

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

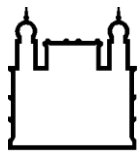
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

**FREQUÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO SEROLÓGICA E MOLECULAR
DE HEPATITE B OCULTA EM DADORES DE SANGUE DO BANCO
DE SANGUE NO HOSPITAL CENTRAL DE MAPUTO**

AUTORA: ANA FLORA DOS MABUNDA ZICAI

Maputo
Julho, 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: ANA FLORA DOS MABUNDA ZICAI

Frequência, Características Serológicas e Moleculares de Hepatite B Oculta em Dadores de Sangue do Banco de Sangue no Hospital Central de Maputo

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz, à Coordenação do Programa de Pós-Graduação como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Medicina Tropical.

Orientadores: Prof. Dr. Nilesh Bhatt

Prof. Dr^a. Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues

Co-orientador: Nédio Eugénio Jonas Mabunda

Maputo

Julho, 2017

Zicai, Ana Flora dos Mabunda.

Frequência, Caracterização Serológica e Molecular de Hepatite B Oculta em Dadores de Sangue do Banco de Sangue no Hospital Central de Maputo / Ana Flora dos Mabunda Zicai. - Maputo, 2017.

X, 60f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

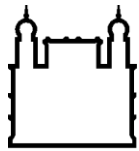
Orientador: Dr. Nilesh Bhatt.

Co-orientadora: Dra. Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues.

Co-orientador: Dr. Nédio Eugénio Jonas Mabunda.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Hepatite B Oculta . 2. Dadores de Sangue. 3. Maputo. 4. Vírus de Hepatite B. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ANA FLORA DOS MABUNDA ZICAI

Frequência, Características Serológicas e Moleculares de Hepatite B Oculta em Dadores de Sangue do Banco de Sangue no Hospital Central de Maputo

ORIENTADOR (ES): Dr. Nilesh Bhatt

Dr^a. Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues

Co-orientador: Nédio Eugénio Jonas Mabunda

Aprovada em: 11/07/2017

EXAMINADORES:

Dr. Eduardo Samo Gudo - Presidente (Instituto Nacional de Saúde)

Dr. Renato Porozzi (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

Dr^a. Ana Olga Mocumbi (Instituto Nacional de Saúde)

Maputo, 11 de Julho de 2017

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Obed e Balbina (em memória), Sem eles nada disso seria possível

*Ao meu esposo Samsone Zicai pelo apoio, força, incentivo e companheirismo e ao meu
filho Míshek pela alegria*

AGRADECIMENTOS

À Deus e minha família, em especial ao meu amado esposo Samsone Zicai pelo incentivo, força e paciência durante a jornada e minha irmã Percina Mabunda pelo apoio moral.

Aos meus orientadores, Dr Nilesh Bhatt, Dra Lia Lewis, em especial ao Nédio Mabunda pela maneira sabia e inteligente de orientar, criticar e dar sugestões para a melhoria do trabalho.

À equipe do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo, em especial a Dra. Sandra da Gloria, pela colaboração.

Aos Dadores de sangue que participaram do estudo.

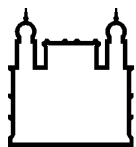
À equipe do Laboratório e Ambulatório de Hepatites virais do Instituto Oswaldo Cruz, em especial as Dras. Elizabeth Lampe e Lia Lewis por terem aceite a parceria para a testagem laboratorial.

Ao Dr Francisco Melo, Vanessa Duarte e Dra Bárbara Vieira pelo apoio na testagem das amostras biológicas. Nunca me esquecerei do carinho com o qual me receberam no Rio de Janeiro.

Aos colegas dos laboratórios do Departamento das Plataformas Tecnológicas do Instituto Nacional de Saúde pelo apoio moral, em especial a Nadia Siteo, Adolfo Vubil, Nalia Ismael, Almiro Tivane, Gabriela Pinto, Sadia Ali e a Rosa Macamo.

À colega Evelina Chambo, pelo apoio na colheita e testagem das amostras biológicas.

A todos os colegas da 4^a turma do curso de Pós-graduação em Ciências de Saúde pelo convívio e aprendizado. Em especial a Isabel, Deonilde e Tatiana pelos conselhos e pela força.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

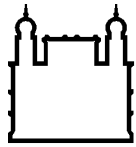
Frequência, Características Serológicas e Moleculares de Hepatite B Oculta em Dadores de Sangue do Banco de Sangue no Hospital Central de Maputo

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Ana Flora dos Mabunda Zicai

A hepatite B oculta é caracterizada pela presença do ácido desoxiribonucleico (ADN) do VHB no soro, plasma ou tecido hepático em indivíduos com serologia negativa para o antígeno de superfície (HBsAg). Os mecanismos que conduzem à infecção oculta pelo VHB não são claros, embora as mutações virais sejam provavelmente um factor significativo. O objectivo deste estudo foi determinar a frequência, presença de marcadores serológicos e características moleculares dos casos com Hepatite B Oculta em dadores de sangue no banco de sangue do Hospital Central de Maputo. Para tal, 1500 dadores de sangue foram recrutados e testados para HBsAg. As amostras HBsAg negativas foram testadas para identificar a presença de ADN do VHB. Amostras com o ADN do VHB detectado foram submetidas ao nested PCR para amplificação das regiões S e P do genoma de VHB, de seguida foram sequenciadas. A frequência de hepatite B oculta foi de 1,2% (17/1436). Os resultados das análises filogenéticas realizadas em 10 dos 17 casos com hepatite B oculta revelaram que 9 isolados pertenciam ao genótipo A e um isolado pertencia ao genótipo E. Foi encontrada uma mutação de escape em uma das amostras e varias substituições de aminoácidos na região S e P. O marcador Anti-HBc foi encontrado na maior parte dos casos com Hepatite B oculta 76,4% (13/17) e não foi registada a reactividade para HBeAg. Os dados mostram uma urgência de introdução de testes complementares para a exclusão de Hepatite B Oculta e necessidade de maior entendimento dos factores relacionados com a não expressão de HBsAg (Hepatite Oculta).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Frequency, serological and molecular characterization of Occult Hepatitis B in Blood Donors in
Maputo, Mozambique

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Ana Flora dos Mabunda Zicai

Occult hepatitis B is characterized by the presence of HBV DNA in serum, plasma or hepatic tissue in subjects with negative serology for the surface antigen (HBsAg). The mechanisms leading to occult HBV infection are unclear, although viral mutations are likely a significant factor. The aim of this study was to determine the presence of HBV serological markers other than HBsAg (anti-HBc, anti-HBs and HBeAg), frequency of OBI and to characterize viral genotypes and mutations among blood donors at the *Hospital Central de Maputo*. A total of 1500 blood donors were recruited and tested for HBsAg. Serum samples HBsAg negative were tested for presence of HBV DNA. Serum samples HBV DNA detected were submitted to nested PCR for amplifications of S and P regions in HBV genome and sequencing. The frequency of hepatitis B was 4.3% (64/1500) and the frequency of occult hepatitis B was 1.2% (17/1436). The results of the phylogenetic analysis in 10 of 17 cases of occult hepatitis B sequences obtained in this study revealed that 9 isolates belonged to genotype A and only one isolate belonged to genotype E. An escape mutation was found in one of the samples and several amino acid substitutions in the S and P regions in HBV genoma. Anti-HBc marker was found in most OBI cases (76.4%) and no sample was reactive for HBeAg. The data show an urgency to introduce complementary tests for the exclusion of Occult Hepatitis B and need for a better understanding the factors related to non-expression of HBsAg (Occult Hepatitis B).

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. História da descoberta da hepatite B.....	1
1.2. Epidemiologia do VHB.....	1
1.3. Formas de transmissão	3
1.4. Marcadores serológicos da infecção pelo VHB	4
1.5. Classificação e Estrutura do VHB.....	6
1.6. Organização Genómica do VHB	7
1.7. Replicação viral do VHB.....	10
1.8. Genótipos do VHB e sua distribuição geográfica	11
1.9. Mutações no genoma de VHB.....	13
1.9.1 Mutações na região Pré-S/S	14
1.9.2 Mutações na região P	15
1.9.3 Mutações na região Pré-C/C.....	16
1.9.4 Mutações na região X	17
2. Hepatite B Oculta	17
2.1. Mecanismo associados a hepatite B oculta.....	19
2.2. Justificativo.....	22
3. OBJECTIVO	22
3.1. Objectivo geral	22
3.2. Objectivos específicos.....	22
4. METODOLOGIA	23
4.1. Desenho do estudo	23
4.2. Tamanho da amostra	24
4.3. Testagem Laboratorial.....	27
4.3.1. Testes serológicos	27
4.3.2. Testagem Molecular.....	30
5. ANÁLISE FILOGENÉTICA	36

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
7. RESULTADOS	37
7.1. Características demográficas da população do estudo	37
7.2. Características serológicas e moleculares da população de estudo	39
7.3. Identificação dos genótipos em amostras com Hepatite oculta.....	40
8. DISCUSSÃO.....	44
9. CONCLUSÃO	49
10. LIMITAÇÕES.....	49
11. RECOMENDAÇÕES	49
12. PERSPECTIVAS	49
13. REFERÊNCIAS	50
14. ANEXO	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Endemicidade global da infecção pelo vírus de Hepatite B	2
Figura 2- Representação das quatro fases da história natural da infecção pelo VHB.....	5
Figura 3 - Representação da estrutura do VHB.....	7
Figura 4 - Organização genómica do VHB	8
Figura 5 - Representação da fase de leitura aberta P do VHB e os domínios.	9
Figura 6 - Representação da fase de leitura aberta X do VHB	11
Figura 7 - Ciclo replicativo do Vírus de Hepatite B.	11
Figura 8 - Distribuição geográfica dos genótipo do vírus de Hepatite B	12
Figura 9 - Genoma de VHB	14
Figura 10 - Mutações de resistências nos domínios que compõem a região da polimerase do gene Pol do HBV.....	16
Figura 11 - Mecanismos associados a hepatite B oculta.....	21
Figura 12 - Fluxograma de recrutamento e testagem laboratorial.	26
Figura 13 - Representação do gel de agarose com as 10 amostras amplificadas dos 17 casos com Hepatite B oculta	38
Figura 14 - Árvore filogenética das regiões S e P do genoma do VHB.	41
Figura 15 - Alinhamento de aminoácidos na região S do genoma de VHB (aa 1-227) dos indivíduo infectado pela HBO pertencentes ao genótipo A	42
Figura 16 - Alinhamento de aminoácidos na região S do genoma de VHB (aa 1-227) dos indivíduo infectado pela HBO pertencentes ao genótipo E..	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interpretação dos resultados dos testes serológicos e moleculares na infecção pelo VHB.....	6
Tabela 2 - Primers utilizados para o nested PCR e reacção de sequenciamento o.....	34
Tabela 3 - Características demográficas e serológicas da população do estudo	35
Tabela 4 - Características serológicas e moleculares dos casos com hepatite oculta ..	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus de hepatite B (HBsAg)
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno da core do vírus de hepatite B (HBcAg)
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno "e" do vírus de hepatite B (HBeAg)
BSM	Banco de Sangue Maputo (código do estudo)
cccADN	Do inglês <i>covalently closed circular DNA</i>
CHC	Carcinoma hepatocelular
ddNTPs	Didesoxiribonucleotídeos trifosfatos
HCM	Hospital Central de Maputo
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus de hepatite B
HBcAg	Antígeno da core do vírus de hepatite B
HBeAg	Antígeno "e" do vírus de hepatite B
HBxAg	Antígeno "x" do vírus de hepatite B
HBO	Hepatite B oculta
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
IU/ml	Unidade internacional por mililitro
Kg	Kilograma
LVM	Laboratório de Virologia Molecular
MISAU	Ministério da Saúde
MHR	Do inglês <i>Major hidrofílic Region</i>
NAT	Do inglês <i>Nucleic acid test</i>
ng/μl	nanograma por microlitro

OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Do inglês <i>Open Reading Frame</i>
PM	Peso Molecular
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RT	Transcriptase reversa
VHA	Vírus de hepatite A
VHB	Vírus de hepatite B
VHD	Vírus de hepatite D
VHE	Vírus de hepatite E
°C	graus centígrados
%	porcentagem
µl	microlitro

1. INTRODUÇÃO

1.1. História da descoberta da hepatite B

Hepatites são doenças causadas por um grupo de vírus, denominados vírus de hepatite A (VHA), vírus hepatite B (VHB), vírus de hepatite C (VHC), vírus de hepatite D (VHD) e o vírus de hepatite E (VHE) (Feinstone *et al.*, 1973, Dane *et al.*, 1970, Houghton *et al.*, 1989, Rizzetto *et al.*, 1977). Sendo a principal característica entre eles o tropismo pelas células hepáticas (hepatócitos), causando a inflamação e necrose no fígado. Falando concretamente do vírus de hepatite B, o antígeno de superfície do vírus foi observado pela primeira vez em 1965, por Bulmberg, um geneticista do *National Institute of Health (NIH)*, em Filadélfia, no soro de um aborígina australiano, durante as suas pesquisas em polimorfismo genético em seres humanos. Sendo posteriormente denominado antígeno de superfície do vírus de hepatite B (HBsAg), e posteriormente outros antígenos foram associados ao vírus de hepatite B (HBcAg e HBeAg) e cada um dos antígenos induz a formação de anticorpos específicos denominados Anti-HBs, Anti-HBc e Anti-HBe.

1.2. Epidemiologia do VHB

A hepatite B é um problema sério de saúde pública. Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas no mundo estejam em contacto com o vírus, destas cerca de 257 milhões estão cronicamente infectados (OMS, 2016). A cada ano, há cerca de 686.000 milhões de mortes por complicações da hepatite aguda ou crônica, onde cerca de 45% de casos crônicos desenvolvem carcinoma hepatocelular (CHC) e 30% cirrose hepática (OMS, 2016).

Três categorias foram estabelecidas para definir a endemicidade para VHB no mundo com base na prevalência do marcador HBsAg na população em geral: elevada (superior a 8%), intermédia (2 a 7%) e baixa (<2%) (OMS, 2011). A prevalência do VHB é muito alta nas regiões do sudeste asiático, África sub-Sahariana, que apresentam uma taxa superior a 8% (Kramvis & Kew, 2007; Kew, 2010).

Schweitzer *et al.*, (2015) encontraram uma prevalência de HBsAg de 3.61% a nível global, onde a maior parte dos países da África apresentavam prevalência alta-intermédia (5-7,9%) e alta (>8%) conforme ilustra 1.

Estudos realizados em Moçambique apontam para uma alta prevalência de VHB em doadores de sangue. Cunha e colaboradores (2007), encontraram uma prevalência de VHB de 9,3% na região sul de Moçambique (Maputo). Dados da região centro (Tete) mostram uma prevalência de 10,6% (Stokx *et.al.*, (2011). Também tem sido reportado alta prevalência de VHB em indivíduos co-infectados por HIV. Semá e colaboradores (2011), encontraram uma prevalência de 16,0% em um estudo realizado numa Unidade Sanitária da região sul de Moçambique (Maputo), por outro lado, Wendeler e colaboradores (2016), encontraram uma prevalência de 8% no norte do país (Cabo Delgado).

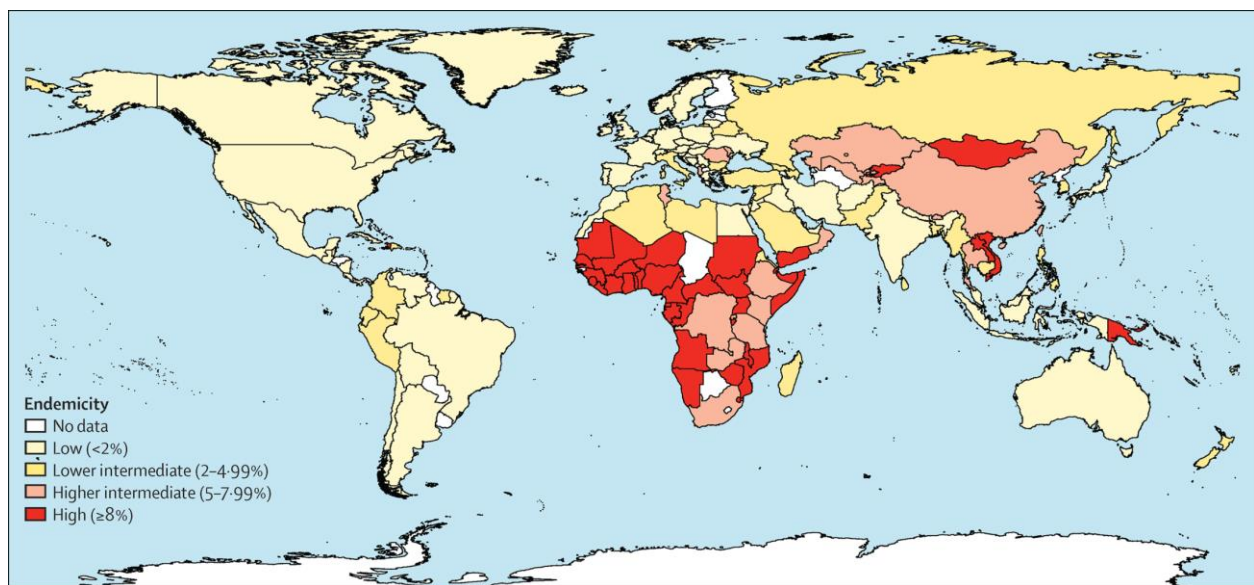


Figura 1– Endemicidade global do HBsAg.

Os retângulos com diferentes cores indicam as percentagens de endemicidade nas diferentes regiões do mundo- elevada representada pela cor vermelha, elevada intermediária representada pela cor rosa, baixo intermediário representada pela cor amarela e baixo amarelo mais palido (Schweitzer *et al.*, 2015).

1.3. Formas de transmissão

As principais formas de transmissão do VHB são: via perinatal, sexual e parenteral/percutânea (OMS, 2015).

Segundo a OMS (2015), a transmissão perinatal é a principal via de transmissão de VHB em muitas partes do mundo, e um factor importante na manutenção do reservatório da infecção em algumas regiões. Dai que, na ausência de profilaxia uma grande parte de mães virémicas transmitem a infecção aos lactentes durante ou após o parto. Sendo que o risco de infecção perinatal também aumenta em mães com hepatite B aguda no primeiro e terceiro mês de gravidez e dois meses após o parto. No entanto, após a infecção perinatal, o risco de desenvolver uma infecção crônica é de 90%, até aos 6 meses de idade, este risco diminui para 20-60% entre os 6 meses aos 5 anos de idade.

