chronic HBV patients in order to reduce the mortality and morbidity associated with this viral infection.

Key words: Chronic hepatitis B/epidemiology, Hepatitis B virus, Genotype, Drug resistance, Mutation, São José do Rio Preto.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADF** Adefovir

**ALT** Alanina aminotransferase

**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

**CADIP** Centro de Atendimento a Doenças Infecto Contagiosas e Parasitárias

**cccDNA** “Covalently closed circular DNA” (DNA circular covalentemente fechado)

**CEPIAL** Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz

**CHC** Carcinoma hepatocelular

**CLR** Centro de Laboratório Regional

**CNS** Conselho Nacional de Saúde

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**dNTPs** trifosfatos de desoxinucleotídeos

**ddNTPs** didesoxinucleotídeos

**EDTA** Ácido Etilenodiamino Tetracético

**EFV** Efavirens

**ETV** Entecavir

**FTC** Emtricitabina

**GAL** Gerenciador de Ambiente Laboratorial para amostras

**HBcAg** antígeno do core do vírus da hepatite B

**HBeAg** antígeno e do vírus da hepatite B

**HBsAg** antígeno de superfície do vírus da hepatite B

**HBC** hepatite B crônica

**HBV** vírus da Hepatite B

**HCV** vírus da Hepatite C

**HDV** vírus da Hepatite Delta

**HIV** vírus da imunodeficiência humana adquirida

**IAL** Instituto Adolfo Lutz

**IFN** Interferon

**LAM** Lamivudina  
**LDT** Telbivudina  
**MgCl<sub>2</sub>** Cloreto de Magnésio  
**ng** nanograma  
**nm** nanômetro  
**ORF** “open read frame” (fase de leitura aberta)  
**pb** pares de base  
**PCR** reação em cadeia pela polim  
**pgRNA** RNA pré-genômico  
**pMol/μL** picomol por microlitro  
**RA** Região Administrativa  
**RC-DNA** “relaxed circular DNA” (DNA não fechado covalentemente)  
**Região Pol** região de codificação da polimerase do genoma do HBV  
**Região S** região de codificação das proteínas de superfície do HBV  
**RGs** Regiões de Governo  
**RNA** ácido ribonucleico  
**SAE** Serviço de Assistência Especializada  
**SIGH** Sistema de Informação e Gestão Hospitalar  
**SS DNA** single stranded DNA (DNA de fita simples)  
**SUS** Sistema Único de Saúde  
**TAE** Tris-Acetato-EDTA  
**Taq** *Thermus aquaticus*  
**TDF** Tenofovir  
**TR** transcriptase reversa  
**UI/mL** unidades internacionais por mililitro  
**μL** microlitro

## LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Estimativa de soroprevalência do HBsAg no Mundo.....	01
<b>Figura 2:</b> Representação da estrutura do HBV.....	03
<b>Figura 3:</b> Representação das quatro fases de leitura aberta (ORFs) do HBV: pré-S/S, pré-C/C, P e X.....	04
<b>Figura 4:</b> Ciclo de replicação do HBV.....	06
<b>Figura 5:</b> Distribuição geográfica dos genótipos do HBV.....	11
<b>Figura 6:</b> Representação do padrão de massa (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen).....	29
<b>Figura 7:</b> Regiões de Governo da Região Administrativa de São José do Rio Preto.....	32
<b>Figura 8:</b> Árvore Filogenética das sequências classificadas como genótipo A, subgenótipo A1.....	41
<b>Figura 9:</b> Árvore Filogenética das sequências classificadas como genótipo A, subgenótipo A2.....	42
<b>Figura 10:</b> Árvore Filogenética das sequências classificadas como genótipo D, subgenótipo D3.....	43
<b>Figura 11:</b> Árvore Filogenética das sequências classificadas como genótipo D, subgenótipos D1, D2 e D4.....	44
<b>Figura 12:</b> Árvore Filogenética das sequências classificadas como Genótipo B, C, E e F, subgenótipos B1, C1, F2a e F4.....	45
<b>Figura 13:</b> Pacientes que não realizaram tratamento para Hepatite B, com perfil de resistência.....	48

<b>Quadro 1:</b> Interpretação dos resultados da PCR em tempo real pelo Método Abbott RealTime HBV.....	26
<b>Quadro 2:</b> Primers utilizados nas reações de PCR.....	28
<b>Quadro 3:</b> Sequência de ciclagem para amplificação do material genético, primeira e segunda PCR.....	28
<b>Quadro 4:</b> Quantidade dos reagentes utilizados na primeira e segunda PCR.....	28
<b>Quadro 5:</b> Mix de reações de PCR para sequenciamento.....	30
<b>Quadro 6:</b> Sequência de ciclagem utilizada na PCR para sequenciamento.....	30
<b>Quadro 7:</b> Distribuição dos subgenótipos do HBV segundo origem das amostras por Serviço de Saúde.....	40
<b>Tabela 1:</b> Exames de carga viral do HBV realizados pelo CLR-IAL-X, no período de setembro de 2015 a janeiro de 2018, dos Serviços de Assistência à Saúde da Região Administrativa de São José do Rio Preto.....	33
<b>Tabela 2:</b> Número de pacientes, no período de setembro de 2015 a janeiro de 2018, dos Serviços de Assistência à Saúde da Região Administrativa de São José do Rio Preto.....	34
<b>Tabela 3:</b> Solicitações dos exames de carga viral do HBV.....	36
<b>Tabela 4:</b> Valores de carga viral do HBV.....	37
<b>Tabela 5:</b> Pacientes em tratamento para hepatite B com perfil de resistência.....	47

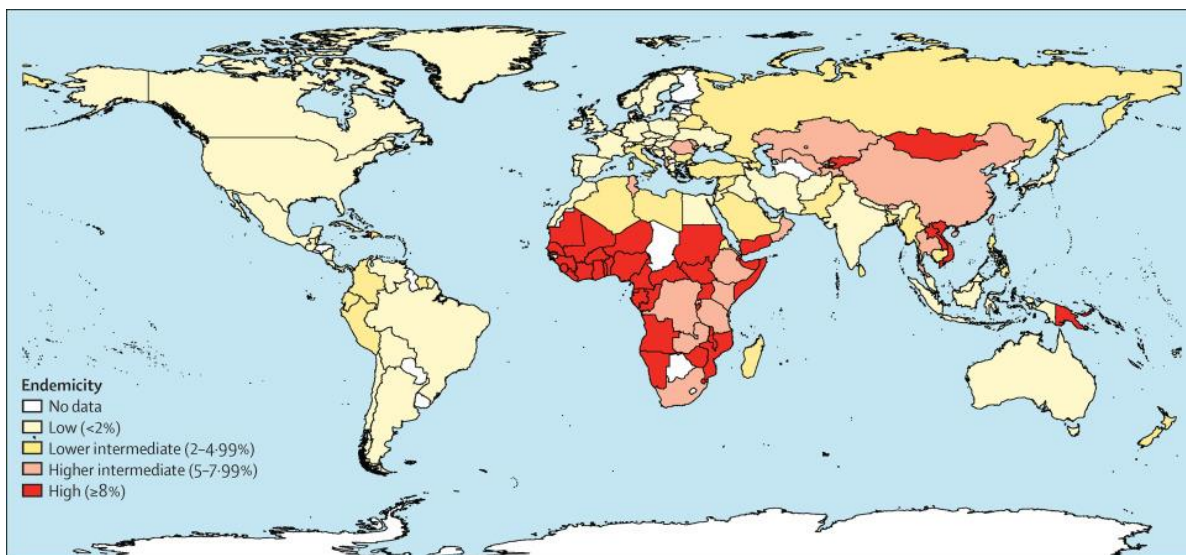
## ÍNDICE

<b>1) INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Características estruturais e moleculares do HBV .....	2
1.2 Ciclo de replicação do HBV .....	5
1.3 Transmissão do HBV .....	7
1.4 História Natural da Infecção por HBV .....	8
1.5 Genótipos e subgenótipos do HBV.....	10
1.6 Tratamento da Hepatite B Crônica .....	14
1.7 Resistência viral e mutações no gene da polimerase.....	15
1.8 Epidemiologia do HBV no Brasil.....	18
<b>2) OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 Objetivo geral .....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
<b>3) CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 Aspectos éticos.....	21
3.2 População de Estudo.....	21
3.3 Seleção de amostras .....	22
3.3.1 Critérios de inclusão .....	22
3.3.2 Critérios de exclusão .....	22
3.3.3 Coleta, Armazenamento e Transporte .....	22
3.4 Coleta de dados .....	23
3.5 Abbott RealTime HBV .....	23
3.5.1 Preparação das amostras: extração do DNA .....	24
3.5.2 Reação de Amplificação .....	25
3.5.3 Interpretação dos resultados .....	26
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção e genotipagem do vírus da hepatite B (HBV) .....	26
3.6.1 Extração do DNA.....	26
3.6.2 Amplificação por Nested PCR <i>in house</i> do genoma do HBV .....	27
3.6.3 Identificação do material amplificado.....	29
3.6.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados .....	29
3.6.5 Identificação dos genótipos do HBV e análise da presença de mutações de resistência .....	31
<b>4) RESULTADOS</b> .....	32
<b>5) DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>6) CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
<b>ANEXO 1</b> .....	74
<b>ANEXO 2</b> .....	78
<b>ANEXO 3</b> .....	79

## 1) INTRODUÇÃO

As hepatites virais constituem um enorme desafio à saúde pública em todo o mundo. Elas são responsáveis por cerca de 1,4 milhão de óbitos anualmente, como consequência de suas formas agudas graves ou, principalmente, pelas complicações das formas descompensadas crônicas ou por hepatocarcinoma (Ministério da Saúde, 2017b).

Estima-se que dois bilhões de pessoas já foram expostas ao vírus da hepatite B, e 248 milhões estejam infectadas cronicamente. A soroprevalência varia de acordo com a idade e a região geográfica com maior prevalência (> 5%) na África Saariana, leste da Ásia, algumas partes da região dos Balcãs, e nas ilhas do Pacífico. A prevalência abaixo de 2% é vista nas regiões como a América Central, a América do Norte e a Europa Ocidental (Organização Mundial da Saúde, 2017). No geral, quase metade da população mundial vive em áreas de endemicidade alta, intermediária alta ou intermediária baixa (Figura 1).



**Figura 1:** Endemicidade global do HBsAg.

Fonte: Schweitzer et al., 2015.

As principais complicações da hepatite B crônica (HBC) são cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Em todo o mundo, estima-se que cerca de 686 mil pessoas morram a cada ano por complicações da HBC. No geral, a

infecção por HBV é responsável por cerca de 45% dos casos de CHC e 30% de cirrose. Na Ásia e na maioria das outras regiões, a incidência de CHC e cirrose é baixa em indivíduos com idade entre 35 e 40 anos, no entanto, em algumas partes da África, Alasca e Amazônia, a incidência de CHC é alta em crianças e jovens adultos do sexo masculino (Organização Mundial da Saúde, 2017).

### **1.1 Características estruturais e moleculares do HBV**

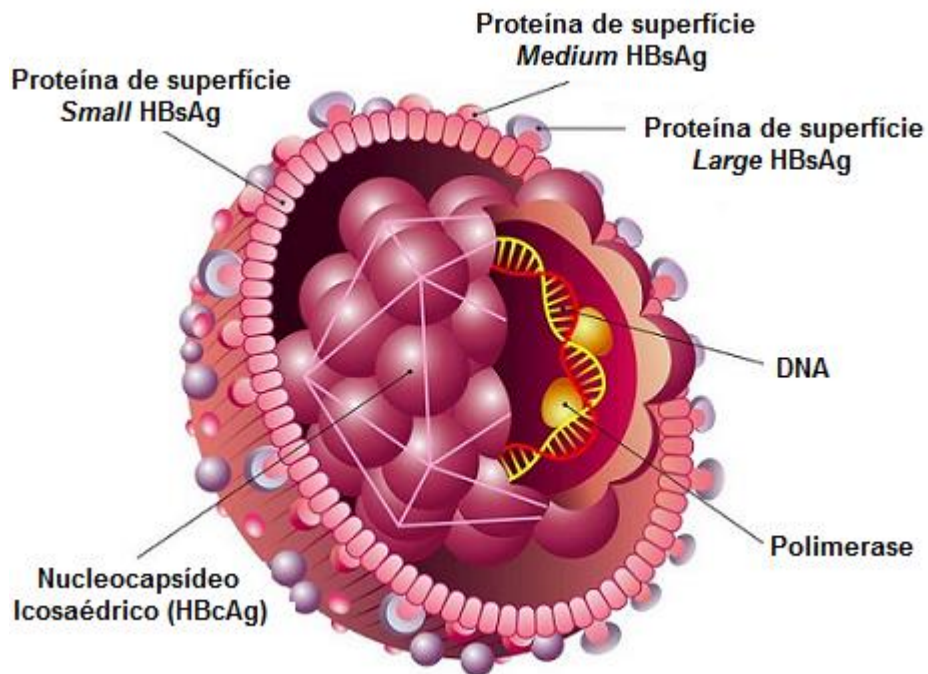
O HBV é um vírus envelopado pertencente à família Hepadnaviridae, gênero Orthohepadnavirus. A partícula viral (Figura 2) é esférica, com 42 nm de diâmetro, formada por um nucleocapsídeo protéico icosaédrico (HBcAg), envolto por um envelope lipoproteico que contém as três formas (*Small*, *Medium* e *Large*) do antígeno de superfície viral (HBsAg). No seu interior estão presentes a enzima DNA polimerase e o genoma viral (Tiollais et al., 1985).

O genoma do HBV é um dos menores entre os dos vírus que infectam o homem e possui aproximadamente 3.200 pares de bases (pb), composto por uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla, com uma fita longa (Negativa) complementar aos RNA virais, e uma fita curta (positiva) (Tiollais et al., 1985) de comprimento variável (50% a 90% do comprimento da fita complementar). A totalidade do genoma do HBV é codificante, apresentando quatro fases de leitura aberta (ORF) designadas de pré-S/S, pré-C/C, P e X (Gomes e Araújo, 2013), representadas na Figura 3.

Todos os genes são codificados pela fita longa e possuem pelo menos uma região de sobreposição a outro gene. O gene pré S/S codifica as proteínas que formam o HBsAg, e o pré C/C é responsável pela síntese do HBcAg e do antígeno e (HBeAg). O gene P codifica a polimerase viral e a região X é responsável pela síntese de uma proteína regulatória chamada proteína X (Ministério da Saúde, 2015). A sobreposição das quatro fases de leitura abertas aumenta a capacidade de síntese proteica do que seria esperado para a totalidade do genoma do HBV, que produz mais proteína

por nucleotídeo do que qualquer outro vírus conhecido (Gomes e Araújo, 2013).

O gene pré-S/S inclui as regiões pré-S1, pré-S2 e S, com três códon de iniciação na mesma fase de leitura. A maior proteína (*Large*) que compõe o HBsAg, cujo códon de iniciação é localizado no início da região pré-S1, é codificada pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S. A proteína de tamanho intermediário designada de *Medium*, é codificada pelas regiões pré-S2 e S. A menor proteína (*Small*) é sintetizada a partir do códon de iniciação localizado no início da região S. Todas essas proteínas possuem o mesmo códon de terminação localizado no final da região S (Gomes e Araújo, 2013).



**Figura 2:** Representação da estrutura do HBV.  
Fonte: Biasini, 2018, modificado.

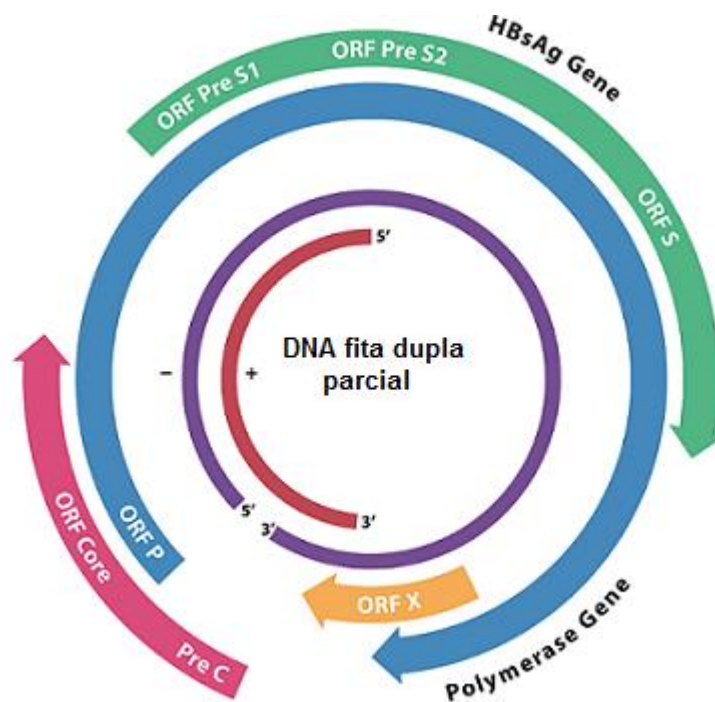
A região pré-C/C possui dois códon de iniciação na mesma fase de leitura aberta. O HBeAg é traduzido a partir do único códon de iniciação da região Pré-C. Inicialmente é produzido um polipeptídeo precursor compreendendo os aminoácidos da região pré-C e os demais aminoácidos do gene C, que é processado por clivagem das extremidades, no retículo endoplasmático, resultando na formação do HBeAg. O códon de iniciação para o HBcAg está localizado no gene C, e produz o polipeptídeo do core,



para formar o nucleocapsídeo viral (partícula icosaédrica) (Gomes e Araújo, 2013).

O gene P cobre aproximadamente 75% do genoma e codifica uma enzima com atividade de DNA polimerase, transcriptase reversa e RNase H. A polimerase viral é composta por quatro domínios: o domínio aminoterminal, que atua como proteína terminal ou primase, é necessário para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; uma região chamada de “espaçadora” sem função definida; o domínio de transcriptase reversa e o domínio C-terminal que exibe atividade de RNase H (Gomes e Araújo, 2013).

O gene X especifica um pequeno polipeptídeo de 154 aminoácidos que pode ser detectado apenas nos hepatócitos infectados. Sua sequência é conservada entre os hepadnavírus que infectam os mamíferos, entretanto, está ausente nos vírus que infectam as aves. Dessa forma, acredita-se que o gene X não seja necessário para a encapsidação e replicação viral, porém é um gene regulador que pode ativar a transcrição de certos genes virais e celulares (Gomes e Araújo, 2013).



**Figura 3:** Representação das quatro fases de leitura aberta (ORFs) do HBV: pré-S/S, pré-C/C, P e X.

Fonte: Ministério da Saúde, 2015, modificado.

## 1.2 Ciclo de replicação do HBV

O genoma do HBV é formado por um DNA circular, parcialmente em cadeia dupla, não fechado (*relaxed circular* DNA ou RC-DNA), que é replicado por meio da transcrição reversa a partir de um RNA pré-genômico (pgRNA), no hepatócito do hospedeiro (Hu e Liu, 2017).

No núcleo do hepatócito, o RC-DNA é convertido em um DNA circular covalentemente fechado (*covalently closed circular* DNA ou cccDNA), ou integra-se ao DNA do hospedeiro (Hu e Liu, 2017). A partir do cccDNA é feita a transcrição dos RNA virais, que ao serem traduzidos originarão todos os componentes necessários para a montagem do vírus: as proteínas do envelope (*Large, Medium e Small*), proteínas do core (nucleocapsídeo), proteína P (Transcriptase reversa), proteína X; além do pgRNA que será encapsulado e transcrito em novos genomas RC-DNA (Hu, 2016).

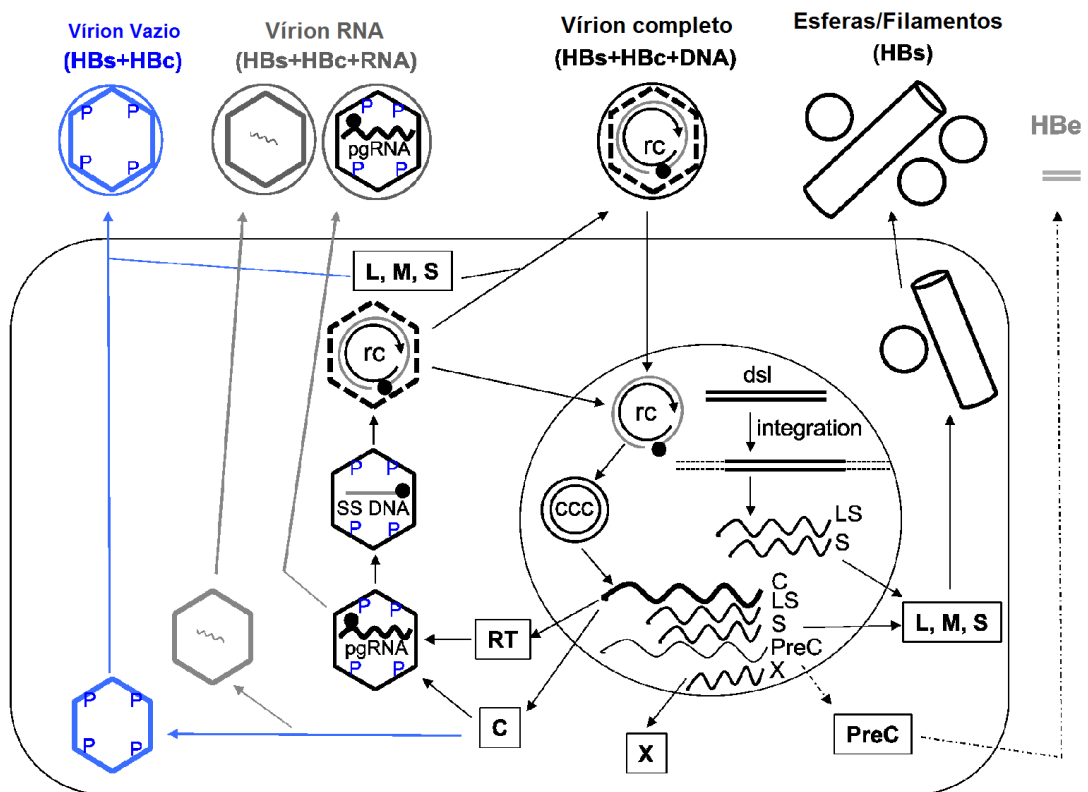
A montagem dos vírions do HBV completo, começa com o empacotamento do pgRNA e da transcriptase reversa (TR), pelo nucleocapsídeo, e dentro dele, a TR primeiro converte o pgRNA em um DNA de fita simples (SS DNA, sentido negativo) e, subsequentemente, no RC-DNA (Hu e Seeger, 2015). Os nucleocapsídeos contendo DNA de fita parcialmente dupla são considerados maduros e são selecionados para envoltura pelo envelope viral (HBsAg) e secretados extracelularmente como vírions completos (Figura 4) (Hu e Liu, 2017).

