

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA
NÍVEL: DOUTORADO**

CARLOS KUPSKI

**PERFIL SOROLÓGICO E MOLECULAR DE INDIVÍDUOS ANTI-HB_c REAGENTE
E HBsAg NEGATIVO PROVENIENTES DE UM BANCO DE SANGUE EM UMA
ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE PARA HBV**

PORTO ALEGRE

2005

CARLOS KUPSKI

**PERFIL SOROLÓGICO E MOLECULAR DE INDIVÍDUOS ANTI-HB_c REAGENTE
E HBsAg NEGATIVO PROVENIENTES DE UM BANCO DE SANGUE EM UMA
ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE PARA HBV**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do título de Doutor em Medicina.
Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Dra. Denise Cantarelli Machado
Co-Orientadora: Dra. Virgínia M. Schmitt

Porto Alegre
2005

Dedico esta tese aos Acadêmicos de Medicina e Médicos Residentes da PUCRS que são o estímulo contínuo para meu aprimoramento acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas e serviços que contribuíram para que essa tese fosse concluída e em especial:

- *à Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado por sua orientação, compreensão, estímulo e espírito científico para a realização deste trabalho, fundamentais nesta etapa que se encerra;*
- *à Profa. Dra. Virgínia Minghelli Schmitt pela co-orientação, competência, seriedade e incentivo para que este trabalho fosse realizado e por, há mais de seis anos, acompanhar minha formação científica, sendo parceira em outros projetos, sempre disponível para ajudar nos momentos difíceis (e nos fáceis também!);*
- *à Profa. Dra. Maria Helena Itaquí Lopes, grande colega, amiga e incentivadora na minha formação humanitária e profissional, nunca medindo esforços para me auxiliar e orientar;*
- *ao Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni, meu grande mestre, por sua capacidade e integridade profissional, estímulo acadêmico e amizade de longos anos;*
- *à Dra. Myriam Moretto pela amizade, constante incentivo e auxílio na revisão final deste trabalho;*
- *aos acadêmicos Felipe Ruschel Trasel e Felipe Mazzoleni pela amizade, companheirismo e ajuda na difícil tarefa de realizar a pesquisa molecular;*
- *aos profissionais do Banco de Sangue, do Setor de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do HSL-PUCRS e do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas desta Universidade pelo carinho, disponibilidade, tolerância e auxílio na coleta e manuseio das amostras;*
- *aos colegas dos Serviços de Gastroenterologia e Medicina Interna do HSL-PUCRS pelo incentivo e por acreditarem no meu desenvolvimento profissional e acadêmico;*
- *aos médicos residentes do Serviço de Gastroenterologia do HSL-PUCRS, Lucas Spadari Maggioni e Lysandro Alsina Nader pela amizade, parceria e tolerância com minha ausência em alguns momentos, devido ao envolvimento no trabalho;*
- *aos funcionários da Secretaria da Faculdade de Medicina, pelo carinho, apoio e auxílio em vários, pequenos (e relevantes) detalhes do trabalho;*
- *aos Profs. Drs. Mario Bernardes Wagner e Luciano Passamani Diogo pelo auxílio estatístico;*
- *à Sra. Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia pela amizade e colaboração neste estudo;*
- *à Profa. Eloci Gloria de Mello pela revisão ortográfica e competência na organização do trabalho.*

RESUMO

O vírus da Hepatite B (HBV), mesmo depois de eliminado, deixa marcas sorológicas que podem demonstrar esse contato prévio ou infecção oculta. O perfil de marcadores permite identificar os diferentes estágios da infecção pelo HBV. O objetivo do presente estudo foi definir o perfil sorológico e molecular de indivíduos de uma área de baixa endemicidade para o HBV excluídos de doação de sangue por apresentarem anticorpos contra o antígeno do cerne do HBV (anti-HBc total), apesar de negativos para o antígeno de superfície do HBV (HBsAg). Um estudo transversal foi delineado para avaliar o perfil sorológico e molecular de indivíduos anti-HBc total reagente e HBsAg negativo impedidos da doação sangüínea no Banco de Sangue do HSL-PUCRS. No período de março/2003 a maio/2005 foram selecionados 244 indivíduos, todos apenas anti-HBc total reagente, com os demais marcadores rotineiramente testados negativos. As variáveis do estudo foram os seguintes marcadores: título de anticorpos contra o HBsAg (anti-HBs), antígeno "e" do HBV (HBeAg), anticorpos contra o HBeAg (anti-HBe) e HBV-DNA. Os marcadores sorológicos foram determinados utilizando *kits* comerciais Elecsys (Roche *Diagnostics*) e a pesquisa molecular de HBV foi realizada através da reação em cadeia de polimerase (PCR). A amostra do estudo foi composta por 244 impedimentos, sendo que 85,7% já apresentavam títulos de anti-HBs ≥ 10 UI/L. Em relação aos marcadores relacionados com a replicação viral, das 164 amostras

testadas, todas foram HBeAg não-reagentes e 66,5% apresentavam anti-HBe reagente. Todas amostras testadas para o HBV-DNA (n=241) foram negativas. A análise estatística mostrou uma associação significativa entre anti-HBe e títulos de anti-HBs, onde os indivíduos anti-HBe reagente apresentaram uma associação positiva com títulos anti-HBs forte-protetores ($P=0,026$). A partir dos dados do presente estudo, é possível concluir que estes indivíduos de uma zona considerada de baixa endemicidade para o HBV, excluídos de doação sanguínea por apresentarem anti-HBc total reagente isolado, apresentaram, na maioria das vezes, títulos de anti-HBs que lhe conferem imunidade contra o HBV, além de não apresentarem HBV-DNA circulante.

Palavras-chave: anti-HBc total, HBsAg, HBeAg, anti-HBe, HBV-DNA, marcadores sorológicos, reação em cadeia de polimerase (PCR), Hepatite vírus B, baixa endemicidade, doadores de sangue.

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV), even after being eliminated, leaves serological markers which demonstrate a previous contact with the virus or an occult infection. Stages of HBV infection can be identified based on the profile of HBV markers. The aim of this study was to characterize the profile of serological and molecular HBV markers of individuals excluded from blood donation in a region of low HBV endemicity due to the presence of antibodies against hepatitis B core antigen (total anti-HBc), but negative for HBV surface antigen (HBsAg). A transversal study was designed to evaluate serological and molecular profile of subjects excluded from blood donation at the Blood bank of Hospital São Lucas -PUCRS (HSL-PUCRS), presenting a reagent total anti-HBc and negative HBsAg. From March 2003 to May 2005, 244 individuals were selected, all them exclusively total anti-HBc reagent, with all other serological markers routinely tested negative. Serological markers such HBsAg antibodies (anti-HBs), HBV "e" antigen (HBeAg), HBeAg antibodies (anti-HBe) were determined using the Elecsys commercial kits (Roche Diagnostics) and HBV-DNA was identified by polymerase chain reaction (PCR). Study was conducted with a total of 244 rejected blood samples, 85.7% presenting anti-HBs titles ≥ 10 IU/L. Among 164 samples tested for serological markers related to viral replication, all were negative for HBeAg and 66.5% were reagent for anti-HBe. All samples tested for HBV-DNA (n=241) were negative. Statistical analysis showed a significant

association between anti-HBe and anti-HBs titles, where individuals with anti-HBe reagent were positively associated with strong protective anti-HBs titles ($P=0,026$). Based upon reported data, it is possible to conclude that study individuals from a low endemic area for HBV, excluded from blood donation due to an isolated reagent anti-HBc, have frequently shown anti-HBs titers which confer immunity against HBV, besides being negative for HBV-DNA.

Key-words: total anti-HBc, HBsAg, HBeAg, anti-HBe, HBV-DNA, serological markers, polimerase chain reaction (PCR), Hepatitis B virus, low HBV endemicity, blood donation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral de HBV	19
Figura 2 - Representação do genoma de HBV.....	20
Figura 3 - Mapa da distribuição mundial do HBV.	23
Figura 4 - Distribuição dos indivíduos estudados de acordo com as categorias de proteção do anti-HBs (não-protetor, fraco protetor, forte protetor). Os títulos de anti-HBs são apresentados em UI/L	60
Figura 5 - Distribuição dos indivíduos estudados em cinco categorias de acordo com os títulos de anti-HBs (UI/L).	61
Figura 6 - Visualização do resultado da PCR para o HBV após separação por eletroforese em gel de agarose 1,5%.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Situações de marcadores de Hepatite B e as interpretações clínicas.....	42
Tabela 2 - Marcadores sorológicos x percentual de impedimentos por região	46
Tabela 3 - Resultado geral dos marcadores de HBV pesquisados	59
Tabela 4 - Títulos de anti-HBs não-protetor (<10 UI/L), fraco-protetor (≥10 a <100 UI/L) e forte-protetor (≥100 UI/L) x resultado do anti-HBe.....	63
Tabela 5 - Títulos de anti-HBs não-protetores (<10 UI/L) e protetores (≥10 UI/L) x resultado do anti-HBe.....	64
Tabela 6 - Títulos de anti-HBs fraco (≥10 a <100 UI/L) e forte (≥100 UI/L) protetores x resultado de anti-HBe	65

LISTA DE SIGLAS

% = percentual

μl = microlitros

A = adenina

AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ALT = alaninotransaminase

Anti-HBc = anticorpo do antígeno do cerne do vírus da Hepatite B

Anti-HBe = anticorpo contra o antígeno “e” do vírus da Hepatite B

Anti-HBs = anticorpo do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde

AST = aspartatotransaminase

C = citosina

CDC = Centro de Controle de Doenças

dL = decilitros

DNA = ácido desoxiribonucleico

ECLIA = imunoenensaio por eletroquimioluminescência

EIE = enzima imunoenensaio

ELISA = ensaio imunoenzimático

EUA = Estados Unidos da América

g = gramas

G = guanina

HAV = vírus da Hepatite A

HBcAg = antígeno da porção cerne do vírus da Hepatite B

HBeAg = antígeno “e” do vírus da Hepatite B

HBIG = imunoglobulina da Hepatite B

HBsAg = antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

HBV = vírus da Hepatite B

HBV-DNA = genoma (DNA) do vírus da Hepatite B
HCV = vírus da Hepatite C
HDV = vírus da Hepatite Delta
HIV = vírus da imunodeficiência humana
HSL = Hospital São Lucas
HTLV = vírus da leucemia de células T humanas
IC = intervalo de confiança
IgG = porção G das imunoglobulinas
IgM = porção M das imunoglobulinas
IPB = Instituto de Pesquisas Biomédicas
kg = kilogramas
L = litros
mg = miligramas
mL = mililitros
mm = milímetros
n = número de indivíduos
n° = número
NAT = testes de ácidos nucleicos
NIH = Instituto Nacional de Saúde
nm = nanômetro
OMS = Organização Mundial de Saúde
OR = Razão de Chance
ORF = Quadro de Leitura Aberta
pb = pares de base
PCR = reação em cadeia de polimerase
PEI = *Paul-Ehrlich-Institut*
PUCRS = Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RNA = ácido ribonucleico
RS = Rio Grande do Sul
SPSS = Pacote Estatístico para Ciências Sociais
T = timina
UI = Unidade Internacional
VDRL = Laboratório de Pesquisa de Doenças Venéreas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Vírus da Hepatite B	17
2.1.1 Mutantes do HBV.....	20
2.1.2 Hepatotoxicidade do HBV.....	21
2.1.3 Epidemiologia e transmissão.....	22
2.2 Infecção pelo HBV	25
2.2.1 Definições	26
2.2.2 Critério diagnóstico.....	27
2.2.3 Infecção aguda pelo HBV	27
2.2.4 Infecção crônica pelo HBV	28
2.2.5 Recidiva clínica e reativação	30
2.2.6 História natural e complicações	31
2.2.7 Prevenção	33
<i>2.2.7.1 Mudança de comportamento.....</i>	<i>33</i>
<i>2.2.7.2 Imunoprofilaxia passiva.....</i>	<i>34</i>
<i>2.2.7.3 Imunoprofilaxia ativa.....</i>	<i>34</i>
2.2.8 Tratamento.....	35
2.3 Marcadores Hepatite B.....	37
2.3.1 HBsAg	38
2.3.2 Anti-HBs	39
2.3.3 HBcAg	39
2.3.4 Anti-HBc	39