O VHB é também disseminada por exposição percutânea ou mucosa ao sangue infectado e vários fluídos corporais, tais como fluídos salivares, menstruais, vaginais e seminal. A transmissão sexual do VHB ocorre particularmente em homens não vacinados que fazem sexo com homens e heterossexuais com múltiplos parceiros sexuais ou em contato com profissionais do sexo. Infecção na idade adulta leva a hepatite crônica em menos de 5% dos casos. A transmissão sexual pode contribuir para uma alta proporção de casos de hepatite B entre os adolescentes e adultos vivendo em países com uma baixa prevalência de hepatite B. Em países com alta prevalência a maioria das pessoas já terá sido infectada durante a infância (OMS, 2017)

Por outro lado à transmissão pode ocorrer por contactos interpessoais através de feridas e ulcerações. Muitas crianças se infectam nos primeiros anos de vida. A transmissão do vírus também pode ocorrer entre pessoas que injetam drogas ou através da reutilização de agulhas e seringas em ambientes de saúde. Além disso, a infecção pode ocorrer durante procedimentos médicos, cirúrgicos e odontológicos, através da tatuagem, ou ainda através do uso de lâminas de barbear e objetos semelhantes que estão contaminados com sangue infectado (OMS, 2015 & OMS, 2017).

A transmissão do VHB também pode ocorrer por transfusão de sangue contaminado, isto é, nos casos em que os doadores são assintomáticos e com resultados negativo para o marcador HBsAg. O risco de transmissão de VHB ocorre maioritariamente como resultados de doações no período de janela (Tagny *et al.*, 2008; Allian & Cox, 2011). De acordo com Kim *et al.*, (2012), testar doadores com tecnologias avançadas pode reduzir o risco de transmissão de agentes infecciosos.

1.4. Marcadores serológicos da infecção pelo VHB

O diagnóstico da infecção aguda ou crónica por VHB é resultante da análise dos marcadores serológicos. Os antígenos e anticorpos associados à infecção pelo VHB incluem HBsAg e anticorpo para HBsAg (anti-HBs), antígeno da core de hepatite B (HBcAg) e anticorpo para HBcAg (anti-HBc), antígeno "e" de hepatite B e anticorpo para HBeAg (Anti-HBe). Assim, testes serológicos estão disponíveis para todos os marcadores excepto para o antígeno da core (HBcAg), isto porque nenhum HBcAg livre circula no sangue (Hoofnagle & Di Bisceglie, 1991).

Por outro lado, testes moleculares também podem ser realizados para avaliar a presença e concentração de ADN do VHB circulante (El Ekiaby *et al.*, 2010).

A história natural da infecção pelo vírus de hepatite B é classificada em quatro fases: a fase imune tolerante (HBeAg-positiva, com altos níveis de ADN do VHB mas ausência de doença hepática), a fase imune ou crónica da hepatite (HBeAg-positivo/anti-HBe negativo, com níveis elevados de ADN do VHB e inflamação activa do fígado), e a fase inativa (HBeAg negativo/anti-HBe positivos, níveis normais de aminotransferase hepática e níveis baixos ou ausentes de ADN do VHB) e a fase de recuperação (Hoofnagle & Di Bisceglie, 1991 & Zhang *et al.*, 2016), conforme ilustrado na figura 2.

O decurso da infeção pelo VHB depende dos factores do hospedeiro e do próprio vírus. Grande parte dos indivíduos infectados não apresenta nenhum sintoma durante a fase aguda da infecção, embora existam indivíduos que apresentam sintomas e doença

na fase aguda, por vezes levando a morte. Na fase crónica 20 à 30 % dos indivíduos adultos podem desenvolver cirrose hepática ou CHC.

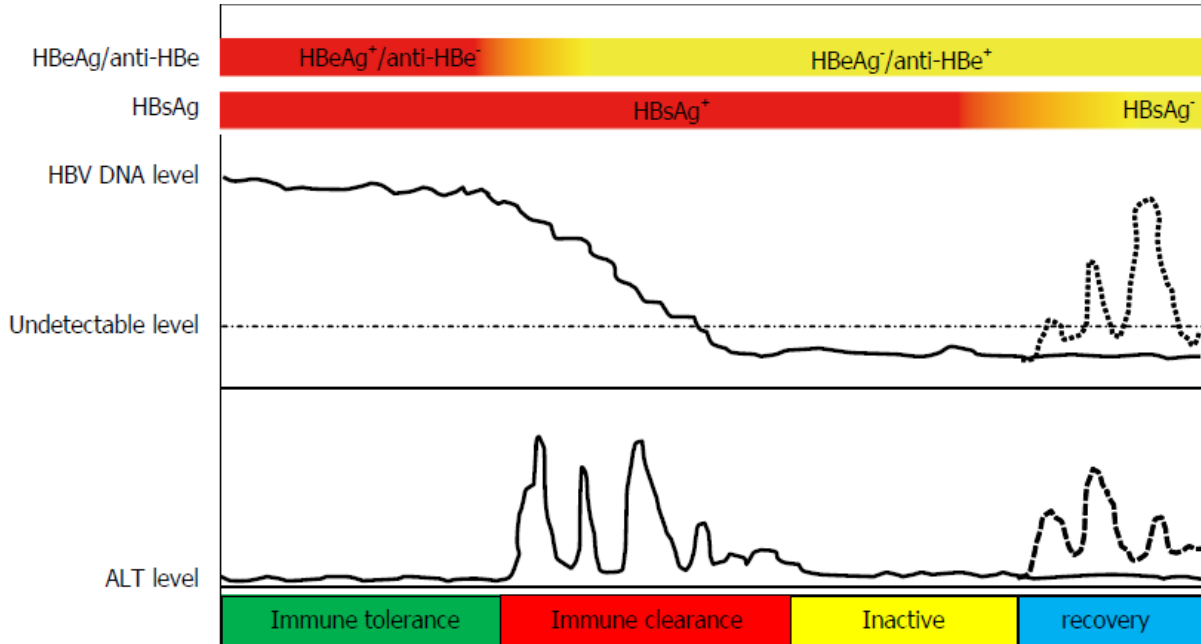


Figura 2: Representação das quatro fases da história natural da infecção pelo VHB (adaptado do Zhang *et al.*, 2016).

Os marcadores serológicos tipicamente utilizados para diferenciar entre infecção aguda, resolutive e crónica são HBsAg, anti-HBs e anti-HBc total. A presença de HBeAg e ADN de VHB indica geralmente níveis elevados de replicação viral. Contudo, existem casos em que o HBsAg não é detectado mas é possível detectar o ADN do vírus, isto, com ou sem a presença de outros marcadores, nestes casos estamos perante a uma Hepatite B Oculta (tabela 1) (Hoofnagle & Di Bisceglie, 1991; Torbenson & Thomas, 2002).

Tabela 1. Interpretação dos resultados dos marcadores serológicos e Moleculares para a infecção pelo VHB.

Marcador	Imuniz.	Infecção aguda	Infecção pregressa	Infecção crônica	Portador inativo	HBV oculta
Anti- HBs	+	-	+	-	-	-/+
Anti-HBc total	-	+	+	+	+	-/+
Anti-HBe	-	-	+	-	+	-/+
AgHBs	-	+	-	+	+	-
AgHBe	-	+	-	+	-	-/+
VHB ADN	-	+	-	+, >10 ⁵ cópias	+, <10 ⁵ cópias	+, <10 ³ cópias

(Torbenon & Thomas, 2002)

1.5. Classificação e Estrutura do VHB

O vírus de hepatite B (VHB) pertence a família *HepaADNviridae*, género *OrthohepaADNvirus*. Este vírus apresenta tropismo pelas células hepáticas (hepatócitos) e tem o homem como hospedeiro natural. Estruturalmente, a partícula completa do VHB (*Virion* ou partícula de Dane), com 40-42 nm de diâmetro, apresenta no seu exterior um envelope constituído pelo antígeno de superfície (HBsAg), e no seu interior o nucleocapsídeo ou *core*, que mede cerca de 27 nm de diâmetro, com uma simetria icosaédrica constituído pelo antígeno do core (HBcAg) e o genoma viral (ADN) associado a enzima ADN polimerase (Fig 2)(Schädler & Hildt, 2009).

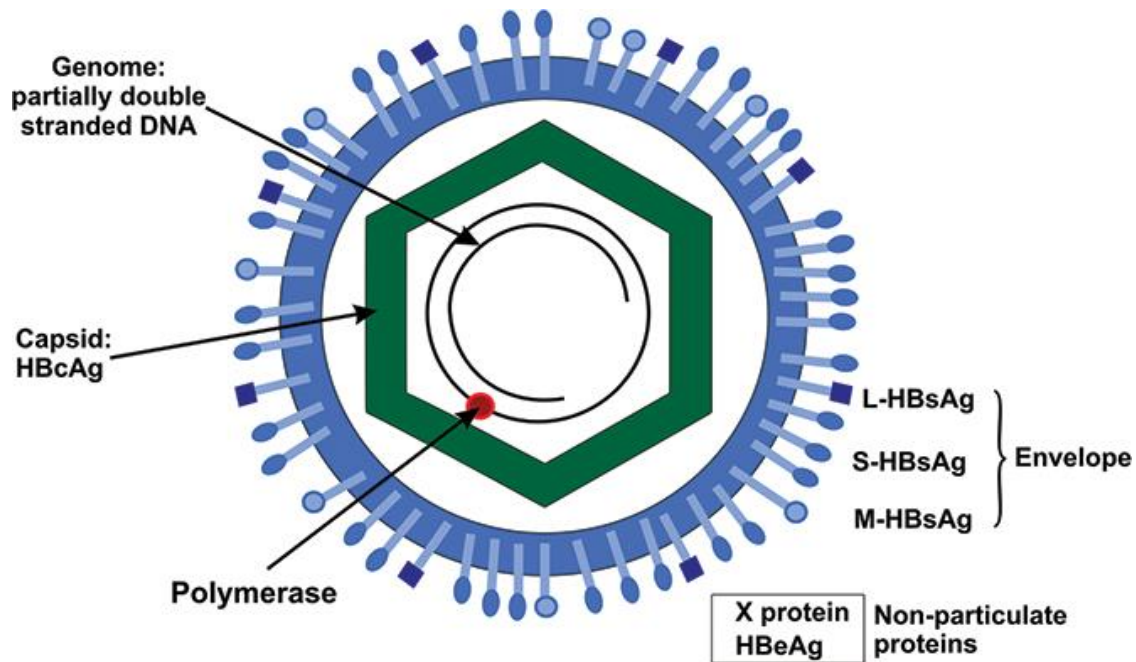


Figura 3 - Representação da estrutura do VHB.

A figura ilustra a partícula viral do vírus de hepatite B composta pelo envelope, nucleocapsídeo, o genoma viral e os antígenos expressos no envelope (HBsAg) e no nucleocapsídeo (HBcAg e HBeAg) (Bell & Kramvis, 2016).

1.6. Organização Genômica do VHB

O genoma do VHB apresenta um ADN circular de fita parcialmente dupla com 3200 pares de base (pb) de polaridade positiva e negativa, com quatro fases abertas de leitura (*Open Reading Frame-ORF*): Pre-S/S, Pre-C/C, P e X que codificam proteínas virais, e quatro promotoras Pré-S1, Pre-S2/S, *core* e X que regulam a actividade gênica. O genoma apresenta também pequenas sequências de nucleotídeos de 11 pares de bases localizadas na extremidade de ambas fitas denominadas DR1 e DR2 (*Direct Repeats*) importantes na iniciação da replicação do vírus (Fig 3) (Schädler & Hildt, 2009; Caliguri *et al.*, 2016).

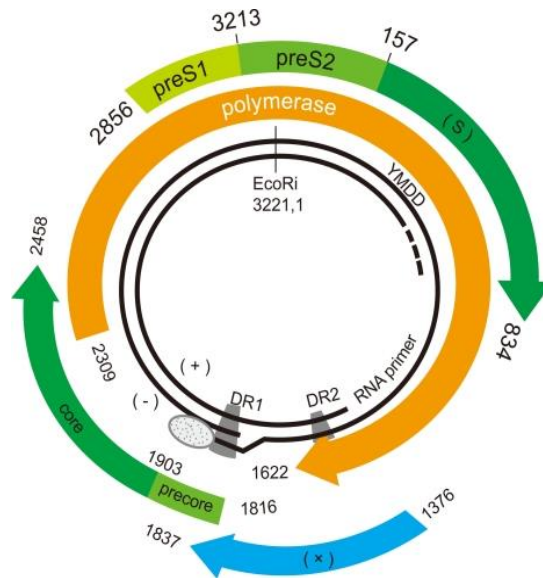


Figura 4 - Organização genômica do VHB

A figura ilustra as quatro fases abertas de leitura (*Open Reading Frame-ORF*) do genoma do VHB: Pre-S/S- pintado a cor verde com três regiões, Pre-C/C- pintado a verde com duas regiões, P-pintado a laranja e X-pintado a azul claro (Kao, 2011).

A região Pré-S/S, codifica três proteínas do envelope que são sintetizadas a partir de codons de iniciação alternativa denominadas L (Large), M (Medium) e S (Small). A proteína L, que contém 389 aminoácidos (aa), é codificada a partir do códon de iniciação da região Pré-S1, seguida de Pré-S2 e S. A síntese da proteína M, com 281 aminoácidos, é realizada a partir do códon de iniciação da região Pré-S2, seguida pela S. A menor proteína (S) consiste em 226 aminoácidos sintetizada pela região S. A codificação das três proteínas são finalizadas no códon de terminação da região S (Seeger & Mason, 2000).

A região pré-C/C possui dois códon de iniciação na mesma fase de leitura aberta. A região pré-C que dá origem a uma proteína solúvel, o HBeAg (antígeno "e" do VHB) a qual é secretada pelos hepatócitos e liberada para a corrente sanguínea. O HBeAg não faz parte da estrutura viral, mas como é uma proteína produzida durante

um estágio de replicação viral intensa, a sua presença está associada à infecciosidade. Por outro lado a região pré-core origina o HBcAg que compõem o nucleocapsídeo. Este antígeno não é detectado no soro mas induz a formação de anticorpos (anti-HBc) que podem ser detectados em forma de IgM e IgG (Milich & McLacham, 1986).

A região P codifica a proteína polimerase (Pol) com aproximadamente 800 aminoácidos. Esta região encontra-se dividida em quatro domínios: Proteína terminal, que está envolvida na inicialização da síntese da fita de ADN de cadeia negativa, região espaçadora, transcriptase reversa (RT) que catalisa a síntese do genoma, com sete domínios denominados de A a G e o ribonuclease H, que tem a função de degradar a o RNA pré-genômico e facilitar a replicação do vírus (Bartholomeusz e Locarnini, 2006).

A polimerase viral possui o motivo YMDD (Tirosina-Metionina-Aspartato-Aspartato), que é parte do sítio ativo do domínio C, presente também na transcriptase reversa (figura 4) (Bartholomeusz e Locarnini, 2006).

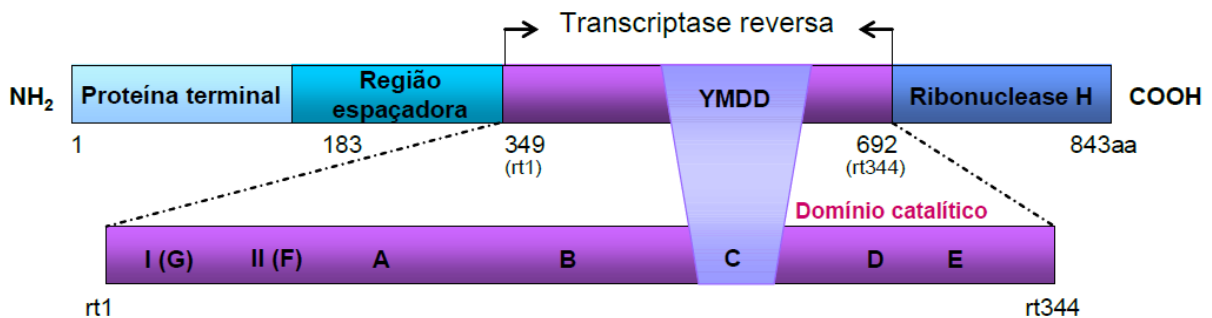


Figura 5 - Representação da fase de leitura aberta P do VHB.

A figura ilustra os quatro domínios que compõem a região P do genoma do VHB e os sete domínios catalíticos (Matos, 2007).

A região X do VHB é a menor das quatro fases abertas de leitura. O gene X codifica a proteína HBx que tem 154 aminoácidos, um domínio N-terminal regulador e um domínio C-terminal Transativação (Fig 5). A proteína HBx é responsável pela

activação da transcrição viral, reparação do ADN e inibição da degradação de proteínas. Embora não se saiba o mecanismo de actuação e a função biológica do HBx na replicação viral, está bem estabelecido que o HBx tem grande influência para aumento da infecção e aparecimento do câncer do fígado (Carcinoma hepatocelular) (Liang, 2009; Lee et al., 2011).

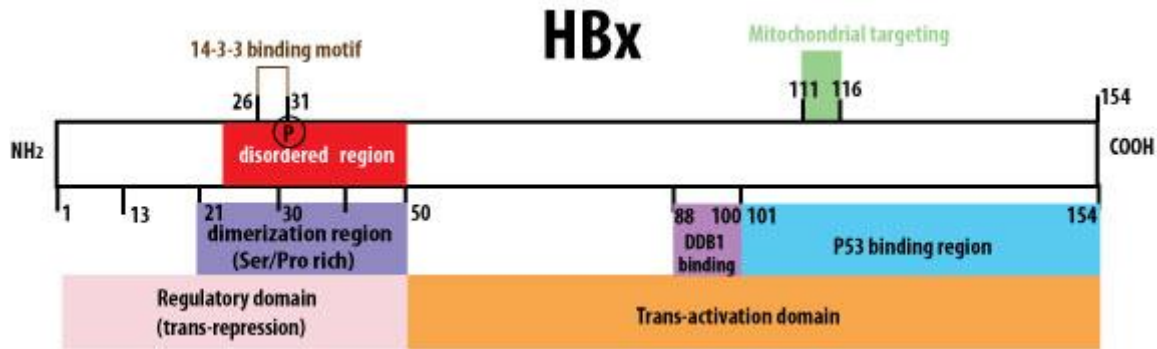


Figura 6. Representação da fase de leitura aberta X do VHB (Kruse, 2015).