A característica principal da replicação do HBV é a seleção de nucleocapsídeos contendo RC-DNA, mas não aqueles que contêm o RNA ou o DNA intermediário da replicação de fita simples, para o envelopamento durante a secreção dos vírions, pois são considerados imaturos (Hu e Liu, 2017).

A morfogênese do HBV é caracterizada ainda, pela liberação de partículas subvirais, mais abundantes que os vírions completos, como os antígenos de superfície clássicos (antígeno Austrália) que contêm apenas as proteínas do envelope viral; vírions isentos de genomas (vazios), mais recentemente descobertos, que contêm envelope e nucleocapsídeo, mas

sem genoma; ou ainda, em níveis baixos, partículas contendo RNA (Hu e Liu, 2017).

As células infectadas pelo HBV também secretam um antígeno proteico solúvel chamado antígeno e da hepatite B (HBeAg). Independentemente da montagem dos nucleocapsídeos ou da replicação viral, o HBeAg é liberado pela via secretora da célula hospedeira e pode exercer efeitos imunorregulatórios. Historicamente, o HBeAg sérico tem sido amplamente utilizado para monitorar a infecção viral e a resposta ao tratamento, pois está geralmente associado a altos níveis de replicação viral (Milich e Liang, 2003; DiMattia et al., 2013).



**Figura 4:** Ciclo de replicação do HBV.  
Fonte: Hu e Liu, 2017, modificado.

Considerando que o cccDNA é o responsável pela replicação viral, bem como pela síntese de todas as partículas e proteínas do HBV (Hu e Liu, 2017), esforços contínuos para desenvolver uma cura para a infecção crônica pelo HBV visam a eliminação do cccDNA (ou o silenciamento estável

de sua atividade transcricional). Acredita-se que o cccDNA é muito estável e pode persistir na ausência de replicação viral enquanto a célula infectada sobreviver (Yokosuka et al., 1985; Reaiche et al., 2010; Seeger et al., 2016).

### **1.3 Transmissão do HBV**

A transmissão do HBV se faz por via parenteral, e, sobretudo, pela via sexual, sendo considerada uma infecção sexualmente transmissível. Dessa forma, a hepatite B pode ser transmitida por solução de continuidade (pele e mucosa), relações sexuais desprotegidas e por via parenteral (compartilhamento de agulhas e seringas, tatuagens, piercings, procedimentos odontológicos ou cirúrgicos, etc). Outros líquidos orgânicos, como sêmen, secreção vaginal e leite materno, também podem conter o vírus e constituir-se fonte de infecção. A transmissão vertical (de mãe para filho) também é causa frequente de disseminação do HBV (Ministério da Saúde, 2015).

Nas áreas de alta endemicidade, predominam as formas de transmissão vertical e horizontal do HBV, esta última dada pelo próprio contato familiar continuado com as mães portadoras, ou mesmo com outros portadores dentro do núcleo familiar. Nas populações correspondentes a estas áreas, a maioria das infecções ocorre na infância precoce (Ministério da Saúde, 2011).

Em locais de endemicidade intermediária a transmissão de hepatite B ocorre em todas as idades, concentrando-se em crianças em faixas etárias maiores, adolescentes e adultos. Já nas áreas de baixa endemicidade, adolescentes e adultos são os mais frequentemente expostos à infecção pelo HBV. Em ambos os casos, a contaminação ocorre por exposição a sangue e fluidos corpóreos, durante o contato sexual e/ou uso de drogas injetáveis (Ministério da Saúde, 2011).

No Brasil, mesmo com disponibilidade de uma vacina eficaz, de produção nacional autossuficiente, e dos esforços progressivos em imunização e prevenção no Sistema Único de Saúde (SUS), a transmissão

da hepatite B ainda é uma realidade. Aproximadamente 17.000 novos casos são detectados e notificados anualmente, o que contribui para evidenciar o impacto da doença no território brasileiro (Ministério da Saúde, 2017a).

#### **1.4 História Natural da Infecção por HBV**

A infecção pelo HBV pode causar hepatite aguda ou crônica; habitualmente, ambas as formas são oligossintomáticas (poucos sintomas ou nenhum sintoma característico), e raramente causam icterícia (coloração amarelada de pele, mucosas e escleróticas): menos de um terço dos indivíduos infectados apresenta esse sinal clínico. Aproximadamente 5% a 10% dos indivíduos infectados tornam-se portadores crônicos do HBV. Cerca de 20% a 25% dos casos crônicos de hepatite B que apresentam replicação do vírus evoluem para doença hepática avançada. Em indivíduos adultos expostos exclusivamente ao HBV, a cura espontânea se dá em cerca de 90% dos casos (Mandell et al., 2010; Leão, 2013; Gonçalves Junior, 2013).

Diversos fatores podem influenciar na gravidade da doença hepática, e aumentar o risco de desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), em pacientes portadores da hepatite B crônica, como: os extremos de idade; sexo masculino; fatores comportamentais e genéticos; uso constante de bebida alcoólica e cigarros; episódios decorrentes de exacerbação aguda de hepatite e replicação viral persistente; superinfecção por outros vírus hepatotrópicos como coinfeção com o vírus da hepatite Delta (HDV) e/ou vírus da hepatite C (HCV) (Fattovich, 2002; Lok e McMahon, 2009; European Association for the Study of the Liver, 2012; Liaw, 2012).

O genótipo C do HBV, a mutação na região promotora do pré-core e a coinfeção com o HIV também são fatores que aumentam a probabilidade de evolução para formas graves da doença. Embora a cirrose seja fator de risco para CHC, 30% a 50% dos casos de CHC por HBV ocorrem na ausência de cirrose (Lok e McMahon, 2009; European Association for the Study of the Liver, 2012; Liaw, 2012).

A infecção pelo HBV é um processo dinâmico, dividido em cinco fases. Inicialmente, existe a fase de imunotolerância, caracterizada por elevada replicação viral, sem evidências de agressão hepatocelular (pouca atividade necroinflamatória e lenta progressão de fibrose) e positividade de HBeAg. A replicação viral é tolerada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Em virtude da elevada viremia, os pacientes nessa fase podem transmitir a doença com maior facilidade (Gonçales Junior, 2013; Ministério da Saúde, 2017b).

Na segunda fase, imunorreativa, a tolerância imunológica esgota-se diante da incapacidade do sistema imune de eliminar o vírus. É caracterizada pelo teste HBeAg reagente e por menores índices de HBV-DNA sérico, indicativo de menor replicação viral. A atividade necroinflamatória no fígado pode ser moderada ou grave, com progressão da fibrose acelerada. Esta fase encerra-se com a soroconversão para anti-HBe (Ministério da Saúde, 2017b).

Após a fase anterior, tem início a fase residual não replicativa, ou Estado de portador inativo, caracterizada por níveis muito baixos – ou até mesmo indetectáveis – de HBV-DNA sérico, e habitualmente, soroconversão anti-HBe. O sistema imunológico do hospedeiro é capaz de reprimir a replicação viral, reduzindo o risco de cirrose e CHC. Esse processo corresponde a um bom prognóstico (Gonçales Junior, 2013; Ministério da Saúde, 2017b).

Após o período inativo, pode surgir a fase de reativação: quando ocorrerem mutações na região pré-core e/ou core do vírus, mantendo-se a replicação viral mesmo na vigência de HBeAg não reagente. A atividade necroinflamatória e de fibrose no fígado persistem durante essa fase. A hepatite B crônica HBeAg não reagente também está associada a baixas taxas de remissão espontânea e risco elevado para complicações, como cirrose descompensada e CHC (Ministério da Saúde, 2017b).

Existe ainda, a fase HBsAg não reagente: mesmo após resposta imune com eliminação do HBsAg, há possibilidade de uma baixa replicação viral (índices indetectáveis ou muito baixos de HBV-DNA sérico). Existem

poucas informações sobre a importância dessa infecção oculta e persistente, mas compreende-se que a reativação pode ocorrer em pacientes com perfil sorológico atípico, caracterizado pela presença de anti-HBc reagente, independentemente da reatividade para anti-HBs (Ministério da Saúde, 2017b).

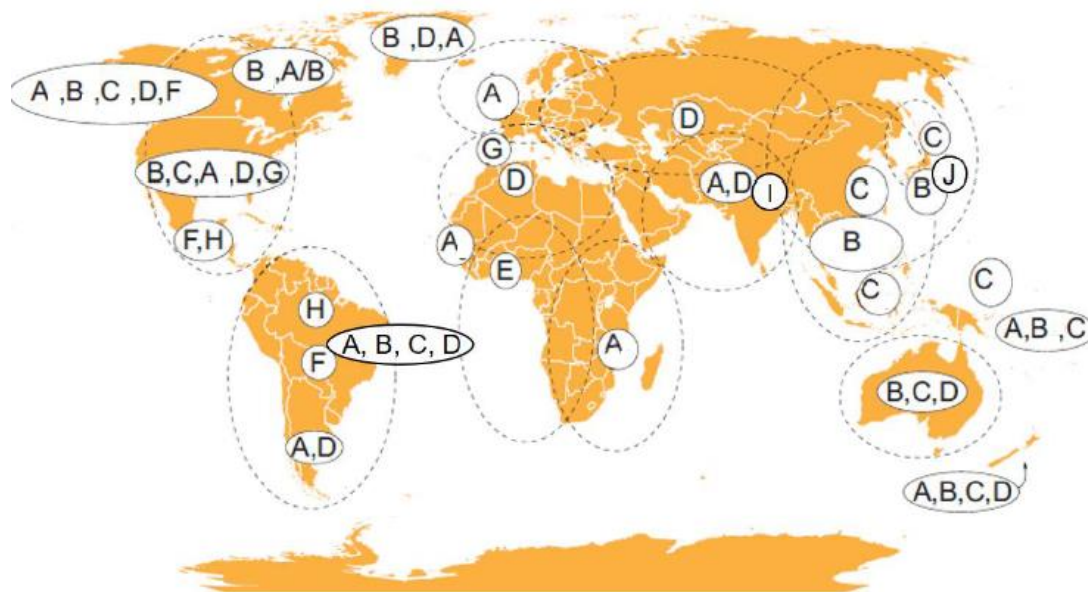
### **1.5 Genótipos e subgenótipos do HBV**

Até o momento, dez genótipos de HBV (A a J) foram caracterizados. A classificação do genótipo baseia-se numa divergência de sequência superior a 8% de todo o genoma. A diversidade significativa nos genótipos A-D e F levou à divisão em numerosos subgenótipos, com base em divergências de nucleotídeos dos intergrupos entre 4% e 7,5%. Os genomas dos genótipos mais recentemente caracterizados, HBV/I e HBV/J, são provavelmente recombinantes de HBV/C (De Pina-Araujo et al., 2018).

Os genótipos e subgenótipos do HBV têm distribuições geográficas distintas e podem ser responsáveis por diferenças na história natural e no curso clínico da infecção. Na África, os genótipos A, D e E são predominantes. O HBV/A e o HBV/D estão distribuídos globalmente, com um alto predomínio de HBV/A no noroeste da Europa, América do Norte e África do Sul e Brasil. O HBV/D é predominante na área euromediterrânica, em Portugal, na Índia, na Rússia e no norte da África. O HBV/E é o mais prevalente na África Ocidental e Central (De Pina-Araujo et al., 2018). O HBV/B e HBV/C, estão presentes na Ásia; o HBV/G, na França, Alemanha e Estados Unidos; o HBV/H, nas Américas do Sul e Central; o HBV/I, no Vietnã e Laos (Sunbul, 2014); e HBV/J, no Japão (Tatematsu, 2009). A distribuição geográfica dos genótipos está representada na Figura 5.

O genótipo A é agora classificado como A1, A2, quase subgenótipo A3 (QS-A3) e A4. Com exceção do A2, altamente prevalente na Europa e na América do Norte, os subgenótipos do HBV/A são de origem africana e estão relacionados ao povo africano e às populações a que entra em contato. O A1 é altamente prevalente no sudeste da África e é predominante entre os

povos sul-americanos de ascendência africana, principalmente no Brasil, e também foi encontrado em indianos do sul. Foi sugerido que o A1 foi introduzido na América do Sul por escravos africanos, que seriam portadores desse subgenótipo. O A2, o subgenótipo mais frequente no noroeste da Europa e nos EUA, também está sendo identificado na África do Sul (De Pina-Araujo et al., 2018).



**Figura 5:** Distribuição geográfica dos genótipos do HBV.  
Fonte: Locarnini et al, 2015; adaptado por Abreu, 2017; e modificado.

O genótipo B classificado de B1-B9, é distribuído no Japão (B1), China (B2), Indonésia (B3, B7, B8 e B9), Vietnã (B4), Filipinas (B5), Canadá e Groelândia (B6) (Shi et al., 2012).

Com 16 subgenótipos, o HBV/C é predominante na Ásia. No entanto, alguns subgenótipos recentemente descritos não foram totalmente aceitos. C1 é encontrado principalmente no sudeste da Ásia, enquanto C2 é predominante no leste da Ásia. O C3 está confinado à Oceania, enquanto o C4 é encontrado na Austrália, China, Alaska e é considerado o subgenótipo mais divergente dentro do HBV/C. Subgenótipos C5 e C7 são encontrados nas Filipinas, enquanto C6 e C8-C16 foram isolados na Indonésia (Zhu et al., 2015).

O genótipo D é o mais difundido, com dez subgenótipos, D1-D10, descritos até o momento (De Pina-Araujo et al., 2018). D1 é predominante



no Oriente Médio e Norte da África, D2 pode ser encontrado na Albânia, Turquia, oeste da Índia, Líbano e Sérvia. D3 foi relatado na Sérvia, oeste da Índia e Indonésia. É um subgenótipo predominante em infecções agudas por HBV relacionadas ao uso de drogas injetáveis na Europa e no Canadá. D4 é relativamente raro e relatado no Haiti, Rússia e região do Báltico, Quênia, Marrocos e Ruanda. Subgenótipo D5 parece ser comum no leste da Índia. D6 foi relatado como um subgenótipo raro da Indonésia, Quênia, Rússia e região do Báltico. D7 é o principal genótipo no Marrocos e na Tunísia. D8 e D9 são subgenótipos recentemente descritos e relatados no Níger e na Índia, respectivamente (Ozaras et al., 2015), e D10 na Etiópia (Hundie et al., 2017).

O HBV/E é encontrado exclusivamente na África ou em descendentes de africanos, e foi identificado em Mali, Burkina Faso, Togo, Benin, Nigéria, Camarões, República Democrática do Congo e Angola. Os isolados do genótipo E possuem baixa variabilidade genética (De Pina-Araujo et al., 2018).

O genótipo F do vírus da hepatite B é endêmico nas Américas Central e do Sul, bem como em populações nativas do Alasca, com uma proporção menor no México e América do Norte. O HBV/F é dividido em subgenótipos e subtipos com padrões de circulação geográfica específicos. É um genótipo altamente divergente: subgenótipos F1 a F4, com F1, F2 e F4 sendo dividido em subtipos “a” e “b”. F1a é encontrado na Costa Rica e El Salvador; F1b no Alasca, Argentina, Chile, e México (Fragoso-Fonseca et al., 2018); F2 e F3 no norte da América do Sul: F2a é encontrado no Brasil e Venezuela, F2b é descrito apenas na Venezuela, F3 é freqüente na Colômbia, Venezuela e Panamá; F4 é relatado nas áreas central e sul da América do Sul incluindo Bolívia, Argentina (F4a e F4b) e sul do Brasil (Mojsiejczuk et al., 2015; Alvarado-Mora e Pinho, 2013).

O Genótipo G, não possui clara associação geográfica, e está presente em certos grupos na Europa, e já foi detectado no México. As Infecções por HBV/G ocorrem principalmente em grupos de risco como Homens que fazem sexo com homens (HSH), mas curiosamente

principalmente como coinfeções com HBV/A2 e vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1); e usuários de drogas injetáveis infectados pelo HIV. Monoinfeções com o HBV/G são incomuns. Os isolados globais do HBV/G estão intimamente relacionados e possuem pouca divergência em suas seqüências, o que sugere uma origem evolutiva recente, e/ou uma introdução recentemente nos grupos de risco (Cornelissen et al., 2016).

O HBV/H é encontrado no México, e está historicamente relacionado com as migrações dos povos pré-hispânicos, o assentamento dos astecas na Mesoamérica antes da conquista espanhola e a mistura sucessiva da população; portanto, é o genótipo predominante detectado em ambas as populações mexicana nativa (ameríndia) e mestiça (Roman e Panduro, 2013).

No Brasil, o genótipo A é o mais comum, seguido pelo D e F. O genótipo A é o mais prevalente nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste; o genótipo D o mais prevalente na região Sul; e no centro do país, representado pela região Centro-Oeste, há uma distribuição equilibrada dos genótipos A e D. O genótipo F foi encontrado em todas as regiões do Brasil, com exceção da região Sul (Mello et al., 2007).

Os genótipos B, C e E também circulam na população, sendo que B e C são mais encontrados em pacientes de origem asiática (Sitnik et al., 2004; Espírito-Santo et al., 2015). A circulação do genótipo E ocorre na África Ocidental e sua circulação no Brasil é incomum, porém já descrita nas regiões Sudeste e Nordeste do país (Espírito-Santo et al., 2015).

Com relação à circulação de subgenótipos no país, foram relatados D4 e A1 no Maranhão (Cruz-Santos et al., 2018); A1, A2, D1-D4, F2a e F4 em Ribeirão Preto (Chachá et al., 2017); A1, D3 e F2 em Goiânia (Marinho et al., 2014); F2a em São Paulo (Alvarado-Mora et al., 2013); A1, D2-D4, e F2a em Rondônia (Santos et al., 2010), sendo que A1, D3 e F2a são os mais frequentemente encontrados.

## 1.6 Tratamento da Hepatite B Crônica

O objetivo principal do tratamento é reduzir o risco de progressão da doença hepática e de seus desfechos primários, especificamente cirrose, CHC e óbito (Tan e Sun, 2013, U.S Department of Health & Human Services, 2008). De acordo com os relatórios de vigilância epidemiológica, do Ministério da Saúde (2017a), aproximadamente 500 indivíduos morrem anualmente no país por infecção por HBV.

Desfechos substitutivos ou intermediários – como níveis de HBV-DNA, títulos de aminotransferases e marcadores sorológicos – estão validados e têm sido utilizados como parâmetros para inferir a probabilidade de benefícios da terapêutica em longo prazo. O conjunto desses exames pode refletir supressão da replicação viral sustentada e atividade necroinflamatória no fígado, reduzindo o risco de complicações, de progressão para cirrose e de CHC (Ministério da Saúde, 2017b).

A perda sustentada do HBsAg, com ou sem soroconversão para anti-HBs, é o resultado ideal da terapia. Esse perfil corresponde à completa remissão da atividade da hepatite crônica, porém, raramente é alcançado. Portanto, devem-se buscar desfechos alternativos para pacientes com HBsAg persistente e HBeAg reagente ou não reagente: soroconversão para anti-HBe, redução de carga viral (resposta virológica) e/ou normalização de ALT (resposta bioquímica) (Ministério da Saúde, 2017b).

As indicações para o tratamento são controversas, e evidências crescentes sugerem que a genotipagem do HBV, bem como o monitoramento quantitativo de HBsAg e da cinética do HBV devem ser usadas para prever a resposta ao tratamento antiviral. A probabilidade de alcançar uma resposta virológica sustentada também é aumentada pela extensão da duração do tratamento e pelo uso da terapia combinada. Portanto, o paradigma para o tratamento do HBV está em constante evolução (Tang et al., 2014).

Os tratamentos atuais para a hepatite B, segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para hepatite B e coinfeções do Ministério da

Saúde (2017b), incluem a alfapeguinterferona, e os análogos de núcleos(t)ídeos de maior eficácia e barreira genética Entecavir e Tenofovir, e não recomenda o uso de Alfainterferona, Lamivudina e Adefovir.