2.3.5 Anti-HBc IgM.....	40
2.3.6 HBeAg	40
2.3.7 Anti-HBe	41
2.3.8 HBV-DNA.....	41
2.4 Doação de sangue.....	42
2.4.1 Para doar sangue é necessário.....	43
2.4.2 Não poderá doar	43
2.4.3 Como é a doação?.....	44
2.4.4 Inaptidão sorológica	46
2.5 Anti-HBc reagente isolado.....	47
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos.....	51
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	52
4.1 Delineamento do estudo.....	52
4.2 Critérios de inclusão	52
4.3 Critérios de exclusão	52
4.4 Pacientes e amostra.....	52
4.5 Variáveis em estudo.....	53
4.6 Cálculo do tamanho da amostra	54
4.7 Pesquisa das variáveis na amostra	54
4.7.1 Titulação de anti-HBs.....	54
4.7.2 HBeAg e anti-HBe.....	54
4.7.2.1 HBeAg.....	55
4.7.2.2 Anti-HBe	55
4.7.3 Extração de DNA	56
4.7.4 Reação de amplificação (PCR).....	56
4.8 Local da realização do estudo	57
4.9 Aspectos éticos.....	57
4.10 Análise estatística	57
5 RESULTADOS.....	59

	14
6 DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

O vírus da Hepatite B (HBV) infecta cerca de dois bilhões de pessoas no mundo, e mais de 350 milhões são portadores de Hepatite crônica nos seus diferentes estágios. Clinicamente, a Hepatite B pode se manifestar de inúmeras formas que vão desde a assintomática e autolimitada até a fulminante, passando pela condição de portador crônico assintomático, estando associada ao desenvolvimento de cirrose por Hepatite crônica e ao carcinoma hepatocelular.

A distribuição geográfica dos portadores do HBV, através da identificação do antígeno de superfície (HBsAg) positivo, é variável e a Organização Mundial de Saúde (OMS) a classifica em três áreas conforme a prevalência: alta ($\geq 8\%$), intermediária (2-7%) e baixa ($< 2\%$). O Brasil é classificado como um país de prevalência intermediária para o HBV, embora dentro do território nacional existam diferentes prevalências. A Região Sul é considerada de baixa prevalência, onde a taxa de portadores varia de 0,5 a 1%.

Os marcadores sorológicos de infecção por HBV são úteis não somente para caracterizar a fase aguda da doença através da positividade do HBsAg e do anticorpo de fase aguda contra o antígeno viral do cerne (anti-HBc IgM), mas também são utilizados para demonstrar a evolução ou não para a cronicidade em diferentes fases da doença. Na fase replicativa viral, encontra-se o antígeno de replicação viral (HBeAg) e o próprio DNA do vírus da Hepatite B (HBV-DNA).

A Hepatite B pós-transfusional representa um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Várias medidas são adotadas para prevenir a transmissão através de sangue contaminado e, entre elas, está a pesquisa de marcadores sorológicos do HBV como o HBsAg e o anticorpo do antígeno do cerne da Hepatite B (anti-HBc) total. Por ser o primeiro anticorpo detectável, a pesquisa de anti-HBc total proporciona uma cobertura sorológica no período da “janela imunológica”, onde o indivíduo está contaminado pelo HBV, mas ainda não possui níveis de HBsAg detectáveis. A positividade do anti-HBc total (IgM+IgG), porém, pode persistir por longos períodos, mesmo após a eliminação do vírus e recuperação do paciente.

A principal causa de impedimento da doação, isto é, rejeição da bolsa sangüínea após os testes sorológicos, é o marcador anti-HBc total reagente isolado. No Estado do Rio Grande do Sul, no ano de 2004, a taxa de impedimento por HBsAg positivo foi de 0,16% e para anti-HBc reagente, de 2,49%.

Entretanto, estima-se que cerca de 80% dos doadores de sangue anti-HBc total reagente e HBsAg negativo apresentam títulos do anticorpo do antígeno de superfície da Hepatite B (anti-HBs) que lhes conferem imunidade. Os dados da literatura são discordantes em relação à presença ou não de HBV-DNA em quantidades detectáveis em pacientes HBsAg negativos e anti-HBc total reagentes.

Frente a estas considerações, o objetivo do presente estudo foi traçar o perfil sorológico e molecular de indivíduos de uma área de baixa endemia, cuja doação sangüínea foi rejeitada por apresentarem, isoladamente, anti-HBc total reagente, identificando títulos de anti-HBs e presença de HBeAg, anticorpo do antígeno de replicação (anti-HBe) e HBV-DNA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vírus da Hepatite B

As hepatites virais constituem um grave problema de saúde pública no mundo todo, destacando-se, entre os agentes responsáveis, o vírus da Hepatite B (HBV). Em 1965, nos Estados Unidos da América (EUA), Blumberg e colaboradores identificaram em dois pacientes hemofílicos politransfundidos anticorpos que reagem com um antígeno presente no soro de um aborígine australiano (1). Devido a esta descoberta, este antígeno foi denominado “antígeno Austrália”. Posteriormente, o antígeno Austrália foi encontrado em indivíduos com diagnóstico de hepatite. No ano de 1976, Blumberg foi contemplado com o prêmio Nobel de Medicina em reconhecimento à sua descoberta (2). Atualmente, sabe-se que o antígeno Austrália corresponde a uma proteína presente na superfície da partícula do HBV, denominada “antígeno de superfície do vírus da Hepatite B” (HBsAg). Estima-se que dois bilhões de pessoas estejam infectadas por este vírus no mundo, e que mais de 350 milhões tenham Hepatite crônica nos seus diferentes estágios (2, 3). A infecção crônica pelo HBV representa uma das doenças virais mais importantes dos seres humanos, evidenciado pelo fato de que mais de um terço da população mundial mostra evidências sorológicas de contato prévio com o vírus (4). Entretanto, a incidência mundial do HBV está caindo e esta queda não está

relacionada apenas à vacinação, mas também às melhores condições de higiene e à campanha de combate à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) que enfatiza os perigos da promiscuidade e do compartilhamento de seringas e agulhas (4, 5).

O HBV pertencente à família *Hepadnaviridae* e vírus da mesma família causam uma doença semelhante à Hepatite B em animais, como marmotas, esquilos terrestres e patos de Pequim (2, 3). O vírus da Hepatite B é um vírus pequeno de, aproximadamente, 42nm de diâmetro. A partícula viral consiste de uma porção central de natureza protéica, o cerne, que contém o genoma viral e a DNA polimerase, e uma porção externa de natureza lipídica, o envelope, com proteínas virais inseridas (Figura 1). A estrutura do DNA genômico é de dupla fita circular incompleta com um hiato de 600 a 2.100 nucleotídeos (6, 7). Ao penetrar na célula hospedeira, a DNA polimerase viral repara este hiato. O cerne é constituído pela proteína chamada “antígeno do cerne” (HBcAg) e contém a proteína conhecida como “antígeno ‘e’” (HBeAg) relacionada com replicação viral. No envelope viral encontra-se a proteína chamada de “antígeno de superfície” (HBsAg). Durante a infecção, o DNA viral encontra-se no núcleo da célula infectada, na forma episomal, e, nos casos de carcinoma hepatocelular, tem sido encontrado integrado no DNA do hepatócito. O genoma do HBV apresenta quatro fases de leitura aberta (ORFs) que se sobrepõem, permitindo uma maior capacidade codificadora (Figura 2). A ORF-S é subdividida em S, pré-S1 e pré-S2, e codifica o HBsAg. O domínio pré-S1 parece estar envolvido na interação do HBV com o receptor específico nos hepatócitos (8, 9). Esse efeito pode ser importante no desenvolvimento da Hepatite B crônica, sendo que o pré-S2 tem comportamento semelhante (10). A ORF-C/pré C codifica o antígeno do cerne (HBcAg) e o antígeno “e” (HBeAg). A ORF-P codifica a DNA

polimerase que tem, também, atividade de transcriptase reversa. A ORF-X codifica uma proteína ativadora da transcrição de diversos genes que estimulam a proliferação celular, além de interagir com a proteína supressora tumoral p53, interferindo na sua capacidade de regular negativamente a proliferação celular (11). Supõe-se que a proteína X desempenhe um papel importante no carcinoma hepático associado ao HBV, pois camundongos transgênicos para o gene X do HBV desenvolvem carcinoma hepatocelular (12). Há uma variabilidade genética do HBV, definida em oito genótipos (A-H), e estes genótipos são encontrados em diferentes populações geográficas e se diferem quanto a viabilidade, replicação e sensibilidade às drogas antivirais.

Nos pacientes infectados pelo HBV podem ser identificados anticorpos contra estas proteínas virais (anti-HBs, anti-HBc, anti-HBe). A interpretação da fase clínica da doença é baseada na análise destes marcadores (antígenos e anticorpos) (3).

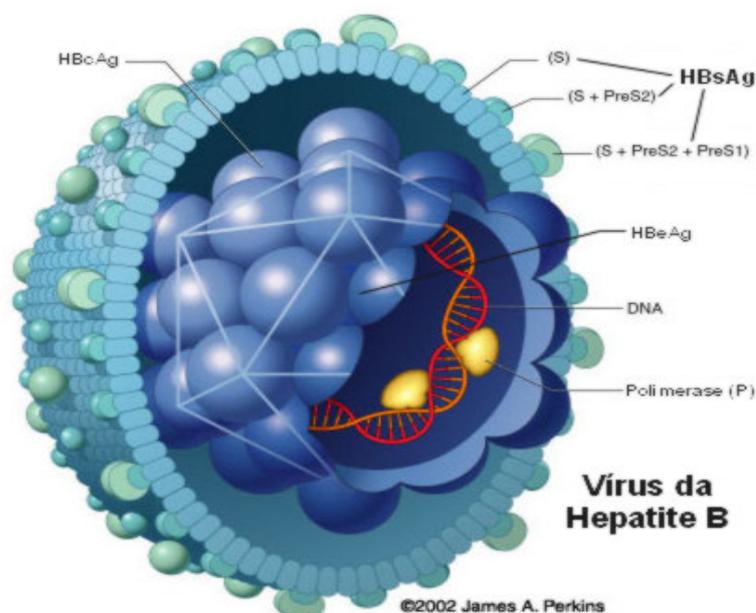


Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral de HBV, apresentando os antígenos virais, DNA, polimerase.