1.7. Replicação viral do VHB

No decurso da infecção pelo VHB, a ligação da partícula viral ao hepatócito é mediada pela glicoproteína da superfície pré-S1 e um receptor do hepatócito. Uma vez no interior do hepatócito, o genoma do VHB é libertado para dentro do núcleo, onde se completa a cadeia positiva (incompleta) do ADN. O genoma viral é convertido em cadeia fechada com ligações covalentes (cccADN) pela ADN polimerase. Assim, o cccADN dá origem ao RNA mensageiro (RNAm) para a síntese de proteínas virais e o RNA pré-genômico para a síntese de genoma viral. De seguida, o RNA pré-genômico é transportado para o citoplasma, incorporado no nucleocapsídeo e convertido em cadeia negativa do ADN sob ação da transcriptase reversa. Por fim é iniciada a síntese de cadeia positiva, onde as partículas do core, contendo o ADN viral são envolvidas pelo antígeno de superfície (HBsAg) e secretadas para fora do hepatócito ou transportadas para o núcleo onde se completa a síntese da cadeia positiva com a formação de um novo cccADN (Fig 5) (Schädler & Hildt, 2009; Locarnini & Zoulim, 2010; Caliguri *et al.*, 2016).

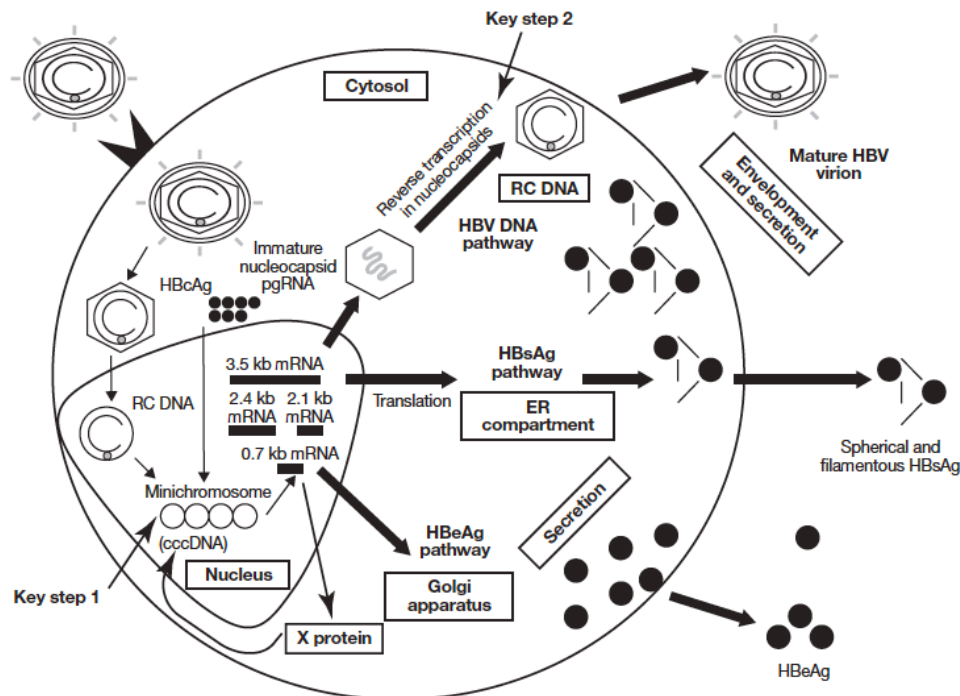


Figura 7 - Ciclo replicativo do vírus de Hepatite B. A figura mostra o mecanismo de infecção pelo VHB, desde a entrada do vírus na célula do hospedeiro, a integração do genoma ao genoma do hospedeiro, formação de novas partículas virais e liberação de proteínas virais. (Locarnini & Zoulim, 2010).

1.8. Genótipos do VHB e sua distribuição geográfica

O VHB apresenta diferentes genótipos e subgenótipos, actualmente são conhecidos 10 genótipos representados pelas letras do alfabeto (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J) e 9 subtipos (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4q -, adrq+, andadrq-) (Tatematsu et al., 2009; Olinger et al., 2008; Hannoun, et.al., 2000). Os subtipos de VHB tem uma distribuição restrita, assim o subtipo ayw1 está associada aos genótipos A e B, Adw2 é encontrado no genótipo A, B e C, enquanto Adw4 apenas circula nos genótipos E e F. Por outro lado, ayw2 e ayw3 estão associados ao grupo D e adr / ayr só foi encontrado no genótipo C (Norder et al., 1992).

Estudos recentes demonstraram que os genótipos do VHB podem ser divididos em subgenótipos: A (A1-A7), B (B1-B4), C (C2-C4), D (D1-D4), F (F1 e F2), excepto os genótipos E, G, I e J. Com uma variabilidade de 8% entre cada genótipo conhecido e de

4% entre os subgenótipos. Esta diversidade ocorre como resultado dos erros de replicação durante a multiplicação do vírus (Okamoto et al., 1988; Kao et al., 2009; Tatematsu et al., 2009 & Buti et al., 2005).

Estudos epidemiológicos mostraram que os genótipos do VHB tem uma distribuição geográfica distinta. Assim o genótipo A é prevalente na África, Europa, Brasil e na Índia. Os genótipos B e C são comuns na Ásia. O genótipo E é comum na África subsahariana. Os genótipos F e H estão restritos a América do sul e Central, (Lindh et al., 1997; Miyakawa & Mizokami, 2003). O genótipo G é prevalente nos EUA, França, Colômbia e Alemanha. O genótipo I foi identificado no Vietnã e no Laos (Yu, 2010,). O genótipo J foi identificado no Japão (Tatematsu *et.al.*, 2009), ao passo que o genótipo D é distribuído em todo o mundo (Figura 6).

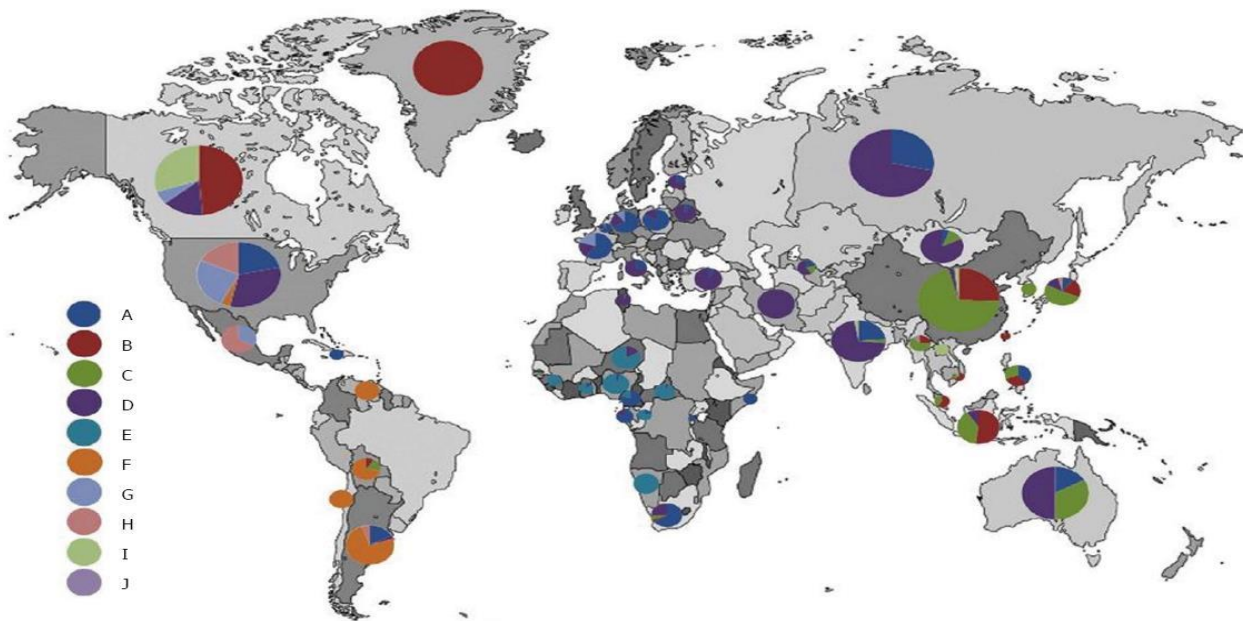


Figura 8 - Distribuição geográfica dos genótipos do vírus de Hepatite B (Shi *et al.*, 2013).

Em Moçambique, estudo realizado no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo (região sul do País) por Cunha *et al.*, (2007), encontrou maior prevalência do genótipo A (86,3%) seguido do genótipos E (8,5%) e uma menor prevalência para o genótipo D (0,5%) do vírus de hepatite B. No estudo realizado por Wendeler *et al.*,

(2016) os genótipos A (58,8%) e E (38,2%) do VHB foram os mais predominantes em indivíduos co-infectados com HIV. Dados recentes não publicados, mostram na região sul (Maputo), a predominância do genótipo A (92.6%) quando comparado ao genótipo E (7.4%) numa população de indivíduos co-infectados com HIV. (Chambal *et al.*, 2016).

Vários estudos demonstraram que os genótipos e subgenótipos do VHB podem influenciar na severidade e progressão da doença, na resposta ao tratamento antiretroviral e no prognóstico (Liu *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2009; Tanaka&Mizokami, 2007; Fung&Lok, 2004). Por exemplo, no estudo realizado por Hsieh *et al.*, (2009) verificaram que o genótipo B esteve significativamente associado ao desenvolvimento da resistência a lamivudina (3TC) nos primeiros 12 meses de tratamento quando comparado com o genótipo C.

Por outro lado, os resultados do estudo realizado por Chan *et al.*, (2004), mostraram que o genótipo C está associado ao aumento do risco de desenvolver CHC independente da presença da cirrose hepática. Na Índia os subgenótipos D1 e D3 estiveram significativamente associados à infecção crônica e oculta e o genótipo C esteve correlacionado a hepatite B oculta (Ghosh *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013&Kim *et al.*, 2013).

1.9. Mutações no genoma de VHB

As altas taxas de erros na região P do VHB causam frequentes substituições de nucleotídeos durante a replicação viral, que resultam numa diversidade genética dos genótipos e subgenótipos, como também num aumento no número de mutações nas diferentes regiões do genoma do VHB. Assim, estes factores influenciam as taxas de seroconversão de HBeAg, HBcAg, nos níveis da viremia, no escape imune, na emergência das mutações, a patogênese da doença hepática, na resposta e resistência a terapia antiretroviral e a vacinação contra o vírus (Fig.7) (Zhang *et al.*, 2016; Lazerevic *et al.*, 2014; Buti *et al.*, 2005)

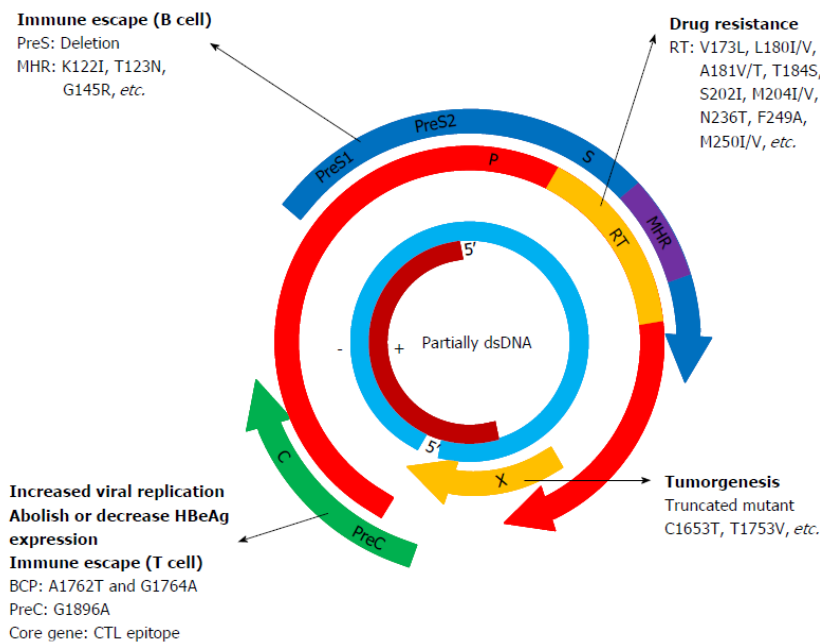


Figura 9 -Genoma de VHB. A figura mostra os principais tipos de mutações que podem ocorrer nas 4 fases abertas de leitura no genoma do VHB. Na região S pintada a azul-escuro ocorrem mutações de escape imune. Na região P pintada a vermelho e laranja (principalmente na RT) ocorrem mutações relacionadas a resistências aos antiretrovirais. Na região C pintado a verde ocorrem mutações que aumentam a replicação viral e reduzem a expressão do HBeAg e na região X ocorrem mutações tumorais (Zhang *et al.*, 2016).

1.9.1 Mutações na região Pré-S/S

O antígeno de superfície do vírus de hepatite B (HBsAg) é o maior alvo de anticorpos presentes em indivíduos vacinados. É também a maior proteína do envelope e é altamente heterogênic, e também apresenta uma região conservada denominada Maior Região Hidrofílica (da sigla em inglês MHR) onde encontra-se localizado determinante "a" entre a posição 99 a 169, que é o principal alvo de neutralização das células B (Lazerevic *et al.*, 2014).

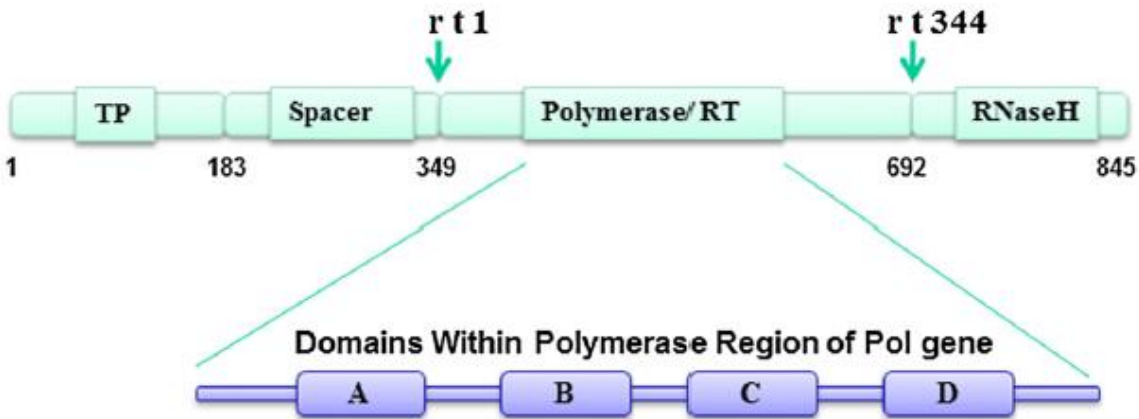
Mutações no MHR particularmente no determinante "a" podem afectar na antigenicidade, essencial para indução de anticorpos protectores responsáveis pelo escape imune induzida pela vacina, como também fornecer resultados falsos negativos em testes serológicos (Carman *et al.*, 1995, Lazerevic *et al.*, 2014).

Em 1988, foi observado pela primeira vez a mutação na região S do VHB no soro de uma criança Italiana vacinada, onde as sequências do gene S revelavam substituição de Glicina por Aminoácido na posição 145 (G145A) (Carman *et al.*, 1990). Segundo mesmo autor o aumento da detecção desta mutação tem sido reportado em vários estudos realizados em últimos anos.

Para além da mutação G145A, várias outras mutações também consideradas de escape imune têm sido encontradas no determinante “a” como: T116N, P120S/E, I/T126A/N/I/S, Q129H/R, M133L, K141EP142S e D144A/E. Por outro lado, deleções nesta região podem estar associadas ao desenvolvimento de hepatite B oculta, pois influenciam na expressão, síntese e secreção do HBsAg (Huang *et al.*, 2012).

1.9.2 Mutação na região P

Mutações nesta região estão relacionadas à resistência aos antiretrovirais, sendo que a resistência a lamivudina ocorre com maior frequência e tem sido observada em mais de 80% de pacientes em tratamento. A maior substituição de aminoácido associado à resistência a lamivudina é rtM204 V/I. Nesta ocorre a substituição de um resíduo de metionina por uma valina ou isoleucina na posição 204 do domínio C, que está localizado no motivo YMDD do RT. Também têm sido verificadas várias mutações de resistência relacionadas a outros antivirais em outros domínios como é o caso da resistência a Adefovir, Entecavir e Telbivudina, conforme mostras a figura 8 (Bartholomeusz & Locarnini, 2006, Villet *et al.*, 2007).



Antiviral agent	A	B	C	D
Adefovir		rtA181V/T		rtN236T
Lamivudine and Emtricitabine	rtL80V/I	rtA181T rtV173L rtL180M	rtM204V/I/S	
Telbivudine			rtM204I	
Entecavir	rtI169T	rtL180M, rtT184S/A/I /L/F/G,	rtS202G/I, rtM204V/I	rtM250V

Figura 10 - Mutações de resistências nos domínios que compõem a região da polimerase do gene Pol do VHB (Datta *et al.*, 2012, adaptado de Locarnini & yuen, 2010).

1.9.3 Mutações na região Pré-C/C

Mutações nesta região estão associadas à diminuição da expressão de HBeAg que é um marcador de replicação viral e infecciosidade pelo VHB. As mutações mais comuns estão relacionadas à alteração de guanina (G) na posição 1896 por adenina (A) que cria um códon de paragem no códon 28 da proteína Pré-C (Locarnini *et al.*, 2003). Estudos realizados por Yang *et al.*, (2013) demonstraram que o elevado risco para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC) depende dos genótipos e a presença de mutações no promotor basal da core (A1762T e G1764A) e a região pré-C (G1896A).

1.9.4 Mutações na região X

O gene X se sobrepõe com a região promotora core e as mutações nessa região podem alterar as funções da proteína HBx. Até então, estudos realizados identificaram 11 sítios de mutações no gene HBx. Estas mutações estão associadas ao desenvolvimento de CHC, supressão da secreção de HBeAg e aumento da síntese do ADN viral (Yang *et al.*, 2013, Xie *et al.*, 2014)

No estudo de Lee *et al.*, (2011) que avaliou o impacto das mutações no gene X do VHB no desenvolvimento do CHC em indivíduos com infecção crônica por VHB, verificaram que as mutações HBx131, HBx130, HBx5, HBx94, and HBx38 eram comuns nos pacientes com CHC e que a mutação HBx5 em indivíduos do genotipo C aparenta ser um factor de risco para o desenvolvimento do CHC e pode ser usada para prever os resultados clínicos de pacientes com infecção crônica por VHB.

2. Hepatite B Oculta

Hepatite B oculta é caracterizada pela presença do ADN do VHB no soro/plasma ou no tecido hepático de pacientes negativos para o antígeno de superfície (HBsAg), geralmente com carga viral em torno de 10^{2-3} IU/ml (WHO, 2015; Sagnelli, 2014; Raimundo, 2007).