A Alfapeguinterferona é uma citocina com ação antiviral e imunomoduladora, enquanto os análogos de núcleos(t)ídeos suprimem a replicação do genoma viral ao inibir seletivamente a transcriptase reversa viral. No entanto, sem erradicar o cccDNA, a infecção pelo HBV continua a apresentar o risco de desenvolvimento de CHC, mesmo se for obtida uma cura funcional com tratamento antiviral, especialmente em pacientes que já desenvolveram cirrose (Yoo et al., 2018).

### **1.7 Resistência viral e mutações no gene da polimerase**

A resistência antiviral a drogas é definida como a susceptibilidade diminuída de um vírus ao efeito inibitório de uma droga, que resulta de uma série de mutações adaptativas sob a pressão seletiva do tratamento antiviral. Dois tipos de mutações foram identificados: mutações primárias de resistência, que são diretamente responsáveis pela resistência às drogas associadas; e mutações secundárias ou compensatórias, que ocorrem para que o vírus mantenha a competência de replicação, porque as mutações de resistência primária podem estar associadas a uma redução na capacidade de replicação (Bang e Kim, 2014).

As mutações de maior importância no gene da polimerase ocorrem na região com função de transcriptase reversa (Zoulim e Locarnini, 2009), e assim como as demais mutações, surgem em decorrência da transcrição reversa do HBV pela RT ser propensa a erros, pois ocorre uma alta taxa de substituição de nucleotídeos, sem um mecanismo de reparo, gerando uma população de variantes virais ou quasi-espécies capazes de se adaptar rapidamente ao hospedeiro (resposta imune) e ao tratamento antiviral. Considerando a alta taxa de replicação viral do HBV de mais de  $10^{11}$  vírions por dia, pelo menos  $10^{10}$  mutações pontuais poderiam ocorrer no genoma todos os dias. Isso significa que, dado o comprimento total do genoma de

3.200 pb, todas as possíveis alterações de base podem ser produzidas em um único dia (Bang e Kim, 2014). Desse modo, não é incomum observar resistência a medicamentos presente em uma população viral do HBV que ainda não tenha sido exposta a quaisquer análogos de nucleos(t)ídeos (Pacheco et. al., 2017).

A identificação das mutações na polimerase é realizada por meio de uma nomenclatura padronizada que numera de forma independente os aminoácidos de cada uma das quatro regiões da polimerase (amino-terminal, espaçadora, RT e carboxi-terminal) (Stuyver et al., 2001). As mutações são identificadas usando as letras rt para identificar a região, seguidas pela inicial do aminoácido original, o número da posição do aminoácido e o novo aminoácido gerado pela mutação, por exemplo rtM204I (Lok et al., 2007).

As mutações estabelecidas como causadoras de resistência do HBV aos análogos de núcleos(t)ídeos ocorrem em oito códons localizados nos diferentes domínios da região de RT da polimerase viral: domínio B (rtI169, rtL180, rtA181, rtT184), domínio C (rtS202, rtM204), domínio D (rtN236) e domínio E (rtE250) (Locarnini e Yuen, 2010).

A mais importante mutação responsável pela resistência à lamivudina localiza-se no locus YMDD (domínio C) e é caracterizada pela substituição de uma Metionina (M) para uma Isoleucina (I), para Valina (V) ou para Serina (S) na posição 204: rtM204I/V/S. Posteriormente, a mutação rtA181T/V/S também foi relacionada com redução da susceptibilidade viral a esse fármaco (Karatayli et al., 2007; Zoulim e Locarnini, 2009). Além dessas mutações, diversas mutações compensatórias em diferentes domínios da RT já foram identificadas em cepas com resistência à lamivudina: rtL80V/I, rtV173L, rtL180M/C (Shaw et al., 2006; Zoulim e Locarnini, 2009), rtA200V (Sheldon et al., 2006), rtV/F/L/M207I (Fu e Cheng, 1998), rtQ215S (Bartholomeusz e Locarnini, 2006; Locarnini e Mason, 2006), rtL217P (Ji et al., 2011), e rtL229F (Ji et al., 2012).

A resistência ao adefovir foi inicialmente caracterizada pelas mutações rtA181V/T (domínio B) e/ou rtN236T (domínio D) (Bartholomeusz e Locarnini, 2006; Locarnini e Yuen, 2010; Zoulim e Locarnini, 2009).

Posteriormente, outras mutações foram associadas com resistência ou susceptibilidade reduzida ao adefovir: rtL80V/I (Lee et al., 2009; Shaw et al., 2006), rtV84M, rtS85A (Bartholomeusz e Locarnini, 2006; Shaw et al., 2006), rtL180M (Lee et al., 2012), rtA181S (Karatayli et al., 2007), rtV214A, rtQ215S (Shaw et al., 2006), rtL217R (Sheldon et al., 2006), rtE218G (Liu et al., 2010), rti233V (Zoulim e Locarnini, 2009), rtP237H (Bartholomeusz e Locarnini, 2006; Shaw et al., 2006), rtN238T/D/R, rtT240Y, rtN248H (Bartholomeusz e Locarnini, 2006; Qin Bo et al, 2013; Shaw et al., 2006). Entre essas a rtV214A e a rtQ215S também foram associadas com falhas na resposta ao tratamento com lamivudina (Locarnini, 2005; Locarnini e Mason, 2006). Entretanto o papel dessas mutações na resistência a esses análogos de núcleos(t)ídeos não está bem estabelecido, em alguns casos os estudos ainda são escassos e em outros os resultados apresentados por diferentes estudos são contraditórios (Gomes-Gouvêa, 2014).

A resistência ao entecavir ocorre quando há a combinação das mutações de resistência à lamivudina (rtM204V/I) com uma das seguintes mutações: rti169T, rtT184G/A/I/S/C/L/F/M, rtS202G/I/C/A ou rtM250V/I/L/C (Baldick et al., 2008; Zoulim e Locarnini, 2009). Estas mutações isoladamente conferem redução mínima da susceptibilidade ao entecavir (Zoulim e Locarnini, 2009). Outras mutações (rtS219A e rtY245H) também foram associadas à redução da susceptibilidade ao entecavir (Karatayli et al., 2012).

Para o tenofovir nenhuma mutação foi definitivamente associada à resistência, por outro lado, já se conhece que as mutações que conferem resistência ao adefovir (rtN236T e rtA181V/T) promovem a redução da eficácia do tratamento com tenofovir, uma vez que essas drogas são estruturalmente relacionadas (Locarnini e Yuen, 2010; Zoulim e Locarnini, 2009).

A total erradicação do HBV ainda permanece praticamente impossível, mesmo com a existência dos agentes antivirais potentes para o tratamento da hepatite B crônica (HBC) atualmente disponíveis. Apesar de os análogos de nucleos(t)ídeos estarem associados com boa supressão viral, pela

redução dos níveis séricos de HBV-DNA, a resistência ainda é um problema no tratamento a longo prazo (Bang e Kim, 2014).

O monitoramento é fundamental no acompanhamento dos pacientes em tratamento pelo fato de algumas mutações conferirem resistência cruzada a vários medicamentos. Por exemplo, cepas do HBV resistentes à lamivudina com as mutações rtL180M ± rtM204V/I, que desenvolvam mutações nas posições rtT184, rtS202 ou rtM250 serão resistentes também ao entecavir. A mutação rtA181T/V, que pode ser selecionada durante o tratamento com lamivudina, confere resistência ao adefovir e redução da susceptibilidade ao tenofovir (Locarnini e Yuen, 2010; Zoulim e Locarnini, 2009).

A resistência pode ser classificada em Primária, quando ocorre resposta ausente ou insuficiente ao tratamento, com redução de menos de 1 log<sub>10</sub> UI/mL em exame de HBV-DNA, realizado seis meses após instituído o tratamento; e Adquirida, no paciente que inicialmente apresentou supressão viral durante o tratamento, porém ocorreu elevação do HBV-DNA de mais de 1 log<sub>10</sub> UI/mL em relação ao menor valor de HBV-DNA apresentado, ou alterações nos exames de função hepática (Ministério da Saúde, 2017b). A presença de resistência pode ser efetivamente suprimida adequando a terapia com um análogo de nucleos(t)ídeo de diferente grupo estrutural, e para isso, testes de resistência a antivirais poderão ser solicitados, quando disponíveis, a fim de escolher o fármaco mais adequado, para o qual o VHB seja susceptível.

## **1.8 Epidemiologia do HBV no Brasil**

O Brasil é classificado como um país com baixa endemicidade para hepatite B, com regiões que possuem prevalência intermediária alta (comunidades amazônicas como Lábrea, população rural em Rondônia e indígenas no sudeste do Pará), intermediária baixa (Acre, entre moradores de rua em São Paulo e populações de afro-descendentes no Estado do Mato Grosso do Sul), e baixa (Rondônia, Pará, Bahia, Maranhão, Mato Grosso do

Sul, Goiás, Mato Grosso, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul) (Souto, 2015).

As regiões Sudeste e Sul apresentam o maior número de casos notificados, comparadas às demais regiões, o que pode ser atribuído a um melhor sistema de vigilância. Em 2016, as maiores taxas de notificação no Brasil foram no estado de São Paulo (Ministério da Saúde, 2018) o qual apresenta baixa endemicidade para hepatite B (Souto, 2015).

A Região Administrativa (RA) de São José do Rio Preto localiza-se no Noroeste do Estado de São Paulo, fazendo divisa com Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. É formada por 96 municípios, compreendendo as regiões de Governo (RGs) de Catanduva, Fernandópolis, Jales, São José do Rio Preto e Votuporanga (Secretaria de Planejamento e Gestão, 2015).

Nos últimos anos, muitos investimentos na região foram voltados à agroindústria, exigindo uma crescente demanda de mão de obra; as universidades atraem cada vez mais estudantes; além disso, pessoas de diversos estados do país buscam tratamentos e procedimentos médicos, caracterizando São José do Rio Preto como um centro de referência em desenvolvimento, educação e saúde.

O Município, entre outros serviços, conta com o Hospital de Base, um dos maiores da região, que cobre uma área de 99 municípios onde se concentram cerca de um milhão e meio de habitantes. Sendo assim, a RA de São José do Rio Preto está entre as três regiões com maiores taxas de migração no Estado, tendo sido superada somente por Ribeirão Preto e Campinas (Fundação SEADE, 2018).

Todos esses fatores colaboram para intensa circulação e flutuação da população, fazendo com que aumente a possibilidade de disseminação de várias doenças com as mais variadas etiologias. Considerando que, na Região de São José do Rio Preto existem muitos pacientes em tratamento da Hepatite B e que nenhum estudo foi realizado sobre os genótipos circulantes, o presente trabalho avaliou os aspectos epidemiológicos e moleculares da Hepatite B nesta região.



## **2) OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar os aspectos epidemiológicos e moleculares do Vírus da Hepatite B na região de São José do Rio Preto.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar os genótipos e subgenótipos do Vírus da Hepatite B circulantes na região de São José do Rio Preto;
- Correlacionar os dados clínicos dos pacientes ao genótipo viral identificado;
- Verificar a frequência de cepas do HBV com mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos utilizados no tratamento da hepatite B;
- Analisar filogeneticamente as cepas virais encontradas.

### **3) CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL, com parecer número 1.731.731 (ANEXO 1) o qual consta o projeto principal. O presente estudo foi desenvolvido como subprojeto da proposta inicial, contemplando somente o estudo da hepatite B, que foi devidamente justificado (ANEXO 2).

#### **3.2 População de Estudo**

Trata-se de um estudo retrospectivo no qual foram incluídos pacientes portadores de Hepatite B aguda ou crônica, de todas as faixas etárias, que fizeram acompanhamento por meio de exames de carga viral do HBV no Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto – X, e que possuíam carga viral acima de 2.000 UI/mL. Foi realizada amostragem por conveniência no período de Setembro de 2015 a janeiro de 2018. Os Serviços de Assistência à Saúde participantes foram:

- 1) Serviço de Assistência Especializada – SAE de Mirassol;
- 2) Programa de DST/AIDS de Catanduva;
- 3) Centro de Atendimento a Doenças Infecto Contagiosas e Parasitárias – CADIP de Fernandópolis;
- 4) Serviço de Atendimento Especializado – SAE de Jales;
- 5) Serviço de Atendimento Especializado – SAE de Votuporanga;
- 6) Ambulatório Municipal de Hepatites Virais de São José do Rio Preto;
- 7) Serviço de Assistência Especializada – SAE de São José do Rio Preto.

### **3.3 Seleção de amostras**

#### **3.3.1 Critérios de inclusão**

Amostras recebidas na rotina de carga viral do HBV pelo CLR – IAL – São José do Rio Preto – X, que possuíssem carga viral acima de 2.000 UI/mL (um dos critérios utilizados pelo Laboratório de Hepatites Virais – Instituto Adolfo Lutz Central para realização dos exames de genotipagem do HBV e resistência aos antivirais, estabelecidos pelo Comitê Técnico Estadual de Hepatites), e volume de 450 µL de plasma para alíquota. No caso de amostra insuficiente para alíquota de plasma, foi utilizada como alternativa amostra de soro quando disponível.

#### **3.3.2 Critérios de exclusão**

Amostras de plasma ou soro que estivessem hemolisadas ou lipêmicas, e amostras coletadas em datas diferentes dos pacientes que já estivessem incluídos no estudo.

#### **3.3.3 Coleta, Armazenamento e Transporte**

A coleta das amostras foi realizada nos Serviços de Assistência à Saúde e encaminhadas ao CLR-IAL São José do Rio Preto, até quatro horas após a coleta em caixa rígida de transporte de material biológico com temperatura entre 2°C e 30°C, onde foram separadas e estocadas a -20°C até o processamento.

As alíquotas das amostras selecionadas para realização do teste de genotipagem do vírus da hepatite B foram estocadas a -70°C. Ao final da seleção, foram encaminhadas para o Laboratório de Hepatites Virais – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, em caixa rígida de transporte de material biológico com gelo seco, onde o teste de genotipagem foi realizado.

As amostras ficaram sob a responsabilidade do Instituto Adolfo Lutz –

São Paulo para realização da análise laboratorial citada, seguindo as normas da DG/IAL 16 de 22/12/2010 a qual dispõe sobre as Normas de Temporalidade das amostras biológicas e produtos armazenados no IAL.

### **3.4 Coleta de dados**

As informações foram obtidas por meio dos Formulários de solicitação de Carga Viral do Vírus da Hepatite B (ANEXO 3), elaborados pelo Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais – Ministério da Saúde, obrigatórios para realização do exame, e confirmadas por meio de consulta ao Prontuário Médico de cada paciente. No caso de formulários que não estavam preenchidos corretamente, os dados foram obtidos diretamente durante a consulta ao Prontuário Médico. Os dados analisados foram:

- Idade e sexo;
- Raça/cor;
- Motivo de solicitação do exame de carga viral do HBV;
- Estágio da doença;
- Tratamento;
- Presença de cirrose,
- Coinfecções pelos vírus HCV e HIV.

Os resultados de carga viral do Vírus da Hepatite B, realizados no CLR-IAL-São José do Rio Preto-X, foram consultados no SIGH – Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (período 09/2015 a 08/2016), ou GAL – Gerenciador de Ambiente Laboratorial para amostras (período 08/2016 a 01/2018).

### **3.5 Abbott RealTime HBV**

Os resultados de carga viral do Vírus da Hepatite B, realizados no CLR-IAL-São José do Rio Preto-X, foram obtidos por meio da técnica de PCR em tempo real com o kit Abbott RealTime HBV, fornecido pelo Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais – Ministério da Saúde.

O Abbott RealTime HBV é um ensaio in vitro de reação em cadeia da Polimerase (PCR) para a quantificação de DNA do Vírus da Hepatite B, em plasma, de indivíduos infectados por HBV. O ensaio utiliza a PCR em tempo real para gerar produto amplificado do genoma do DNA do HBV (região altamente conservada do gene de superfície) em amostras clínicas. A quantidade da sequência alvo que está presente em cada ciclo de amplificação é medida no instrumento m2000rt com o uso de sondas de oligonucleotídeos marcados por fluorescência. As sondas não geram sinal a menos que estejam ligadas especificamente ao produto amplificado. O ciclo de amplificação no qual o sinal fluorescente é detectado é inversamente proporcional ao logaritmo da concentração de DNA presente na amostra original (Abbott Molecular, 2013).

### **3.5.1 Preparação das amostras: extração do DNA**

A finalidade da preparação das amostras é extrair e concentrar as moléculas do DNA-alvo de modo que fiquem acessíveis para amplificação, bem como remover potenciais inibidores da amplificação (Abbott Molecular, 2013). A extração do HBV DNA foi realizada na plataforma automatizada Abbott m2000sp, utilizando o kit de extração Abbott *mSample Preparation System*<sub>DNA</sub> (Promega Corporation, Madison, USA), conforme orientações do fabricante, o qual possui os seguintes reagentes:

- mLysis
- mWhash 1 DNA
- mWhash 2 DNA
- mMicroparticles DNA
- mElution Buffer DNA
- Proteinase K
- Controle Interno

O kit de extração utiliza a tecnologia de partículas magnéticas para capturar os ácidos nucleicos, e lavagem das partículas para remover os componentes não ligados da amostra. Os ácidos nucleicos ligados foram eluídos para a amplificação. O controle interno foi adicionado na preparação das amostras, e foi processado também junto aos calibradores e controles

do kit (Abbott Molecular, 2013).

### **3.5.2 Reação de Amplificação**

Para amplificação do genoma e determinação da carga viral do HBV, foi feito o ensaio Abbott RealTime HBV, no instrumento Abbott m2000rt, com o kit de amplificação Abbott RealTime HBV Amplification Reagent Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, USA), segundo orientações do fabricante, o qual possui os seguintes reagentes:

- Frasco 1: Amplitaq Gold Enzyme (DNA polimerase) em solução tampão com estabilizantes;
- Frasco 2: Oligonucleotídeos (4 primers e 3 sondas) e dNTPs em solução tampão;
- Frasco 3: Cloreto de magnésio em solução tampão.

Nessa etapa, os componentes do reagente de amplificação foram misturados, gerando a mistura principal de amplificação (Master Mix), que foi distribuída na placa óptica de PCR, bem como as alíquotas das amostras de DNA extraídos (Abbott Molecular, 2013), ainda pela plataforma automatizada m2000sp, depois da extração.

Após a distribuição do Master Mix e amostras, foi feita a aplicação manual do adesivo óptico, e a placa foi transferida para o instrumento m2000rt, onde ocorreu a reação de amplificação. Durante cada ciclo, os produtos da amplificação dissociam-se em fitas simples sob alta temperatura, possibilitando o anelamento e a extensão dos oligonucleotídeos à medida que a temperatura baixa. A amplificação exponencial do produto foi obtida pela ciclagem repetida de temperaturas altas e baixas, resultando na amplificação das sequências alvo em um bilhão de vezes ou mais. A amplificação dos alvos do HBV e do controle interno ocorreu simultaneamente na mesma reação (Abbott Molecular, 2013).

A presença de produtos de amplificação foi detectada pela medição da fluorescência da sonda que se ligou ao alvo. A presença da amplificação do controle interno foi detectada de forma semelhante.

### 3.5.3 Interpretação dos resultados

A concentração de DNA do HBV em uma amostra, ou do controle, foi calculada a partir de uma curva de calibração armazenada no instrumento Abbott m2000rt, o qual informa automaticamente os resultados, em Unidades Internacionais por mililitro (UI/mL). O Quadro 1 apresenta os possíveis resultados e as interpretações.

**Quadro 1:** Interpretação dos resultados da PCR em tempo real Abbott RealTime HBV.

Resultados	Interpretação	Descrição
Não detectado	Alvo não detectado	DNA do HBV não detectado na amostra
< 10 UI/mL	Alvo detectado	DNA detectado, abaixo do limite inferior de quantificação
Entre 10 UI/mL e $10^9$ UI/mL	Alvo detectado	DNA detectado, dentro do intervalo de quantificação
> $10^9$ UI/mL	Alvo detectado	DNA detectado, acima do limite de quantificação

### 3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção e genotipagem do vírus da hepatite B (HBV)

#### 3.6.1 Extração do DNA

Para extração do ácido nucleico viral (HBV DNA) foi utilizado o kit comercial de extração QIAamp® DNA Mini, Qiagen (Germantown, Maryland, USA), conforme orientações do fabricante, em amostras de soro ou plasma.

À 200µL de plasma ou soro, foram adicionados 20µL de Proteinase K e 200µL de tampão AL, para lise da amostra e ajuste das condições de ligação do DNA, após agitação e incubação a 56°C por 10 minutos.

As amostras foram transferidas para as mini colunas QIAamp, já

acrescidas de 200µL de Etanol 100%, onde o DNA permaneceu ligado à membrana de sílica, e os componentes celulares foram completamente removidos em duas etapas de lavagem (Buffer W1 e Buffer W2).

O DNA puro foi eluído com 60µL de tampão AE, e as amostras extraídas foram armazenadas em freezer -20°C. Todos os protocolos de extração continham no mínimo três controles negativos, intercalados entre as amostras, a fim de assegurar a qualidade da extração realizada.

### **3.6.2 Amplificação por Nested PCR *in house* do genoma do HBV**

Para caracterização dos genótipos e subgenótipos foram realizados a amplificação e o sequenciamento das regiões S e polimerase (S/Pol) do genoma do HBV, com um conjunto de primers que amplificam um fragmento de 734pb, por meio da técnica de *nested PCR in house*. Os primers utilizados foram FHBS1 e FHBS2, descritos por Sitnik e colaboradores (2004); RADE1 e RADE2, descritos por Gomes-Gouvêa e colaboradores (2009). As sequências e concentrações de cada primer estão representadas no Quadro 2.