Fonte: <<http://www.rit.edu/~japfaa/infectious.html>>

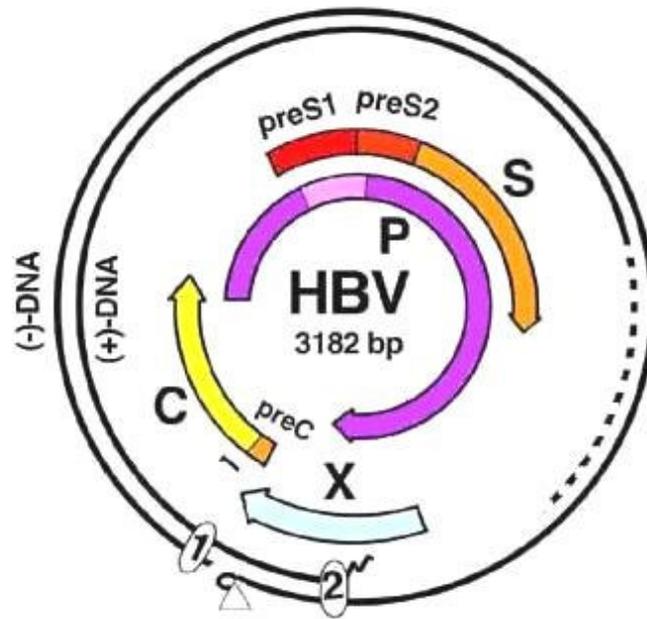


Figura 2 - Representação do genoma de HBV, mostrando a dupla fita circular (fita + e -) e as ORFs C, P, S, X, pré-S1 e pré-S2.

Fonte: <<http://www.molecular-virology.uni-hd.de/EN/HBV/HBV.HTM>>

2.1.1 Mutantes do HBV

O HBV, apesar de ser um vírus de DNA, utiliza um RNA intermediário e uma transcriptase reversa para sua replicação, estando sujeito a mutações ao longo do genoma. A ocorrência de substituições, deleções, duplicações, inserções e redistribuições de nucleotídeos pode não ter consequência alguma no nível das proteínas sintetizadas, mas pode comprometer a replicação viral, modificar a suscetibilidade do hospedeiro ou levar ao escape viral do ataque imunológico do hospedeiro. A condição imune do paciente, vacinação prévia e o uso de drogas antivirais, podem influenciar na taxa de mutação do vírus (13). Mutações específicas na região pré-*cerne* impossibilitam a secreção do HBeAg (14). Nestes casos, o paciente é positivo para o DNA de HBV, mas negativo para o antígeno “e”, apresentando, geralmente, doença ativa grave (15, 16). Foram também descritos

mutantes do gene X, mas sua importância clínica não está bem clara. Mutantes YMDD do gene da polimerase são responsáveis por casos de resistência à lamivudina, droga utilizada no tratamento da Hepatite crônica pelo HBV (16, 17). Portanto, os mutantes podem influenciar a evolução clínica, favorecer a ocorrência de formas fulminantes e induzir resistência viral aos medicamentos. Nessas circunstâncias, o HBeAg sérico não tem utilidade como indicador de replicação (18, 19).

2.1.2 Hepatotoxicidade do HBV

O vírus não é diretamente citopático, e a lise dos hepatócitos infectados depende da resposta imunológica do hospedeiro. A lesão hepatocelular começa com o reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T citotóxicos específicos para o HBV. É provável que a resistência viral esteja relacionada à deficiência específica dos linfócitos T citotóxicos em reconhecer o HBsAg. O recrutamento de células inflamatórias não específicas do hospedeiro - incluindo macrófagos, neutrófilos e outras - pelos linfócitos T, provocam inflamação e elevação dos níveis séricos de aminotransaminases (20). Durante a infecção autolimitada aguda, a alteração patológica é discreta a moderada com resolução da Hepatite ao término da infecção viral. Entretanto, em alguns casos pode ocorrer uma inflamação tão intensa e pronunciada que pode ocorrer lesão hepatocelular maciça e Hepatite fulminante. Se a resposta imunológica for insatisfatória, ocorre pouca ou nenhuma lesão hepática, mas o vírus continua a proliferar, ocorrendo uma Hepatite crônica. Se a resposta imunológica for particularmente mínima e não houver dano hepático, esse paciente é considerado um portador inativo do HBV (2, 21, 22).

2.1.3 Epidemiologia e transmissão

Clinicamente, a Hepatite B pode manifestar-se de inúmeras formas que vão desde a aguda, assintomática e autolimitada até a fulminante, passando pela condição de portador crônico assintomático e estando associada ao desenvolvimento de cirrose por Hepatite crônica e ao carcinoma hepatocelular (2).

A distribuição geográfica dos portadores é muito variável e a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica em três áreas, conforme a prevalência do HBsAg:

- alta: igual ou superior a 8%;
- intermediária: entre 2-7%;
- baixa: inferior a 2%.

Nas áreas de alta prevalência, a população evidencia infecção prévia (anti-HBc total reagente) em taxa superior a 60%. Nas áreas de endemicidade intermediária, a taxa de anti-HBc total reagente varia de 20-60%. Provavelmente, estas altas taxas são decorrentes da transmissão neonatal. (23, 24).

O Reino Unido, os EUA e a Escandinávia apresentam taxas de HBsAg de 0,1 a 0,2%. A Grécia e o sudeste italiano têm em torno de 3% e na população sul-africana e oriental a taxa chega a 10-15% (24).

O Brasil é classificado como um país de endemicidade intermediária para o HBV, embora dentro do território nacional existam diferentes prevalências. Os estudos epidemiológicos no Brasil são escassos e, considerando que muitos indivíduos infectados são assintomáticos e que as infecções sintomáticas são insuficientemente notificadas, a frequência da Hepatite B ainda é subestimada. Uma análise de base

populacional feita na cidade de São Paulo detectou uma prevalência de portadores crônicos de 1,02% (HBsAg positivo). Na Região Amazônica, apesar das desigualdades das notificações, as taxas referentes à mortalidade por Hepatite B são mais altas do que no restante do país. De maneira geral, a soroprevalência nesta região geográfica revela percentuais de positividade variáveis de 1,9% a 13,5% para HBsAg e de 10% a 90% para o anti-HBs (25).

A Região Sul é considerada de baixa endemicidade, onde a taxa de portadores varia de 0,5 a 1%. Entretanto, a maioria dos dados é referente a impedimentos em doação sanguínea em Bancos de Sangue que podem subestimar a real taxa.

Na Figura 2, temos a distribuição mundial do HBV, conforme dados da OMS.

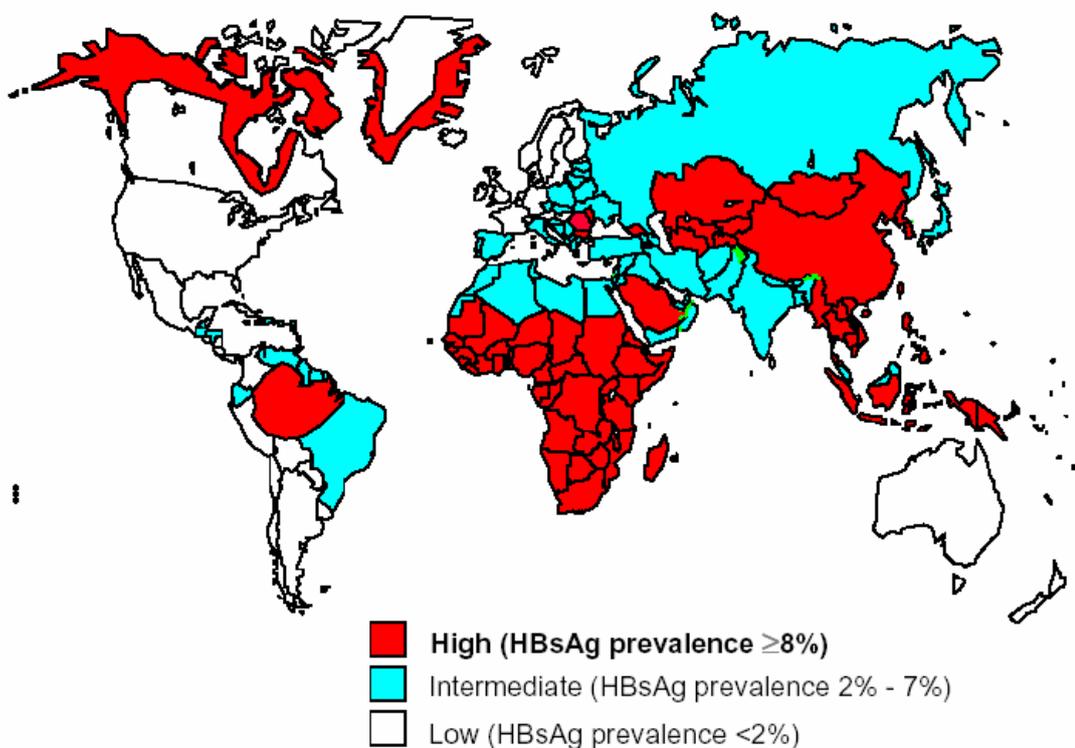


Figura 3 - Mapa da distribuição mundial do HBV.

Fonte: *World Health Organization. Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services, 2001, Geneva.*

O HBV se transmite por via parenteral, sexual ou de forma vertical (mãe-filho). Em face dessas vias preferenciais de transmissão, os grupos de risco para a infecção e que, portanto, devem ter a pesquisa do HBV no soro são indivíduos politransfundidos, hemofílicos, renais crônicos, transplantados de órgãos, pacientes de unidades de oncologia, usuários de drogas injetáveis, homossexuais masculinos, prostitutas, profissionais da área de saúde e neonatos de mães portadoras do vírus (2, 21). Também são de risco aqueles que se expõem a material com risco de acidente punctório como tratamentos dentários, extração de cutículas, acupuntura, tatuagens e *piercing*. Em relação à transmissão vertical, existem três possibilidades pelas quais mães portadoras do HBV podem infectar seus filhos: transmissão transplacentária intra-útero, durante o parto e no pós-parto. Em áreas de alta prevalência, a transmissão de mães portadoras para seus recém-nascidos ocorre não pela veia umbilical, mas no momento do parto e durante os íntimos contatos após o nascimento (24). A inoculação e/ou aspiração de sangue ou secreções vaginais maternas pelo recém-nascido é um importante modo de contágio. A possibilidade de contágio perinatal aumenta nos casos de infecção materna nos últimos três meses de gestação e na presença do HBeAg no soro. O risco de transmissão do HBV através do aleitamento materno é baixíssimo. Assim, esta forma de aleitamento não está proibida, ressaltando a necessidade de vacinação dos recém-nascidos nas primeiras 48 horas após o nascimento (24, 26).

Nas áreas altamente endêmicas como África e Extremo Oriente, a transmissão ocorre na infância e, provavelmente, é horizontal, através de beijos e utensílios compartilhados como escovas de dentes e barbeadores (24, 27).

2.2 Infecção pelo HBV

A infecção pelo HBV acontece, na maior parte das vezes, de maneira anictérica. Apenas 15 a 20% dos pacientes manifestam um quadro clínico clássico de Hepatite aguda icterícia. A grande maioria, cerca de 80%, apresenta um quadro clínico inespecífico que não permite o diagnóstico de Hepatite aguda. Admite-se que 5 a 10% dos pacientes poderão evoluir para uma forma crônica de infecção cujas conseqüências se manifestarão a longo prazo. Entretanto, aqueles que desenvolvem uma Hepatite aguda clássica, icterícia, terão uma menor chance de desenvolver formas crônicas de doença (2, 26). Há várias características do quadro clínico que sugerem ser uma doença por imunocomplexo. Esta observação se deve pelo período prodrômico que antecede a icterícia em uma semana, pela presença de lesões urticariformes na pele e artropatia simétrica não-migratória que acomete pequenas articulações, sendo o fator reumatóide negativo. Após a infecção aguda pelo HBV ocorre, na maior parte dos indivíduos adultos, a eliminação do vírus decorrente da destruição de todos hepatócitos infectados por meio de linfócitos citotóxicos. Em raras ocasiões, uma resposta imunológica agressiva e exacerbada pode resultar em Hepatite fulminante, decorrente da destruição maciça de células hepáticas. Entretanto, naqueles indivíduos que evoluem para formas crônicas de infecção, o sistema imunológico destrói somente alguns hepatócitos infectados, permitindo que o vírus continue a se replicar, infectando hepatócitos adicionais. Aproximadamente 10% dos adultos infectados e 90% dos neonatos não conseguem eliminar o vírus com seis meses de evolução, tornando-se os chamados portadores crônicos (2, 28).