Os teste de rastreio para a detecção do antígeno de superfície (HBsAg) e o anticorpo da core (anti-HBc) são comumente usados para detectar a infecção por VHB e prevenir que o receptor do sangue doado seja infectado. Entretanto, com a introdução de testes de ácidos nucleicos (NAT) no rastreio do VHB em dadores de sangue, o risco residual de transmissão de VHB por transfusão sanguínea reduziu e com a implementação deste teste foi possível detectar a infecção oculta (Seo *et al.*, 2015; Roth *et al.*, 2002 & Allian, 2004). Sendo que o primeiro caso de infecção pelo VHB transmitido por transfusão de sangue de um dador com hepatite B oculta foi reportado em 1978 (Hoofnagle *et al.*, 1978). Contudo esses testes são de elevado custo, principalmente em países com recursos limitados (El Ekiaby, 2010).

Todavia a persistência do ADN de VHB em indivíduos HBsAg seronegativos tem sido observada em pacientes co-infectados com os vírus de VHC/VIH. Como também acontece em indivíduos sem doença hepática, como doadores de sangue e de órgãos (Kwak & Kim, 2014 & Bréchet, 2001). Está bem documentado que a infecção por hepatite B oculta é um factor de risco importante para o desenvolvimento do CHC, reativação da hepatite crônica durante a supressão imunológica e transmissão durante a transfusão de sangue e transplante de fígado (Candott & Allain, 2009; Allain & Cox, 2011; Powell *et al.*, 2015; Pollicino & Saitta, 2014; Olotu *et al.*, 2016).

A taxa de prevalência de hepatite B oculta a nível mundial varia de 1% a 87%, estas taxas são influenciadas por vários factores como: tamanho da amostra, região geográfica, prevalência de VHB e co-infecções, utilização de diferentes equipamentos de laboratório e kits de medição com diferentes especificidades e sensibilidades; tipo de população estudada (diferentes origens raciais, étnicas e genéticas) que muitas vezes podem afetar a resposta imune humoral ao VHB, levando a diferenças na produção de anticorpos anti-HBc (Kwak & Kim, 2014, Samal *et al.*; 2012; Arababadi *et al.*, 2011 & Dragun, 2008).

Para além dos factores acima referidos, vários mecanismos têm sido propostos para que a infecção pelo VHB se torne oculta, tais como: mutações na sequência do ADN do VHB que bloqueiam a exportação do antígeno (Melegari *et al.*, 1994), formação de imuno-complexos entre o HBsAg e anti-HBs (Ackerman *et al.*, 1994), co-infecção com outros vírus (Lee *et al.*, 1997), mutação no loop hidrofílico (MHR) que é o principal alvo de detecção de anticorpos usados nos testes de diagnóstico (Ghany *et al.*, 1998 & Protzer-Knolle *et al.*, 1998), trocas epigenéticas, integração do genoma, resposta imune do hospedeiro e inibição da replicação (Samal *et al.*; 2012).

Estudos relacionados a hepatite oculta em várias partes do mundo reportaram elevada prevalência, por exemplo, em Irão (9,98%) (Alizadeh *et al.*; 2014), Itália (4,86%) (Manzini *et al.*, 2007), Índia (7,5%) (Asim *et al.*, 2010), Nigéria (8%) (Nna *et al.*, 2014) e no Brasil Jardim *et al.*, (2008) e Tovar (2012), encontraram uma prevalência de VHB oculta de 4% e 0,2% respectivamente em amostras de doadores de sangue.

2.1. Mecanismo associados a hepatite B oculta

Mutação no determinante "a" do HBsAg foi um dos primeiros mecanismos reconhecidos que levam a infecção por hepatite B oculta. A região S do genoma do VHB é rica em resíduos de cisteína que estão envolvidos na ligação da formação de dissulfureto e manter a conformação desta região. As mutações nesta região levam a mudanças conformacionais fazendo com que o HBsAg não seja detectado pelos testes comercialmente disponível (Carmen *et al.*, 1990; Cacciola *et al.*, 2001).

As trocas epigénicas podem ocorrer por metilação ou acetilação. A metilação é o mecanismo chave para actividade transcricional. O VHB induz a expressão de ADN celular-metiltransferases (DNMT), conduzindo à metilação de dinucleotidos CpG no genoma de VHB. A metilação do ADN do VHB representa um novo mecanismo epigenético que prejudicam as proteínas, replicação e produção de viriões de VHB, levando a infecção oculta pelo VHB (Vivekanandan *et al.*, 2008; Kaur, 2010; Kim *et al.*, 2011).

Entretanto, a integração das sequências do ADN do VHB no genoma do hospedeiro é frequentemente detetado em pacientes com hepatite crónica. No entanto, rearranjo no gene durante a integração do ADN cromossómico pode resultar na perda de HBsAg no soro, redução da produção de viriões e na perda do ADN do VHB detectável (Urashima *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 1997; Tamori *et al.*, 2003).

Por outro lado, as interações vírus-hospedeiro desempenham um papel crucial na determinação do resultado da infecção pelo vírus da hepatite B, na medida em que a resposta imune do hospedeiro está envolvido na liberação viral, persistência viral e imunopatogênese na infecção pelo VHB. Mecanismos relacionados à resposta imune do hospedeiro, como apoptose, resposta de células T citolítica e não citolíticas e polimorfismos do receptor de vitamina D (VDR), foram associados à modulação da replicação e síntese protéica do VHB (Martin, 2009; Samal *et al.*; 2012).

A co-infecção VHB e VHC estão bem documentadas, vários estudos demonstram que a co-infecção VHB e VHC resultam na redução da replicação do VHB e na expressão do HBsAg (Cacciola *et al.*, 2001; Rodríguez-Iñigo 2005). Na medida em

que a proteína do núcleo do VHC pode interagir com o gene X do VHB e impedir a sua transcrição. Além disso, as proteínas NS2 e NS5A da "core" do VHC poderiam inibir fortemente a replicação do VHB (Chen *et al.*, 2003; Dumoulin *et al.*, 2003 & Pan *et al.*, 2007).

A infecção pelo vírus de hepatite B oculta em pacientes cronicamente infectados com VHC e HIV tem sido associada a um risco aumentado de CHC (Tagger *et al.*, 1999; Branco *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2008; Matsuoka *et al.*, 2008; Mallet *et al.*, 2011)

Segundo Samal *et al.*; (2012), a função fisiológica da apolipoproteína B mRNA-edição Polipéptidos catalíticos enzimáticos (APOBECs) é desaminação de citidina. Mecanismos de inibição da replicação do VHB por desaminação dependentes e desaminação independentes foram relatados para APOBECs. A actividade de desaminação da proteína APOBEC converte a citosina em uracilo no genoma do VHB, levando a várias mutações associadas com a infecção oculta pelo VHB. A actividade de desaminação independente de APOBEC deaminases inibe a formação de híbridos de ADN-ARN, aumenta a susceptibilidade à digestão de nucleases e diminui o processamento de proteínas, conduzindo eventualmente a infecção oculta pelo VHB.

O bloqueio de HBsAg em complexos imunes com anti-HBs pode prejudicar a detecção de HBsAg por ensaios serológicos convencionais. Geralmente, o aparecimento de anti-HBs detectáveis está correlacionado com a diminuição ou ao desaparecimento completo do HBsAg contendo imunocomplexos (Pernice *et al.*, 1979). Todos os mecanismos mencionados acima estão resumidos na figura abaixo.

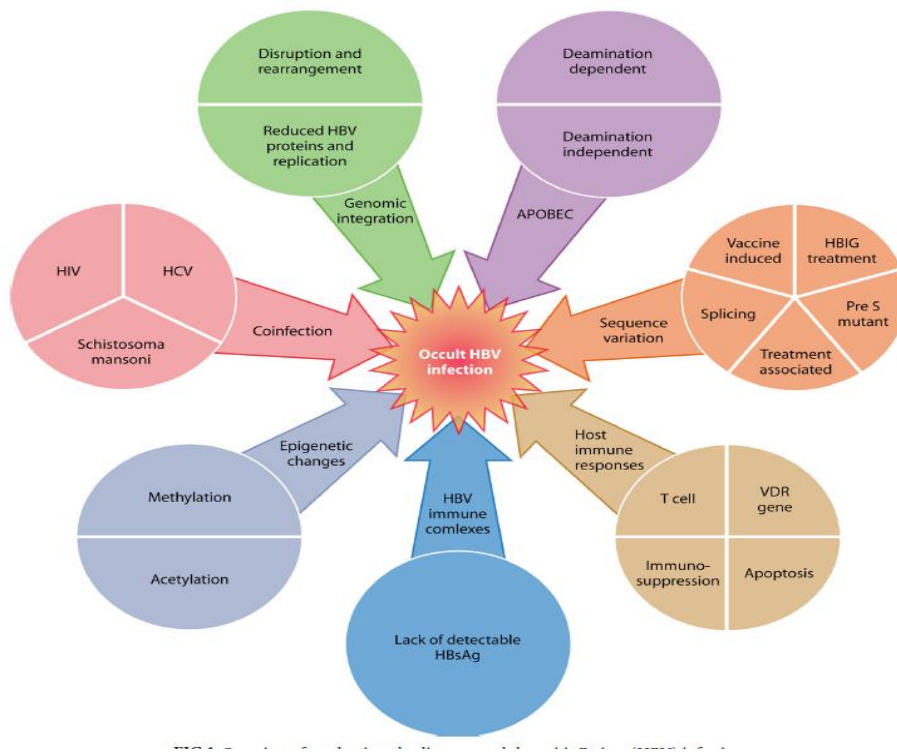


Figura 11 - Mecanismos associados a hepatite B Oculta (Samal et al., ; 2012).

Infelizmente, em Moçambique, ainda não se usam testes moleculares para o rastreio de VHB em doadores de sangue. As directrizes nacionais preconizam o uso de testes serológicos para a detecção apenas do antígeno de superfície (HBsAg) e a confirmação é feita com base em testes rápidos. A inclusão de mais testes de triagem serológica, alta precisão na selecção de doadores de sangue e uma eficaz vacinação contra o vírus de hepatite B, têm um grande impacto na diminuição do risco de transmissão via transfusão de sangue. No entanto, um pequeno risco ainda persiste. De acordo com Kwak & Kim, (2014), o risco de transmissão de VHB por transfusão pode ocorrer como resultado de doação no período de janela imunológica, infecções não detectáveis com base nos testes usados rotineiramente para o diagnóstico devido a mutação na região S do VHB, principal alvo dos testes de diagnóstico, o que possibilita a transmissão de VHB.

2.2. Justificativo

O VHB é um dos três mais importantes agentes responsáveis por infecções transmitidas por transfusão, principalmente no continente africano (Tagny et al., 2008; Mbanya et al., 2003). Estudos realizados em Moçambique apontam para uma elevada frequência do VHB, contudo em Moçambique ainda não existem dados publicados sobre a hepatite B Oculta em dadores de sangue. O presente estudo não só tem o potencial de trazer a magnitude de Hepatite B Oculta em Dadores de Sangue em Moçambique, mas também os mecanismos relacionados a mesma. Os resultados deste estudo serão de grande importância para o entendimento da Hepatite B Oculta no país, contribuindo deste modo para o desenho de políticas na área de diagnóstico, tratamento e prevenção da Hepatite B.

3. OBJECTIVO

3.1. Objectivo geral

- Determinar as caraterísticas Serológicas e Moleculares da Hepatite B oculta em Dadores de Sangue do Banco de Sangue no Hospital Central de Maputo.

3.2. Objectivos específicos

1. Determinar a frequência de Hepatite B Oculta em Dadores de Sangue do Banco de Sangue no Hospital Central de Maputo.
2. Identificar e estimar a frequência dos genótipos e subgenótipos do VHB associados a Hepatite B Oculta no Banco de sangue no Hospital Central de Maputo.
3. Identificar mutações na região S e P associados a Hepatite B Oculta em Dadores de sangue do Banco de Sangue no Hospital Central de Maputo.
4. Identificar a presença de co-infecção VIH/VHC em Dadores de sangue com Hepatite B Oculta no Banco de Sangue no Hospital Central de Maputo.

4. METODOLOGIA

4.1. Desenho do estudo

Este é um estudo transversal realizado no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo, no período entre Novembro de 2014 à Fevereiro de 2016.

Para o presente estudo foram usadas amostras negativas para o antígeno de superfície do VHB-HBsAg (testagem feita no banco de sangue) de dadores que consentiram em participar do "Estudo Diversidade Genética e Risco Residual de Transmissão de HIV, VHB, VHC por transfusão Sanguínea em Moçambique". O estudo foi aprovado pelo Comité Nacional de Bioética, com o número (263/CNBS/2014). Segundo o estudo acima referido, os critérios de inclusão foram os mesmos usados nos bancos de sangue para que um dador seja considerado elegível, tais como:

- ✓ Estar bem de saúde;
- ✓ Ter idade entre 18 a 65 anos;
- ✓ Ter um peso igual ou superior a 50 Kg;
- ✓ Temperatura não superior a 37,50C;
- ✓ Pressão arterial sistolica ate 180mmHg e diastolica ate 100mmHg;
- ✓ Hematócrito mínimo de 41% (sexo masculino) e 38% (sexo femenino);
- ✓ Hemoglobina mínima de 12,0 g/dl (homens) e 11,0 g/dl (mulheres)
- ✓ Não ter tomado asperina em menos de 24 horas;
- ✓ Nunca ter sido excluído definitivamente para doação de sangue;
- ✓ Não ser usuário de drogas;
- ✓ Não ter feito transfusão há menos de um ano;

4.2. Tamanho da amostra

O tamanho de amostra para o presente estudo foi determinado com base na estimativa da proporção populacional, utilizando a seguinte fórmula:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 * p * q}{E^2}$$

Onde,

n = tamanho da amostra

$Z_{\alpha/2}$ = Valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado (95% = 1.645)

P = Proporção populacional de indivíduos que pertence à categoria que estamos interessados em estudar.

q = Proporção populacional de indivíduos que NÃO pertence à categoria que estamos interessados em estudar (q = 1 – p).

E = Margem de erro ou ERRO MÁXIMO DE ESTIMATIVA.

O tamanho amostral foi calculado assumindo uma frequência de hepatite B oculta em doadores de sangue de 50% (valores de p e q desconhecidos), um grau de confiança de 95% = 1.645, um erro de 2.5%. Com base nestes dados o tamanho amostral para este estudo é de 1082 doadores de sangue e o mesmo foi alargado para 1500 doadores de sangue face ao estudo acima citado.

Os 1500 doadores de sangue foram recrutados após passarem pelo pré-inquerito realizado no banco e incluídos para o estudo após a assinatura do consentimento informado.

Para além da colheita requisitada pelo Banco de Sangue para o rastreio de agentes infecciosos foi feita uma colheita adicional, onde foram usados 6ml de sangue total em tubos de vácuo com o anticoagulante. Todas as colheitas foram feitas somente

no período da manhã de modo a garantir o cumprimento das 6h desde a colheita até a preparação das amostras. As amostras uma vez chegadas ao Laboratório de Virologia Molecular (LVM), foram atribuídas um código interno, de seguida fez-se a centrifugação das mesmas à 1600 rpm por 20 minutos para a obtenção do plasma, e foram alicotados 500 µl de plasma para os testes serológicos (anti-HBc, anti-HBs e HBeAg), 1100µl de plasma para carga viral de VHB que foi testada em *pool* de 6 amostras (**caso o *pool* desse positivo isto é ADN do VHV detectado, o *pool* era aberto e as amostras eram testadas individualmente**) e 500µl de plasma para a genotipagem por sequenciamento das amostras com carga viral detectável e anti-HBc positivas e negativas (Fig 12).

Todas as amostras foram armazenadas a -80°C no LVM até a data do processamento

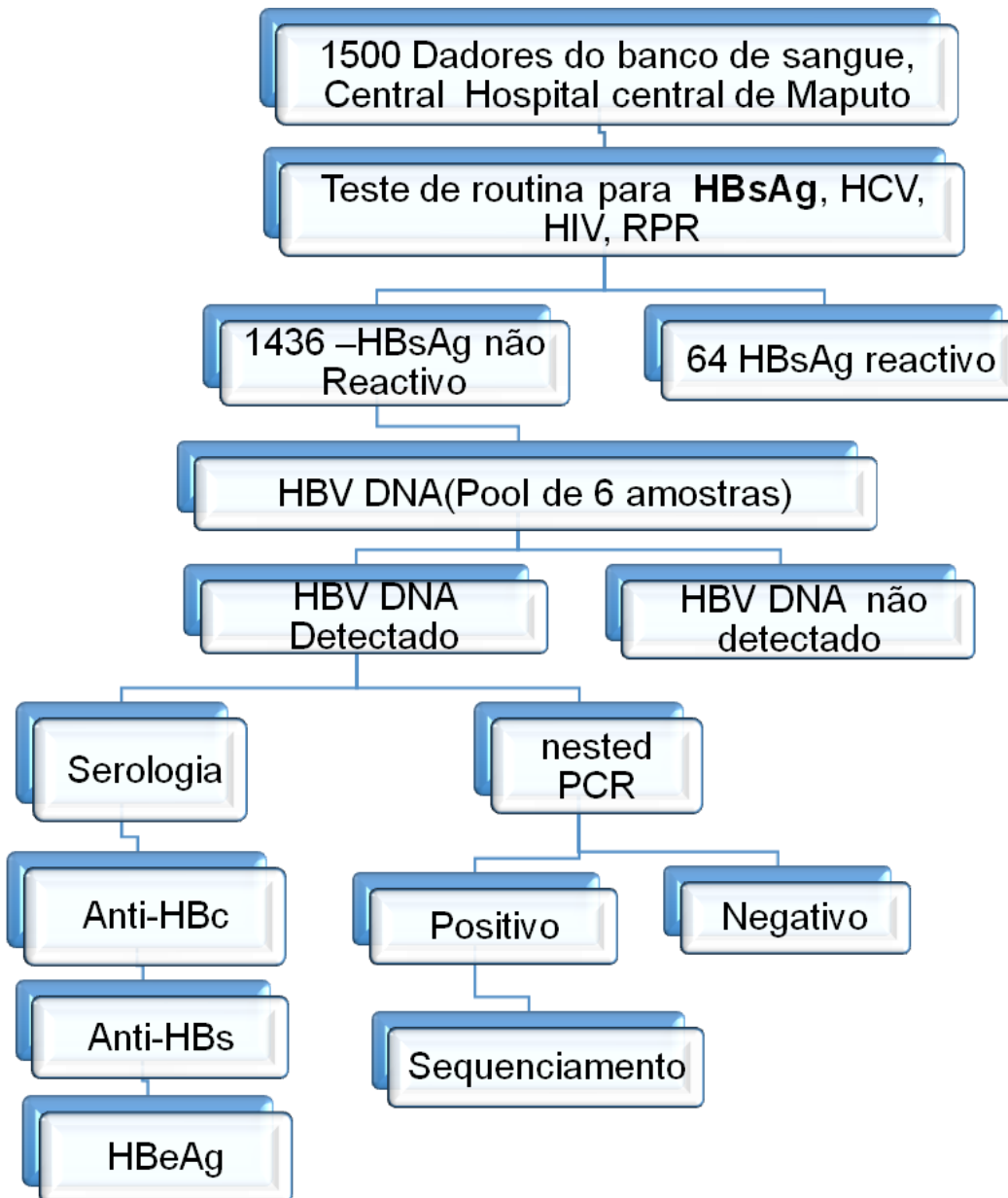


Figura 12 - Fluxograma de recrutamento e testagem laboratorial.