Para realização da primeira PCR foram utilizados 5µL de DNA extraído e 45µL da mistura de PCR, constituída de água ultrapura (Invitrogen, CA, EUA); Tampão 10x (LGC Biotecnologia, Brasil); dNTPs; Cloreto de magnésio (LGC Biotecnologia, Brasil); primers FHBS1 e RADE1; Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia, Brasil).

Na segunda PCR foram utilizados 5 µL dos produtos amplificados da primeira PCR, adicionados a uma nova mistura de PCR (água ultrapura, Tampão 10x, dNTPs, Cloreto de magnésio, primers FHBS2 e RADE2, Taq DNA polimerase). As amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, em termociclador, com programa específico, representado no Quadro 3. As quantidades e concentrações utilizadas nas Misturas da Primeira e Segunda PCR estão descritas no Quadro 4.



**Quadro 2:** Primers utilizados nas reações de PCR.

Primers	Sequência (5'- 3')
<b>1ª PCR</b>	
FHBS1 (30 pMol/μL)	GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC
RADE1 (30 pMol/μL)	TGC GTC AGC AAA CAC TTG GC
<b>2ª PCR</b>	
FHBS2 (30 pMol/μL)	CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC
RADE2 (30 pMol/μL)	CAT ACT TTC CAA TCA ATA GG
<b>PCR para sequenciamento</b>	
FHBS2 (1,6 pMol/μL)	CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC
RADE2 (1,6 pMol/μL)	CAT ACT TTC CAA TCA ATA GG

**Quadro 3:** Sequência de ciclagem para amplificação do material genético, primeira e segunda PCR.

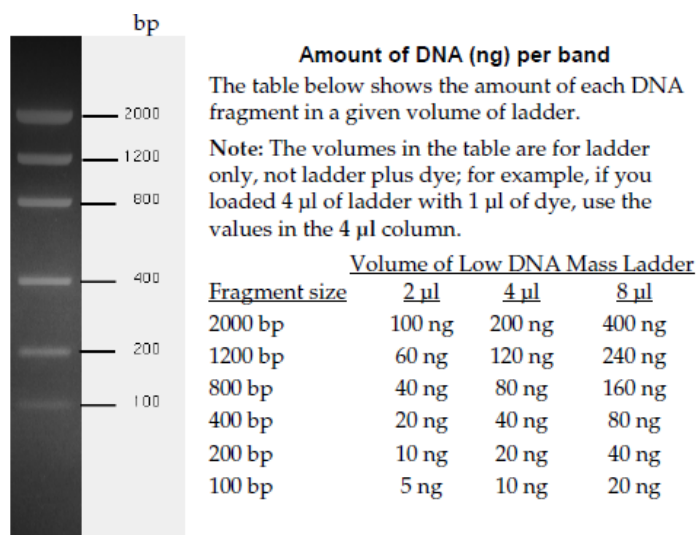
1ª PCR			2ª PCR		
Ciclos	Temperatura	Tempo	Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	2 minutos	1	94°C	2 minutos
34	94°C	30 segundos	34	94°C	30 segundos
	56°C	30 segundos		50°C	30 segundos
	72°C	1 minuto		72°C	1 minuto
1	72°C	7 minutos	1	72°C	7 minutos

**Quadro 4:** Quantidade dos reagentes utilizados na primeira e segunda PCR.

Reagente	Quantidade (μL)
H <sub>2</sub> O Milli Q	33,80
Buffer 10X	5,00
dNTPs (10mM)	3,00
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,00
Primer 1 (30μM)	0,50
Primer 2 (30μM)	0,50
TAQ (5 U/ml)	0,25

### 3.6.3 Identificação do material amplificado

A detecção do DNA amplificado foi realizada em gel de agarose (LGC Biotecnologia, Brasil) 2%, preparado em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE 50x), corado com GelRed™ Nucleid Acid Stain (BIOTIUM, Fremont, CA, EUA), no qual foi realizada a eletroforese das amostras, controles positivo e negativo, e do marcador de tamanho e massa molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) para identificação do tamanho do fragmento gerado e quantificação do DNA, de acordo com instruções do fabricante. A quantificação é feita comparando a intensidade das bandas obtidas com o padrão de massa (Figura 6).



**Figura 6:** Representação do padrão de tamanho e massa (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen).

### 3.6.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Foi utilizada a técnica de sequenciamento por PCR, derivada da metodologia de Sanger e colaboradores (1977), utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O DNA amplificado foi quantificado, e quando necessário diluído em

água ultrapura, a fim de atingir a concentração ideal de 3ng/2µL para melhores resultados.

Na PCR para sequenciamento, foram utilizados os primers FHBS2 e RADE2, cujas sequências e concentração estão descritas no Quadro 2.

Para cada amostra foram feitas duas reações distintas (A e B), cada uma com seu respectivo primer (*Forward e Reverse*), mistura de PCR para sequenciamento e DNA amplificado, em quantidades representadas no Quadro 5, atingindo um volume final de 20µL por reação. As amostras foram submetidas a PCR para sequenciamento, onde ocorreu incorporação dos didesoxinucleotídeos marcados, em termociclador, com programa específico, representado no Quadro 6.

**Quadro 5:** Mix de reações de PCR para sequenciamento.

MIX A		MIX B	
FHBS2		RADE2	
H2O	7µL	H2O	7µL
Big Dye	4µL	Big Dye	4µL
Tampão 5x	5µL	Tampão 5x	5µL
FHBS2	2µL	RADE2	2µL
DNA	2µL	DNA	2µL

**Quadro 6:** Sequência de ciclagem utilizada na PCR para sequenciamento.

PCR para sequenciamento		
Ciclos	Temperatura	Tempo
1	96°C	2 minutos
35	96°C	45 segundos
	55°C	30 segundos
	60°C	4 minutos

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas pelo método EDTA/Etanol (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, de acordo com as instruções do fabricante), para retirada dos ddNTPs

marcados não incorporados. O produto foi ressuspendido com Formamida HI-DI (Life Technologies™), e a eletroforese e leitura das fluorescências nas moléculas de DNA foram realizadas em sequenciador automático modelo ABI 3130xL (Applied Biosystems).

### **3.6.5 Identificação dos genótipos do HBV e análise da presença de mutações de resistência**

Após o sequenciamento, a qualidade das sequências foi analisada por meio do programa Sequence Scanner (Thermo Fisher Scientific – Waltham, Massachusetts, EUA). A sequência consenso de cada amostra foi obtida, utilizando o programa Sequencher® version 4.1.4 DNA sequence analysis software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA).

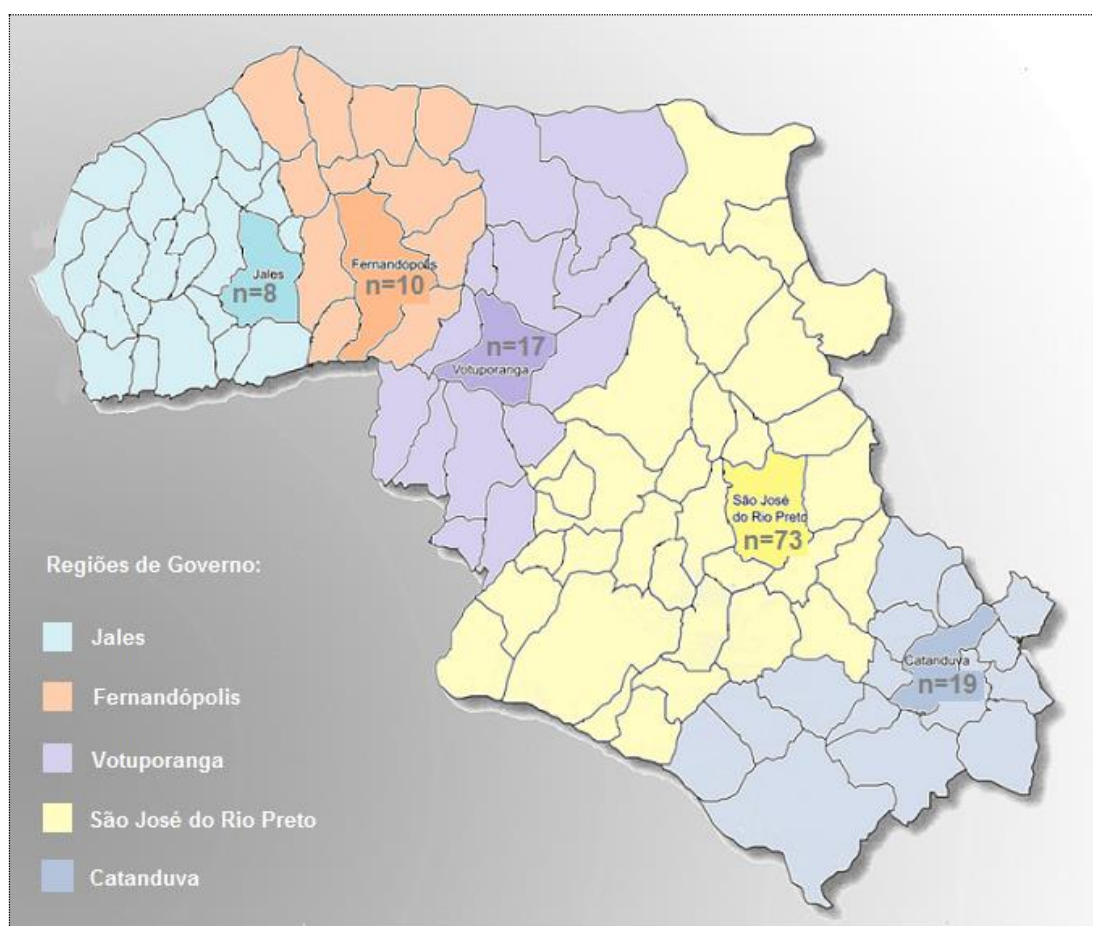
As sequências consenso geradas foram submetidas à ferramenta online VIRUS TOOLS (Hospital Israelita Albert Einstein), para a classificação dos genótipos e subgenótipos do HBV e análise da presença de mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos Lamivudina, Adefovir Entecavir, Emtricitabina, Tenofovir e Telbuvudina.

Para realização da análise filogenética foram utilizados os softwares: BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 (Hall, 1999) para alinhar as sequências consenso obtidas com as sequências referências; e BEAST version 1.8.0 com modelo GTR, para construção da árvore, composto por mais três programas: BEAUTI v.1.8.0; TreeAnnotator v1.8.0, e FigTree v.1.3.1.

As sequências referências foram obtidas no GenBank após pesquisa realizada no Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (National Center for Biotechnology Information, U.S., NCBI), que encontra regiões de similaridade entre sequências biológicas, com significância estatística.

#### 4) RESULTADOS

Entre o período de setembro de 2015 a janeiro de 2018, o CLR-IAL-X realizou 1.731 exames de carga viral do HBV, equivalente a 773 pacientes. Os sete Serviços de Assistência à Saúde participantes, que compreendem as cinco Regiões de Governo da Região Administrativa de São José do Rio Preto, ilustrada na Figura 7, foram responsáveis pela solicitação de 1500 exames, conforme descrito na Tabela 1, de 619 pacientes, dos quais 164 possuíam pelo menos uma amostra com resultado da carga viral do HBV igual ou superior a 2.000 UI/mL, sendo que foi possível incluir 127 deles no estudo (amostras por conveniência), conforme Tabela 2.



**Figura 7:** Regiões de Governo da Região Administrativa de São José do Rio Preto.

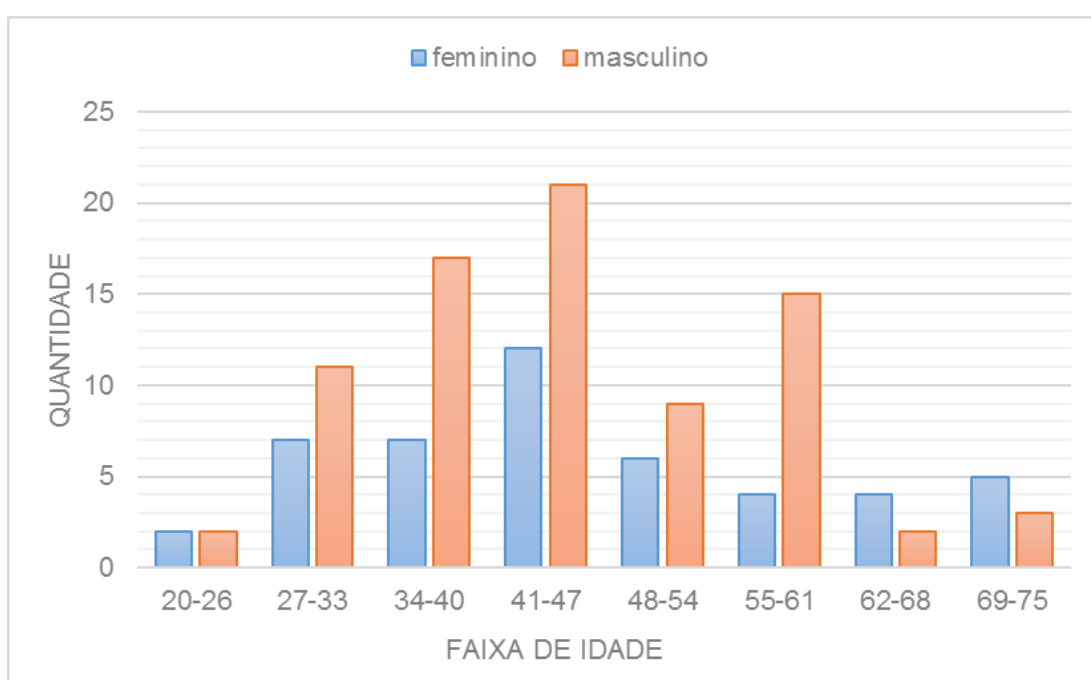
**Tabela 1:** Exames de carga viral do HBV realizados pelo CLR-IAL-X, no período de setembro de 2015 a janeiro de 2018, dos Serviços de Assistência à Saúde da Região Administrativa de São José do Rio Preto.

Unidades de Saúde	Carga viral do HBV				Total
	Detectável	Não Detectável	Abaixo do limite de quantificação	Acima do limite de quantificação	
SAE - Mirassol	15	3	0	0	18
SAE - SJRP	15	11	1	1	28
SAE - Jales	21	23	4	0	48
CADIP - Fernandópolis	52	11	3	0	66
SAE - Votuporanga	90	19	8	1	118
HEEC - Catanduva	185	120	24	2	331
AMHV - SJRP	581	236	67	7	891
<b>Total</b>	<b>959</b>	<b>423</b>	<b>107</b>	<b>11</b>	<b>1500</b>

**Tabela 2:** Número de pacientes, no período de setembro de 2015 a janeiro de 2018, dos Serviços de Assistência à Saúde da Região Administrativa de São José do Rio Preto.

Unidades de Saúde	Número de pacientes		
	Total da Unidade	Carga viral > 2000 UI/mL	Incluídos no estudo
SAE - Mirassol	12	6	4
SAE - SJRP	21	11	7
SAE - Jales	24	8	8
CADIP - Fernandópolis	33	10	10
SAE - Votuporanga	64	22	17
HEEC - Catanduva	141	28	19
AMHV - SJRP	324	79	62
<b>Total</b>	<b>619</b>	<b>164</b>	<b>127</b>

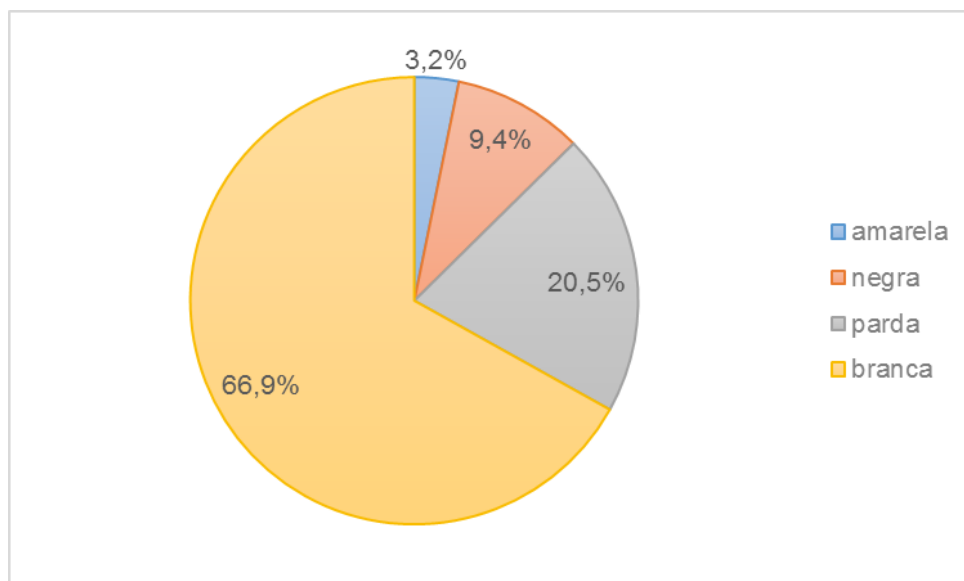
Do total de amostras analisadas, 80 (63%) eram de pacientes do sexo masculino e 47 (37%) de pacientes do sexo feminino. A média de idade foi de 45,8 anos, com desvio padrão de  $\pm 12,1$  e mediana de 44 anos, sendo a idade mínima 20 e a idade máxima 75 anos. A faixa etária com maior número de amostras foi entre 41 e 47 anos, em ambos os sexos, com o total de 33 amostras, sendo 12 de pacientes do sexo feminino e 21 de pacientes do sexo masculino, conforme o Gráfico 1.



**Gráfico 1:** Distribuição dos pacientes segundo sexo e faixa etária.

A raça predominante foi a branca com 66,9%, seguida pela parda, negra e amarela (Gráfico 2). Com relação a nacionalidade, somente 3 amostras eram de pacientes estrangeiros (Angola, China e Paquistão).





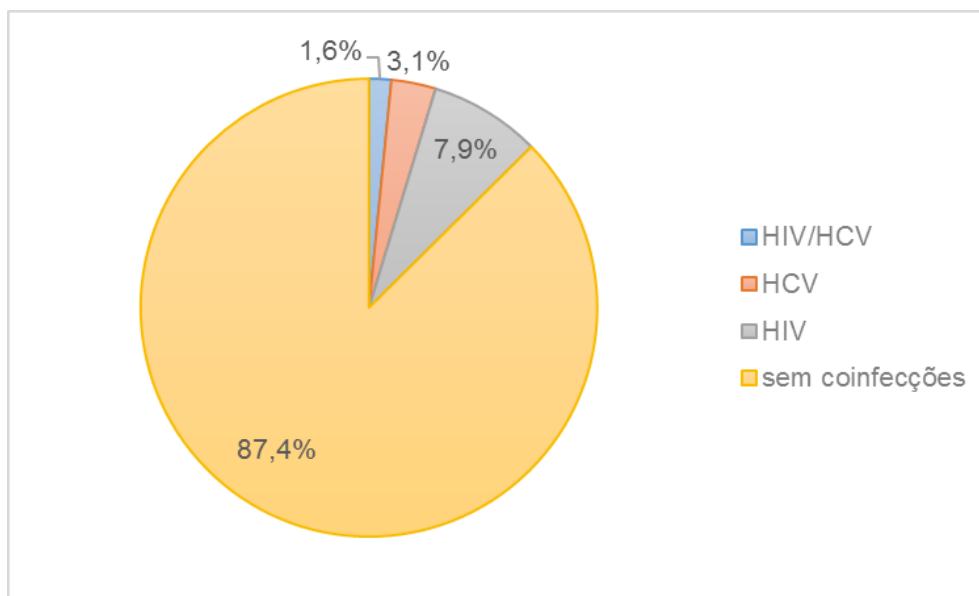
**Gráfico 2:** Distribuição dos pacientes segundo Raça.

Entre as solicitações dos exames de carga viral do HBV predominam avaliar indicação de tratamento (59,8%) e monitorar tratamento (28,3%), como descrito na Tabela 3.

**Tabela 3:** Solicitações dos exames de carga viral do HBV.

Motivo do exame	Quantidade	
	N°	%
<b>Confirmação do diagnóstico</b>	13	10,3
<b>Avaliar indicação de tratamento</b>	76	59,8
<b>Monitorar tratamento</b>	36	28,3
<b>Gestante portadora de hepatite B</b>	2	1,6
<b>Total</b>	<b>127</b>	<b>100</b>

Com relação ao estágio da doença, todas as amostras analisadas foram provenientes de pacientes com Hepatite B crônica, com presença de cirrose em 4,7% (6/127) e coinfeção com HCV e/ou HIV em 12,6% (16/127). A coinfeção HBV/HIV foi 7,9% (10/127), HBV/HCV 3,1% (4/127), e HBV/HCV/HIV 1,6% (2/127). Esses dados estão apresentados no Gráfico 3. Os valores de carga viral do HBV foram variados, e encontram-se descritos na Tabela 4.