O consenso de definição e critério diagnóstico para os termos clínicos da

infecção pelo HBV, aprovado pelo *National Institutes of Health* (NIH), no *Workshop on Management of Hepatitis B 2000* são descritos a seguir (3):

2.2.1 Definições

- Hepatite B crônica: doença crônica necroinflamatória causada pela persistente infecção pelo HBV. A Hepatite B crônica pode ser subdividida em portador HBeAg reagente e HBeAg não-reagente.
- Estado de portador inativo do HBsAg: infecção persistente pelo HBV no fígado sem evidência de doença necroinflamatória.
- Hepatite B resolvida: infecção prévia pelo HBV e sem evidência virológica, bioquímica ou histológica de infecção ativa pelo vírus ou doença.
- Exacerbação aguda ou *flare* da Hepatite B: elevação intermitente das aminotransaminases mais que dez vezes o limite superior da normalidade e mais que duas vezes o valor de linha de base.
- Reativação da Hepatite B: reaparecimento de doença necroinflamatória no fígado de indivíduo sabidamente portador inativo do HBsAg ou em Hepatite B resolvida.
- Negativação de HBeAg: perda do HBeAg em indivíduo que era previamente HBeAg reagente.
- Soroconversão para HBeAg: perda do HBeAg e detecção do anti-HBe em indivíduo que era previamente HBeAg reagente e anti-HBe não-reagente.
- Reversão de HBeAg: reaparecimento do HBeAg em indivíduo que era previamente HBeAg não-reagente e anti-HBe reagente.

2.2.2 Critério diagnóstico

- Hepatite B crônica: HBsAg positivo > 6 meses, HBV-DNA sérico > 10^5 cópias/mL, HBeAg positivo ou negativo, elevação persistente ou intermitente de aminotransaminases e biópsia hepática evidenciando atividade necroinflamatória.
- Portador inativo do HBV: HBsAg positivo > 6 meses, HBV-DNA sérico < 10^5 cópias/mL, sem evidência de replicação viral pelos marcadores, anti-HBe positivo, aminotransaminases persistentemente normais e histologia hepática sem atividade necroinflamatória.
- Hepatite B resolvida: história prévia conhecida de infecção aguda ou crônica pelo HBV, com HBsAg negativo, anti-HBc total (IgM+IgG) presente associado ou não a títulos de anti-HBs, DNA-HBV indetectável e nível normal de aminotransaminases.

2.2.3 Infecção aguda pelo HBV

A infecção aguda é subclínica em 70% dos adultos e 90% das crianças menores que cinco anos. O período de incubação após a infecção varia de um a quatro meses. Os sintomas da fase aguda incluem náuseas, anorexia, fadiga, febre baixa e dor no hipocôndrio direito ou epigástrica. A icterícia surge quando os sintomas constitucionais estão em resolução. Manifestações extra-hepáticas incluem mialgias, dores articulares e urticária. Os sintomas da fase aguda se resolvem em um a três meses, embora alguns pacientes apresentem fadiga prolongada. O tratamento nesta fase é geralmente de suporte, sendo que algumas vezes requer hospitalização. A elevação do nível das aminotransaminases hepáticas, a alaninotransaminase (ALT)

e aspartatotransaminase (AST), refletem o dano hepatocelular e podem variar de 100 a 20.000 UI/L. Estes valores tendem a subir de uma a duas semanas antes do início da icterícia. A bilirrubina total geralmente não ultrapassa a faixa de 20 mg/dL. Anemia leve é comum, bem como linfocitose relativa. Uma fase aguda mais severa da infecção pelo HBV resulta na elevação do tempo de protrombina e decréscimo na taxa de albumina sérica. A infecção aguda pode levar à insuficiência hepática aguda grave com necrose maciça hepatocelular em 1% dos casos. Raramente, pacientes com uma resposta imune exuberante e sintomas clínicos podem evoluir para uma progressiva descompensação hepática, caracterizada por encefalopatia e coagulopatia. Nestes casos, a mortalidade é alta e o transplante hepático, muitas vezes, necessário (4, 29).

2.2.4 Infecção crônica pelo HBV

A infecção crônica é definida pela positividade do HBsAg por mais de seis meses. Atualmente, são conceituados quatro estágios distintos na infecção pelo HBV que podem ser usados para descrever a doença crônica (4, 26, 30).

- Estágio 1: também denominado de fase de tolerância imunológica, é caracterizado por níveis elevados de HBV-DNA em replicação, positividade do HBsAg e HBeAg e normalidade do nível de aminotransaminases. Na infecção aguda de crianças e de adultos, este estágio representa o período de incubação antes da resposta imune ao HBV. Em neonatos, esta fase pode durar anos a décadas;
- Estágio 2: esta fase reflete a resposta imunológica, onde o processo inflamatório é resultante da destruição das células infectadas pelo HBV,

traduzida pela elevação das aminotransaminases. A persistência desta resposta imunológica por mais de seis meses caracteriza a fase crônica da infecção pelo HBV. Neste estágio há o risco elevado de progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular. Também está associado a manifestações extra-hepáticas como poliarterite nodosa, vasculite sistêmica, e glomerulonefrite membranosa ou membranoproliferativa;

- Estágio 3: denominado de estágio de portador inativo, é marcado pelo fim da replicação viral. O HBeAg torna-se negativo, surge o anti-HBe e ocorre normalização das aminotransaminases. Uma baixa carga viral de HBV-DNA pode estar presente. A maioria dos adultos com infecção aguda pelo HBV rapidamente entra neste estágio. De 10 a 30% destes portadores inativos podem experimentar uma “explosão” (*flare*) da doença, similar à infecção aguda pelo HBV. Entretanto, estes episódios podem ser decorrentes de uma reativação viral, de uma desregulação da resposta imune ou, ainda, secundários a infecções por outros vírus como o da Hepatite A (HAV), Hepatite C (HCV) e Hepatite Delta (HDV). Esta situação de *flare* pode ocorrer também durante o tratamento com interferon ou depois do uso de corticóide ou quimioterapia por outras doenças;
- Estágio 4: é o estágio imune caracterizado pela eliminação do HBsAg. Usualmente o HBV-DNA é indetectável e a reativação é incomum. A progressão do terceiro para o quarto estágio ocorre em aproximadamente 3% ao ano nos indivíduos infectados pelo HBV. O surgimento do anti-HBs sinaliza o desenvolvimento da total imunidade ao vírus.

O risco de infecção crônica pelo HBV é maior para os contatos sexuais de

portadores, trabalhadores que lidam com sangue humano, pacientes submetidos a transplante ou tratamento imunossupressor, usuários de drogas e homossexuais. Neonatos, filhos de mãe HBeAg positiva, têm de 80 a 90% de chance de se tornarem portadores crônicos. Nos adultos saudáveis, o risco de cronificação após uma infecção aguda é muito baixo (cerca de 5,5%). A cronificação também ocorre com mais frequência após uma Hepatite aguda subclínica (2, 24, 29).

A Hepatite crônica é, geralmente, uma doença silenciosa e os sinais e sintomas não se correlacionam com a gravidade da lesão hepática. Em cerca de 50% dos casos, a doença se manifesta numa fase avançada com icterícia e/ou hipertensão portal. Alguns já se apresentam com carcinoma hepatocelular (29).

2.2.5 Recidiva clínica e reativação

Um paciente aparentemente estável pode ter uma recidiva clínica, caracterizada pelo aumento da fadiga e, em geral, aumento das aminotransaminases. A recidiva pode estar relacionada à soroconversão de um estado de HBeAg reagente para HBeAg não-reagente. Neste momento, a biópsia hepática demonstra uma Hepatite aguda com necrose e que, posteriormente, regride, acompanhada da queda dos níveis de aminotransaminases. Esta soroconversão pode ocorrer espontaneamente ou após terapia antiviral. O HBV-DNA pode permanecer positivo mesmo com o desenvolvimento do anti-HBe.

Também foi descrita reativação espontânea do HBeAg e do HBV-DNA em pacientes que já estavam negativos. O quadro clínico varia da ausência de manifestações clínicas até a insuficiência hepática aguda grave. Esta reativação é particularmente grave nos pacientes co-infectados com o vírus da imunodeficiência

humana (HIV) (31).

A reativação da Hepatite pode ser caracterizada sorologicamente pelo simples achado do anti-HBc IgM positivo e pode ocorrer após quimioterapia antineoplásica, transplante de órgãos, uso de metotrexato ou de corticóide nos pacientes HBeAg reagentes. Exacerbações graves foram associadas às mutações do pré-cerne, onde o HBV-DNA está presente, mas o antígeno “e” está ausente.

O paciente pode ser superinfectado pelo vírus da Hepatite Delta (HDV), o que provoca aceleração acentuada na evolução da Hepatite crônica. Também é necessário considerar superinfecção pelos vírus A ou C. Outra situação a ser considerada é quando há qualquer piora em um portador do HBV, sendo que a possibilidade de carcinoma hepatocelular deve ser levantada (2).

2.2.6 História natural e complicações

A necessidade de tratamento da Hepatite B depende da história natural da doença e do estágio de doença crônica. Estima-se que 12% dos pacientes com Hepatite crônica desenvolvem cirrose anualmente, e que um percentual pequeno irá desenvolver carcinoma hepatocelular. O risco de morte por cirrose e carcinoma hepatocelular nos pacientes com Hepatite B é de 15 a 25% ao longo da vida.

A taxa de progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular varia de acordo com o estado imunológico do portador, a idade, o estágio sorológico da infecção e de fatores geográficos e genéticos. Entretanto, os dois fatores de maior risco para cronificação da Hepatite B são a idade em que a infecção foi adquirida e o estado imunológico do hospedeiro. O risco de cronificação após o contágio é baixo em adultos imunocompetentes, variando de 1% a 12%, mas é consenso que o risco de

cronificação é menor que 5%.

O risco de cronificação é maior em pacientes que não conseguem eliminar o vírus, tais como os pacientes em hemodiálise, transplantados de órgãos sólidos e em quimioterapia. Pacientes co-infectados com HIV também têm riscos maiores e cerca de 20% a 30% ficam portadores crônicos do HBsAg após a infecção aguda. O risco de cronificação após exposição neonatal é extremamente alto, sendo superior a 90%, possivelmente pela imaturidade do sistema imunológico. Aos seis anos de idade o risco diminui bastante, ficando em cerca de 30%.

A progressão da infecção crônica pelo HBV é determinada, predominantemente, pela presença ou ausência de replicação viral e pelo grau de dano histológico no fígado. Aproximadamente, metade de todos portadores crônicos do HBV tem evidência de replicação viral, especialmente aqueles com níveis de aminotransaminases elevadas. Esta situação tem alto risco de evoluir para doença avançada: cirrose pode ocorrer em 15% a 20% destes pacientes em cinco anos, mesmo com um dano histológico inicial de leve intensidade. O acompanhamento destes pacientes demonstrou que uma taxa de 7% a 20% têm eliminação espontânea do HBeAg ao ano, portanto, a prevalência de HBeAg diminui com a idade (32). A perda do HBeAg pode ocorrer espontaneamente ou em associação com o uso de terapia antiviral e é, muitas vezes, acompanhada de uma exacerbação da doença hepática. A taxa de eliminação do HBsAg ocorre menos freqüentemente, cerca de 1% a 2% ao ano, e a maioria dos pacientes ficam portadores pelo resto da vida (3, 4, 24).