4.3. Testagem Laboratorial

4.3.1. Testes serológicos

Todas as amostras HBsAg negativas com ADN do VHB detectado foram testadas para a detecção dos marcadores anti-HBc, anti-HBs e HBeAg do VHB e para a presença de anticorpos contra o vírus da hepatite C (VHC) e do vírus da imunodeficiência humana (VIH).

A pesquisa do marcador HBsAg, anticorpo contra o VHC e VIH foi realizada no Laboratório do Banco de Sangue do HCM como parte da rotina de rastreio de VHB em Dadores de Sangue.

A pesquisa dos marcadores anti-HBc, anti-HBs e HBeAg do VHB foi realizada no laboratório das Hepatites Virais da Fiocruz-Brasil.

- **Detecção do HBsAg**

A detecção do HBsAg foi feita utilizando ADVANCED® HBsAg ELISA Test Kit (InTec Products, INC, China) e ADVANCED® QUALITY™ one step HBsAg (InTec Products, INC, China), de acordo com as instruções do fabricante.

ADVANCED HBsAg TEST é um ELISA baseado no imunoensaio de duplo antígeno de sanduíche, que utiliza anticorpos anti-HBsAg específicos: anticorpos monoclonais para o HBsAg fixos no fundo dos poços das placas e anticorpos policlonais para o HBsAg ligado a peroxidase de rábano (HRP) na solução de conjugado. Durante o ensaio, o HBsAg presente na amostra reage com estes anticorpos para formar um complexo imune "anticorpo-HBsAg-anticorpo-HRP". Subsequentemente o material que não reagiu é removido durante o processo de lavagem e o substrato de agregado determina o resultado do teste. A presença de uma cor azul nos poços da placa indica que o resultado é reactivo para HBsAg. A ausência de cor indica resultados não-reativos na amostra. A adição de uma solução de ácido sulfúrico paralisa a reacção e produz uma cor amarela. As absorvâncias são lidas utilizando um espectrofotómetro a 450 ou 450-630 nm.

- **Detecção de anticorpos anti-VHC**

A detecção de anticorpos anti-VHC foi feita utilizando ADVANCED® Test Kit VHC (InTec Products, INC, China) e ADVANCED® QUALITY™ Rapido Anti-VHC (InTec Products, INC, China), de acordo com as instruções do fabricante.

ADVANCED Test Kit VHC é um ELISA para a determinação qualitativa de anticorpos contra o vírus de hepatite C em soro ou plasma humano. Durante o ensaio as amostras são diluídas em solução de amostras em poços revertidos com antígenos de VHC recombinante e incubou-se durante 1 hora a 37°C. Durante a incubação todos os anticorpos anti-VHC ligam-se aos antígenos. Foi feita a lavagem para remover todo o material não ligado, de seguida adicionou-se a solução peroxidase de rébano-silvestre conjugado monoclonal anti-IgG humano e incubou-se. Durante a segunda incubação o conjugado liga-se ao anticorpo imobilizado na primeira etapa. Após a remoção do excesso de conjugado, foi adicionada a solução contendo Tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogénio. A presença do complexado é mostrada por uma mudança de cor (azul). A adição de uma solução de ácido sulfúrico paralisa a reacção e produz uma cor amarela. As absorvâncias são lidas utilizando um espectrofotómetro a 450 ou 450-630 nm.

- **Detecção dos antígenos/anticorpos do VIH**

A detecção do vírus da imunodeficiência humana foi feita usando o teste ELISA Genscreen Ultra P-24 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) e confirmadas com o teste UNIGOLD (Trinity Biotech Plc, Bray, Co. Wicklow, Ireland)

O Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab test é um ensaio imuno enzimático baseado no princípio da técnica de sanduíche para a detecção do antígeno VIH e dos vários anticorpos associados a VIH-1e/ou VIH-2 em soro ou plasma humano. Onde as amostras e controis foram incubados juntamente com o conjugado 1 durante 1 hora a 37°C. Se o antígeno estiver presente este liga-se aos anticorpos revestidos na placa ou vice-versa. Após a incubação inicial a microplaca é lavada para remoção de todo material não ligado. De seguida é adicionado o conjugado 2 e, a placa é novamente incubada á 18-30°C, apos a incubação e feita uma segunda lavagem e de seguida e adicionado o substrato, a presença do complexado é mostrado por uma mudança de

cor (azul). A adição de uma solução de ácido sulfúrico paralisa a reacção e produz uma cor amarela. As absorvâncias são lidas utilizando um espectrofotómetro a 450 / 620-700 nm.

- **Detecção do Anti-HBc**

A detecção do marcador anti-HBc foi realizada com base em reagentes comerciais (*Bioelisa anti-HBc, Biokit, Barcelona, Spain*). Um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos do antígeno de core do VHB no soro ou plasma humano.

O princípio da reacção é baseado em inibição competitiva. Cada poço da placa estava revestida com antígeno core do vírus da hepatite B (HBcAg). O conjugado era constituído de anticorpos anti-HBc humano interligado a enzima peroxidase. As amostras e os controis foram incubados juntamente com o conjugado durante 1 hora a 37°C, em seguida, a placa foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem diluída. Após a lavagem, foi adicionada a solução cromógeno (Substrato) (Tetrametilbenzidina (TMB) dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente (20-25 ° C). Finalmente, a reacção foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) e fez-se uma leitura bicromática, utilizando filtro de referência de 620 - 630 nm.

- **Detecção do Anti-HBs**

A detecção do marcador anti-HBs foi realizada com base em reagentes comerciais (*Bioelisa anti-HBs, Biokit, Barcelona, Spain*). Que é um método imunoenzimático direto, do tipo “sanduíche”, onde as amostras foram incubadas durante 1 hora a 37°C em poços de uma microplaca recobertos com HBsAg (subtipos ad e ay) altamente purificado. Se a amostra contiver anticorpos anti-HBs, estes se ligarão especificamente ao HBsAg que recobre o poço. Foi feita uma primeira lavagem para extrair a amostra residual, de seguida adiciona-se HBsAg conjugado com peroxidase e incubação por 30 minutos a 37°C. Após esta segunda incubação e posterior lavagem, procede-se à adição do substrato enzimático e do cromógeno, incubou-se durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Finalmente, a reacção foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) e fez-se uma leitura bicromática, utilizando filtro de referência de 620 - 630 nm.

- **Detecção do HBeAg**

A detecção do marcador HBeAg foi realizada com base em reagentes comerciais (DiaSorin, Sallugia, Italy). Um ensaio imunoenzimático directo não competitivo para a detecção do antígeno "e" do VHB no soro ou plasma humano. Onde as amostras e controis foram incubadas por 10 min a 37°C em poços de uma microplaca recobertos com anticorpo contra o antígeno "e" (anti-HBe) do VHB. Se o HBeAg estiver presente se ligará ao anticorpo que recobre o poço. Foi feita uma primeira lavagem para remover o excesso de amostra, de seguida foi adicionado o conjugado com peroxidase e incubação por 30 minutos a 37°C. Após esta segunda incubação e posterior lavagem, procedeu-se com adição do substrato enzimático e do cromógeno, incubou-se durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Finalmente, a reacção foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) e fez-se uma leitura bicromática, utilizando filtro de referência de 450 - 630 nm.

4.3.2. Testagem Molecular

A pesquisa do ADN do VHB foi realizada no laboratório de Virologia Molecular do Instituto Nacional de saúde.

- **Detecção e quantificação da carga viral do VHB.**

A detecção e quantificação do ADN de VHB foi feita com base no PCR em Tempo Real usando o Kit COBAS *Ampliprep/COBAS® TaqMan® VHB/HBC Test, v2.0* (Roche Diagnostics, Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

O Teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VHB, v2.0 é um teste de amplificação de ácidos nucleicos destinado à quantificação do ADN do VHB em soro e plasma humano. O Teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VHB, v2.0 baseia-se em dois processos principais: (1) preparação da amostra para isolar ADN do VHB e (2) amplificação simultânea por PCR do ADN alvo e detecção de sonda de detecção oligonucleotídica duplamente marcada e clivada específica para o alvo. O Teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VHB, v2.0 permite a preparação automatizada das amostras, seguida da amplificação e detecção automatizadas por PCR do ADN alvo para o VHB e do ADN do Padrão de Quantificação (PQ) do VHB. O reagente de Mistura Principal contém pares de iniciadores e sondas específicos para o ADN do VHB

e para o ADN do PQ do VHB. A Mistura Principal foi desenvolvida para assegurar a quantificação equivalente dos génotipos A a H do VHB. A detecção de ADN amplificado é efectuada através de uma sonda oligonucleotídica duplamente marcada específica para o alvo e específica para o PQ, que permite a identificação independente do amplicon do VHB e do amplicon do PQ do VHB. A quantificação do ADN viral do VHB é realizada utilizando o PQ do VHB. Compensa os efeitos de inibição e controla os processos de preparação e amplificação, visando permitir uma quantificação mais rigorosa do ADN do VHB presente em cada amostra. Trata-se de uma estrutura de ADN não infeccioso que contém sequências de VHB com locais de ligação ao iniciador idênticos aos do ADN alvo do VHB e uma região única de ligação da sonda que permite que o amplicon do PQ do VHB se distinga do amplicon do VHB. O PQ do VHB é incorporado em cada amostra a um número conhecido de cópias e é submetido aos passos de preparação da amostra subsequentes, amplificação por PCR simultânea e detecção das sondas de detecção oligonucleotídicas duplamente marcadas e clivadas. O Analisador COBAS® TaqMan® calcula a concentração do ADN do VHB nas amostras de teste, comparando o sinal do VHB com o sinal do PQ do VHB em cada amostra e controlo.

As amostras com ADN detectável foram submetidas para sequenciamento no laboratório de hepatitis virais- Fiocruz Brasil e obedeceu os passos abaixo.

- **Extracção do ADN de VHB**

A obtenção do ADN de VHB foi feita com base no *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche/ Germany). Onde foram colocados para cada tubo de 1.5 ml, 200µl do plasma, 200µl da solução de trabalho (tampão de ligação a membrana e Poly A) e 50µl de Proteinase K. A mistura foi homogeneizada em vortex por 15 a 30 segundos e incubou-se a 72°C por 10 minutos. De seguida adicionou-se 100µl do tampão de ligação e homogeneizou-se. Combinou-se o tudo de filtragem ao tudo colector, pipetou-se todo o volume para a parte superior do tudo de filtragem para cada amostras. Centrifugou-se a velocidade 8000xg por 1 minuto, de seguida descartou-se o conteúdo e o tubo colector e combinou-se o tudo de filtragem a um novo tudo colector. A seguir adicionou-se 500µl do tampão de remoção de inibidores, centrifugou-se à 8000xg por 1

minuto e descartou-se o conteúdo e o tubo colector e combinou-se o tudo de filtragem a um novo tudo colector. Posteriormente, procedeu-se com a lavagem que foi feita duas vezes onde adicionou-se 450µl do tampão de lavagem, na 1ª lavagem centrifugou-se a centrifugou-se à 8000xg por 1 minuto e descartou-se o conteúdo e o tubo colector e combinou-se o tudo de filtragem a um novo tudo colector e na 2ª lavagem centrifugou-se à 8000xg por 1 minuto e de seguida à 13000xg por 10 segundos e descartou-se o conteúdo e o tubo colector. Para finalizar combinou-se o tubo de filtragem ao tubo de 1,5ml e adicionou-se 50µl do tampão de eluição e centrifugou-se à 8000xg por 1 minuto. O ADN foi conservado a uma temperatura de 2 a 8°C ou -15 a -25° C para posterior análise.

- **Reacção em cadeia da polimerase (PCR)**

Após a extração do ADN, foi realizado um nested PCR para a amplificação do ADN na região S e P. Este procedimento decorreu em duas etapas: 1ª Etapa (PCR1) e 2ª Etapa (PCR-2). A preparação do Mastermix foi feita na sala limpa, a adição do ADN na sala de extração e o produto de PCR 1 na sala de aplicação de ácidos nucleicos.

1ª Etapa (PCR-1) - Foi obtido um volume final de 25µl

Reagentes	Volume (µl) por amostras	Volume final (µl) 26 amostras
Tampão HiFi (1X)	2,5	65
MgSO ₄ (2mM)	1	26
dNTP (0,2 mM)	0,5	13
Primer S1 (0,2µM)	0,5	13
Primer 4R (0,2µM)	0,5	13
Platinum ^{taq} HiFi (0,5 U)	0,1	2,6
ADN (500ng)	0,2	5,0
H ₂ O	14,9	387,4
TOTAL	18,1	520*

*Para cada tudo adicionou-se 20µl do Mastermix e 5µl do ADN, de seguida levou-se para o termociclador por 1h 57min.

Programa no Termociclador

		30 ciclos			
94,0 °C Desnaturação inicial	94,0 °C Desnaturação				
1:00 min	0:15 seg		68,0 °C Extensão inicial	68,0 °C Extensão final	
			1min:15 seg	10:00 min	
		56,0 °C Hibridização			
		0:30 seg			
					4,0 °C

2ª Etapa (PCR-2) - Foi obtido um volume final de 50 µl

Reagente	Volume (µl) para 1 amostras	Volume final (µl) para 26 amostras
Tampão HiFi (1X)	5,0	130
MgSO ₄ (2mM)	2,0	52
dNTP (0,2 mM)	1,0	26
Primer1F (0,2µM)	1,0	26
Primer 4R (0,2µM)	1,0	26
Platinum ^{taq} HiFi (0,5 U)	0,2	5,6
H ₂ O	36,8	956,8
TOTAL	47	1222,4*

*Para cada tudo foi adicionado 47 do Mastermix e 3µl do produto da 1ª PCR, levou-se ao termociclador nos mesmos programas da PCR.

- **Electroforese em gel de agarose**

Preparou-se o gel de agarose a 2% em TBE 1X (Tampão Tris-Borato-EDTA) e adicionou-se brometo de etílio (5µl a cada 100ml de TBE). O produto de PCR 2 (5µl de cada amostras) foi misturado a 2µl do tampão de amostras (azul de bromofenol) e aplicado ao gel, o mesmo foi feito para o marcador de peso molecular (2µl PM, 2µl TA e 10µl TBE). Posteriormente as bandas foram visualizadas com a luz ultravioleta com auxílio de um transluminador. Este procedimento decorreu na sala de electroforese.

- **Purificação do ADN**

Para a purificação do ADN foi preparado o gel de agarose à 0,8% e adicionou-se brometo de etílio (3µl a cada 100ml de TBE). Para cada tubo contendo um volume total (45µl) dos produtos da PCR 2 foi misturado ao tampão de amostras (para cada 10µl do produto de PCR 2 adicionou-se 3µl) e aplicado ao gel. As bandas foram visualizadas com auxílio da luz ultravioleta em um equipamento específico para o corte das bandas. As bandas foram cortadas do gel e colocadas em tubos "Eppendorf" de 1,5ml devidamente identificados.

Este procedimento foi realizado em uma sala específica para o corte das bandas em gel de agarose, onde obedeceu-se as regras de Biossegurança com o uso do equipamento de protecção individual específico para este procedimento devido a alta exposição a luz ultravioleta.

Após a obtenção do ADN no gel, procedeu-se a purificação utilizando o "High Pure Product Purification Kit"(Roche, Germany), onde para cada 100mg da banda do gel cortado adicionou-se 300µl do tampão de ligação a membrana. A mistura foi homogenizada em vortex por 15 a 30 segundos e incubou-se a 56°C por 10 minutos até o gel dissolver. De seguida adicionou-se 150µl de Isopropanol e fiz-se o vortex. Combinou-se o tudo de filtragem ao tudo colector, pipetou-se todo o volume para a parte superior do tudo de filtragem com cuidado para não ultrapassar 700µl, caso acontecesse dividiu-se o volume. Centrifugou-se a velocidade máxima, de seguida

descartou-se o conteúdo e combinou-se o tudo de filtragem no mesmo tudo colector. Posteriormente, procedeu-se com a lavagem, na 1ª lavagem adicionou-se 500µl do tampão de lavagem e na 2ª lavagem 200µl tampão de lavagem e centrifugou-se por 1 minuto na velocidade máxima, descartou-se o conteúdo. Para finalizar combinou-se o tubo de filtragem ao tubo de 1,5ml e adicionou-se 50µl do tampão de eluição e centrifugou-se na velocidade máxima. O ADN foi conservado a uma temperatura de 2 a 8°C ou -15 a -25° C para posterior análise.

- **Quantificação do produto de PCR para o sequenciamento após a purificação**

A quantificação do produto de PCR foi feita com base no equipamento "Qubit Fluorometric Quantitation" da Invitrogen. A solução de trabalho foi preparada com adição de componente A (Reagente Qubit) ao componente B (Tampão Qubit). O volume da solução de trabalho depende do número de amostras.

Para o padrão colocou-se 190µl da solução e 10µl do padrão positivo e negativo. Para a amostra colocou-se 199 µl da solução de trabalho e 1µl do produto purificado. De seguida colocou-se os tubos no equipamento "Qubit" e obteve-se a concentração do ADN em ng/µl em cada amostra.

- **Reacção de sequenciamento da região S e P do VHB**

A reacção de sequenciamento da região Pré-S/S foi realizada utilizando o *BigDye Terminator versão 3.01 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com os primer específicos, dois externos 1F e 4R e dois internos 2F e 3R (Tabela 2).