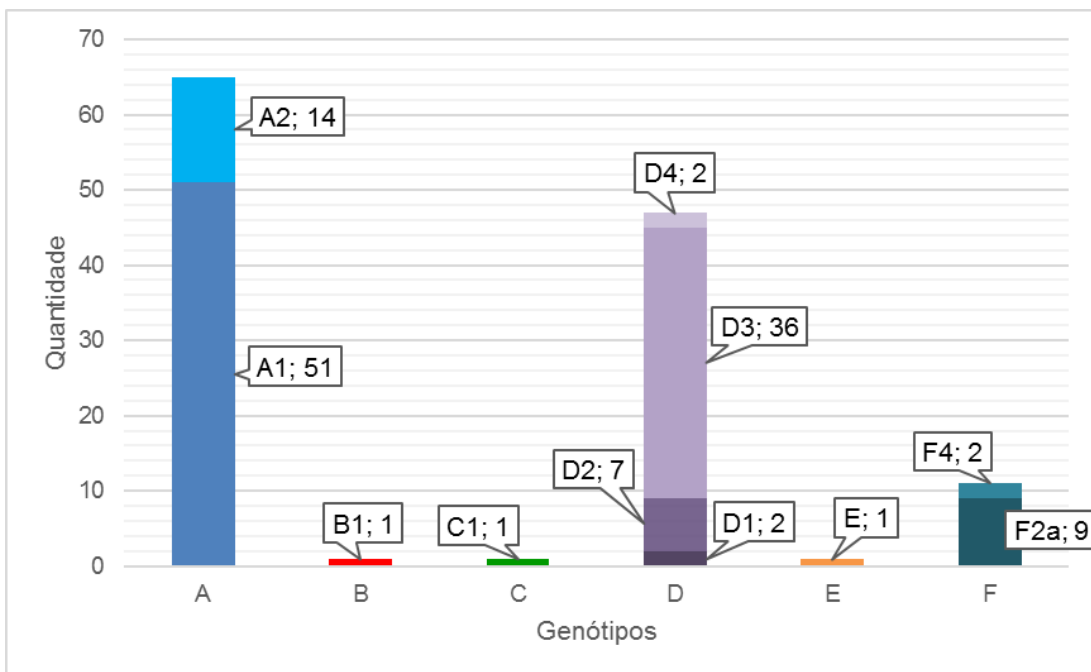
**Gráfico 3:** Distribuição das coinfeções entre os pacientes HBV.

**Tabela 4:** Valores de carga viral do HBV.

Carga Viral do HBV		Quantidade	
UI/mL	Log	Nº	%
2.014 – 9.764	3,3 a 3,99	64	50,4
9.895 – 83.548	4,0 a 4,92	34	26,8
200.639 – 838.388	5,30 a 5,92	5	3,9
991.261 – 7.795.750	6,00 a 6,89	6	4,7
11.972.121 – 67.948.848	7,08 a 7,83	8	6,3
124.487.453 – 993.945.631	8,10 a 9,00	6	4,7
<b>Acima do limite de detecção</b>	> 9,00	4	3,2
<b>Total</b>		<b>127</b>	<b>100</b>

Foi possível amplificar a região S/Pol do HBV das 127 amostras incluídas no estudo, porém uma amostra não atingiu qualidade suficiente para realização da genotipagem por sequenciamento, a qual foi excluída da análise. Das 126 amostras genotipadas, 65 apresentaram o genótipo A (51,6%), uma genótipo B (0,8%), uma genótipo C (0,8%), 47 genótipo D (37,3%), uma genótipo E (0,8%), e 11 o genótipo F (8,7%), sendo os genótipos A e D os mais prevalentes.

Com relação aos subgenótipos, uma grande diversidade foi observada: A1, A2, B1, C1, D1, D2, D3, D4, F2a e F4. Entre os pacientes infectados pelo genótipo A, o subgenótipo A1 foi predominante com 78,5% e o A2 foi 21,5%; entre os infectados pelo genótipo D, o mais encontrado foi D3 (76,6%), seguido pelo D2 (14,9%), D1 (4,3%), D4 (4,3%); entre os infectados pelo genótipo F, a maioria de subgenótipos foi F2a (81,8%), e o F4 (18,2%). Para os genótipos B e C os subgenótipos B1 e C1 foram os identificados, respectivamente. A distribuição de todos os genótipos e subgenótipos encontrados está representada no Gráfico 4.



**Gráfico 4:** Distribuição dos genótipos e subgenótipos do HBV encontrados nos pacientes HBV crônicos.

A distribuição dos genótipos/subgenótipos de acordo com a origem das amostras, encontra-se descrita no Quadro 7, onde temos que no Ambulatório Municipal de Hepatites Virais – AMHV de São José do Rio Preto houve predomínio dos subgenótipos A1 (21,4%) e D3 (12,7%); no CADIP Fernandópolis A1 (4,0%) e D3 (2,4%); em Catanduva A1 (7,1%) e D3 (6,3%); no SAE Mirassol D3 (1,6%) e A1- A2 (0,8% cada); no SAE São José do Rio Preto A1 (2,4%), A2 e D2 (1,6% cada); em Votuporanga A2 (4,0%), D3 e F2a (3,2% cada); e em Jales A1 e D3 (2,4% cada); sendo os subgenótipos A1 e

D3 mais frequentes na maioria das Unidades de Saúde.

Entre os seis pacientes que apresentaram cirrose (4,7%), dois são infectados pelo HBV/A1; dois por HBV/D3; um por HBV/A2; e um por HBV/F2a. Metade dos pacientes cirróticos apresentaram coinfeções, sendo dois pacientes coinfectados somente com HCV e um paciente com HCV e HIV. Entre os coinfectados com HCV os subgenótipos do HBV encontrados foram D3 e F2a; e no coinfectado HCV/HIV, o subgenótipo A2.

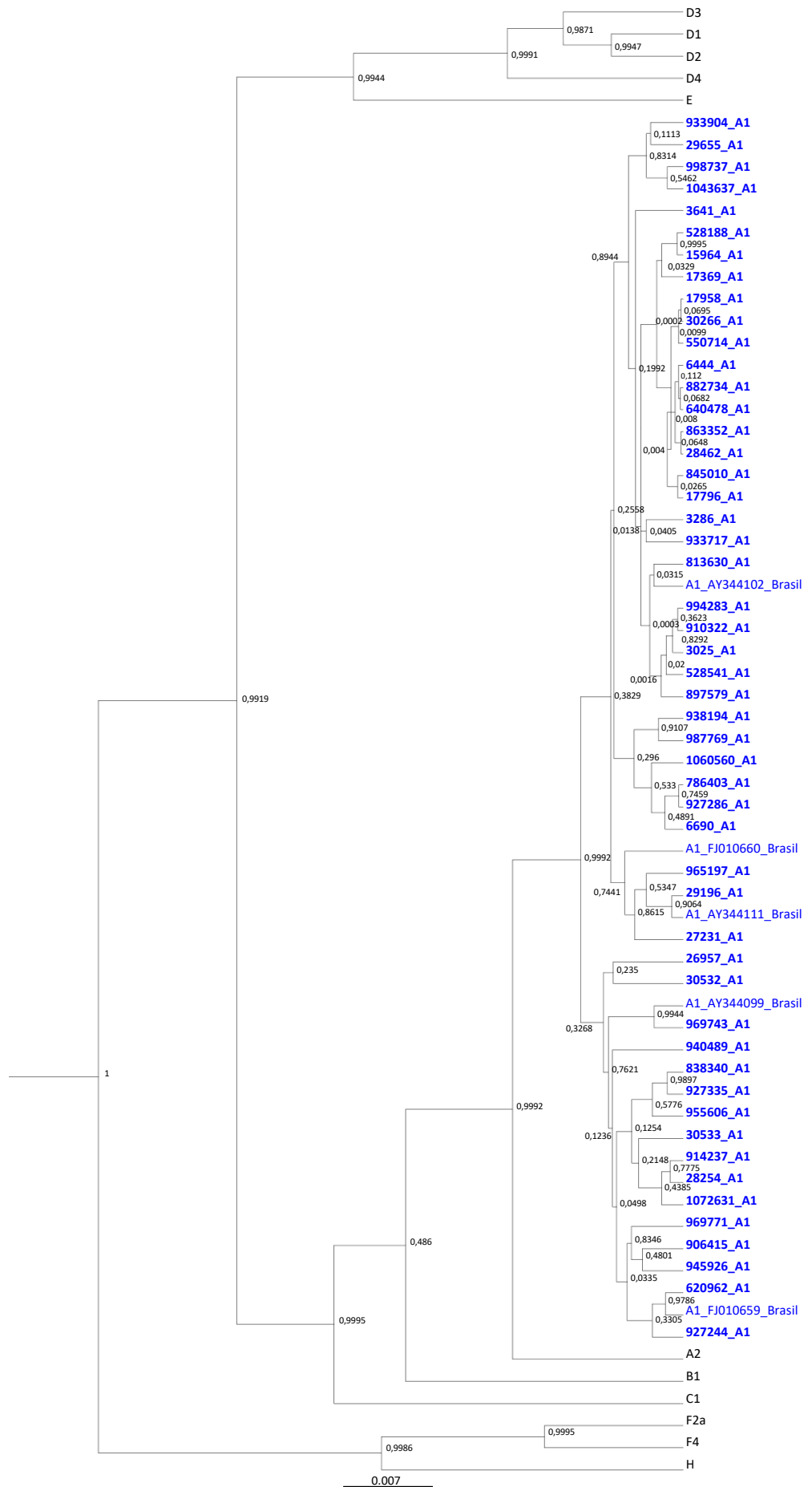
Entre os pacientes coinfectados os subgenótipos do HBV mais prevalentes foram A1 (6/16; 37,5%), A2 (3/16; 18,8%) e F2a (3/16; 18,8%). Os dois pacientes coinfectados HIV/HCV apresentaram os subgenótipos A2 e D2; e os quatro pacientes coinfectados somente com HCV apresentaram subgenótipos A1, A2, D3 e F2a. Dos dez pacientes coinfectados somente com HIV, metade apresentou subgenótipo A1, dois pacientes F2a, e os outros três A2, D2 e D3.

Nas Figuras 8 e 9 estão apresentadas as árvores filogenéticas do genótipo A, subgenótipos A1 e A2 respectivamente, das sequências obtidas neste estudo. As Figuras 10 e 11 representam as árvores do genótipo D (subgenótipos D1, D2, D3, D4), e a Figura 12 os genótipos B (B1), C (C1), E e F (F2a e F4). As sequências referências foram obtidas do GenBank.

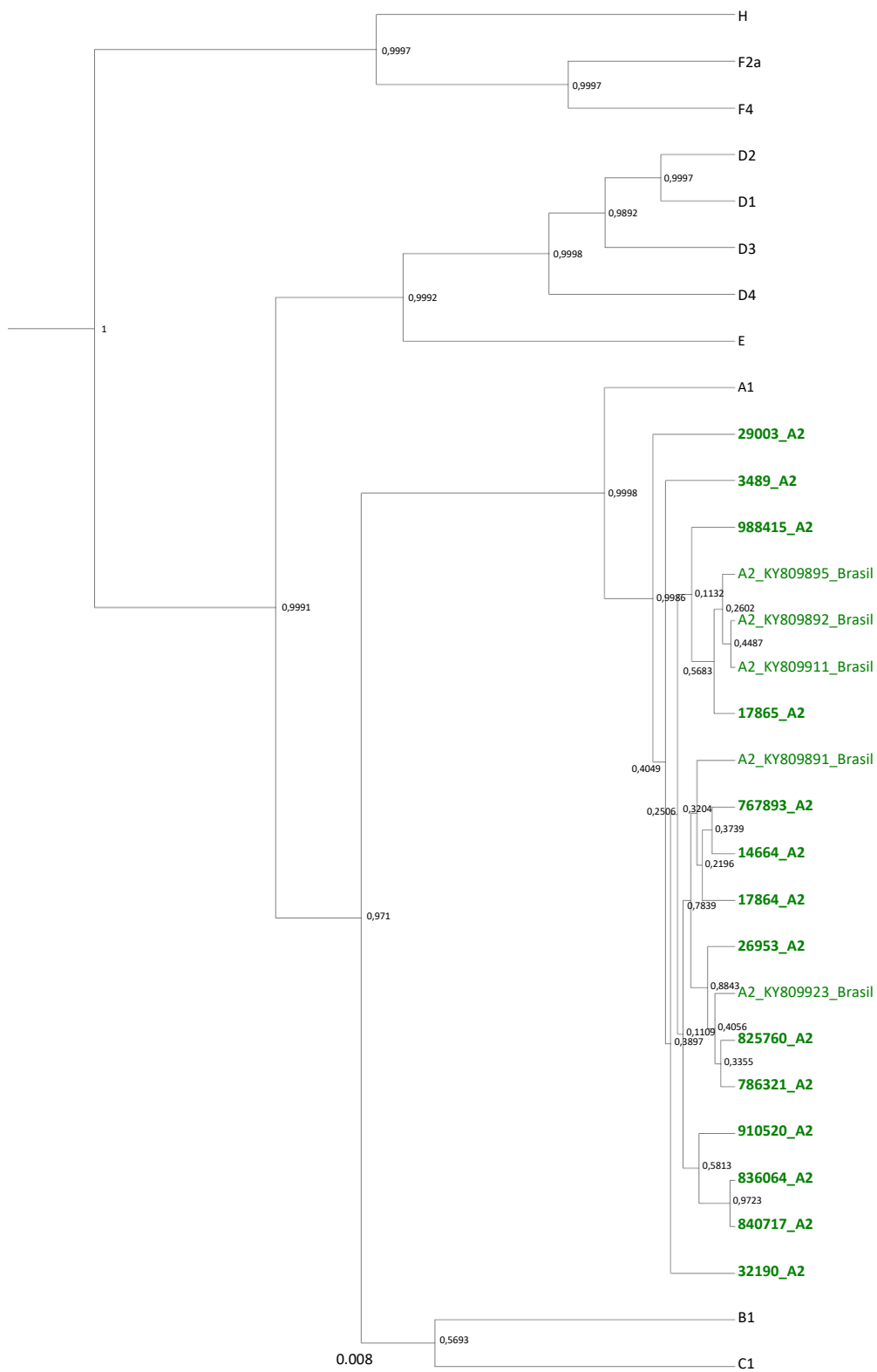
Cada genótipo/subgenótipo dividiu-se em um grupo monofilético, que foi classificado de acordo com suas sequências referências, dados que corroboraram a genotipagem realizada e já descrita anteriormente.

**Quadro 7:** Distribuição dos genótipos/subgenótipos do HBV segundo origem das amostras, por Serviço de Saúde.

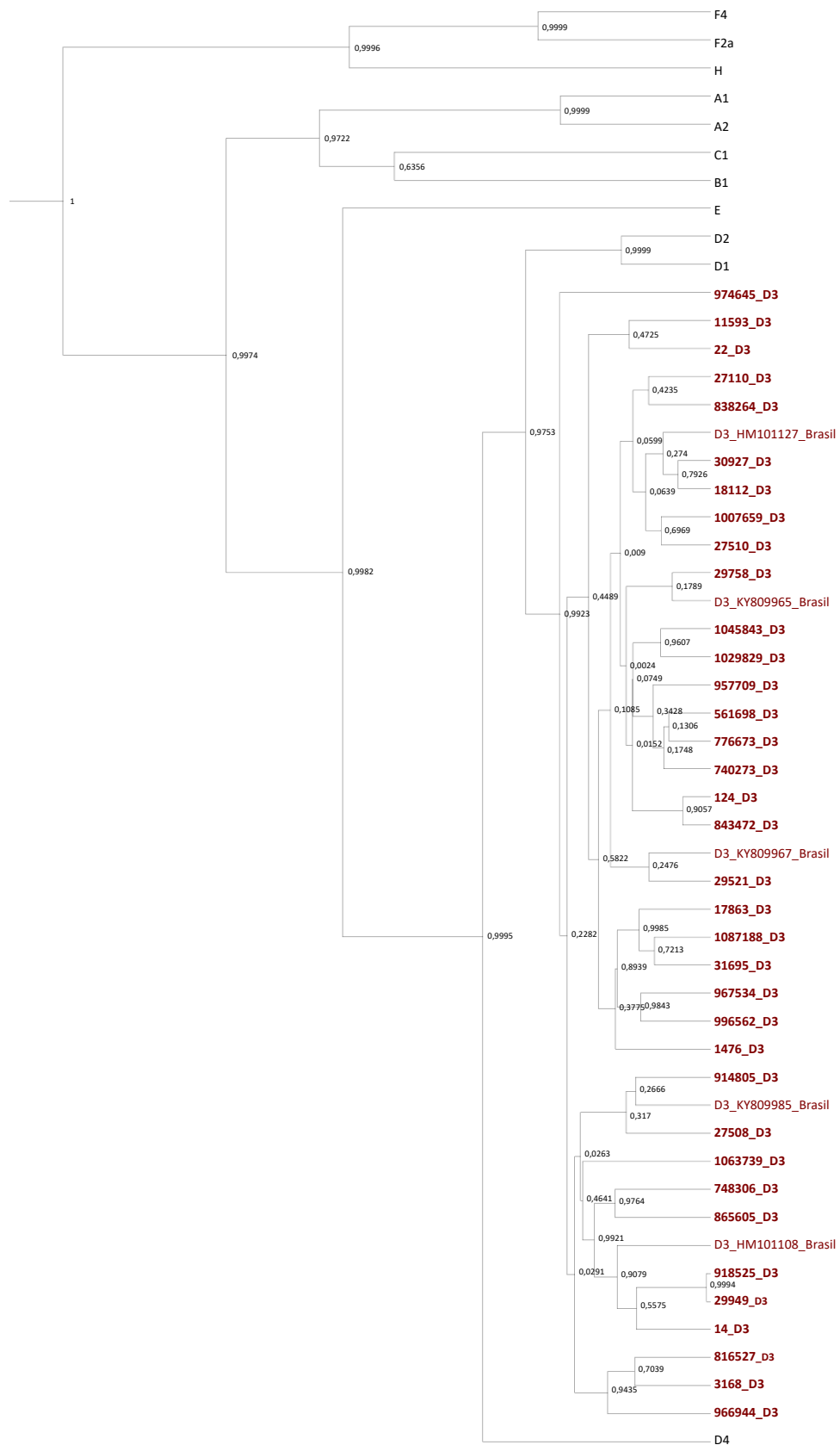
Unidades de Saúde	Genótipos/Subgenótipos																						Total	
	A		B		C		D								E		F							
	A1		A2		B1		C1		D1		D2		D3		D4				F2a		F4			
Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<b>AMHV - SJRP</b>	27	21,4	3	2,4	1	0,8	-	-	1	0,8	4	3,2	16	12,7	2	1,6	1	0,8	4	3,2	2	1,6	61	48,4
<b>CADIP - Fernandópolis</b>	5	4,0	1	0,8	-	-	1	0,8	-	-	-	-	3	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,9
<b>HEEC - Catanduva</b>	9	7,1	-	-	-	-	-	-	1	0,8	-	-	8	6,3	-	-	-	-	1	0,8	-	-	19	15,1
<b>SAE - SJRP</b>	3	2,4	2	1,6	-	-	-	-	-	-	2	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	5,6
<b>SAE - Votuporanga</b>	3	2,4	5	4,0	-	-	-	-	-	-	1	0,8	4	3,2	-	-	-	-	4	3,2	-	-	17	13,5
<b>SAE - Jales</b>	3	2,4	2	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	8	6,3
<b>SAE - Mirassol</b>	1	0,8	1	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	4	3,2
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>40,5</b>	<b>14</b>	<b>11,1</b>	<b>1</b>	<b>0,8</b>	<b>1</b>	<b>0,8</b>	<b>2</b>	<b>1,6</b>	<b>7</b>	<b>5,6</b>	<b>36</b>	<b>28,6</b>	<b>2</b>	<b>1,6</b>	<b>1</b>	<b>0,8</b>	<b>9</b>	<b>7,1</b>	<b>2</b>	<b>1,6</b>	<b>126</b>	<b>100,0</b>



**Figura 8:** Árvore Filogenética das seqüências classificadas como genótipo A, subgenótipo A1. As seqüências obtidas no estudo estão identificadas pelo número da amostra\_subgenótipo, e as seqüências referências, obtidas do GenBank, estão identificadas pelo subgenótipo\_número de acesso\_País de origem.