Muitos pacientes com infecção crônica pelo HBV têm níveis séricos de aminotransaminases normais e histologia hepática normal ou próxima do normal.

Estes indivíduos têm tolerância imunológica ao vírus e excelente prognóstico. Um estudo (33) com 92 indivíduos assintomáticos e portadores de HBsAg, identificados em banco de sangue, demonstrou que a maioria desses indivíduos não apresentou nenhuma ou apenas doença mínima. Somente 5% tiveram evidência de doença hepática, isto é, Hepatite crônica, e nenhum apresentou cirrose. A maior parte deles era HBeAg e HBV-DNA negativos. O acompanhamento destes pacientes, numa média de 130 meses, evidenciou que 12% apresentaram elevação sustentada de aminotransaminases e somente 2% desenvolveram progressão histológica da doença. A prevalência de Hepatite B crônica com HBeAg não-reagente varia de região para região, mas é elevada no Mediterrâneo. Também há evidências que esta forma de Hepatite está associada com doença hepática mais severa do que naqueles com HBeAg reagente (34).

Assim, a infecção pelo HBV em portadores assintomáticos tende a ser uma doença leve e com poucas complicações ao longo do tempo. A mortalidade em cinco anos de Hepatite crônica não complicada é de 0-2%, de Hepatite crônica com cirrose compensada de 14-20% e de cirrose descompensada de 70-86% (30, 35).

2.2.7 Prevenção

Basicamente, há três tipos de prevenção para infecção do HBV: mudança de comportamento, imunoprofilaxia passiva e a imunização ativa.

2.2.7.1 Mudança de comportamento

As mudanças de comportamento sexual em face da infecção pelo HIV contribuíram para a queda da incidência de infecção pelo HBV nos EUA, bem como a triagem mais abrangente em doadores de sangue. Também os programas de

prevenção com usuários de drogas injetáveis visam diminuir o risco, mas estes são mais difíceis de serem implementados. Países em desenvolvimento, além da mudança de comportamento, devem incentivar a imunoprofilaxia de crianças e jovens (29).

2.2.7.2 Imunoprofilaxia passiva

Consiste no uso de imunoglobulina da Hepatite B (HBIG) e é usada em quatro situações:

- neonatos nascidos de mães HBsAg positivas;
- após acidente punctório;
- após exposição sexual;
- após transplante hepático em paciente com HBeAg reagente no pré-transplante.

O mecanismo pelo qual a HBIG previne a infecção pelo HBV continua incerto. A profilaxia é recomendada para todos os recém-nascidos de mães HBsAg positivas (36). A dose recomendada é de 0,13 mL/kg de HBIG imediatamente após o nascimento ou até 12 horas após o parto em combinação com a imunização ativa (vacinação). Esta combinação de imunoprofilaxia resulta em mais de 90% de proteção na transmissão perinatal do HBV. Após exposição sexual e/ou agulha contaminada pelo HBV, a recomendação atual é de 0,05 a 0,07 mL/kg de HBIG intramuscular, preferencialmente nas primeiras 48 horas e não mais do que sete dias após a exposição. Uma segunda dose de HBIG trinta dias após pode diminuir o risco de transmissão do HBV. Imunização ativa deve ser iniciada concomitantemente (37).

2.2.7.3 Imunoprofilaxia ativa

A prevenção primária da infecção pelo HBV se faz com a vacinação e está indicada, idealmente, para todos os indivíduos. Entretanto, devido aos custos as indicações necessárias são: equipe médica e odontológica; equipe hospitalar e de laboratório; deficientes mentais; exposição acidental ao sangue HBsAg positivo; pacientes das equipes de oncologia, hematologia, nefrologia, psiquiatria e hepatologia; filhos de mulheres HBsAg positivas; crianças como parte de um programa ampliado de imunização; usuários de drogas; homossexuais masculinos e viajantes para áreas de alto risco. O esquema de imunização ativa consiste de três doses, aplicadas por via intramuscular (deltóide de adultos e glúteo de crianças), sendo a segunda dose após trinta dias da primeira e a terceira dose em cento e oitenta dias. A série de três injeções confere imunidade em 95% das crianças e 90% dos adultos. A imunidade falha pode ser corrigida com a revacinação, sendo que, nestes casos, a proteção ocorre em 30 a 50% dos indivíduos (38). Devido à grande efetividade da vacinação, o *Center Disease Control* (CDC) americano não recomenda reforço, exceto em pacientes imunodeprimidos. O anti-HBs, marcador de imunidade após a vacinação, deve ser dosado de um a três meses após a vacinação (37). Os resultados são expressos em UI/L e classificados da seguinte maneira (24):

- os que não respondem têm títulos máximos inferiores a 10 UI/L e não tem proteção;
- os que respondem mal têm níveis máximos de anti-HBs entre 10-100 UI/L e geralmente é desprovido de anti-HBs séricos detectáveis dentro de 5 a 7 anos;
- os que respondem bem apresentam níveis de anti-HBs superior a 100 UI/L e, via de regra, tem imunidade de longo prazo.

2.2.8 Tratamento

O tratamento da Hepatite B aguda é de suporte, não estando indicado o uso de antivirais. Deve-se dar atenção aos marcadores de função hepática (tempo de protrombina, nível sérico de bilirrubinas e albumina) e a monitoração sistemática para que, se houver insuficiência hepática, ocorra o pronto encaminhamento a um centro de transplante (39, 40).

O tratamento da Hepatite B específico é recomendado nos casos de Hepatite crônica, baseado numa combinação de critérios clínicos, laboratoriais e fatores histológicos. O tratamento não é curativo, pois raramente produz permanente remissão da doença já instalada. O objetivo da terapia visa à supressão por longo tempo da replicação viral e prevenção de estágios avançados de doença hepática como a cirrose e o carcinoma hepatocelular. Idealmente, o objetivo primário do tratamento consiste na supressão da replicação viral e em induzir a remissão da doença hepática. A longo prazo a meta é eliminar o vírus, prevenindo a progressão da Hepatite crônica para cirrose ou câncer e, assim, melhorando a sobrevida destes pacientes. Os marcadores de sucesso na terapêutica incluem a normalização das aminotransaminases, a não detecção do HBV-DNA no soro através da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR), perda do HBeAg com ou sem detecção do anti-HBe e melhora da histologia hepática (41, 42). O *National Institutes of Health* (NIH) americano propõe que a resposta à terapia antiviral no tratamento da Hepatite B crônica inclua as seguintes categorias de resposta (43):

- bioquímica – decréscimo das aminotransaminases ao nível da faixa de normalidade;
- virológica – decréscimo do nível de HBV-DNA a nível indetectável e perda do HBeAg em pacientes que eram inicialmente HBeAg reagentes;

- histológica – decréscimo na atividade histológica em dois pontos em relação à graduação pré-tratamento;
- completa – preenchimento de critérios de resposta bioquímica e virológica e perda do HBsAg;
- sustentada - persistência da resposta completa em seis ou doze meses após o tratamento.

Há duas estratégias usadas no tratamento da Hepatite B crônica. Na primeira, o sistema imunológico é estimulado para acelerar a eliminação das células hepáticas contaminadas e na segunda, com o uso de drogas antivirais que irão reduzir a carga viral e capacitar o sistema imunológico a combater efetivamente as células restantes infectadas (39, 40, 44).

Não será discutida nesta revisão a abordagem terapêutica específica, por ser atualmente complexa, e a disponibilidade de vários agentes aprovados.

2.3 Marcadores Hepatite B

Os marcadores sorológicos de infecção por HBV são úteis não somente para caracterizar a fase aguda da doença, através da positividade do antígeno de superfície (HBsAg) e do anticorpo de fase aguda contra o antígeno viral (anti-HBc IgM), mas também para demonstrar a evolução ou não para a cronicidade em diferentes fases da doença. Na fase replicativa viral, encontra-se a presença do marcador HBeAg e do HBV-DNA que pode ser detectado pela técnica da PCR ou por hibridização molecular, uma técnica menos sensível que a PCR (2, 4, 20).

2.3.1 HBsAg

É o marcador do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B, polipeptídeo de tamanho variável, é um dos componentes do invólucro externo da partícula do HBV. O sangue de pessoas infectadas pelo HBV contém, além das partículas de HBV infeccioso intactas, partículas do invólucro vazias não-infecciosas, menores, que se formam em excesso e também contêm o antígeno de superfície da Hepatite B. Todas as partículas de HBsAg têm em comum o determinante “a”, contra o qual se dirige majoritariamente a resposta imunológica. Além disso, estão presentes os determinantes principais “d” ou “y” e “w” ou “r”. A detecção do HBsAg no soro ou plasma humano é um indicador de infecção pelo HBV. O HBsAg é o primeiro marcador imunológico a surgir, encontrando-se geralmente já presente alguns dias ou semanas antes de os primeiros sintomas clínicos começarem a manifestar-se e desaparecem três meses após a infecção. A persistência por mais de seis meses indica o estado de portador crônico. Em casos isolados, a infecção pelo HBV também pode ocorrer sem que seja possível detectar o HBsAg como na insuficiência hepática aguda grave. O teste de HBsAg é utilizado no diagnóstico para identificar pessoas infectadas pelo HBV e para impedir a transmissão do vírus da Hepatite B através de sangue e/ou de hemoderivados. Também serve para controlar a evolução da doença em pessoas com Hepatite B aguda e crônica e, em alguns casos, para verificar a eficácia do tratamento antiviral. Os testes de HBsAg também são recomendados nos cuidados pré-natais para tornar possível a adoção de medidas adequadas de impedir a transmissão da infecção aos recém-nascidos. O organismo geralmente produz anticorpos contra o HBsAg como resposta normal à infecção (21, 45).

2.3.2 Anti-HBs

O anticorpo do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B é um anticorpo específico (geralmente IgG) dirigido contra o HBsAg. O anti-HBs pode se formar após a infecção pelo HBV ou após a vacinação. Os anticorpos são formados contra o determinante “a”, que é comum a todos os subtipos, e contra determinantes antigênicos específicos dos subtipos. Em relação à vacinação contra Hepatite B, a determinação do anti-HBs tem por objetivo verificar sua necessidade ou efetividade. Também é utilizado para monitorizar o curso de uma Hepatite B aguda e verificar a formação de anticorpos que conferem imunidade. O teste anti-HBs usa uma mistura de antígenos purificados a partir de dois subtipos HBsAg “ad” e “ay” do soro de humanos (24, 46).

2.3.3 HBcAg

Representa o antígeno da porção cerne do vírus da Hepatite B e contém 183-185 aminoácidos. Não é dosável no soro de pacientes com Hepatite B, sendo detectado apenas através de tecido hepático. Entretanto, o seu anticorpo é precocemente detectado no soro de indivíduos infectados pelo HBV (24, 46).

2.3.4 Anti-HBc

Representa o anticorpo do antígeno do cerne do vírus da Hepatite B. Durante a infecção pelo HBV são formados anticorpos contra HBcAg, sendo precocemente títulos IgM e posteriormente IgG, os quais podem permanecer por toda vida. O anticorpo surge logo após a infecção aguda pelo HBV e pode ser detectado no sangue após o aparecimento do HBsAg. Pode persistir naqueles que desenvolverão Hepatite crônica bem como nos que apenas serão portadores inativos do HBsAg.

Assim, pode indicar a presença de infecção pelo HBV ou uma infecção no passado. Títulos mais baixos de anti-HBc IgG com a presença de anti-HBs indicam infecção pelo HBV no passado remoto. A presença de anti-HBc IgG e ausência de anti-HBs é de diagnóstico incerto, podendo representar uma fase tardia de uma infecção aguda, sendo que, nestes casos, o HBV-DNA é detectável (47, 48).