O volume final para cada reacção de sequenciamento é 10µl, para cada amostra foram usados quatro poços da placa de 96. Onde foi colocado 1µl do BigDye (contendo os didesoxinucleotídeos Trifosfato (ddNTPs) com marcadores fluorescentes, dNTPs e *Taq* ADN polimerase), 1µl do tampão BigDye, 1µl do primer correspondente (3,2pmol), ADN dependendo da concentração e água livre de ADNs suficiente para completar os 10µl. De seguida a placa foi selada com uma tampa de borracha específica para a placa. Colocou-se a placa no termociclador no programa com 40 ciclo (94°C 10seg,

50°C 5seg e 60°C 4min). Posto isso, fez-se a reacção de precipitação usando Isopropanol e finalmente a placa foi colocada no sequenciador automático (3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) para a leitura das electroferogramas.

Tabela 2 - Primers utilizados para o Nested PCR e Reacção de sequenciamento

Primers	Polaridade	Sequencia (5'-3')	Região genômica (nt)	Região genômica
VHB S1	Forward	CTTCTCGAGGACTGGGGACC	124-143	Gene-P e S (parcial)
VHB 1F	Forward	TAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGG	180-203	Gene-P e S (parcial)
VHB 4R	Reverse	GAAAGGCCTTGTAAGTTGGCG	1120-1100	Gene-P e S (parcial)
VHB 2F	Forward	CATCCTGCTGCTATGCCTCATC	409-430	Gene-P e S (parcial)
VHB 3R	Reverse	GATGGGATGGGAATACAGGTGC	615-594	Gene-P e S (parcial)

5. Análise Filogenética

As sequências de nucleótidos dos isolados de hepatite B oculta obtidas no presente estudo foram montadas e alinhadas com outras seqüências de VHB que representam genótipos (A-J) recuperados de GeneBank usando MEGA versão 7.0. A análise filogenética para determinar os genótipos de VBH foi realizada utilizando o método de máxima verossimilhança com bootstrap de 1.000 repetições no MEGA versão 7.0. A árvore filogenética foi gerada usando GTR + G + I como o melhor modelo de substituição de nucleotídeos, conforme indicado pelo software jModeltest versão 2.0.

Para analisar as mutações na região S do genoma de VHB relacionadas a Hepatite B oculta, uma sequência consenso de HBV / A1 e HBV / E foi gerada a partir de 120 e 223 sequências disponíveis em GeneBank, respectivamente. Foi feito um alinhamento de sequências de nucleótidos contendo a sequência consenso e as sequências de HBO moçambicanas e os aminoácidos foram deduzidos através da tradução de codões para analisar as substituições que ocorrem na região S do genoma de VBH.

6. Análise estatística

Foi usada a estatística descritiva para as características demográficas e percentagens para descrever as frequências das análises das variáveis categóricas. Usou-se o teste Qui-quadrado para a comparação das variáveis categoricas a um nivel de significância de 95%. Os dados foram analisados usando o programa Excell.

7. RESULTADOS

7.1. Características demográficas da população do estudo

Participaram do estudo 1500 dadores de sangue, onde a maioria foi do sexo masculino (1173/1500; 78,2 %). Maior parte dos participantes estava na faixa etária dos 25 a 44 anos. A maior parte dos dadores eram repositores (1120/1500; 74,7%) e residiam na cidade e provincia de Maputo.

Um total de 64 dos 1500 (4,3%) foi reactivo para HBsAg. Das 1436 amostras HBsAg não reactivos foi possível dectectar a carga viral do VHB em 17 amostras, correspondendo a 1,2% de frequência de Hepatite B Oculta (HBO). A Maioria dos indivíduos com HBO estavam na faixa etária dos 25 a 44, a maioria era do sexo masculino (14/17; 82,4%) e repositores (16/17; 94,1%). Foi verificada uma diferença estatística significativa entre os indivíduos com Hepatite B (HBsAg reactivos) quando comparados com os indivíduos com Hepatite B oculta em relação a carateristica tipo de dador (Tabela 3). Dos casos com HBO não foi verificado nenhum co-infectado com VIH e VHC.

Tabela 3 - Características demográficas e serológicas da população do estudo

Características	Total n (%)	HBsAg reactivo n (%)	HBsAg não reactivo/HBV DNA detectado n (%)	P (valor)
N	1500	64 (4,3)	17 (1,2)	-
Faixa etária				
<18	8 (0,5)	1(1,6)	0	
18-24	371(24,7)	17(26,6)	5 (29,4)	
25-44	888 (59,2)	40 (62,5)	9 (52,9)	
45-64	231(15,4)	6 (9,4)	3 (17,6)	
>65	2 (0.3)	0	0	
Sexo				0,9
Masculino	1173 (78,2)	50 (78,1)	14 (82,4)	
Feminino	327 (21,8)	14 (21,9)	3 (17,6)	
Nível de escolaridade				0,9
Analfabeto	16 (1,1)	1(1,6)	0	
Primario	330 (22)	16 (25)	4 (23,5)	
Secundário	988 (65,9)	44 (68,7)	12 (70,6)	
Superior	166 (11,1)	3 (4,7)	1 (5,9)	
Proveniência				1,4
Zona Sul	1489 (99,23)	63 (98,4)	5 (29,4)	
Zona Centro	7 (0,5)	1(1,6)	12 (70,6)	
Zona Norte	3 (0,2)	0	0	
outro	1(0,07)	0	0	
Estado Civil				0,7
Casado (a)	321(21,4)	16(25)	1(5,9)	
Solteiro (a)	1158 (77,2)	47 (73,4)	16 (94,1)	
Divorciado (a)	15(1)	1(1,6)	0	
Viúvo (a)	6 (0,4)	0	0	
Tipo de dador				0,004
Repositor	1120 (74,6)	57 (89,1)	16 (94,1)	
Voluntário	381 (25,4)	7(10,9)	1 (5,9)	

7.2. Características serológicas e moleculares da população de estudo

Das 17 amostras de dadores com serologia negativa para o HBsAg e carga viral de VHB detectável, 13 (76,5%) eram anti-HBc positivos, 4 (23,5%) eram anti-HBs positivos e 3 eram anti-HBc/anti-HBs positivos. Nenhuma amostra foi reactiva para o marcador HBeAg. A carga viral variou de <20 a 1326 UL/ml. (Tabela 3).

Tabela 3 - Características serológicas e Moleculares dos casos com Hepatite Oculta

Codigo	Perfil Serologico				Características virológicas	
	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs	HBeAg	Carga viral (IU/ml)	Genótipos e Subgenótipos
BSM 385	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<20	A (A1)
BSM 532	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<20	A (A1)
BSM 590	Negativo	Negative	Positivo	Negativo	1014	A (A1)
BSM 800	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	28	A (A1)
BSM 885	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	1326	A (A1)
BSM 1498	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	503	E
BSM 1551	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	349	A (A1)
BSM 1626	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	< 20	A (A1)
BSM 1634	Negativo	Negative	Negativo	Negativo	< 20	A (A1)
BSM 1637	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	< 20	A (A1)
BSM 377	Negativo	Negativo	-	-	< 20	-
BSM 805	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	26	-
BSM 806	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	< 20	-

BSM 942	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	< 20	-
BSM 1628	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	175	-
BSM 1629	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	< 20	-
BSM 1688	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	125	-

7.3. Identificação dos genótipos em amostras com Hepatite oculta

A amplificação das regiões S/P do genoma do VHB foi efectuada com sucesso em 10 dos 17 (58,8%) casos com Hepatite B oculta, conforme ilustrado na figura 13.

Os resultados das análises filogenéticas das 10 sequências obtidas neste estudo revelaram que 9 (90%) isolados pertenciam ao genótipo A (A1) e somente um (10%) isolado pertencia ao genótipo E (Figura 14).

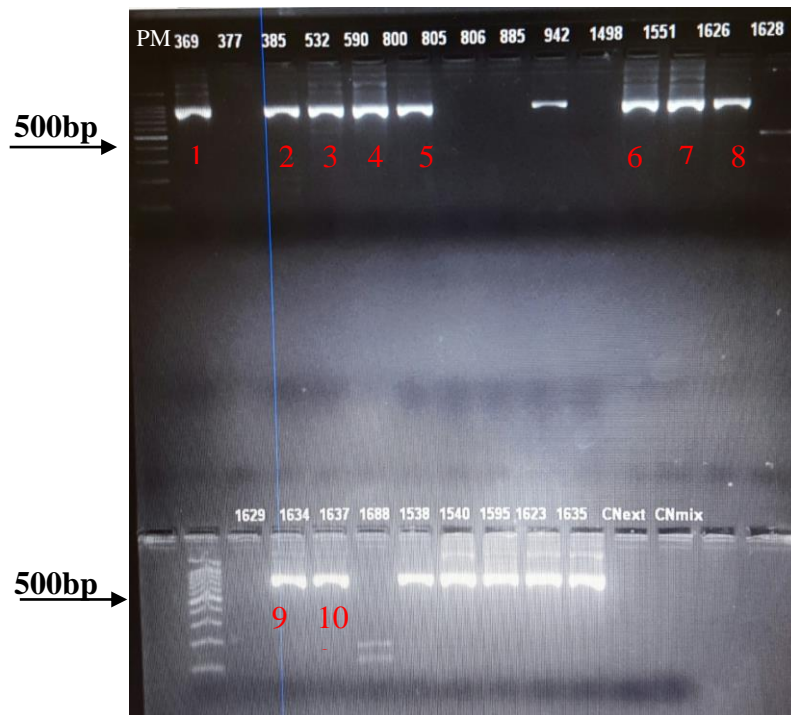


Figura 13. Representação do gel de agarose 2% com as 10 amostras amplificadas (indicadas pelos números a vermelho) dos 17 casos com Hepatite B oculta. *PM*-peso

molecular, *bp*-pares de bases, *CNext*-controle negativo da extração, *CNmix*-controle negativo da amplificação.

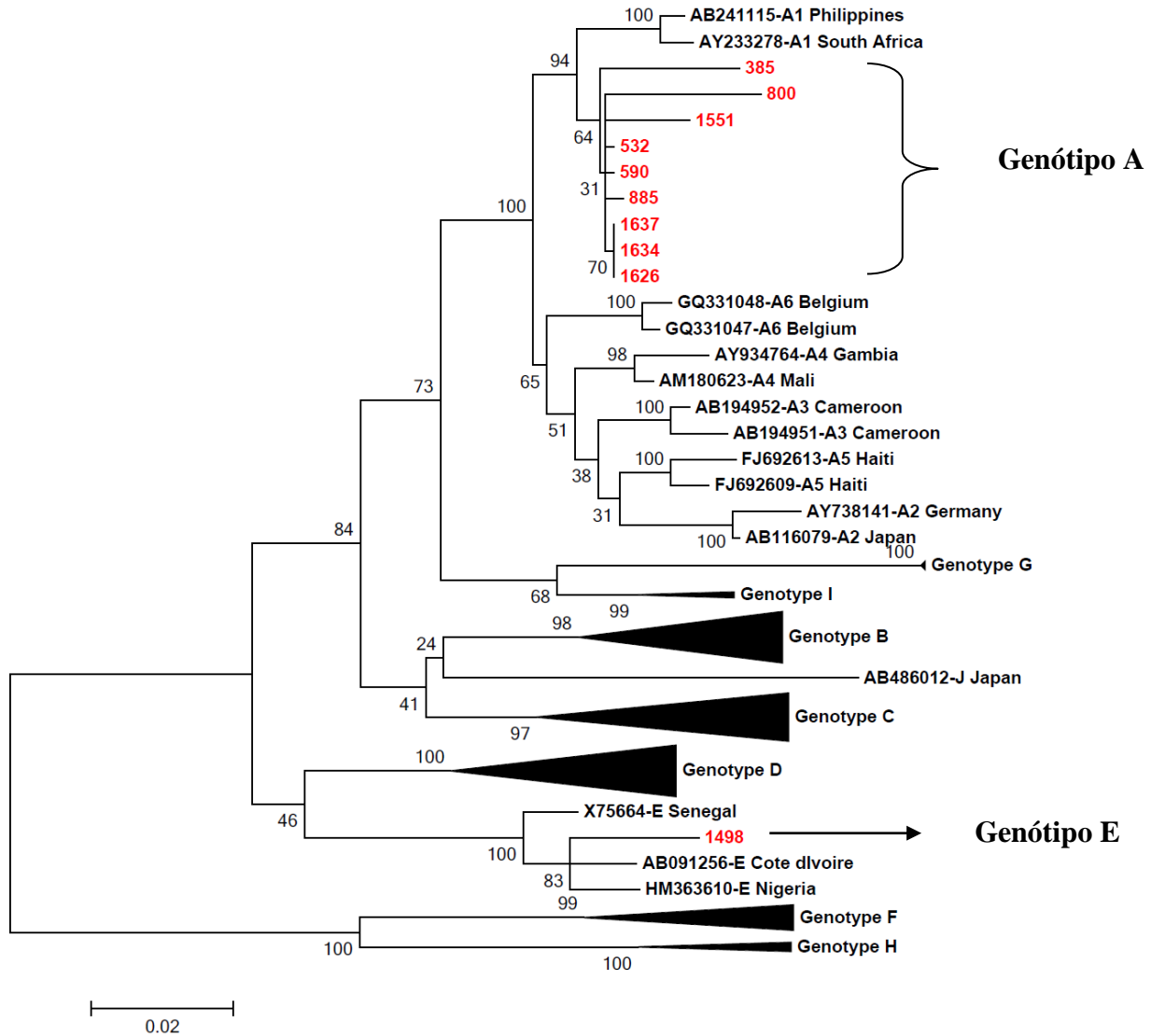


Figura 14 - Árvore filogenética das regiões S e P do gemoma do VHB. Para a análise, utilizou-se um fragmento de 897 nucleótidos, correspondente a região S e P do genoma do VHB. As sequências dos casos com Hepatite Oculta (indicados pelos números a vermelhos) foram comparadas com sequências representativas de todos genótipos de VHB (A a J). Árvore foi gerada pelo programa MEGA 7.0 usando o método Neighbor Joining. Valores de bootstrap foram obtidos a partir de 1000 repetições.

7.4. Identificação das mutações na região S associadas a Hepatite B oculta

No presente estudo, não foram observadas substituições de aminoácidos na maior região hidrofílica, mas substituição de aminoácidos F134I para a amostra BSM1551 e mutação de escape T123A para amostra BSM590 na região do determinante "a" em amostras pertencentes ao genótipo A e substituição de aminoácidos E164G na amostra BSM1498 pertencente ao genótipo E. Adicionalmente, foi observado o polimorfismo A193V na região S para todas as amostras com HBO (Figura 15 e 16).

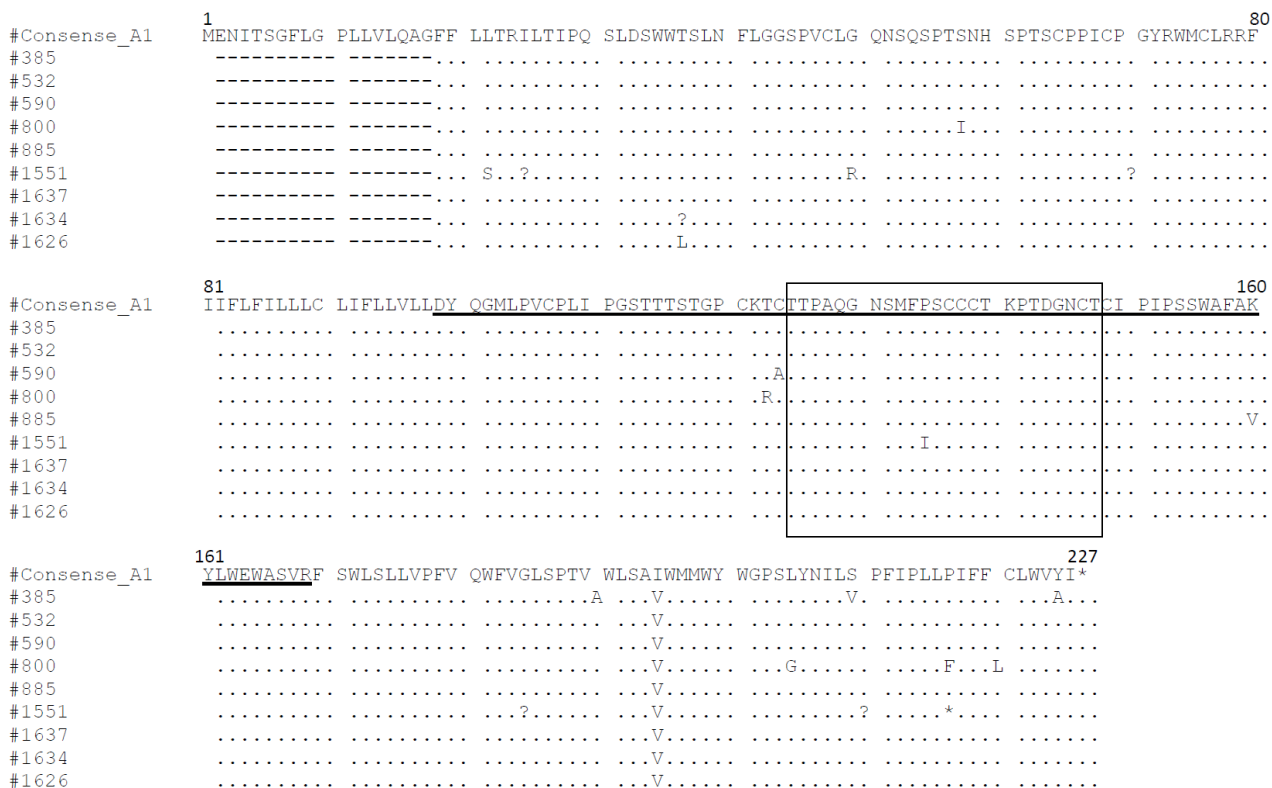


Figura15. Alinhamento de aminoácidos na região S do genoma de VHB (aa 1-227) dos indivíduo infectado pela HBO pertencentes ao genótipo A. A maior região hidrofílica (aa 99-169) está sublinhada e a região do epítipo determinante "a" está representada na caixa.

```

#Consensus_E      1 MESITSGFLG PLLVLQAGFF LLTKILTIPQ SLDSWWTSLN FLGGAPVCLG QNSQSPTS NH SPTSCPPICP GYRWMCLRRF 80
#1498             -----.....LI.....

#Consensus_E      81 IIFLFILLLC LIFLLVLLDY OGMLPVCPLI PGSSTTSTGP CRTCTTLAG TSMFPSCCCS KPSDGNCTCI PIPSSWAFGK 160
#1498             .....

#Consensus_E     161 FLWEWASARF SWLSLLVPFV QWFAGLSPTV WLSVIWMMWY WGPSLYNILS PFIFLLPIFF CLWVYI* 227
#1498             ...G.....N.....*.....