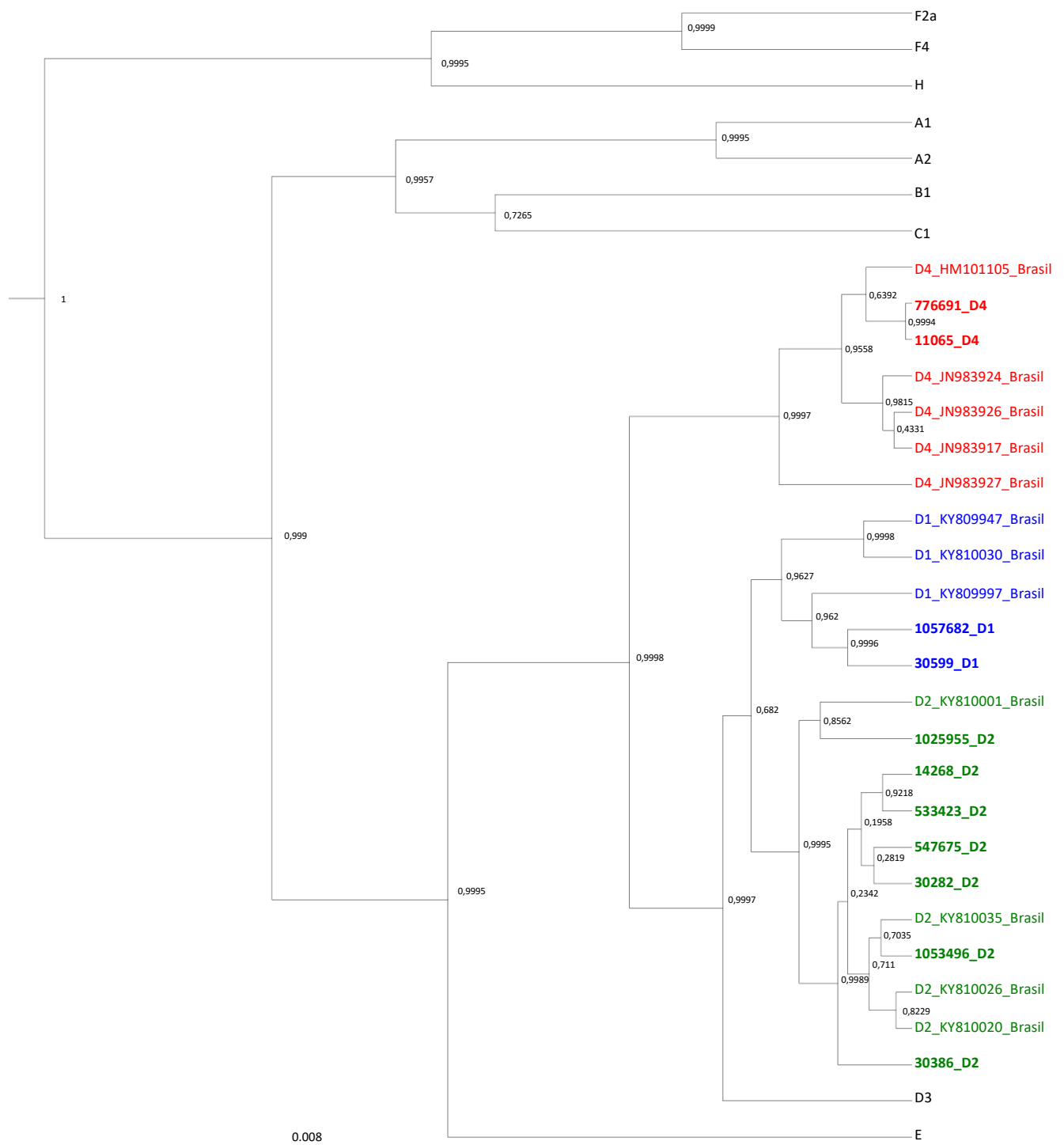


**Figura 9:** Árvore Filogenética das sequências classificadas como genótipo A, subgenótipo A2. As sequências obtidas no estudo estão identificadas pelo número da amostra\_subgenótipo e as sequências referências, obtidas do GenBank, estão identificadas pelo subgenótipo\_número de acesso\_País de origem.

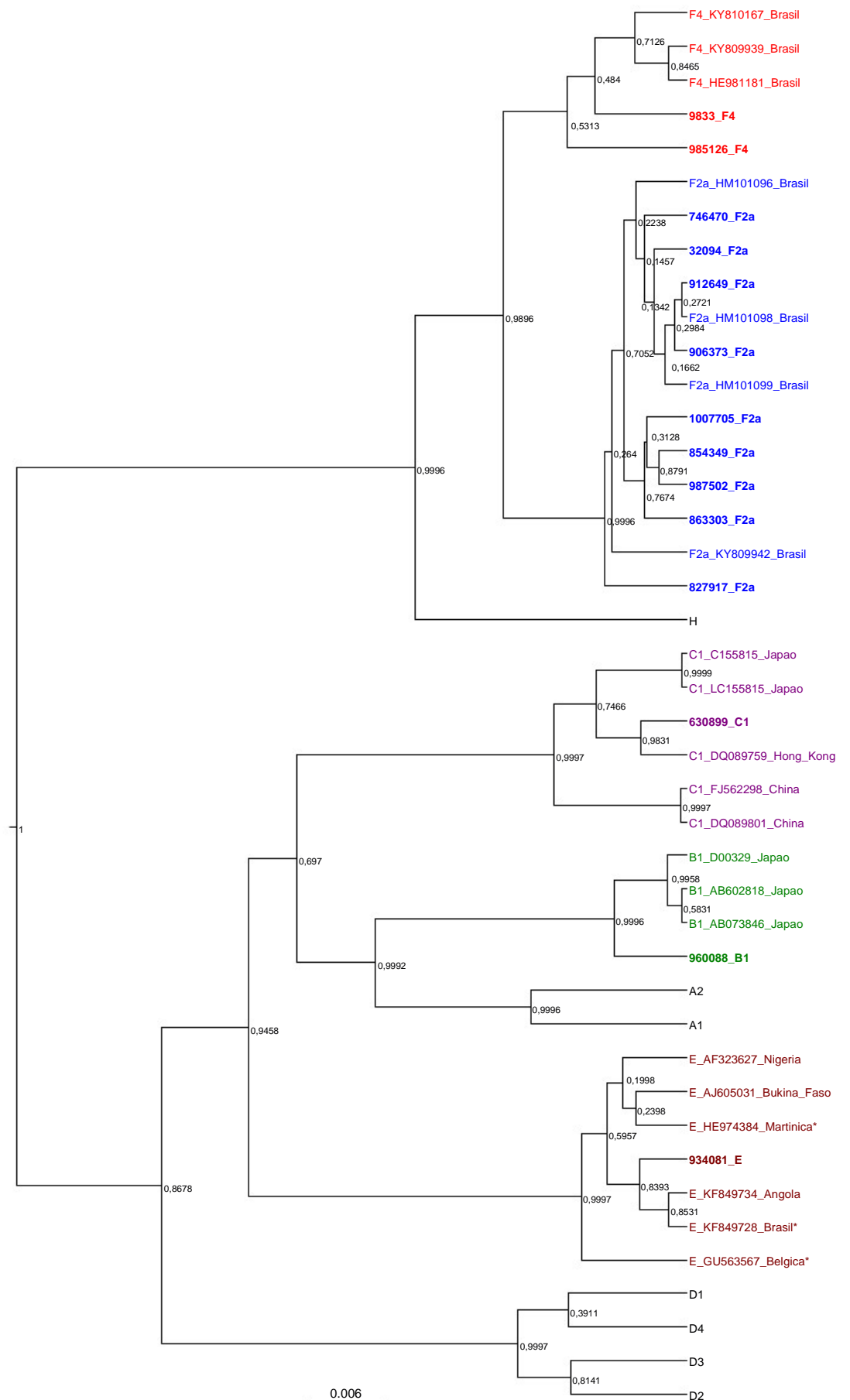


**Figura 10:** Árvore Filogenética das sequências classificadas como genótipo D, subgenótipo D3. As sequências obtidas no estudo estão identificadas pelo número da amostra\_subgenótipo, e as sequências referências, obtidas do GenBank, estão identificadas pelo subgenótipo\_número de acesso\_País de origem.





**Figura 11:** Árvore Filogenética das sequências classificadas como genótipo D, subgenótipos D1, D2 e D4. As sequências obtidas no estudo estão identificadas pelo número da amostra\_subgenótipo e as sequências referências, obtidas do GenBank, estão identificadas pelo subgenótipo\_número de acesso\_País de origem.



**Figura 12:** Árvore Filogenética das sequências classificadas como Genótipo B, C, E e F, subgenótipos B1, C1, F2a e F4. As sequências obtidas no estudo estão nomeadas pelo número da amostra\_subgenótipo, e as sequências referências, obtidas do GenBank, estão nomeadas pelo subgenótipo\_número de acesso\_País de origem. As referências do Genótipo E marcadas com o símbolo \* foram isoladas no país indicado, mas em amostras de imigrantes Africanos.

As 126 amostras genotipadas foram analisadas quanto a presença de mutações de resistência aos análogos de nucleos(t)ídeos Lamivudina (LAM), Adefovir (ADF), Entecavir (ETV), Emtricitabina (FTC), Tenofovir (TDF) e Telbivudina (LDT); e para isso divididas em dois grupos: pacientes que fazem tratamento e pacientes virgens de tratamento (formado pelos pacientes anteriormente classificados como “avaliar indicação de tratamento”, “confirmar diagnóstico” e “gestantes portadoras de HBV”).

No grupo dos pacientes que fazem tratamento, cepas do HBV com mutações de resistência (rtM204V/I/S) associadas ou não a mutações compensatórias (rtL180M, rtV173L) foram identificadas em 13,9% (5/36) das amostras analisadas. Cepas com mutações de resistência parcial ao Entecavir (rtM204V/I/S) ou potencialmente associadas com resistência ao Adefovir (rtV214A, rtL217R, rtQ215S, rtN238T e rtP237H) foram identificadas em 13,9% (5/36) e 19,4% (7/36) dos pacientes, respectivamente.

O perfil de resistência de cada amostra, com suas respectivas mutações e informações clínicas está descrito na Tabela 5, na qual se observa cinco amostras com resistência à Lamivudina e Emtricitabina, e resistência parcial ao Entecavir. Uma amostra apresentou ainda resistência a Telbivudina. Os valores de carga viral do HBV foram variados, com log médio de 5,33 ( $\pm$  1,51); o subgenótipo HBV/D3 foi o mais prevalente (40%); e a taxa de coinfeção HIV e/ou HCV foi de 50%.

No grupo de pacientes que não fazem tratamento (Figura 13), 1,1% (1/90) das amostras apresentou mutação de resistência (rtM204V) a LAM, ADF e FTC; e resistência parcial ao Entecavir, além de mutação (rtA181T) que confere resistência parcial *in vitro*, mas que não implica em resistência *in vivo* ao Tenofovir. Uma amostra (1,1%) apresentou mutação compensatória (rtV/F/L/M207I), que em geral aparece após outras variantes primárias de resistência à Lamivudina; e 26,7% (24/90) das amostras apresentaram mutações de potencial resistência ao Adefovir (rtV214A, rtL217R, rtP237H, rtN238T, rtQ215S, rtI233V). Os valores de carga viral apresentaram log médio de 4,18 ( $\pm$  1,15); o subgenótipo HBV/D3 foi o mais prevalente (46,2%); e não houve pacientes com coinfeções neste grupo.

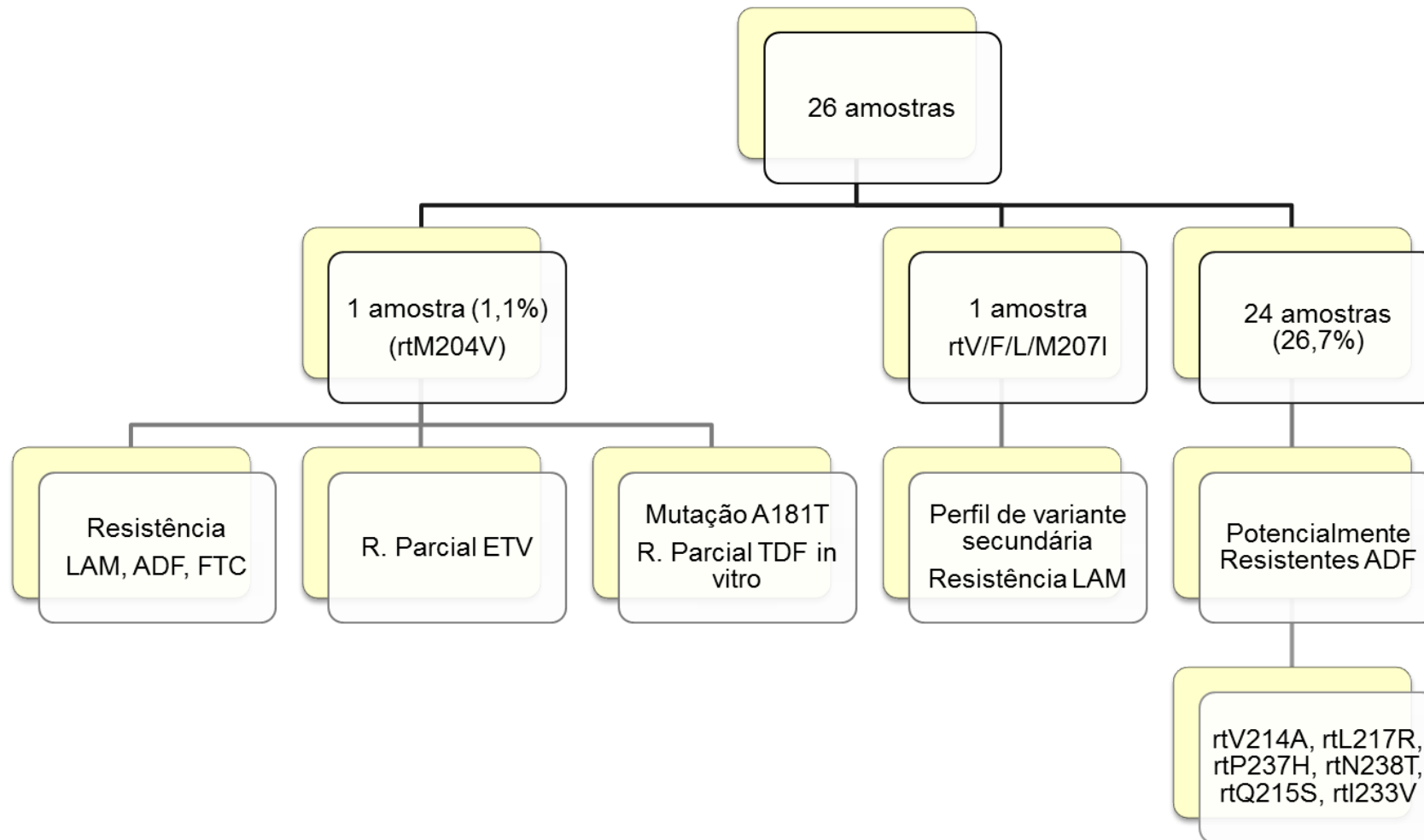
**Tabela 5:** Pacientes em tratamento para hepatite B com perfil de resistência.

ID Paciente	Subgenótipo HBV	Tratamento	Log da Carga Viral	Mutações	Perfil de Resistência						Coinfecções
					LAM	ADF	ETV	FTC	TDF	LDT	
99	D2	LAM/TDF/EFV	6,36	rtV214A	S	PTR	S	S	S	S	HIV/HCV
101	F2a	TDF	5,64	rtM204V + rtL180M	R	S	RP	R	S	S	HIV
102	A2	LAM/ADF	3,82	rtL217R	S	PTR	S	S	S	S	-
104	D3	LAM	3,34	rtM204I + rtL180M	R	S	RP	R	S	R	-
106	D3	TDF	7,14	rtV214A + rtP237H	S	PTR	S	S	S	S	-
108	A1	LAM/TDF/EFV	7,08	rtM204V + rtV173L + rtL180M	R	S	RP	R	S	S	HIV
111	D3	ETV	3,77	rtM204S + rtQ215S	R	PTR	RP	R	S	S	-
112	F2a	TDF	5,30	rtN238T	S	PTR	S	S	S	S	HIV
121	D2	TDF/LAM	3,99	rtM204S + rtQ215S	R	PTR	RP	R	S	S	HIV
126	D3	TDF (irregular)	6,89	rtV214A + rtP237H	S	PTR	S	S	S	S	-

\*LAM: Lamivudina; ADF: Adefovir; ETV: Entecavir; FTC: Emtricitabina; TDF: Tenofovir; LDT: Telvivudina; EFV: Efavirens.

\*\*S: Sensível; R: Resistente; RP: Resistência Parcial; PTR: Potencialmente Resistente.

**Figura 13:** Pacientes que não realizaram tratamento para Hepatite B, com perfil de resistência.



## 5) DISCUSSÃO

A Região Administrativa de São José do Rio Preto localiza-se no Noroeste do Estado de São Paulo, fazendo divisa com Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. É dividida em cinco regiões de governo que compreendem as cidades de Jales, Fernandópolis, Votuporanga, São José do Rio Preto e Catanduva (Secretaria de Planejamento e Gestão, 2015), e está entre as três regiões com maiores taxas de migração no Estado (Fundação SEADE, 2018), o que contribui para a intensa circulação e flutuação da população, com a possibilidade de disseminação de várias doenças. Nesta região, existem muitos pacientes em acompanhamento da Hepatite B, 191 casos foram notificados entre 2015 e 2016 (Ministério da Saúde, 2018), e este é o primeiro estudo a determinar os genótipos e subgenótipos circulantes.

Segundo o Boletim Epidemiológico Hepatites Virais 2017 (Ministério da Saúde, 2017a) a maioria de casos confirmados de Hepatite B no Brasil está concentrada na Região Sudeste, sendo a taxa de infecção pelo HBV mais elevada em homens do que em mulheres. Refletindo essa realidade, ao analisar as características dos pacientes HBV estudados, observou-se que houve predomínio do sexo masculino, com idade média aproximada de 46 anos. Características semelhantes foram verificadas em outras investigações brasileiras realizadas em Ribeirão Preto (Chachá et al, 2017), Campinas (Cunha-Silva et al, 2017) e Maranhão (Cruz-Santos et al, 2018).

Em nossas amostras, a faixa etária com maior número de casos segue o panorama nacional, o qual, nos últimos 10 anos, é caracterizado por uma detecção maior em indivíduos com 45 anos ou mais, e uma queda entre aqueles com idade inferior a 35 anos (Ministério da Saúde, 2017a). A diminuição da faixa etária predominante pode ser explicada pela implantação da vacina contra a hepatite B em 1992 para grupos de risco (Ministério da Saúde, [s. d.]), que passou em 1998, por recomendação do Programa Nacional de Imunizações (PNI), do Ministério da Saúde, a ser universal para crianças a partir do nascimento (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2006).

A distribuição dos casos segundo raça/cor mostrou maior concentração entre as pessoas de raça/cor branca, e difere do que Nabuco (2012) e Cruz-Santos (2018) descreveram para o Rio de Janeiro e Maranhão respectivamente, porém, corrobora com os dados de distribuição racial do País, para pacientes portadores de hepatite B (Ministério da Saúde, 2017a).

Nesse contexto, vale ressaltar que ocorreram aumento e diversificação dos fluxos imigratórios no Brasil, nas últimas décadas, devido a seu reposicionamento geopolítico com a emergência da crise econômica mundial de 2007, em que os países emergentes não foram tão afetados como os chamados países desenvolvidos, e os imigrantes que eram originários principalmente do norte global (europeus e asiáticos), atualmente, são provenientes também do hemisfério sul como haitianos, colombianos, senegaleses, peruanos e bengalis (Cavalcanti, 2015), que diversifica a distribuição racial em todo o país.

Entre os motivos de solicitação de carga viral do HBV, podemos observar que o teste molecular foi utilizado principalmente para acompanhamento dos pacientes, com o objetivo de monitorar ou avaliar a indicação de tratamento. Entretanto, também presente em nossos resultados, a técnica de biologia molecular foi utilizada para confirmação de diagnóstico, uso recentemente aprovado pelo Ministério da Saúde, regulamentado no Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais (Ministério da Saúde, 2015).

O diagnóstico, que anteriormente era exclusivamente sorológico, passou a contar com a especificidade e sensibilidade do teste molecular, como alternativa para a detecção cada vez mais precoce da infecção pelo HBV e para a confirmação de casos em que o HBsAg não é detectado, como nos casos de infecção oculta pelo HBV. Essa inclusão mudou o cenário de utilização do teste molecular, uma vez que ampliou sua utilização, caracterizando-o como uma ferramenta não só de acompanhamento, mas também como auxiliar no diagnóstico, tornando-o mais rápido e preciso.

Neste estudo, observamos coinfeções importantes HBV/HIV, HBV/HCV, e ainda, HBV/HCV/HIV, que chamam atenção pela quantidade e

gravidade que representam. Diversos fatores podem influenciar na aquisição dos vírus citados, que variam de acordo com fatores de risco, comportamentos individuais, perfis sociodemográficos e cobertura vacinal no caso da Hepatite B, sendo que o risco de apresentar coinfeções advém dos modos compartilhados de transmissão entre eles. Oyaró e colaboradores (2018) demonstraram que as infecções por HCV e HIV têm sido associadas ao compartilhamento de materiais entre usuários de drogas, ao passo que a coinfeção HBV/HIV foi mais comum entre não usuários, ocorrência que pode estar associada a práticas sexuais desprotegidas.

Com relação à gravidade, sabe-se que a presença de dois vírus hepatotrópicos tem sido associada a um curso grave da doença hepática e a um alto risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (Caccamo et al, 2014), bem como os fatores, presença de cirrose, sexo masculino, e coinfeção com HIV (Fattovich, 2002; Lok e McMahon, 2009; European Association for the Study of the Liver, 2012; Liaw, 2012), características que também estão presentes na população estudada.

Este cenário representa um grande desafio de saúde pública em relação ao manejo, alocação de recursos e políticas públicas de redução de danos entre usuários de drogas, principalmente injetáveis, bem como campanhas de incentivo ao uso de preservativo e sua distribuição, e requer monitoramento contínuo para o manejo efetivo dos pacientes, a fim de reduzir a mortalidade e morbidade associadas a essas infecções/coinfeções virais.

Em nossas amostras foram encontrados cinco genótipos diferentes, sendo os principais o genótipo A (A1 e A2), D (D1, D2, D3 e D4) e F (F2a e F4). Esses achados corroboram com outros estudos realizados em diferentes regiões brasileiras, em que os mesmos genótipos/subgenótipos foram encontrados (Gomes-Gouvêa et al, 2015; Gussatti et al, 2015; Barros et al, 2014; Lago et al, 2014a; Mello et al, 2013; Bertolini et al, 2012; Mello et al, 2012).