2.3.5 Anti-HBc IgM

Como já mencionado, representa a fração do anticorpo que aparece no sangue precocemente após o contágio como consequência da reprodução ativa do vírus da Hepatite e pode permanecer detectável por semanas a meses após cessar a replicação, geralmente, até seis meses. Na Hepatite B aguda e em alguns períodos do processo inflamatório crônico pode-se encontrar altos títulos de anti-HBc IgM associado ao HBsAg. Clinicamente, estas duas fases podem ser indistinguíveis e pode ser necessária a correlação com estudo histológico (49).

2.3.6 HBeAg

O antígeno “e” do vírus da Hepatite B é um produto do gene pré-C/C que foi descoberto nos hepatócitos durante a proliferação do vírus da Hepatite B. Após a proteólise, a proteína HBe cujo tamanho varia de 16 kD a 20 kD é secretada para o soro, mas não sob a forma de partículas. O HBeAg surge no soro durante a infecção aguda pelo HBV e só é detectável por um curto período de tempo (dias a semanas). Habitualmente, a detecção do HBeAg está associada a grandes quantidades de vírus. Na fase de recuperação após a Hepatite B aguda, o HBeAg é o primeiro marcador sorológico a desaparecer, sendo substituído pelo anticorpo correspondente (anti-HBe). Pode ocorrer infecção aguda e persistente pelo HBV

sem detecção do HBeAg. A detecção nestes indivíduos do anti-HBe é indicativo da presença de mutantes do pré-cerne. Resumindo, HBeAg correlaciona-se com a síndrome viral contínua e à infecciosidade. Encontra-se transitoriamente presente durante o ataque agudo e em período mais curto que o HBsAg. A persistência por mais de dez semanas sugere fortemente o desenvolvimento de Hepatite crônica (31).

2.3.7 Anti-HBe

Representa o anticorpo contra o antígeno “e” do vírus da Hepatite B, sendo um marcador de infecciosidade relativamente baixa, indicando o fim da replicação viral e significando a soroconversão. O aparecimento do anti-HBe consiste numa forte evidência de que o paciente irá recuperar-se completamente. Portanto, o anti-HBe é útil, juntamente com o HBeAg, na monitoração de uma Hepatite B crônica, devendo ser solicitado somente nestas situações (31, 47).

2.3.8 HBV-DNA

É o marcador da presença do vírus da Hepatite B. É detectado através da técnica da PCR uma semana após a infecção inicial. Através deste método, o HBV-DNA pode ser detectado no soro e no tecido hepático mesmo após a perda do HBsAg, sobretudo nos pacientes que estão em tratamento antiviral. A detecção do HBV-DNA sérico, através da PCR, é um bom marcador de viremia e pode se correlacionar com os níveis séricos de aminotransaminases e com a presença do HBsAg no soro. Os pacientes com mutante pré-cerne do HBV são HBeAg não-reagentes e HBV-DNA positivos (31, 50, 51).

A Tabela 1 apresenta diversas situações da presença ou não de marcadores da Hepatite B e as interpretações clínicas (4).

Tabela 1 - Situações de marcadores de Hepatite B e as interpretações clínicas

Teste	Resultado	Interpretação
HBsAg anti-HBc anti-HBs	negativo não-reagente negativo	Vulnerável
HBsAg anti-HBc anti-HBs	negativo reagente positivo	Imunidade natural devido à infecção
HBsAg anti-HBc anti-HBs	negativo não-reagente positivo	Imunidade após vacinação
HBsAg anti-HBc anti-HBc IgM anti-HBs	positivo reagente reagente negativo	Infecção aguda
HBsAg anti-HBc anti-HBc IgM anti-HBs	positivo reagente não-reagente negativo	Infecção crônica
HBsAg anti-HBc anti-HBs	negativo reagente negativo	Quatro interpretações possíveis*

*Quatro interpretações:

1. Pode estar em fase de recuperação de Hepatite B aguda sem ter formado anti-HBs.
2. Pode ser imunidade adquirida por infecção no passado e o teste para anti-HBs não ser suficientemente sensível para detectar níveis muito baixos de anti-HBs sérico.
3. Pode ser suscetível com um falso anti-HBc reagente.
4. Pode ter níveis de HBsAg no soro indetectáveis, e o indivíduo ser cronicamente infectado.

2.4 Doação de sangue

“Doe vida. Seja um doador“. Este é o *slogan* da campanha sobre doação de sangue do Ministério da Saúde. O objetivo é que a sociedade brasileira participe ativamente do processo de doação de sangue de forma consciente e responsável, visando a garantia da quantidade adequada à demanda do país e a melhoria da

qualidade do sangue, componentes e derivados. Os escassos estoques de sangue são uma preocupação mundial.

2.4.1 Para doar sangue é necessário

- estar em boas condições de saúde;
- apresentar documento de identidade original ou fotocópia autenticada ou documento equivalente com foto e filiação;
- ter entre 18 e 65 anos;
- ter peso mínimo de 50 kg;
- ter descansado no mínimo 6 horas nas últimas 24 horas;
- não estar gripado ou com febre;
- não estar grávida ou amamentando;
- não ter ingerido bebida alcoólica nas últimas 6 horas.

2.4.2 Não poderá doar

- quem fez tatuagem, *piercing* ou tratamento com acupuntura nos últimos 12 meses;
- portadores de HIV, HBV, HCV ou HTLV;
- pessoas que já viveram situações sexuais de risco;
- quem possui histórico de doença hematológica, cardíaca, renal, pulmonar, hepática, auto-imune, diabetes, hipertireoidismo, hanseníase, tuberculose,

câncer, sangramento anormal, convulsão após os dois anos de idade ou epilepsia, sífilis, doença de Chagas ou malária;

- usuários de drogas;
- medicamentos contra-indicados para doação de sangue;
- anemia.

2.4.3 Como é a doação?

Ao chegar, a pessoa é submetida ao teste de hemoglobina ou microhematócrito e verificação dos sinais vitais (pressão arterial, batimentos cardíacos e temperatura). Após uma entrevista e não havendo problemas, a pessoa estará habilitada à doação. Após a doação, é oferecido um lanche que deve ser tomado no local e, em seguida, o doador é liberado.

A resolução nº 153, de 14 de junho de 2004, do Ministério da Saúde, determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. Nesta resolução constam todas as situações de aptidão e inaptidão do sangue doado. O item B.5.2.6.1 determina que são inaptas para a doação de sangue as pessoas que têm antecedentes de Hepatite viral após os 10 anos de idade e antecedentes clínicos ou laboratoriais ou história atual de infecção pelos vírus HBV, HCV, HIV ou HTLV.

No Anexo VIII da mesma resolução, encontra-se o algoritmo para a testagem e liberação de bolsas de sangue e a referência aos testes realizados:

- Hepatite B - os marcadores de Hepatite B a serem pesquisados são HBsAg e anti-HBc total que podem ser realizados por métodos imunoenzimático ou por quimioluminescência ou outras metodologias previamente validadas;
- Hepatite C - deverá ser realizado um teste imunoenzimático ou por quimioluminescência de anti-HCV;
- HTLV I/II - deverá ser realizado um teste imunoenzimático ou por quimioluminescência;
- Doença de Chagas - deverá ser realizado um teste imunoenzimático de alta sensibilidade;
- Sífilis - deverá ser realizado um teste treponêmico ou não-treponêmico, o VDRL;
- HIV I/II: deverão ser realizados dois testes. Um dos testes deve ser imunoenzimático. O segundo teste poderá ser por quimioluminescência ou por outra técnica com princípio metodológico ou antigênico distinto do primeiro teste.

É obrigatória a realização de exames laboratoriais de alta sensibilidade em todas as doações para identificação das doenças transmissíveis pelo sangue. Estes exames devem ser feitos em amostra colhida na doação do dia e ser testados com conjuntos diagnósticos (*kits*) registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) em laboratórios específicos para tal fim.

A portaria nº 112/GM, de 29 de janeiro de 2004, do Ministério da Saúde, dispõe sobre a implantação, no âmbito da Hemorrede Nacional, da realização dos testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos (NAT) para HIV e HCV. A implantação de tal portaria deve ser gradual, inicialmente em Serviços de Hemoterapia públicos.

2.4.4 Inaptidão sorológica

O sangue total e seus componentes não podem ser transfundidos antes da obtenção de resultados finais não-reagentes nos testes de detecção para Hepatite B, Hepatite C, HIV I/II, Doença de Chagas, Sífilis, HTLV I/II. A dosagem de aminotransaminases foi abolida pela RDC 343/03 – ANVISA.

A Tabela 2 apresenta dados sobre a taxa de inaptidão sorológica das doações do Brasil das cinco regiões e dos Estados do Amazonas e Rio Grande do Sul no ano de 2002, conforme dados publicados no *site* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (www.anvisa.gov.br) na área de atuação de sangue e hemoderivados.

Tabela 2 - Marcadores sorológicos: percentual de impedimentos por região

	Anti-HIV	Anti-HCV	HBsAg	Anti-HBc	HTLV I e II	Sífilis	Chagas
Brasil	0,49	0,51	0,52	4,2	0,18	0,83	0,61
Região Norte	0,46	0,62	0,60	8,12	0,17	1,01	0,37
- Amazonas	0,27	0,37	0,48	8,57	0,11	0,58	0,13
Nordeste	0,90	0,69	0,77	4,29	0,29	1,26	0,7
Centro Oeste	0,41	0,35	0,43	4,95	0,16	0,48	0,65
Sudeste	0,39	0,47	0,42	2,91	0,17	0,64	0,66
Sul	0,27	0,38	0,46	4,92	0,09	0,85	0,45
- RS	0,40	0,72	0,49	6,23	0,13	0,33	0,85

Fonte: ANVISA, 2002

Ao analisar-se a Tabela 2, observa-se que a principal causa de impedimento da doação, isto é, a rejeição da bolsa sangüínea após os testes sorológicos é o marcador anti-HBc total reagente, independentemente da região ou estado. Não estão disponíveis informações nacionais atualizadas a partir do ano de 2003.

Em relação ao Estado do Rio Grande do Sul, os dados de soros reagentes em relação à Hepatite B no ano 2003 mostram o impedimento por HBsAg positivo de

0,19% e por anti-HBc total reagente de 2,83%. No ano de 2004, estes números são muito semelhantes com 0,16% para o HBsAg e 2,49% para o anti-HBc total. Também nestes dois anos, a principal causa de impedimento para a doação de sangue no Rio Grande do Sul foi a presença positiva do teste anti-HBc total (os dados da Secretaria da Saúde estão nos Anexos A e B). No ano de 2002, há uma discrepância nos dados da ANVISA com os da Secretaria da Saúde do RS.

No Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) os impedimentos por positividade de marcadores de Hepatite B foram os seguintes, conforme o ano:

- 2003 – HBsAg: 0,20%; anti-HBc total: 3,44%;
- 2004 – HBsAg: 0,29%; anti-HBc total: 3,54%;
- 2005 – HBsAg: 0,20%; anti-HBc total: 3,15% (até maio).

Neste hospital, a presença de anti-HBc total reagente isoladamente foi também o principal motivo de impedimento da doação nestes últimos três anos.

Portanto, o Rio Grande do Sul pode ser considerado um estado de baixa endemicidade para Hepatite B, pois o percentual de HBsAg positivo é menor que 1%.

2.5 Anti-HBc reagente isolado

A presença do anticorpo específico contra o antígeno do cerne do vírus da Hepatite B deve sempre ser especificado se é para a classe IgM ou IgG.