```

Figura16. Alinhamento de aminoácidos na região S do genoma de VHB (aa 1-227) dos indivíduo infectado pela HBO pertencentes ao genótipo E. A maior região hidrofílica (aa 99-169) está sublinhada e a região do epítipo determinante "a" está representada na caixa.

8. DISCUSSÃO

As características (sexo, idade, tipo de dador) apresentadas pelos participantes do nosso estudo constituem padrão ou perfil de dadores de sangue em Mocambique. Estudos anteriores no mesmo Banco de Sangue e em outros encontram o mesmo padrão (Gudo *et al.*, 2004, Cunha, *et al.*, 2007 Stokx *et al.*, 2011 & Mabunda *et al.*, 2014).

A frequência de Hepatite B Oculta encontrada no presente estudo foi de 1,2% (17/1436), esta frequência é baixa quando comparado com outros estudos realizados em dadores de sangue em outros países africanos com mesma epidemiologia para infecção pelo VHB como é o caso da Nigéria com 8% (Nna *et al.*, 2014), 17% (Oluyinka *et al.*, 2015) e 5,4% (Olotu *et al.*, 2016). Bem como quando comparado com estudos realizados no Brasil, Irão, Itália, Índia, e Colômbia com 2,7%, 9,98%, 4,86%, 7.5% e 1,98% respectivamente (Moresco *et al.*, 2014, Alizadeh *et al.*, 2014, Manzini *et al.*, 2007, Asim *et al.*, 2010 & Rios-Ocampo *et al.*, 2014). No entanto existem estudos onde foram reportadas prevalências mais baixas comparadas a prevalência encontrada no presente estudo é o caso dos estudos realizados no Irão onde foram encontradas prevalências de 0,05 %, 0,92 % e 0,8 % (Khamesipour *et al.*, 2011; Pourazar *et al.*, 2005 & Behbahani *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Kwak & Kim, 2014, Samal *et al.*, 2012; Arababadi *et al.*, 2011 & Dragan, 2008) demonstraram que as diferenças das prevalências de hepatite B oculta em vários estudos podem ser influenciadas pela epidemiologia do VHB nas diferentes regiões do mundo, o tamanho da população estudada, sensibilidade dos testes usados para o diagnóstico e o método usado para classificar hepatite oculta. Provavelmente uma das razões para a baixa frequência de HBO encontrada no presente estudo seja explicada pelo método usado para o rastreio dos casos com HBO que foi a detecção da carga viral do VHB usando tecnologia automatizada de PCR em tempo real. Ao contrário do que é verificado quando são usados testes serológicos onde os casos de HBO tendem a ser mais elevados.

Por outro lado, este estudo demonstrou que os casos com HBO apresentavam baixo nível de detecção do ADN do VHB excepto em duas amostras (BSM 885 and 590), estes níveis baixos de detecção do ADN estão de acordo com vários estudos, onde indicam forte supressão da replicação activa e expressão do HBsAg. Não obstante, a alta carga viral observada nas duas amostras pode estar associada a uma infecção recente o que pode aumentar o risco de transmissão de VHB ao receptor do sangue transfundido. E quando olhamos para a população Mocambicana, grande parte dos indivíduos que recebem transfusão sanguínea são indivíduos com o sistema imunológico comprometido como é o caso dos indivíduos HIV positivos, Diabéticos e com CHC.

Nos casos com HBO, o genótipo A foi o mais frequente 9/10 (90%), seguido do genótipo E 1/10 (10%). Este padrão de genótipos assemelha-se ao encontrado nos casos de Hepatite B na região sul e norte de Moçambique (Cunha *et al.*, 2007 & Wandeler *et al.*, 2016). Cunha e colaboradores (2007), encontrou ainda uma pequena porção de indivíduos com genótipo D (0.5%) no mesmo Banco de Sangue. No presente estudo não foi evidenciado a circulação do genótipo D, assemelhança de outros estudos realizados após o estudo de Cunha e colaboradores (2007). Até então, não estão claros os factores que possam estar associados a não identificação do genótipo D em Moçambique. É provável que o genótipo D esteja a ser introduzido no país mas a circulação é limitada. Diferente do genótipo E que no estudo da região norte tem maior percentagem. Contudo, para que se possa dizer com clareza que há uma introdução do genótipo D e E na população Mocambicana é necessários fazer-se o sequenciamento do genoma completo e estudos sobre a fiogeografia do VBH.

Por outro lado, estudo realizado na África do sul sobre mutações associadas a hepatite oculta em indivíduos HIV-Positivos identificaram o genótipo A1 em 4 e o genótipo A2 em 24 dos 30 casos com hepatite oculta (Powell *et al.*, 2015). Oluyinka, *et al.*, (2015) num estudo realizado na Nigéria sobre infecção por hepatite oculta em dadores de sangue e o risco de transmissão, verificaram que o genótipo E foi o mais prevalente seguido do genótipo A, ao contrário do que foi verificado no presente estudo.

Este cenário pode ser explicado pelo facto de o genótipo E ser mais predominante na região Oeste e central de África.

A localização geográfica de Moçambique e as relações históricas com os vários países são condições favoráveis para ocorrência de movimentos migratórios com os outros países principalmente com os países da África sub-Sahariana, o que favorece a troca de estirpes virais. Análise filogeográfica das 10 sequências do genótipo A e E deste estudo formaram pequenos grupos de transmissão (*clusters*) com as sequências provenientes de alguns países da região sub-Sahariana (Figura 11), as sequências Moçambicanas formaram maiores grupos com as sequências de África do Sul e Filipinas (genótipo A) e Nigéria e Costa do Marfim (genótipo E), três destas sequências partilhavam a mesma estirpe viral.

No estudo de Svicher et al; (2012) foram identificadas mutações fortemente correlacionadas com hepatite oculta em estirpes do genótipo D. Segundo Yuan et al., (2010), as mutações identificadas nas estirpes do genótipo D foram diferentes das mutações identificadas nas estirpes do genótipo B e C, daí que estes autores sugerem que as mutações associadas a hepatite B oculta são específicas para cada tipo de genótipo.

No presente estudo foram observadas substituições de aminoácidos na região S. Estas substituições de aminoácido são as primeiras a serem descritas em Moçambique em indivíduos com hepatite B oculta. A substituição de aminoácido F134I observada no presente estudo foi também observada no estudo realizado no Brasil por Almeida *et al.*, (2017). Hou et al., (2001) identificaram 15 aminoácidos substituídos na região MHR, dos quais a mutação de escape T123A fazia parte. Esta mutação foi também identificada no presente estudo e está bem documentado que esta mutação está associado a alteração da imunogenicidade e como resultado, o HBsAg não é reconhecido pelos kits comerciais disponíveis. Adicionalmente a substituição do aminoácido E164G foi também observado no estudo realizado na Nigéria. Por outro lado a ocorrência do polimorfismo A193V em quase todas amostras com HBO pode

estar relacionada a uma característica molecular da população moçambicana infectada pelo VHB. Contudo mais estudos devem ser realizados para suportar esta hipótese.

No estudo realizado por Salpini et al., (2015) foi possível verificar que mais de 75.9% de pacientes VHB reactivos eram portadores de mais de uma mutação na região S do VHB. Na maior região hidrofílica (MHR) foram identificadas 8 mutações (M103I-L109I-T118K-P120A-Y134H-S143L-D144E-S171F) 5 em epitopos nas células T pertencentes a classe I (C48G-V96A-L175S-G185E-V190A).

A co-infecção VHB e VHC/HIV resulta na redução da replicação do VHB e na expressão do HBsAg. No presente estudo não foi identificada nenhuma co-infecção VHB e VHC/HIV. Entretanto foi verificado em uma amostra com hepatite oculta pertencente ao genotipo E evidência serologia de co-infecção com o vírus de hepatite Delta (HDV), contudo testes moleculares são necessários para a confirmação deste caso.

Nossos resultados mostram maior positividade para o marcador Anti-HBc (76.5%) em indivíduos com Hepatite B oculta. Estes dados corroboram com os achados de Lin et al., (2016) e Assim e tal., (2010) onde nos casos com Hepatite oculta 85% foram reactivos para o marcador anti-HBc. Com base nesses achados os autores concluíram que a inclusão do teste anti-HBc levará a uma alta taxa de descarte de amostras. O que irá de certo modo reduzir a taxa de transmissão do VHB por transfusão sanguínea.

Estes resultados mostram que o marcador HBsAg por si só não é suficiente para determinar a infecção ou não por VHB em indivíduos com infecção oculta. E para países com recursos limitados como é o caso de Moçambique que usa somente um teste de rastreio, aumenta o risco de transmissão de VHB por transfusão sanguínea. Dai que o uso de testes complementares como a detecção do anticorpo da core (anti-HBc) e testes moleculares para a detecção do ADN do vírus poderão reduzir o risco de transmissão do vírus.

Este foi o primeiro estudo que identificou a hepatite B oculta e caracterizou os genótipos e mutações em doadores de sangue. Os achados deste estudo poderão contribuir no futuro para revisão das estratégias de rastreio de agentes infecciosos usadas nos Bancos de sangue. Os dados mostram uma urgência de introdução de testes complementares para a exclusão de Hepatite B Oculta e necessidade de maior entendimento dos factores relacionados com a não expressão de HBsAg (Hepatite B Oculta).

9. CONCLUSÃO

Com base nos achados do presente estudo, podemos concluir que há ocorrência de Hepatite B Oculta em Dadores de Sangue e que os genotipos A e E são os mesmos encontrados na população HBsAg positivos. No entanto não foi observada nenhuma co-infecção HIV/VHC nos casos com hepatite B Oculta. As substituições de aminácidos em indivíduos com hepatite B oculta foram identificadas pela primeira vez no presente estudo. Contudo, mais estudos são necessários para entender os factores relacionados com a não expressão de HBsAg (Hepatite Oculta).

10. LIMITAÇÕES

- Não foi possível repetir a testagem das 7 amostras que não amplificaram no nested-PCR devido a escassez de reagente durante o período de estágio no Laboratório de Hepatitis Virais na FIOCRUZ.

11. RECOMENDAÇÕES

- Numa primeira fase adição do marcador Anti-HBc como um teste de confirmação no rastreio de Dadores de Sangue visto que os nossos dados mostraram uma positividade de 76.5% para o marcador anti-HBc em amostras HBsAg negativas que já tinha sido classificadas com negativas para a infecção pelo VBH.
- Posteriormente a avaliação da introdução de testagem molecular para o rastreio de Hepatite B;

12. PRESPECTIVAS

- Seguimento de pacientes que receberam o sangue de dadores com hepatite B oculta para avaliar a infectividade.

13. REFERÊNCIAS

Ackerman Z, Wands JR, Gazitt Y, Brechot C, Kew MC, Shouval D. Enhancement of HBsAg detection in serum of patients with chronic liver disease following removal of circulating immune complexes. *Journal of Hepatology*. 1994 Mar (3):398-404.

Allain JP, Cox L. Challenges in hepatitis B detection among blood donors. *Curr Opin Hematol*. 2011; 18:461-466.

Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang*. 2004 Feb;86 (2):83-91.

Alizadeh Z, Milani S, Sharifi Z. Occult Hepatitis B Virus Infection among Iranian Blood Donors: A preliminary Study. *Arch Iran Med*. 2014;17(2): 106-107.

Asim M, Ali R, Khan LA, Husain SA, Singla R, & Kar P. Significance of anti-HBc screening of blood donors & its association with occult hepatitis B virus infection: Implications for blood transfusion. 2010 pp 312-317.

Arababadi MK, Hassanshahi G, Pourfathollah AA, Zarandi ER, Kennedy D. Post-Transfusion Occult Hepatitis B (OBI): A Global Challenge for Blood Recipients and Health. *Hepat Mon*. 2011;11(9):714-718. DOI: 10.5812/kowsar.1735143X.694.

Bartholomeusz A. e Locarnini S. Hepatitis B mutation associated with antiviral Therapy. *J Med* 2006;78 Supp1:S52-S55.

Behzad-Behbahani A, Mafi-Nejad A, Tabei S, Lankarani K, Torab A, Moaddeb A. Anti-HBc & HBV-DNA detection in blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen in reducing risk of transfusion associated HBV infection. *Indian J Med Res*. 2006;123:37-42.

Biswas A, Panigrahi R, Chandra PK, Banerjee A, Datta S, Pal, M *et al*. Characterization of the Occult Hepatitis B Virus Variants Circulating among the Blood

Donors from Eastern India. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–7.
doi:10.1155/2013/212704.

Blumberg BS, Alten HJ, Visnich S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA* 1965;
191: 541.

Branco F, Mattos AA, Coral GP, Vanderborght B, Santos DE, França P, Alexandre C. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in Brazil. *Arq Gastroenterol* 2007;
44:58-63 [PMID: 17639185].

Brechot C, Thiers V, Kremdorf D, Nalpas, B, Pol S, Brechot PP. Persistent Hepatitis B Virus Infection in Subjects Without Hepatitis B Surface Antigen: Clinically Significant or Purely "Occult"? *Hepatology* 2001;34(1): 194-203. doi:10.1053/jhep.2001.25172

Buti M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Esteban R. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and VHB genotypes. *J Clin Virol* 2005;34:S79–S82.

Caliguri P, Cerruti R, Icacardi G, Bruzzone B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in management of infection. *World J Gastroenterol* 2016;
22(1):145-154.

Carmon WF, Karula J, Wallace L, Macphee R, Mimms L, Decker R.. Fluminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant the escape detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet* 1995; 345:1406-1407.

Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990;
336: 325-329 [PMID: 1697396].

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis Cliver disease. *N Engl J Med* 1999;341:22-26.

Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51:798-809.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cADN clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359.

Chen SY, Kao CF, Chen CM, Shih CM., Hsu MJ., Chao CH., Wang SH., You LR, Lee YH. Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 2003; 278: 591-607 [PMID: 12401801].

Chen Chien-Jen; Yang Hwai-I. Natural History of Chronic Hepatitis B Reveled. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(4):628-638.

Chan HL, Hui AY, Wong ML, Tse AM, Hung LC, Wong VW, Sung JJ.. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 1494-1498.

Cunha L, Plouzeau C, Ingrand P, Gudo JPS, Ingrand I, Mondlane J, et al. Use of replacement blood donors to study the epidemiology of major blood-borne viruses in the general population of Maputo, Mozambique. *Journal of Medical Virology* 2007, 79(12), 1832–1840. doi:10.1002/jmv.21010.

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

Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravart R. Molecular Biology of the hepatitis B virus for clinicians. *J Exp Hepatol* 2012; 2:353-365.

Deshkar, Hepatitis Viruses. 2009 pp 1-75.

Dragun D. Humoral responses directed against nonhuman leukocyte antigens in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2008;86(8):1019-25.

Dumoulin FL, von dem Bussche A, Li J, Khamzina L, Wands JR, Sauerbruch T, Spengler U. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* 2003;305: 260-266.

Ei Ekiaby M, Lelie N, & Allain, JP. Nucleic acid testing (NAT) in high prevalence–low resource settings. *Biologicals* 2010;38(1),59–64. doi:10.1016/j.biologicals.2009.10.015.

Fung K, Lok ASF. Hepatitis b virus genotypes do they play a role in the outcome of VHB infection? *Hepatology*. 2004;40(4): 790-792. doi:10.1002/hep.20455.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 1973;182: 1026.

Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, Gish RG, Rojter S, Vierling JM, Lok AS. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1998;27(1), 213–222.

Ghosh S, Banerjee P, Deny P, Mondal RK, Nandi M, Roychoudhury A, et al. New HBV subgenotype D9, a novel D/C recombinant, identified in patients with chronic HBeAg-negative infection in Eastern India. *J Viral Hepat* 2013;20: 209-218.

Gudo JS. Normas sobre a prática clínica transfusional em Moçambique. Ministério da Saúde-Direcção Nacional de Saúde. 2004 Maputo.

Hannoun C, Norder H, Lindh M. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *Journal of General Virology* 2000;81(9), 2267–2272.

Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *International Journal of Medical Sciences* 2005;2(1), 50.

Hou J, Wang Z, Cheng J, Lin Y, Lau GK, Sun J et al. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in nonimmunized surface antigen-negative Chinese carriers. *Hepatology* 2001;34:1027–1034. [PubMed: 11679975].

Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1991;11:73–83.

Hoofnagle JH, Seeff LB, Bales ZB, Zimmerman H.J. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med* 1978;298: 1379-1383

Hsied TH, Tseng TC, Lin CJ, Lai MY, Chen PJ, Hsied HL et al. Hepatitis B virus genotype B has an earlier emergence of Lamivudine resistance than genotype C. *Antiviral Therapy* 2009;14:1157-1163.

Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult VHB strains from blood donors. *J Hepatol* 2012;57: 720-726

Jardim, RNCM, Gonçalves NSL, Pereira JSF, Fais VC, Gonçalves JFL. Occult hepatitis B virus infection in immunocompromised patients. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2008; 12(4), 300–305.

Ji J, Sundquist K, Sundquist J. A population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2012;104: 790–792.

Kao JH, Chen PJ, Chen DS. Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiologic and molecular biological aspects. *Advances in Cancer Research* 2009;108, 21–72.

Kaur P, Paliwal A, Durantel D, Hainaut P, Scoazec J.Y, Zoulim F, et al. ADN methylation of hepatitis B virus (HBV) genome associated with the development of hepatocellular carcinoma and occult HBV infection. *J Infect Dis* 2010;202:700–704.

Kew MC, Kramvis A, Yu MC, Arakawa K, Hodgkinson J. Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-Saharan Africans. *J Med Virol* 2005; 75: 513–21.

Khamesipour A, Amiri ZM, Kafiabad SA, Saadat F, Mansour-ghanaei F, Esteghamati AR, Shakib RJ.. Frequency of hepatitis B virus DNA in anti-HBc positive, HBsAg negative blood donors in Rasht, northern Iran. *Transfus Apher Sci.* 2011;45:195–7.

Kim JW, Lee SH, Park YS, Hwang J, HJeong SH, Kim N, Lee DH. Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection. *Intervirology* 2011;54:316 –325.

Kim MJ, Park Q, Min HK, Kim HO. Residual risk of transfusion-transmitted infection with human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in Korea from 2000 through 2010. *BMC Infectious Diseases* 2012;12:160.

Kim H, Lee SA, Kim DW, Lee SH, Kim BJ. Naturally occurring mutations in large surface genes related to occult infection of hepatitis B virus genotype C. *PLoS One* 2013; 8: e54486.

Kruse R. HBV X protein Antagonism as a Novel Therapy. 2015).