Essa diversidade na distribuição de genótipos é resultado das migrações populacionais, e vários estudos propõem que a atual distribuição



de genótipos/subgenótipos do HBV no Brasil é decorrente das migrações que ocorreram, durante o período colonial, da Europa e da África (Chachá et al, 2017), já que foi sugerido que o A1 e D4 foram introduzidos na América do Sul por escravos africanos, que seriam portadores desses subgenótipos (De Pina-Araujo et al, 2018; Barros et al, 2014), enquanto a introdução de A2, D2 e D3 tem sido relacionada à imigração europeia (De Pina-Araujo et al, 2018; Gussatti et al, 2015; Bertolini et al, 2012). Por outro lado, a presença de HBV/F2a tem sido relacionada à presença de indígenas, que vivem na região norte do país (Mello et al, 2013).

O conhecimento dos genótipos do HBV tem ganhado atenção especial, pois é essencial na predição da infectividade, modo de transmissão, resposta ao tratamento e progressão da doença (Deressa et al, 2017). Rápida progressão para doença hepática e uma alta incidência de CHC estão relacionadas ao subgenótipo A1, sendo a transmissão principalmente perinatal (Rajoriya et al, 2017).

O subgenótipo A2 vem sendo associado à transmissão sexual e parenteral do HBV em adultos (Rajoriya et al, 2017) e a progressão para a hepatite B crônica (Ozasa et al, 2006; Araújo et al, 2011), e é mais prevalente em grupos com comportamento sexual de risco, como homens que fazem sexo com homens (De Pina-Araujo et al, 2018). A diferenciação entre o subgenótipo A1 e A2 é de fato importante, pois sua biologia e desfechos são diferentes (Rajoriya et al, 2017).

Estudos sugeriram que a dispersão do HBV/A2 deve ser mais recente que a do HBV/A1, sendo que o padrão evolutivo do HBV/A2 sugere um crescimento exponencial de infecções entre 1970 e meados da década de 1990 (Zehender et al, 2014; Zehender et al, 2015).

Os subgenótipos D2 e D3, estão relacionados ao perfil HBeAg negativo, e a progressão para hepatite B crônica e cirrose (Mello et al. 2007, McMahon 2009, Araújo et al. 2011). O genótipo F, subgenótipo F2, é característico da população indígena das Américas, têm suas implicações clínicas ainda pouco conhecidas, uma vez que frequentemente está associado à coinfeção com o HDV (Araújo et al, 2011).

Neste estudo, foram encontrados também os genótipos B, C e E. O genótipo B, subgenótipo B1, foi identificado em paciente do sexo masculino, 57 anos, descendente de orientais, nascido no Brasil. A referida amostra, em análise filogenética, apresentou semelhança com sequências referências provenientes do Japão, onde esse genótipo é mais prevalente. O paciente não desenvolveu cirrose nem carcinoma hepatocelular, apesar desse genótipo ser associado ao desenvolvimento de hepatite fulminante, e não realizava tratamento. Possuía carga viral de 2.529 UI/mL, sem coinfeções.

O genótipo C, subgenótipo C1, foi identificado em paciente do sexo feminino, 34 anos, nascida na China. A análise filogenética demonstrou semelhança com sequência referência isolada em Hong Kong, localizada no continente asiático onde o genótipo C é mais prevalente. A paciente encontrava-se em tratamento com Tenofovir, com carga viral de 2.358 UI/mL, sem coinfeções, nem desenvolvimento de cirrose ou CHC.

O genótipo do HBV pode fornecer pistas sobre as possíveis vias de transmissão em certas áreas geográficas, servindo como uma ferramenta epidemiológica para seguir rotas de transmissão (Rajoriya et al, 2017). Tendo em vista que os genótipos B e C não são comuns no Brasil, é possível supor duas hipóteses de possíveis modos de infecção para o HBV nestes dois casos: transmissão vertical ou viagem para os locais endêmicos desses genótipos com comportamento de risco. Porém, considerando que na Ásia, onde os genótipos B e C são mais prevalentes, a principal via de transmissão é a vertical (Rajoriya et al, 2017), e que os referidos pacientes são descendentes ou provenientes dessa região, essa é a hipótese mais provável. A infecção perinatal causa infecção crônica em 90% dos recém-nascidos, com infecção na primeira infância levando a 20-40% de cronicidade, ao passo que infecções na idade adulta resultam em 0-10% de cronicidade (Beasley et al, 1977; McMahon et al, 1985).

O genótipo E foi identificado em paciente do sexo masculino, negro, 38 anos, nascido na Angola. A referida amostra, em análise filogenética, apresentou semelhança com sequências referências isoladas em outro estudo brasileiro com pacientes Angolanos portadores desse genótipo (Lago

et al, 2014b). O paciente possuía carga viral de 12.930 UI/mL, sem coinfeções, e ainda não realizava tratamento.

Distinto da maioria dos genótipos, o HBV/E possui um baixo grau de diversidade genética. Devido a sua baixa variabilidade genética e ao fato deste genótipo ser encontrado exclusivamente na África ou em descendentes de africanos, Mulders e colaboradores sugeriram que a introdução do genótipo E na população humana é um acontecimento recente que ocorreu de meados para o final do Século 19, quando o tráfico de escravos acabou. Fora da África, os isolados de HBV/E são esporadicamente encontrados nas Américas, indicando que esse genótipo foi introduzido na população africana provavelmente nos últimos 130 anos (Andernach et al, 2009; Andernach et al, 2013).

Nos últimos 20 anos no Brasil, avanços significativos no tratamento da hepatite B crônica ocorreram, inicialmente com o uso de interferon (IFN) alfa, que permitiu alterar a progressão natural da doença (Pacheco et al, 2017). Atualmente, segundo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e coinfeções (Ministério da Saúde, 2017b), que direciona a conduta terapêutica, não é recomendado o uso dos medicamentos alfainterferona e adefovir; foi adicionado ao arsenal terapêutico do SUS a alfapeguinterferona, citocina com ação antiviral e imunomoduladora; e ampliou-se a participação de entecavir e tenofovir, análogos nucleos(t)ídeos de maior eficácia e barreira genética.

O uso prolongado de antivirais pode determinar o desenvolvimento de resistência, um dos maiores desafios para o tratamento da hepatite B, e sua detecção precoce é extremamente importante para o sucesso da terapia. Tem se tornado cada vez mais evidente que as mutações relacionadas à resistência aos antivirais nem sempre são induzidas pela terapia, podendo ser observadas em indivíduos virgens de tratamento (Oliveira, 2013; Pacheco et al, 2017). No presente estudo foi observada presença de mutações de resistência nos dois casos: pacientes com ou sem tratamento, aos fármacos Lamivudina, Adefovir e Emtricitabina; resistência parcial ao Entecavir, e resistência potencial ao Adefovir.

Quanto maior o tempo de tratamento maior a probabilidade de surgir mutantes resistentes, apresentando um coeficiente de incidência de 6%, 31% e 51% em 12, 24 e 48 meses respectivamente, em pacientes tratados com LAM, sendo que a resistência pode aparecer a partir do 9º mês de tratamento (Thompson et al, 2006). Embora ainda existam poucos estudos, acredita-se que o genótipo também possa ter influência no desenvolvimento de resistência a este antiviral (Zöllner et al, 2004; Bottecchia et al, 2008; Haddad et al, 2010).

Alguns estudos mostraram que os genótipos HBV A e D estão associados com taxas mais altas de resistência a LAM e resistência a ADF (Kobayashi et al, 2006; Schildgen et al, 2006; Osioy et al, 2006; Fung et al, 2006). Algumas correlações entre os genótipos do HBV e a seleção de mutações específicas podem existir, no entanto, a maioria dos estudos mostrou que os genótipos do HBV não têm relevância para o tratamento, nem para a taxa emergente de mutações que conferem resistência aos medicamentos (Westland et al, 2003; Zöllner et al, 2004; Yuen et al, 2003; Kim et al, 2011).

Finalmente, a resistência promovida pela monoterapia da LAM pode desencadear resistência do HBV aos demais análogos de nucleos(t)ídeos, a exemplo do ADV (Schildgen et al, 2010). O desenvolvimento de resistência ao ADV é mais lento comparado a LAM, com a taxa reportada de 2% aos dois anos e 29% aos cinco anos de tratamento (Hadziyannis et al, 2006; Yang et al, 2002), entretanto, seu uso não é recomendado pelo Ministério da Saúde, assim como a LAM.

A presença de resistência pode ser efetivamente suprimida usando um análogo de nucleos(t)ídeo de diferente grupo estrutural. No entanto, a resistência a múltiplas drogas pode se tornar um problema no futuro. Para prevenir e minimizar o surgimento de resistência aos medicamentos, o tratamento é feito com análogos de nucleos(t)ídeos que causam supressão viral rápida com uma alta barreira genética à resistência, tais como ETV e TDF, que possuem taxas significativamente mais baixas de resistência em comparação com aqueles com baixa barreira genética para resistência,

como LAM, ADF e LDT, fornecendo assim a melhor chance de alcançar o objetivo principal de tratamento: prevenção da progressão da doença hepática (Bang e Kim, 2014).

Do mesmo modo, é importante acompanhar a presença de resistência em pacientes virgens de tratamento, devido à preexistência de mutações que precisam ser investigadas e rastreadas. A eficácia terapêutica do tratamento antiviral pode ser afetada pela infecção por cepas virais resistentes aos medicamentos.

Para um paciente, sem tratamento prévio, portador de uma cepa com mutações de resistência, deve-se questionar se vale a pena iniciar o tratamento com uma droga para a qual a mutação produz resistência. Esta informação, antes do início do tratamento, pode contribuir para a tomada de decisão clínica, redução do insucesso terapêutico e o risco de progressão para cirrose e hepatocarcinoma (Pacheco et al, 2017), porém estudos são necessários para justificar a implantação de testes de resistência a antivirais antes da prescrição da terapia.

## 6) CONCLUSÃO

- Na região de São José do Rio Preto, cinco genótipos diferentes do HBV foram encontrados: A, B, C, D, E e F, sendo o A, D e F predominantes, assim como em outras regiões brasileiras estudadas;
- Uma grande diversidade de subgenótipos foi observada: A1, A2, B1, C1, D1, D2, D3, D4, F2a e F4. O HBV/A1 foi o mais prevalente, seguido pelo D3;
- Os genótipos B, C e E não são comuns no Brasil, porém foram identificados em pacientes descendentes ou provenientes de regiões onde esses genótipos são endêmicos;
- A grande diversidade de genótipos/subgenótipos observada reflete a intensa migração que ocorre para a região estudada, em virtude de sua importância como um centro de referência em saúde;
- Todos os pacientes eram portadores de hepatite B crônica com presença de cirrose em seis casos, em que os subgenótipos A1 e D3 foram os mais frequentes;
- As coinfeções HIV e/ou HCV estavam presentes em 12,6% dos pacientes, sendo os subgenótipos A1, A2 e F2a os mais identificados neste grupo;
- Entre os pacientes que fazem tratamento, cepas do HBV com mutações de resistência à Lamivudina, Emtricitabina e resistência parcial ao Entecavir foram identificadas em 13,9%, e mutações potencialmente associadas com resistência ao Adefovir em 19,4%, das amostras analisadas;

- Mutações de Resistência à Lamivudina, Adefovir, Emtricitabina e resistência parcial ao Entecavir, e resistência potencial ao Adefovir, foram observadas em 1,1% e 26,7% dos pacientes virgens de tratamento, respectivamente;
- Entre as cepas do HBV, com mutações de resistência aos análogos de núcleos(t)ídeos, o perfil de mutações que confere potencial resistência ao adefovir parece ser o mais disseminado nesta população, porém, resistência total à lamivudina e emtricitabina; e resistência parcial ao entecavir foram observadas em metade dos pacientes em tratamento com perfil de resistência;
- A caracterização dos diferentes subgenótipos do HBV pela análise filogenética corroborou a classificação obtida pelo software online utilizado neste estudo;
- Este trabalho demonstra a importância da Hepatite B na região de São José do Rio Preto, onde ocorre intensa mobilidade urbana pelo potencial de migração, e comprova a necessidade de uma vigilância sempre ativa, para o manejo efetivo dos pacientes HBV crônicos, a fim de reduzir a mortalidade e morbidade associadas a essa infecção viral.

## REFERÊNCIAS

Abbott Molecular. Manual de Procedimentos Operacionais. 2013.

Abreu RM. Avaliação dos desfechos virológicos e de adesão ao tratamento antiviral em pacientes portadores de hepatite B crônica. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo: 2017.

Alvarado-Mora MV, Botelho-Lima LS, Santana RA, et al. Distribution of hepatitis B virus subgenotype F2a in São Paulo, Brazil. *BMC Res Notes* 2013; 6:423.

Alvarado-Mora MV, Pinho JR. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antivir Ther.* 2013; 18(3):459-65.

Andernach IE, Hubschen JM, Muller CP. Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. *Rev Med Virol.* 2009; 19(4): 231-40.

Andernach IE, Hunewald OE, Muller CP. Bayesian inference of the evolution of HBV/E. *PLoS One.* 2013; 8(11):e81690.

Araújo NM, Waizbort R, Kay A. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: how viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infect Genet Evol* 2011; 11(6): 1199-207.

Baldick CJ, Tenney DJ, Mazzucco CE, Eggers BJ, Rose RE, Pokornowski KA, Yu CF, Colonno RJ. Comprehensive evaluation of hepatitis B virus reverse transcriptase substitutions associated with entecavir resistance. *Hepatology* 2008; 47: 1473-1482.

Bang KB, Kim HJ. Management of antiviral drug resistance in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2014; 20(33):11641-11649.



Barros LM, Gomes-Gouvea MS, Kramvis A, et al. High prevalence of hepatitis B subgenotypes A1 and D4 in Maranhao State, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol* 2014; (24): 68-75.

Bartholomeusz A, Locarnini S. Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *J Med Virol* 2006; 78: S52-S55.

Beasley RP, Trepo C, Stevens CE, Szumness W. The e antigen and vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Am J Epidemiol* 1977; 105:94-98.

Bertolini DA, Gomes-Gouvêa MS, Guedes de Carvalho-Melo IM, et al. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect Genet Evol* 2012; (12):1295-1304.

Biasini, R. Hepatitis B virus. 2018. [Acesso em 10 abr 2018]. Disponível em: [https://www.123rf.com/photo\\_14557741\\_hepatitis-b-virus.html](https://www.123rf.com/photo_14557741_hepatitis-b-virus.html).

Bottecchia MS, et al. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. *BMC Microbiol.* 2008; 8(11): 1-10.

Caccamo G, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20(40):14559-14567.

Cavalcanti L. Imigração e mercado de trabalho no Brasil: Características e tendências. 2015. [Acesso em 10 jun 2018]. Disponível em: <https://oestrangero.org.files.wordpress.com/2014/11/relatorio-parcialainse-rc-3a7ao-dos-imigrantes-no-mercado-de-trabalho-brasileiro.pdf>.

Chachá SGF, Gomes-Gouvêa MS, Malta FM, Ferreira SC, Villanova MG, Souza FF, Teixeira AC, Passos ADC, Rebello-Pinho JR, Martinelli ALC.

Distribution of HBV subgenotypes in Ribeirão Preto, Southeastern Brazil: a region with history of intense Italian immigration. *Braz J Infect Dis* 2017; 21(4): 424-432.

Cornelissen M, Zorgdrager F, Bruisten SM, Bakker M, Berkhout B, van der Kuyl AC. Widespread hepatitis B virus genotype G (HBV-G) infection during the early years of the HIV epidemic in the Netherlands among men who have sex with men. *BMC Infect Dis*. 2016; 16:268.

Cruz-Santos MD, Gomes-Gouvêa MS, Costa-Nunes JD, Malta-Romano C, Teles-Sousa M, Fonseca-Barros LM, Carrilho FJ, Paiva-Ferreira AS, Rebello-Pinho JR. High Prevalence of Hepatitis B Subgenotype D4 in Northeast Brazil: an Ancient Relic from African Continent?. *Ann Hepatol*. 2018; 17(1):54-63.

Cunha-Silva M, et al. Retrospective analysis of hepatitis B virus chronic infection in 247 patients: clinical stages, response to treatment and poor prognostic factors. *Braz J Infect Dis* 2017; 21(4): 441-447.

De Pina-Araujo IIM, Spitz N, Soares CC, Niel C, Lago BV, Gomes SA. Hepatitis B virus genotypes A1, A2 and E in Cape Verde: Unequal distribution through the islands and association with human flows. *PLoS ONE* 2018; 13(2): e0192595.

Deressa T, Damtie D, Fonseca K, et al. The burden of hepatitis B virus (HBV) infection, genotypes and drug resistance mutations in human immunodeficiency virus-positive patients in Northwest Ethiopia. *PLoS ONE* 2017; 12(12):e0190149.

DiMattia MA, Watts NR, Stahl SJ, Grimes JM, Steven AC, Stuart DI, Wingfield PT. Antigenic switching of hepatitis B virus by alternative dimerization of the capsid protein. *Structure*. 2013; 21:133–142.

Espírito-Santo, MP, Mello FCDA, Cruz JNM, Lewis-Ximenez LL, Lampe, E. An update on hepatitis B virus genotypes circulating in two Brazilian regions. *J Viral Hepat.* 2015; (22): 36-37.

European Association For The Study Of The Liver. Normas de Orientação Clínica da EASL: abordagem da infecção crônica pelo vírus da hepatite B. *J Hepatol* 2012; (57):167-185.

Fattovich G. Natural history of hepatitis B. Meeting of the European Association for the Study of the Liver. EASL, 2002.

Fragoso-Fonseca DE, Escobar-Escamilla N, Lloret y Sánchez LT, Wong-Arámbula CE, Hernández-Rivas L, Díaz-Quiñonez JA, Ramírez-González JE. Full genome and phylogenetic analysis of hepatitis B virus genotype F in Mexican isolates. *Arch Virol* 2018; 163(7):1981-1984.

Fu L, Cheng Y-C. Role of Additional Mutations outside the YMDD Motif of Hepatitis B Virus Polymerase in  $\mu(-)$ SddC (3TC) Resistance. *Biochemical Pharmacology* 1998; 55 (10): 1567-1572.

Fundação SEADE. Portal de estatísticas do Estado de São Paulo. 2018. [Acesso em 11 Jan 2018]. Disponível em: <http://www.imp.seade.gov.br/frontend/#/>.

Fung SK, Chae HB, Fontana RJ, Conjeevaram H, et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2006; 44: 283-290.

Gomes SA, Araújo NM. Genoma do Vírus da Hepatite B. In: FOCACCIA, R. Tratado de hepatites virais e doenças associadas. São Paulo: Atheneu; 2013. p. 291-300.

Gomes-Gouvêa MS. Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite B entre pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B não submetidos a tratamento. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo: 2014.

Gomes-Gouvêa MS, Bensabath G, De Carvalho-Mello I, Brito E, Souza O, Queiroz A, Carrilho F, Pinho JR. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *Gen Virol* 2009; 90(11): 2638-2643.

Gomes-Gouvêa MS, Ferreira AC, Teixeira R, et al. HBV carrying drug-resistance mutations in chronically infected treatment-naive patients. *Antivir Ther* 2015; (20): 387-395.

Gonçales Junior FL. Hepatite por Vírus B: História Natural da Infecção. In: FOCACCIA, R. Tratado de hepatites virais e doenças associadas. São Paulo: Atheneu; 2013. p. 291-300.

Gusatti CS, Costi C, Halon ML, et al. Hepatitis B virus genotype D isolates circulating in Chapeco, Southern Brazil, originate from Italy. *PLoS One* 2015; 10:p. e0135816

Haddad RM, et al. Hepatitis B virus genotyping among chronic hepatitis B patients with resistance to treatment with lamivudine in the city of Ribeirão Preto, State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:224-228.

Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterol* 2006; 131: 1743-1751.

Hu J, Liu K. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses*. 2017; 9(3):56.

Hu J, Seeger C. Hepadnavirus genome replication and persistence. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015; 5:a021386.

Hu J. Hepatitis B virus virology and replication. In: Liaw YF, Zoulim F, editors. *Hepatitis B Virus in Human Diseases*. Humana Press; New York, NY, USA: Dordrecht, The Netherlands: London, UK: 2016. pp. 1–34.

Hundie GB, Stalin Raj V, Gebre Michael D, Pas SD, Koopmans MP, Osterhaus AD, Smits SL, Haagmans BL. A novel hepatitis B virus subgenotype D10 circulating in Ethiopia. *J Viral Hepat.* 2017; 24(2):163-173.

Ji D, Liu Y, Si LL, Li L, Chen GF, Xin SJ, Zhao JM, Xu D. Variable influence of mutational patterns in reverse-transcriptase domain on replication capacity of hepatitis B virus isolates from antiviral-experienced patients. *Clin Chim Acta* 2011; 412(3-4): 305-313.

Ji D, Liu Y, Li L, Xu Z, Si LL, Dai JZ, Li X, Wang L, Yao Z, Xin SJ, Chen GF, Xu D. The rtL229 substitutions in the reverse transcriptase region of hepatitis B virus (HBV) polymerase are potentially associated with lamivudine resistance as a compensatory mutation. *J Clin Virol* 2012; 54(1): 66 – 72.

Karatayli E, Karayalçin S, Karaaslan H, Kayhan H, Türkyilmaz AR, Sahin FP, Yurdaydin C, Bozdayi AM. A novel mutation pattern emerging during lamivudine treatment shows cross-resistance to adefovir dipivoxil treatment. *Antivir Ther* 2007; 12 (5): 761-768.