A fração IgM representa a fase aguda da infecção pelo HBV, mas pode estar

presente em alguns pacientes portadores crônicos do HBV. A ausência do HBsAg e do anti-HBs pode significar infecção recente e de má evolução clínica como na insuficiência hepática aguda grave (4, 24, 46).

A presença isolada do anti-HBc total (IgM+IgG) identifica todas as pessoas que tiveram contato com o HBV, mas não diferencia os portadores dos não-portadores do HBV. Se estiver acompanhado do anti-HBs positivo, pode representar a cura de uma infecção passada com imunidade estabelecida (52).

A Hepatite B pós-transfusional representa um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Várias medidas foram adotadas para prevenir a transmissão através de sangue contaminado. No ano de 1993, através de Portaria do Ministério da Saúde do Brasil, foi instituído que todo o sangue doado deveria ser testado para a presença do anti-HBc total, além do HBsAg já previsto. Se o anti-HBc total for reagente em duas amostras consecutivas, este indivíduo é considerado inapto para doação de sangue, e tem seu nome registrado em uma lista regional de impedimentos. A função da pesquisa de anti-HBc total é proporcionar uma cobertura sorológica no período da “janela imunológica”, onde o indivíduo está contaminado pelo HBV, mas ainda não possui níveis de HBsAg detectáveis. A positividade do anti-HBc total, porém, pode persistir por longos períodos, mesmo após a eliminação do vírus e recuperação do paciente (53, 54).

Portanto, o significado do anti-HBc total reagente, na ausência do antígeno de superfície, é, até certo ponto, controverso. Tal achado pode significar: (1) uma situação onde, apesar do anti-HBs e do anti-HBe serem indetectáveis, o indivíduo está imunizado; (2) um caso onde o nível de HBsAg é muito baixo e não detectável nos testes de rotina; (3) falso positivo ou reação cruzada do anti-HBc total para

outros vírus; (4) um período de janela imunológica onde o HBsAg já é indetectável e o anti-HBs ainda não está presente. Nas três primeiras situações, nenhuma conclusão é possível sobre a presença ou ausência do HBV sem utilizar algum método molecular (52, 55, 56).

Assim, como a infecção pelo HBV pode ficar silenciosa por longos períodos, é importante a utilização de métodos de maior acurácia para determinar a presença do vírus no organismo. A forma mais rígida de determinar a presença de partículas do HBV é a mensuração de DNA viral circulante no sangue. A utilização da PCR representa esta forma de detecção. Em condições precisamente controladas, as técnicas moleculares aumentaram a sensibilidade e a especificidade de detecção do HBV em amostras clínicas. A reação em cadeia de polimerase permite a amplificação do DNA *in vitro*, utilizando-se uma reação enzimática catalisada pela DNA polimerase e que ocorre em três etapas: desnaturação, hibridização e polimerização propriamente dita, repetidas diversas vezes (50, 51).

O estudo de Mosley (57) com pacientes HBsAg negativo, anti-HBc total reagente e anti-HBs negativo evidenciou a presença do vírus pela PCR, mas não naqueles com anti-HBs positivo. Posteriormente, outros estudos também evidenciaram positividade para o HBV, utilizando a PCR em pacientes HBsAg negativos e anti-HBc total reagente com taxas variáveis de 0 a 90%. Entretanto, tais observações foram possíveis a partir de estudos realizados em áreas de alta e intermediária endemicidade para a Hepatite B e utilizando diferentes técnicas para detecção de DNA viral (58-60, 61, 62).

Por outro lado, estima-se que cerca de 80% dos doadores de sangue anti-HBc total reagente e HBsAg negativo apresentam títulos de anti-HBs que lhes conferem

imunidade (título > 10 UI/L) (58, 62, 63).

Com isso, surgem alguns questionamentos.

- Se já existe imunidade adequada, este doador ainda apresenta vírus circulante?
- Realmente, este indivíduo nunca mais poderá doar sangue?
- Qual o risco futuro de desenvolver doença hepática pelo HBV?
- Como fazer o acompanhamento deste paciente?

O significado clínico do anti-HBc total reagente isolado em indivíduos HBsAg negativos ainda não está bem claro. Títulos de anti-HBs superiores a 10 UI/L são considerados protetores. Dados da literatura sobre a presença ou não de HBV-DNA em quantidades detectáveis nos indivíduos de uma área de baixa endemia de HBV como o Rio Grande do Sul ainda são escassos (59). Frente a estas observações, o presente estudo visa testar amostras sanguíneas de indivíduos impedidos de doar sangue por apresentarem tão somente anti-HBc total reagente, identificando títulos de anti-HBs e pesquisando HBeAg, anti-HBe e HBV-DNA. Com isso, será possível traçar um perfil sorológico e molecular dos indivíduos excluídos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Pesquisar marcadores de Hepatite B no sangue de indivíduos excluídos de doação sangüínea por apresentarem anti-HBc reagente isolado.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os títulos de anti-HBs e classificá-los em três categorias: não-protetor, fraco-protetor e forte-protetor.
- Pesquisar os marcadores de Hepatite B relacionados com a replicação viral: HBeAg e anti-HBe.
- Pesquisar a presença do vírus da Hepatite B circulante através da reação em cadeia de polimerase (PCR).
- Verificar a associação entre títulos de anti-HBs e presença de HBV circulante.
- Relacionar os resultados de HBeAg e anti-HBe com a titulação do anti-HBs.
- Relacionar os resultados de HBeAg e anti-HBe com a presença de HBV circulante.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

O trabalho constitui-se em um estudo transversal, onde foram arrolados indivíduos excluídos pelo Banco de Sangue do HSL-PUCRS por apresentarem anti-HBc total reagente e HBsAg negativo.

4.2 Critérios de inclusão

Indivíduos excluídos da doação sangüínea que apresentaram exclusivamente um teste anti-HBc total reagente e que aceitaram em participar do estudo, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 Critérios de exclusão

Positividade para um ou mais testes realizados numa doação de sangue (HBsAg, anti-HIV I/II, anti-HCV, anti-HTLV I/II, VDRL e IEE Chagas) ou a negativa em participar do estudo.

4.4 Pacientes e amostra

Os pacientes foram arrolados seqüencialmente, segundo os casos de anti-HBc total reagente e HBsAg negativo, identificados no Banco de Sangue do HSL-

PUCRS, num período de dois anos (março 2003 a maio 2005). Como rotina, no momento em que o indivíduo compareceu para o teste confirmatório do anti-HBc total, o próprio Banco de Sangue solicitou a titulação de anticorpos protetores (anti-HBs). Neste momento, também foi apresentada ao paciente a possibilidade de participar deste estudo, esclarecendo os objetivos e a metodologia. Em caso de concordância, foi assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e 5mL de sangue foram coletados para a pesquisa de DNA do HBV, sendo encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) desta Universidade em até, no máximo, duas horas. O soro utilizado para o teste confirmatório de anti-HBc total foi armazenado a -80°C para posterior análise de anti-HBe e HBeAg.

O HBsAg e o anti-HBc total foram analisados no Setor de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do HSL-PUCRS, empregando o método de imunoenensaio por eletroquimioluminescência (ECLIA) Elecsys (Roche *Diagnostics*), seguindo orientações do fabricante. Para leitura do resultado, foi utilizado o analisador automático Elecsys 2010 RACK. A sensibilidade analítica do Elecsys HBsAg é de 0,09 ng/mL e a do Elecsys anti-HBc total, 0,6 U/mL.

Foi criado um banco de dados com o auxílio do Programa Excel 2003, contendo os dados dos participantes e as diversas variáveis para posterior análise estatística (Anexo C).

4.5 Variáveis em estudo

As variáveis analisadas neste estudo foram:

- titulação de anti-HBs;

- HBeAg;
- anti-HBe;
- HBV-DNA.

4.6 Cálculo do tamanho da amostra

Foi calculado um total de 240 (duzentos e quarenta) indivíduos necessários para uma aceitação máxima de positividade do HBV-DNA de 1,5%, usando a distribuição binomial.

4.7 Pesquisa das variáveis na amostra

4.7.1 Titulação de anti-HBs

Foi utilizado o teste ECLIA Elecsys anti-HBs (Roche *Diagnostics*), seguindo orientações do fabricante. Para leitura do resultado, foi utilizado o analisador automático Elecsys 2010 RACK. O limite mínimo de detecção é 2 UI/L. O resultado foi expresso em número absoluto, e os indivíduos foram classificados em três categorias conforme o título:

- menor que 10 UI/L: não-protetor;
- maior ou igual a 10 e menor que 100 UI/L: fraco-protetor;
- maior que 100 UI/L: forte-protetor.

4.7.2 HBeAg e anti-HBe

Os testes HBeAg e anti-HBe foram realizados para completar o perfil de marcadores para HBV. Como havia disponibilidade de 170 testes, foi feita uma

seleção dos indivíduos conforme os títulos de anti-HBs. Todos os indivíduos com títulos inferiores a 10 UI/L e os com títulos variando entre ≥ 10 UI/L e < 100 UI/L foram alocados para realizar o teste de HBeAg e anti-HBe. Cinco indivíduos destes grupos (dois e três, respectivamente) foram excluídos por escassez de material, perfazendo um total de 66 amostras testadas. Para seleção dos indivíduos com títulos ≥ 100 UI/L, foi feita uma amostragem por sorteio sistemático, usando a seqüência: dois selecionados, um não selecionado, dois selecionados, um não selecionado, um selecionado e dois não selecionados, perfazendo um total de 98 amostras selecionadas para cada teste.

4.7.2.1 HBeAg

Foi utilizado o teste de imunoensaio por ECLIA Elecsys HBeAg (Roche *Diagnostics*) que utiliza anticorpos monoclonais anti-HBe para a determinação do HBeAg, segundo orientações do fabricante. Para leitura do resultado, foi utilizado o analisador automático Elecsys 2010 RACK. A sensibilidade analítica do teste é de 0,30 U PEI/mL (*Paul-Ehrlich-Institut*). A interpretação dos resultados é feita de acordo com os seguintes critérios:

- amostras com um índice de *cutoff* menor que 1,0 são não-reativas no teste Elecsys HBeAg. Estas amostras são consideradas negativas para o HBeAg;
- amostras com um índice de *cutoff* maior ou igual a 1,0 são reativas no teste Elecsys HBeAg. Estas amostras são consideradas positivas para o HBeAg.

4.7.2.2 Anti-HBe

Foi utilizado o teste de imunoensaio por ECLIA Elecsys anti-HBe (Roche

Diagnostics) que contém antígeno HBe recombinante e anticorpo anti-HBe monoclonal, segundo orientações do fabricante. Para leitura do resultado, foi utilizado o analisador automático Elecsys 2010 RACK. A sensibilidade analítica do teste é de 0,2 U PEI/mL. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com os seguintes critérios:

- amostras com um índice de *cutoff* maior que 1,0 são não-reativas no teste Elecsys anti-HBe. Estas amostras são consideradas negativas para anti-HBe;
- amostras com um índice de *cutoff* menor ou igual a 1,0 são reativas no teste Elecsys anti-HBe. Estas amostras são consideradas positivas para anti-HBe.

4.7.3 Extração de DNA

O DNA foi extraído de 200µL de soro através do tratamento com 10µg de proteinase K, 5% SDS, 18mM EDTA, seguindo uma etapa de desproteinização com fenol: clorofórmio - álcool isoamílico (25:24:1), de acordo com técnicas padrão (64).