Kramvis A, Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes *Hepatology Research* 2007 2; 37: S9–S19 doi: 10.1111/j.1872-034X.2007.00098.x

Kwak MS, Kim YJ. Occult hepatitis B virus infection. *World Journal of Hepatology*, 2014;6(12), 860. doi:10.4254/wjh.v6.i12.860

Lee DS, Huh K, Lee EH, Lee DH, Hong KS, Sung YC. HCV and HBV coexist in HBsAg-negative patients with HCV viraemia: Possibility of coinfection in these patients must be considered in HBV-high endemic area. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1997; 12(12), 855–861.

Lazarevic I. clinical Implication of hepatitis B virus mutation: Recent advance. *World J Gastroenterol* 2014;20:7653-7664.

Lin H, Zhao H, Tang X, Hu W, Jiang N, Zhu S, Huang C. Serological Patterns and Molecular Characterization of Occult Hepatitis B Virus Infection among Blood Donors. *Hepat Mon* 2016;16 (10):e40492.

Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus large-scale analysis using a new genotyping method. *Journal of Infectious Diseases*, 1997; 175(6), 1285–1293.

Liu Y, Zhong Y, Zou Z, Xu Z, Li B, Ren X, et al. Features and clinical implications of hepatitis B virus genotypes and mutations in basal core promoter/precore region in 507 Chinese patients with acute and chronic hepatitis B. *Journal of Clinical Virology* 2010;47(3): 243–247. doi:10.1016/j.jcv.2009.12.013.

Locarnini S, McMillar J, Bartholomeusz A. The Hepatitis B virus an common mutation. *Semin liver Dis* 2003; 23:5-20.

Mabunda NJ, Alvarado-Arnez LE, Vubil A, Mariamo A, Pacheco AG, Jani IV, • Moraes MO. Gene polymorphisms in patients with pulmonary tuberculosis from Mozambique. *Mol Biol Rep* 2014 DOI 10.1007/s11033-014-3741-1.

Mallory MA, Page SR, Hillyard DR. Development and validation of a hepatitis B virus ADN sequencing assay for assessment of antiviral resistance, viral genotype and surface antigen mutation status. *J Virol Methods* 2011 Oct;177(1):31-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.06.009.

Mallet V, Vallet-Pichard A, Pol S.. The impact of human immunodeficiency virus on viral hepatitis. *Liver Int* 2011;31 Suppl 1:135-139 [PMID: 21205151 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02394.x].

Manzini P, Giroto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, et al . Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica* 2007;92(12), 1664–1670. doi:10.3324/haematol.11224.

Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, Nakamura H, Matsumura H, Oshiro S. Influence of occult hepatitis B virus coinfection on the incidence of fibrosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Intervirology* 2008;51:352–361.

Martin CM, Welgeb J, Shirea NJ, Shataa MT., Shermana KE, Blackarda JT Cytokine expression during chronic versus occult hepatitis B virus infection in HIV co-infected individuals. *Cytokine* 2009;47:194 –198. doi:10.1016/j.cyto.2009.06.005.

Mbanya DN, Takam D, Ndumbe PM. Serological finding amongst first-time blood donors in Yaoundé, Cameroon: Its safe donation a reality or a myth? *Transfusion Medicine* 2003; 13:267-273.

Melegari M, Bruno S, Wands JR. Properties of hepatitis b virus Pre-S1 deletion mutants. *Virology* 1994;199(2). 292-300.

Millich DR, McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and T-cell-dependent antigen. *Science* 1986; 234: 1398-1401.

Miura Y, Shibuya A, Adachi S, Takeuchi A, Tsuchihashi T, Nakazawa T, Saigenji K. Occult hepatitis B virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C in whom viral eradication fails. *Hepatol Res* 2008;38: 546-556 [PMID: 18179561 DOI: 10.1111/j.1872-034X]

Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying Hepatitis B Virus Genotypes. *Intervirology*, 2003;46(6), 329–338. doi:10.1159/000074988.

Madejón A, Romero M, Hernández A, García-Sánchez A, Sánchez-Carrillo M, Antonio O, García-Samaniego J. Hepatitis B and D viruses replication interference: Influence of hepatitis B genotype. *World J Gastroenterol* 2016;21; 22(11): 3165-3174.

Moresco MN, dos S, Virgolino HA, Morais MPE, Motta-Passos I, Gomes-Gouvêa M. S, Assis L MS, et al. Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. *Vox Sang*. 2014 107(1): 19–25. doi:10.1111/vox.12125.

Norder H, Courouc AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and Subtypes. *Intervirology*, 2004; 47(6), 289–309. doi:10.1159/000080872.

Nna E, Mabomalu C, Ekejindu L. Occult hepatitis B viral infection among blood donors in South-Eastern Nigeria. *Pathogens and global health*. 2014 Jul;108(5):223-8. doi: 10.1179/2047773214Y.0000000144.

Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for ad/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *Journal of Virology*, 1987; 61(10), 3030–3034.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 1988;69(Pt 10), 2575–2583.

Olinger C M, Jutavijittum P, Hübschen JM, Yousukh A, Samountry B, Thammavong T, Toriyama K, Muller CP. Possible New Hepatitis B Virus Genotype, Southeast Asia. *Emerging Infectious Diseases* 2008;14(11),1777–1780. doi:10.3201/eid1411.080437

Olotu AA, Adesola O, Oyelese, Salawu L, Audu RA, Okwuraiwe AP, Aboderin AO. Occult Hepatitis B virus infection in previously screened, blood donors in Ile-Ife, Nigeria: implications for blood transfusion and stem cell transplantation. *Virology Journal* 2016;13:76

Organização Mundial da Saúde. Guideline for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. 2015

Organização Mundial da saúde.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> 2016. acessado em 11. 01. 2017.

Organização Mundial da Saúde

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. 2017

Pan Y, Wei W, Kang L, Wang Z, Fang J, Zhu Y, Wu J. NS5A protein of VHC enhances VHB replication and resistance to interferon response. *Biochem Biophys Res Commun* 2007); 359: 70-75

Pernice W, Sodomann CP, Luben G, Seiler FR, Sedlacek HH. Antigen-specific detection of HBsAG-containing immune complexes in the course of hepatitis B virus infection. *Clin. Exp. Immunol* 1979;37:376–380.

Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of Hepatology*, 2006;45(4), 529–538. doi:10.1016/j.jhep.2006.05.013.

Pollicino T, Saitta C. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014 May 28; 20(20): 5951-5961

Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Arababadi MK, Oreizi F, Shariatinezhad K,. Detection of VHB ADN in HBsAg negative normal blood donors. *IJI* 2005 2:72–6.

Powell E A, Gededzha MP, Rentz M, Rakgole NJ, Selabe S G, Seleise TA, Mphahlele MJ, Blackard JT. Mutations Associated With Occult Hepatitis B in HIV-Positive South Africans. *J Med Virol*. 2015 March;87(3): 388–400. doi:10.1002/jmv.24057.

Rizzetto M, Canese MG, Aricó S, Trep C, Bonino I. Verne G. Immunofluorescence detection of a new antigenantibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HbsAg carriers. *Gut*, 1977;18: 997.

Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Platero C, López-Alcorocho JM, Pardo M, Castillo I, Carreño V. Hepatitis C virus (VHC) and hepatitis B virus (VHB) can coinfect the same hepatocyte in the liver of patients with chronic VHC and occult HBV infection. *J Virol* 2005; 79: 15578-15581 [PMID: 16306629 DOI: 10.1128/JVI.79.24.15578 15581.2005].

Roth WK, Weber M, Petersen D, Drosten C, Buhr S, Sireis W, Weichert W, Hedges D, Seifried E NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion*. 2002 Jul;42(7):869-75.4

Salpini R, Colagrossi L, Bellocchi MC, Surdo M, Becker C, Alteri C, et al. Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression. *Hepatology* 2015;61: 823-833 [PMID:25418031 DOI: 10.1002/hep.27604].

Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. (. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev* 2012;25, 142–163.

Sagnelli E. Clinical impact of occult hepatitis B virus infection in immunosuppressed patients. *World Journal of Hepatology*, 2014;6(6), 384. doi:10.4254/wjh.v6.i6.384

Schädler S, Hildt E. HBV Life Cycle: Entry and Morphogenesis. *Viruses*, 2009; 1(2), 185–209. doi:10.3390/v1020185

Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G. Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B Virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 2015;386: 1546-55.

Seeger C. Mason WS. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol. Mol Biol* 2000;64: 51-68

Semá CA. Estudo dos aspectos soropidemiológicos e Imunológicos da infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) em pacientes infectados pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) atendidos no Centro de saúde de Alto Maé. *Inst. Oswaldo Cruz*, Tese de Mestrado, 2011 1-60pp.

Seo DH, Whang DH, Song EY, Ha KS. Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion *World J Hepatol* 2015 March 27; 7(3): 600-606

Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, Higgins DG. Hepatitis B virus subgenotyping: History effect of recombination , misclassification, and correction. Review, *Infection , Genetic Evolution* 2013;16: 355-361

Stokx J, Gillet P, De Weggheleire A, Casas EC, Maendaenda R, Beulane AJ, Jani IV, Kidane S, Mosse CD, Jacobs J, Bottieau E. Seroprevalence of transfusion-

transmissible infections and evaluation of the pre-donation screening performance at the Provincial Hospital of Tete, Mozambique. *BMC Infectious Diseases* 2011;11:141.

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

Rios-Ocampo WA, Mancera FC, Olarte JC, Soto A, Navas MC. Occult Hepatitis B virus infection Among blood donors in Colombia. *Virology Journal*, 2014;11:206.

Svicher V, Cento V, Bernassola M, Neumann-Fraune M, Hemert FV, Chen M, et al Novel HBsAg markers tightly correlate with occult HBV infection and strongly affect HBsAg detection. *Antiviral Res.* 2012;93(1): 86-93.

Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U, Albertini A, Fasola M., Boffetta P. & Nardi G. Case-control study on hepatitis C virus (VHC) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of VHC genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. *Brescia HCC Study. Int J Cancer* 1999;81:695-699

Tagny CT, Mbanya D, Tapko JB, Lefrère JJ. Blood safety in Sub-Saharan Africa: a multi-factorial problem. *Transfusion*, 2008;48(6), 1256–1261. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01697.x

Taira R, Satake M, Momose S, Hino S, Suzuki Y, Murokawa H, Uchida S, Tadokoro, K. Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (VHB) infection caused by blood components derived from donors with occult VHB infection in Japan: Risk of OBI-Related TT-VHB in Japan. *Transfusion* 2013;53(7), 1393–1404. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03909.x.

Tanaka Y, Mizokami M. Genetic Diversity of hepatitis B virus as an important factor associated with differences in clinical outcomes. *The Journal of Infections Disease* 2007;195:1-4.

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. 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. *Journal of Virology* 2009; 83(20), 10538–10547. doi:10.1128/JVI.00462-09.

Thiers V, Kremsdorf D, Schellekens H, Gondean A, Sminsky J, Nakajilma E, et al Transmission of hepatitis B from hepatitis B seronegative subjects. *The Lancet*. 1998;332(8623):1273-1276.

Torbenson M, Thomas DL. Occulto hepatitis B. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(8):479-86.

Tovar TT. Estudo da Hepatite Oculta em Doadores de Sangue de Vitoria, Espirito Santo. 2012

Villet S, Ollivert A, Pichond C, Barrand L, Villeneuve JP, Trépo C, Zoulim F. Stepwise process for the development of entecavir resistance in chronic hepatitis virus infected patient. *J Hepatol* 2007; 46: 531-538.

Vivekanandan P, Kannangai R, Ray SC, Thomas DL, Torbenson M. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of occult hepatitis B from liver tissue samples. *Clin Infect Dis* 2008;46:1227-1236 [PMID: 18444860 DOI: 10.1086/529437].

Wandeler G, Musukuma K, Zürcher S, Vinikoor MJ, Llenas-García J, Aly MM, Mulenga L, Chi BH, Ehmer J, Hobbins MA, Bolton-Moore C, Hoffmann CJ, Egger M, leDEA-Southern Africa. Hepatitis B Infection, Viral Load and Resistance in HIV-Infected Patients in Mozambique and Zambia. *PLoS ONE* 2016;11(3): e0152043. doi:10.1371/journal.pone.0152043.

Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *Journal of General Virology* 2000;81(5), 1165–1174.

Xie Y, Liu S, Zhao Y, Guo Z, Xu J. X protein mutation in hepatitis b virus ADN Predictpostoperative survival in hepatocellular carcinom. *Tumour Biol* 2014;35: 1035-10331.

Yang HC, Chen CL, Shen YC, Peng CY, Liu CJ, Tseng TC, et al. Distinct evolution and predictive value of hepatitis B virus precore and basal core promoter mutation in interferon-induced hepatitis B antigen seroconversion. *Hepatology* 2013;57:934-943.

Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, Li X, Lu MJ. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World Journal of gastroenterol.* 2016;22(1) 126-144.

14. ANEXO

Anexo 1. Aprovação ética



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exma Senhora
Dr. Nédio Mabunda
INS

Ref: 263/CNBS/13

Data 25 de Agosto de 2014

Assunto: Parecer do Comité Nacional de Bioética para saúde (CNBS) sobre o estudo: "*Diversidade Genética e residual de transmissão de HIV, HBV, HCV por Transfusão Sanguínea em Moçambique*"

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) fez a avaliação das correcções efectuadas no protocolo intitulado "*Diversidade Genética e residual de transmissão de HIV, HBV, HCV por Transfusão Sanguínea em Moçambique*"

Registado no CNBS com o número 57/CNBS/2014, conforme os requisitos da Declaração de Helsínquia,

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo, o CNBS dá a sua devida aprovação aos seguintes documentos:


- Protocolo (versão 3) de Agosto de 2014
- Consentimento informado (versão 2) de Abril de 2014
- Instrumentos de recolha de dados (versão 2) de Abril de 2014

Todavia, o CNBS informa que:

- 1- A presente aprovação não substitui a autorização administrativa.
- 2- Houve declaração de conflitos de interesse por um dos membros do CNBS.
- 3- A aprovação terá a validade de um ano, terminando esta a 25 de Agosto de 2015. Os investigadores deverão submeter o pedido de renovação da aprovação um mês antes de terminar o prazo.
- 4- Recomenda-se aos investigadores que mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.
- 5- A lista actualizada dos membros do CNBS esta disponível na secretaria do Comité

Com as nossas mais cordiais saudações.

O Presidente


Dr. João Fernando Lima Schwalbach

ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
C. POSTAL 264
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)
Telex: 6-239 MISAU MO
FAX: 258 (1) 426547
258 (1) 33320

Anexo 2. Aprovação administrativa



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE

Doutor Nilsa de Deus
Dr. Nelson Manguela
em os devidos efeitos. 24
16/9/14.

Autoriza
Nilsa

Sua Excelência
Dr. Alexandre Manguela
Ministro da Saúde

11/09/14

Ref: 1443/024/2014

Maputo, aos 28 de Agosto de 2014

Assunto: Pedido de autorização de realização do estudo “Diversidade Genética e Risco Residual de Transmissão de HIV, HBV, HCV por Transfusão Sanguínea em Moçambique”

Vimos por este meio solicitar autorização para a realização do estudo acima mencionado. O estudo será conduzido pelo Instituto Nacional de Saúde, em colaboração com os Bancos de Sangue dos Hospitais Centrais do País (Maputo, Beira e Nampula) e o Instituto Oswaldo Cruz (Brasil). De realçar que a versão 3.0 do protocolo já obteve aprovação do Comité Nacional de Bioética para Saúde (Ref 263/CNBS/13) no dia 25 de Agosto de 2014. ✓

Atenciosamente,

O Director do Instituto Nacional de Saúde

Ilesh V. Jani, MD PhD



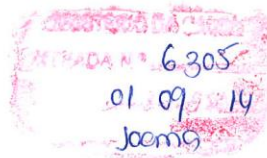
Em anexo:

- Carta de aprovação do CNBS (Ref 263/CNBS/13)
- Protocolo do estudo versão 3.0 de 11 de Agosto de 2014

NM-Virologia Molecular

ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
C. POSTAL 264
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)
Telex: 6-239 MISAU MO
FAX: 258 (1) 426547
258 (1) 33320



Anexo 3. Carta de colaboração do HCM



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE

Exmo. Senhor
Dr. João Carvalho Fumane
Director do Hospital Central
Maputo

Nota nº 1426.002

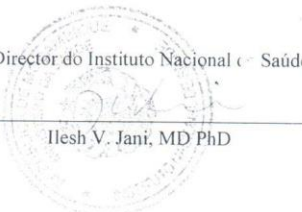
Maputo, 03 de Dezembro de 2013

Assunto: Pedido de colaboração para a realização de um estudo no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo.

No âmbito das actividades de pesquisa que o Instituto Nacional de Saúde tem vindo a realizar, vimos por meio desta, pedir autorização da colaboração da instituição acima referida e da técnica Sandra da Glória Oficiano para a realização de um estudo intitulado "**Análise do Risco Residual de Transmissão de HIV, HBV e HCV por Transfusão Sanguínea em Moçambique**".

Atenciosamente,

O Director do Instituto Nacional de Saúde


Ilsh V. Jani, MD PhD



Anexo: Protocolo de Pesquisa

NM-Virologia Molecular

ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
C. POSTAL 264
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)
Telex: 6-239 MISAU MO
FAX: 258 (1) 426547
258 (1) 33320

Anexo 4. Ficha de dados Sócio-Demográficos

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Saúde

“Diversidade Genética e Risco Residual de Transmissão de HIV, HBV, HCV por Transfusão Sanguínea em Moçambique”

Dados sócio-demográficos

Número do Dador: _____ Número do frasco: _____	Idade: _____ anos Tipo de Dador: 1. Repositor <input type="checkbox"/> 2. Voluntário <input type="checkbox"/>
Sexo: 1. Masculino: <input type="checkbox"/> 2. Feminino: <input type="checkbox"/>	Grau de Escolaridade: 1. Analfabeto: <input type="checkbox"/> 2. Primário: <input type="checkbox"/> 3. Secundário / Técnico : <input type="checkbox"/> 4. Superior: <input type="checkbox"/>
Estado civil: 1. Solteiro/a: <input type="checkbox"/> 2. Casado/a: <input type="checkbox"/> 3. Divorciado/a: <input type="checkbox"/> 4. Viúvo/a: <input type="checkbox"/>	Cor da pele: 1. Negra: <input type="checkbox"/> 2. Mista: <input type="checkbox"/> 3. Branca: <input type="checkbox"/>
Local de nascimento: Local de Residência (provincia):	Profissão:

Observações do entrevistador

Maputo, _____ de _____ de 2015

(Assinatura do paciente)

(Assinatura do entrevistador)

Instituto Nacional de Saúde