Karatayli E, Karatayli SC, Cinar K, Gokahmetoglu S, Güven K, Idilman R, Yurdaydin C, Bozdayi AM. Molecular characterization of a novel entecavir mutation pattern isolated from a multi-drug refractory patient with chronic hepatitis B infection. *J Clin Virol* Volume 2012; 53(2): 130-134.

Kim BK, Revill PA, Ahn SH. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2011; 16: 1169-1186.

Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, et al. Response to long-term lamivudine treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. *J Med Virol* 2006; 78: 1276-1283.

Lago BV, Mello FC, Kramvis A, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B virus subgenotype A1: evolutionary relationships between Brazilian, African and Asian isolates. *PLoS One* 2014a; 9:e105317.

Lago BV, Mello FC, Ribas FS, et al. Analysis of Complete Nucleotide Sequences of Angolan Hepatitis B Virus Isolates Reveals the Existence of a Separate Lineage within Genotype E. *PLoS ONE*. 2014b; 9(3):e92223.

Leão RN, et al. *Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia*. Belém: Samauma Editorial; 2013. v. 1.

Lee Y, Chung Y, Kim JA, Kim SE, Shin J W, Kim KM, Lim Y, Park NH, Lee HC, Lee YS, Suh DJ. Hepatitis B virus with the rtL80V/I mutation is associated with a poor response to adefovir dipivoxil therapy. *Liver Int* 2009; 29: 552-556.

Lee Y, Chung Y, Kim JA, Jin YJ, Park WH, Kim SE, Lee D, Shim JH, Kim KM, Lim YS, Lee HC, Lee YS, Suh DJ. rtL180M mutation of hepatitis B virus is closely associated with frequent virological resistance to adefovir dipivoxil therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 300-305.

Liaw YF, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update. *Hepatol Int* 2012; (6): 531-561.

Liu LJ, Wang JH, Du SC, Tian JH, Yang RF, Wei L. rtE218G, a novel hepatitis B virus mutation with resistance to adefovir dipivoxil in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2010; 17: 66-72.

Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis* 2005; 25(1):9-19.

Locarnini S, et al. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J Hepatol* 2015; (62): S76 - S86.

Locarnini S, Yuen L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antivir Ther* 2010; 15:451-461.

Locarnini S, Mason WS. Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. *J Hepatol* 2006; 44(2): 422 – 431.

Lok ASF, McMahon, BJ. AASLD practice guideline update: chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatol* 2009; 3(50): 661-662.

Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky J, Liaw Y, Mizokami M, Kuiken C. Antiviral drug-resistant HBV: Standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007; 46: 254-265.

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Elsevier; 2010.

Marinho TA, Lopes CLR, Teles SA, et al. Epidemiology of hepatitis B virus infection among recyclable waste collectors in central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*; 2014; 47(1): 18-23.

McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis* 1985; 151: 599–603.

McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2009; 3: 334-342.

Mello FCA, et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 2007; 7:103.

Mello FC, Fernandes CA, Gomes AS. Antiviral therapy against chronic hepatitis B in Brazil: high rates of lamivudine resistance mutations and correlation with HBV genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; (107):317-325.

Mello FC, Araujo OC, Lago BV, et al. Phylogeography and evolutionary history of hepatitis B virus genotype F in Brazil. *Virol J* 2013; 10:236.

Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatol* 2003; 38:1075–1086.

Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico – Hepatites Virais. Brasília (DF); 2017a.

Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Painel de indicadores epidemiológicos. 2018. [Acesso em 10 jan 2018]. Disponível em <http://indicadoreshepatites.aids.gov.br/>.

Ministério da Saúde. Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais. Brasília (DF); 2015.



Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. Brasília (DF); 2011.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite viral crônica B e coinfecções. Brasília (DF); 2017b.

Ministério da Saúde. Centro Cultural da Saúde. Revista da Vacina. [s. d.] [Acesso em 06 jun 2018]. Disponível em: <http://www.ccms.saude.gov.br/revolta-/ltempo.html>.

Mojsiejczuk LN, Torres C, Fainboin HA, Galdame OA, Campos RE, Flichman DM. Identification of a new clade of hepatitis B virus genotype F. *Infection, Genetics and Evolution* 2015; (34) 122–125.

Nabuco LC, et al. Hepatitis B virus genotypes in Southeast Brazil and its relationship with histological features. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2012; 107(6): 758-789.

Oliveira MP. Estudo Molecular da Infecção pelo Vírus da Hepatite B em pacientes coinfectados pelo HIV, virgens de tratamento, em Goiânia-Goiás. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2013.

Organização Mundial da Saúde. WHO guidelines on hepatitis B and C testing. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Osiowy C, Villeneuve JP, Heathcote EJ, Giles E, Borlang J. Detection of rtN236T and rtA181V/T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil in samples from patients with chronic hepatitis B virus infection by the INNO-LiPA HBV DR line probe assay (version 2). *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1994-1997.

Oyaro M, Wylie J, Chen C-Y, Ondondo RO, Kramvis A. Human immunodeficiency virus infection predictors and genetic diversity of hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infections among drug users in three major Kenyan cities. *South Afr J HIV Med* 2018; 19(1):737.

Ozaras R, Inanc Balkan I, Yemisen M, Tabak F. Epidemiology of HBV subgenotypes D. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015; 39(1):28-37.

Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 44(2): 326-34.

Pacheco SR, dos Santos MIMA, Stocker A, et al. Genotyping of HBV and tracking of resistance mutations in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B. *Infect Drug Resist* 2017; 10:201-207.

Qin Bo, Pei R, He TT, Huang ZH, Pan GS, Tu CY, Lu MJ, Chen XW. Polymerase mutations rtN238R, rtT240Y and rtN248H of hepatitis B virus decrease susceptibility to adefovir. *Chinese Science Bulletin* 2013; 58(15): 1760-1766.

Rajoriya N, Combet C, Zoulim F, Janssen HLA. How viral genetic variants and genotypes influence disease and treatment outcome of chronic hepatitis B. Time for an individualised approach?. *J Hepatol* 2017; 67(6):1281-1297.

Reaiche GY, Le Mire MF, Mason WS, Jilbert AR. The persistence in the liver of residual duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA is not dependent upon new viral DNA synthesis. *Virology*. 2010; 406:286–292.

Roman S, Panduro A. HBV endemicity in Mexico is associated with HBV genotypes H and G. *World J Gastroenterol* 2013; 19(33): 5446-5453.

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

Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, et al. Characterization of Hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. *Virology* 2010; 7:315.

Schildgen O, Sirma H, Funk A, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006; 354: 1807-1812.

Schildgen O, et. al. Selection and Counterselection of the rtI233V Adefovir Resistance Mutation during Antiviral Therapy. *J Clin Microbiol* 2010; 48(2): 631-634.

Schweitzer A, et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *The Lancet* 2015; 386(10003): 1546-1555.

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Vacina contra hepatite B. *Rev Saúde Pública* 2006; 40(6): 1137-1140.

Secretaria de Planejamento e Gestão – Governo do Estado de São Paulo. O estado dos Municípios 2010-2012. Índice Paulista de Responsabilidade Social. Síntese das Regiões Administrativas. São Paulo (SP); 2015.

Seeger C, Litwin S, Mason WS. Hepatitis B virus: Persistence and clearance. In: Liaw YF, Zoulim F, editors. *Hepatitis B Virus Virology and Replication*. Humana Press; New York, NY, USA: Dordrecht, The Netherlands: London, UK: 2016.

Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: Mechanisms, detection and interpretation. *J Hepatol*, 2006; 44(3): 593 – 606.

Sheldon J, Rodès B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006; 13: 427-434.

Shi W, Zhu C, Zheng W, Carr MJ, Higgins DG, Zhang Z. Subgenotype reclassification of genotype B hepatitis B virus. *BMC Gastroenterol*. 2012; 12:116.

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

Souto FJD. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 century. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015; 49: 11-23.

Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001; 33: 751-757.

Sunbul, M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol* 2014; 18(20): 5427-5434.

Tan ZM, Sun BC. Effects of antiviral therapy on preventing liver tumorigenesis and hepatocellular carcinoma recurrence. *World J Gastroenterol* 2013; (19): 8895-8901.

Tang CM, Yau TO, Yu J. Management of chronic hepatitis B infection: Current treatment guidelines, challenges, and new developments. *World J Gastroenterol* 2014; 20(20):6262-6278.

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009; 83(20):10538–47.

Thompson AJVA, et. al. Lamivudine resistance in patients with chronic hepatitis B: Role of clinical and virological factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 22: 1078-1085.

Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317:489-495.

U.S. Department Of Health & Human Services. NIH Consensus Development Program: Office of Disease Prevention. NIH Consensus Development Conference: Management of Hepatitis B; 2008. [Acesso em 20 fev 2017]. Disponível em: <http://consensus.nih.gov/2008/hepbstatement.htm>.

Westland C, Delaney W, Yang H, et al. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil1. *Gastroenterol* 2003; 125: 107-116.

Yang H, Westland CE, Delaney WE, et al. Resistance surveillance in chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil for up to 60 weeks. *Hepatol* 2002; 36: 464-473.

Yokosuka O, Omata M, Imazeki F, Okuda K. Active and inactive replication of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in chronic liver disease. *Gastroenterol.* 1985; 89:610–616.

Yoo J, Hann HW, Coben R, Conn M, DiMarino AJ. Update Treatment for HBV Infection and Persistent Risk for Hepatocellular Carcinoma: Prospect for an HBV Cure. *Diseases* 2018; 6(2): 27.

Yuen MF, Wong DK, Sablon E, et al. Hepatitis B virus genotypes B and C do not affect the antiviral response to lamivudine. *Antivir Ther* 2003; 8: 531-534.

Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Sorrentino C, Lo Presti A, Tanzi E, et al. Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient travelling companion or a recent encounter?. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(24): 7622–34.

Zehender G, Svicher V, Gabanelli E, Ebranati E, Veo C, Lo Presti A, et al. Reliable timescale inference of HBV genotype A origin and phylodynamics. *Infect Genet Evol*. 2015; 32:361–9.

Zhu HL, Wang CT, Xia JB, Li X, Zhang ZH. Establishment of reference sequences of hepatitis B virus genotype C subgenotypes. *Genet Mol Res* 2015; 14(4): 16521-34.

Zöllner B, Petersen J, Puchhammer-Stöckl E, et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatol* 2004; 39: 42-50.

Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues. *Gastroenterology* 2009; 137(5): 1593 - 1608.

## ANEXO 1

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** SOROPREVALÊNCIA DA HEPATITE DELTA NO NOROESTE PAULISTA

**Pesquisador:** Márcia Maria Costa Nunes Soares

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 41553315.4.0000.0059

**Instituição Proponente:** Instituto Adolfo Lutz

**Patrocinador Principal:** Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais  
Instituto Adolfo Lutz

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.731.731

#### **Apresentação do Projeto:**

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 05/09/2016.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 05/09/2016.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 05/09/2016.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 05/09/2016.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Declaração de concordância, do Departamento de Vigilância à Saúde / Serviço de Assistência Especializada (SAE) "Maria Angélica Vieira Carvalho", da Secretaria Municipal de Saúde de Marília, SP, assinada por Jucilene Maria Silva Nascimento, Enfermeira Gerente do SAE, de 29/06/2015.

Documento apresentado nesta edição do protocolo de pesquisa e de acordo.

#### **Recomendações:**

1. Observar no parecer consubstanciado do CEPIAL de 13/04/2015 a informação da obrigatoriedade de apresentação de relatórios parciais e final, exigidos na Resolução CNS

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.248-902

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3088-2859

**Fax:** (11)3085-3505

**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.731.731

466/2012.

2. Atentar ao prazo de cada atividade descrita no cronograma proposto no documento "PB informações básicas do projeto".

Sempre que necessário, adequar o cronograma com justificativa em edições futuras do protocolo de pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Em carta de 13/09/2016, anexada à Plataforma Brasil, a pesquisadora responsável respondeu satisfatoriamente todos os questionamentos apontados no parecer anterior, bem como revisou o protocolo de pesquisa, especificamente o item "Metodologia proposta do documento "PB Informações Básicas do Projeto", com a correção da indicação da Resolução CNS 466/2012, e anexou os documentos complementares exigidos pelo CEPIAL.

Nessa carta declarou que o protocolo de pesquisa não teve atraso em seu início e citou as exigências para o desenvolvimento do projeto, informou sobre a colaboração do Serviço de Assistência Especializada do Município de Marília com apontamento para declaração de concordância, e enunciou as atribuições dos colaboradores Dr. Flavio T. Troncoso, Dra. Josilene D. e Silva, Renata B. Vieira e Esperdina S. P. Foltran.

Protocolo de pesquisa bem instruído, aprovado quanto a eticidade, e coerente com as normas institucionais.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL em reunião ordinária de 15 de setembro de 2016.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90  
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.248-902  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3088-2850 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br



Continuação do Parecer: 1.731.731

Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_757666_E1.pdf	13/09/2016 14:57:17		Aceito
Outros	CARTA2.pdf	13/09/2016 14:56:27	Márcia Maria Costa Nunes Soares	Aceito
Outros	SAEMARILIA.jpg	13/09/2016 14:54:52	Márcia Maria Costa Nunes Soares	Aceito
Outros	emenda_2016_03_02_18_29_00_703.pdf	14/07/2016 15:06:08	Márcia Maria Costa Nunes Soares	Aceito
Outros	DECLARACAOPRUDENTE.pdf	14/07/2016 15:05:29	Márcia Maria Costa Nunes Soares	Aceito
Outros	DECLARACAOFAMEMA.pdf	14/07/2016 15:04:56	Márcia Maria Costa Nunes Soares	Aceito
Outros	CARTA RESPOSTA CEPIAL DELTA.pdf	10/03/2015 14:50:43		Aceito
Outros	TERMO DE ASSENTIMENTO.doc	10/03/2015 10:40:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - modificado.doc	10/03/2015 10:34:08		Aceito
Folha de Rosto	fFOLHA DE ROSTO ASSINADA.pdf	05/02/2015 13:56:19		Aceito
Outros	QUESTIONARIO.doc	26/01/2015 12:08:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HEPATITE DELTA - PROJETO.pdf	26/01/2015 12:08:21		Aceito
Outros	TERMO DE CONFIDENCIALIDADE.pdf	26/01/2015		Aceito

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90  
 Bairro: Cerqueira César CEP: 01.248-902  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3088-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.731.731

Outros	TERMO DE CONFIDENCIALIDADE.pdf	12:06:21		Aceito
Outros	TERMO DE COMPROMETIMENTO.pdf	26/01/2015 12:06:10		Aceito
Parecer Anterior	APROVAÇÃO CTC.pdf	26/01/2015 11:56:58		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO SAE - MIRASSOL.pdf	26/01/2015 11:56:48		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO SAE - ARAÇATUBA.pdf	26/01/2015 11:56:33		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO SAE - ADAMANTINA.pdf	26/01/2015 11:56:21		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO GVE - VOTUPORANGA.pdf	26/01/2015 11:56:04		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO GVE - JALES.pdf	26/01/2015 11:55:30		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO CATANDUVA.pdf	26/01/2015 11:55:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	26/01/2015 11:49:53		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**



Não

SAO PAULO, 16 de Setembro de 2016

---

Assinado por:  
Luz Marina Trujillo  
(Coordenador)

## ANEXO 2

	<p>SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS INSTITUTO ADOLFO LUTZ CENTRO DE VIROLOGIA NÚCLEO DE DOENÇAS SANGUÍNEAS E SEXUAIS LABORATÓRIO DE HEPATITES Tel: 3068-2911 - E-mail: labhepsp@ial.sp.gov.br</p>	
---	---	---

São Paulo, 01 de fevereiro de 2018.

Ilmo(a) Sr(a).

Coordenador (a) do

Programa de Pós Graduação em Ciências

Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD/SES/SP

Prezada,


O projeto inicial para a dissertação de mestrado da aluna BRIGIDA HELENA DA SILVA MENEGHELLO abordava, como tema central, o estudo da hepatite delta na região de São José do Rio Preto. A hepatite delta é uma infecção endêmica da região norte do país, e a ela restrita. Porém, muitas perguntas permanecem sem respostas, visto que há regiões com elevada prevalência de hepatite B, porém sem a descrição da presença do vírus delta. Talvez essas perguntas não tenham sido respondidas por ausência do vírus ou, talvez, por falta de estudos.

A região de São José do Rio Preto é uma região por onde transitam muitos viajantes de várias regiões do país, inclusive da região norte, de onde há relatos de grande consumo de drogas injetáveis e/ou inaláveis e que, ainda, há escassez de estudos sobre hepatites virais. Assim, estudar a hepatite delta na região despertou bastante interesse clínico, epidemiológico e laboratorial, possibilitando a inclusão de novas técnicas de diagnóstico no CRL- de São José do Rio Preto.

A falta de dados na literatura e a dificuldade de se determinar um indicador de prevalência levaram-nos a ter uma amostragem estimada bastante elevada, que entendemos que não conseguiremos atingir a tempo de cumprir os prazos estipulados na Pós-graduação.

Por isso, o novo tema proposto é estudar a Hepatite B na mesma região, por ser um assunto de muito interesse, por levar entre 5 a 10% das pessoas infectadas a se tornarem portadores crônicos, não há estudos epidemiológicos na região e, também, poderemos implantar novos métodos moleculares no IAL regional de Rio Preto.

Assim, creio que cumpriremos os prazos determinados pela CPG, produziremos um trabalho de mestrado bastante interessante e dentro do escopo da nossa área, formando uma aluna pronta para prosseguir sua formação no Doutorado após sua defesa de Mestrado.

  
Regina Célia Moreira

# ANEXO 3



Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde  
Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

## Formulário de solicitação Carga Viral do Vírus da Hepatite B

DADOS DA INSTITUIÇÃO						
1. Instituição solicitante (carimbo padrão)*				2. CNES*		
INFORMAÇÕES BÁSICAS						
3. CNS do(a) paciente		Nome completo do(a) usuário(a)*			7. Preferência de identificação*	
		5. Oficial			<input type="checkbox"/> 1-Oficial <input type="checkbox"/> 2-Social	
4. Data de nascimento*		6. Social			8. Sexo*	
					<input type="checkbox"/> 1-Feminino <input type="checkbox"/> 2-Masculino	
9. Nacionalidade		10. Raça/Cor		11. Etnia	12. Nome da mãe*	
		<input type="checkbox"/> 1-branca 2-preta 3-amarela 4-parda 5-indígena 6-não informado 7-ignorada				
13. Número da identidade		14. CPF		15. Logradouro*		
16. Número*	17. Complemento	18. Bairro		19. Município*	20. Cód. IBGE	22. CEP*
23. Telefone		24. País	25. Prontuário	26. Gestante*	27. Escolaridade (em anos)	
( )				<input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não	<input type="checkbox"/> 1. Nenhuma / 2. De 1 a 3 / 3. De 4 a 7 / 4. De 8 a 11 5. - De 12 e mais / 6. não informado / 7. ignorado	
28. Nome do(a) responsável (se o(a) paciente for menor de idade ou incapaz)					29. CPF do(a) responsável	
30. Código do procedimento			31. Nome do procedimento			
02.13.01.020-8			Identificação do vírus da hepatite B por PCR (quantitativo)			
DADOS CLÍNICOS GERAIS/DETALHES DO AGRAVO						
32. Data 1 <sup>o</sup> s sintomas		33. Idade gestacional		34. Motivo do exame*		
/ /		<input type="checkbox"/> 1. 1 <sup>o</sup> trimestre / 2. 2 <sup>o</sup> trimestre <input type="checkbox"/> 3. 3 <sup>o</sup> trimestre 4. Ignorado <input type="checkbox"/> 5. Não se aplica		<input type="checkbox"/> 1. Confirmação do diagnóstico 2. Avaliar indicação de tratamento 3. Monitorar tratamento <input type="checkbox"/> 4. Gestante portadora de hepatite B 5. Investigação de transmissão vertical		
35. Estágio da doença (CID)			36. Tratamento		37. Data de início da terapia	
<input type="checkbox"/> 1. Hepatite B aguda (B16) <input type="checkbox"/> 2. Hepatite B crônica sem Delta (B18.1) <input type="checkbox"/> 3. Hepatite B crônica com Delta (B18.0)			<input type="checkbox"/> Alfainterferona <input type="checkbox"/> Alfapeginterferona (PEG-IFN) <input type="checkbox"/> TDF <input type="checkbox"/> ETV <input type="checkbox"/> 3TC <input type="checkbox"/> ADF		/ /	
38. Comorbidades (CID)					39. Data do diagnóstico	
<input type="checkbox"/> 1. Hepatite C (B18) 2. Carcinoma de células hepáticas (C22) 3. HIV/Aids (B20-B24) 4. Fígado transplantado (Z94.4)					/ /	
40. Nome do profissional solicitante*				41. Registro do conselho profissional*	42. Assinatura e Carimbo*	
				Conselho/UF/Nº:		
43. Data da solicitação*				44. CPF do profissional*		
/ /						
LOCAL DA COLETA DA AMOSTRA						
45. Nome da instituição*				46. Data da coleta*	47. Hora da coleta*	
				/ /	:	
LABORATÓRIO EXECUTOR DO TESTE						
48. Nome da instituição*			49. CNES*	50. Data do recebimento*	51. Hora do recebimento*	
				/ /	:	
Carga Viral	52. Solicitação do exame*	53. Identificador da amostra*	54. Responsável*			55. Data do resultado*
	/ /					/ /
56. Material biológico*	57. Volume da amostra	58. N <sup>o</sup> de cópias	59. Log	60. Técnica*		

\* Preenchimento obrigatório