4.7.4 Reação de amplificação (PCR)

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) que hibridizam na região pré-cerne/cerne do genoma viral e resultam em um amplicon de 770pb (13). A mistura de reação (50µl) continha: 50pmol de *primer* senso (HB1: 5´- GGG AGG AGA TTA GGT TAA -3´) (Invitrogen), 50pmol de *primer* anti-senso (HB2: 5´- GTA CAG TAG AAG AAT AAA GC -3´) (Invitrogen), 2,5U de *Taq* DNA polimerase (CenBiot), 2mM MgCl₂, 20mM Tris-Cl (pH 8,4), 50mM KCl, 200µM dNTP (Invitrogen) e 2,5µL de DNA. Foi utilizado um controle positivo (plasma positivo para HBV) e um branco de reação (mistura de reação sem adição de DNA). O programa de

amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos (MJ Research PTC200). Os produtos da PCR foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen), contendo 5µg/mL de brometo de etídio (Sigma), sob luz ultravioleta (GelDoc 1000, BioRad). O limite de detecção foi estimado em 10³ cópias/mL. O processo de extração do DNA e reação de amplificação (PCR) foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do IPB da PUCRS.

4.8 Local da realização do estudo

O presente estudo foi desenvolvido no HSL-PUCRS com a participação do Banco de Sangue, do Setor de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica e do Laboratório de Biologia Molecular do IPB desta Universidade.

4.9 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS em 08 de novembro de 2002 (Anexo D). Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo E) e foram orientados sobre a finalidade da pesquisa e que, se apresentassem algum resultado que indicasse viremia residual do HBV, seriam contatados via telefone e encaminhados para o Ambulatório de Hepatites do HSL-PUCRS para orientações e acompanhamento.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma analítico-descritiva. A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS),

versão 12,0. Foi aplicado o teste do qui-quadrado para a análise das variáveis categóricas, razão de chance (OR) e medidas de associação, sendo considerado, como significância estatística, valores de $P < 0,05$ (IC 95%).

5 RESULTADOS

No período de março de 2003 a maio de 2005, foram incluídos no estudo 244 indivíduos provenientes do Banco de Sangue do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS) impedidos da doação sanguínea por um anti-HBc total reagente isolado e, portanto, com todos os demais marcadores sorológicos rotineiramente testados negativos.

As freqüências das variáveis estudadas (anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, HBV-DNA) são apresentas na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado geral dos marcadores de HBV pesquisados

Marcador	Resultado	n (%)
anti-HBs n=244	imunizado (≥ 10 UI/L)	209 (85,7)
	não-imunizado (< 10 UI/L)	35 (14,3)
HBeAg n=164	reagente	zero
	não-reagente	164 (100)
anti-HBe n=164	reagente	109 (66,5)
	não-reagente	55 (33,5)
HBV-DNA n=241	positivo	zero
	negativo	241 (100)

A titulação do anti-HBs foi realizada em todas as 244 amostras incluídas no estudo. Conforme especificação do fabricante do teste de anti-HBs, os títulos de anticorpos ≥ 10 UI/L são considerados reagentes e, portanto, o indivíduo que apresentar este resultado é considerado imunizado contra o vírus da hepatite B. Na presente amostra, 209 indivíduos (85,7%) foram considerados imunizados. Quando se analisou os títulos de anti-HBs de acordo com as categorias de não-protetor (< 10 UI/L), fraco-protetor (≥ 10 a < 100 UI/L) e forte-protetor (≥ 100 UI/L), observou-se que a maioria (70,9%) já apresentava títulos ≥ 100 UI/L (Figura 4). O grupo não-protetor foi composto por 14,3% da amostra e o grupo considerado fraco-protetor, por 14,8%.

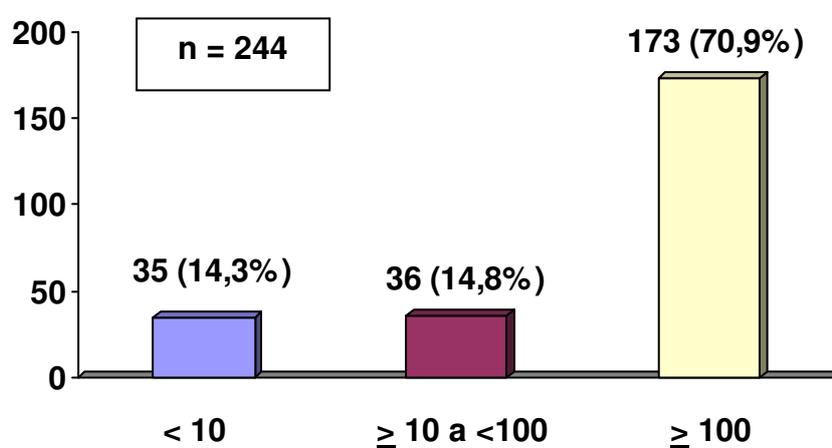


Figura 4 - Distribuição dos indivíduos estudados de acordo com as categorias de proteção do anti-HBs (não-protetor, fraco protetor, forte protetor). Os títulos de anti-HBs são apresentados em UI/L

Ainda em relação aos títulos de anti-HBs, a distribuição dos resultados em cinco categorias de concentrações de anti-HBs (Figura 5), demonstrou que 95 (38,9%) indivíduos do estudo apresentaram concentrações que ultrapassaram a 1.000 UI/L

e 78 (32%), titulação entre 100 e menor que 1.000 UI/L. Abaixo de 100 e até 10 UI/L, foi mantida a mesma proporção apresentada na Figura 4, isto é, 36 indivíduos (14,8%). Entre os 35 indivíduos com títulos abaixo de 10 UI/L, 22 (9%) expressaram um resultado inferior a 2 UI/L e 13 (5,3%) indivíduos tiveram títulos entre 2 e menor que 10 UI/L.

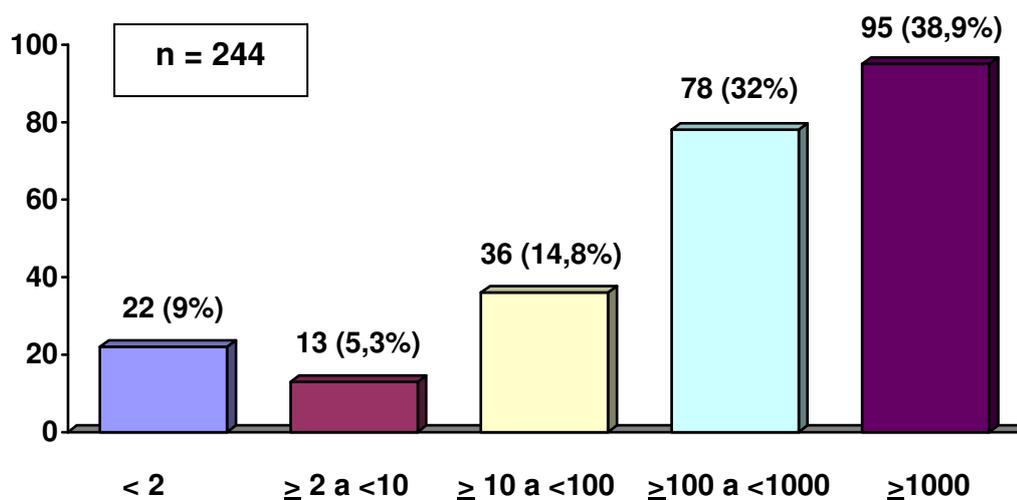


Figura 5 - Distribuição dos indivíduos estudados em cinco categorias de acordo com os títulos de anti-HBs (UI/L).

Em relação à pesquisa dos marcadores de replicação viral, foram testados 164 indivíduos para o HBeAg e 164 para o anti-HBe. Estes representaram 67,2% do total de indivíduos participantes do estudo e a forma de seleção destas amostras já foi descrita anteriormente na seção 4.7.2 (Material e Métodos). O resultado do HBeAg foi não-reagente para todas as 164 amostras. O resultado para o teste anti-HBe foi reagente em 109 (66,5%) indivíduos e não-reagente em 55 (33,5%).

A pesquisa do HBV-DNA foi feita em 241 dos 244 indivíduos do estudo, pois em três amostras não foi possível realizar a pesquisa pela técnica da PCR por insuficiência de material. Este número de amostras testadas forneceu um poder β de

98,5%. Todas as amostras testadas foram negativas para HBV-DNA. A Figura 6 mostra o resultado da eletroforese realizada após a amplificação pela técnica da PCR de parte da região pré-cerne/cerne do genoma viral de um grupo de amostras negativas (colunas 4 a 11). As colunas 1 e 2 mostram a presença do amplicon de 770 pares de base do vírus da Hepatite B no marcador e no controle positivo, respectivamente. A coluna 3 mostra o resultado chamado do controle branco de reação, que é o controle de todos os reagentes empregados na PCR sem adição de DNA de HBV e, portanto, não deve apresentar amplicon.



Coluna 1: Marcador do amplicon de 770pb de HBV. Coluna 2: controle positivo de HBV. Coluna 3: controle branco de reação. Colunas 4-11: resultados da PCR de algumas amostras do estudo (negativas para HBV).

Figura 6 - Visualização do resultado da PCR para o HBV após separação por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

A relação entre os títulos de anti-HBs distribuídos em três categorias e os resultados de anti-HBe é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Títulos de anti-HBs não-protetor (<10 UI/L), fraco-protetor (≥10 a <100 UI/L) e forte-protetor (≥100 UI/L) x resultado do anti-HBe

Títulos de anti-HBs (UI/L)	Anti-HBe		
	Total N	Reagente n (%)	Não-reagente n (%)
<10	33	17 (51,5)	16 (48,5)
≥10 a <100	33	21 (63,6)	12 (36,4)
≥100	98	71 (72,4)	27 (27,6)
Total	164	109	55

$P=0,026$

A pesquisa do anti-HBe foi realizada em 164 indivíduos do estudo e os resultados expressos em reagente e não-reagente. A distribuição dos 109 casos anti-HBe reagente (66,5%) nas três categorias de anti-HBs foi a seguinte: 17 indivíduos (15,6%) foram classificados como não-protetor (<10 UI/L), 21 indivíduos (19,3%) como fraco-protetor (≥10 a <100 UI/L) e 71 indivíduos (65,1%) como forte-protetor (≥100 UI/L). A distribuição dos 55 casos (33,5%) de anti-HBe não-reagente nas categorias de anti-HBs foi a seguinte: 16 amostras (29,1%) foram classificadas como possuindo título não-protetor, 12 amostras (21,8%) como fraco-protetor e 27 amostras (49,1%) como forte-protetor. No grupo de indivíduos anti-HBe reagente, houve uma tendência maior de títulos de anti-HBs forte-protetor em relação ao grupo de anti-HBe não-reagente. A análise estatística destes resultados evidenciou uma associação positiva significativa, onde os indivíduos anti-HBe reagente apresentaram títulos anti-HBs forte-protetores ($P=0,026$) (Tabela 4).

A relação entre os títulos de anti-HBs, classificados em imunizado e não imunizado e os resultados de anti-HBe é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Títulos de anti-HBs não-protetores (<10 UI/L) e protetores (≥10 UI/L) x resultado do anti-HBe

Títulos de anti-HBs (UI/L)	Anti-HBe		
	Total n	Reagente n (%)	Não-reagente n (%)
<10	33	17 (51,5)	16 (48,5)
≥10	131	92 (70,2)	39 (29,8)
Total	164	109	55

OR 2,220 (IC 95%; 1,019-4,837) e $P=0,042$

A comparação dos resultados do anti-HBe em relação aos títulos de anti-HBs cujas concentrações expressam imunidade ou não, isto é, indivíduo imunizado é aquele com título ≥10 UI/L e não imunizado aqueles indivíduos com título <10 UI/L, evidenciou que no grupo de 109 indivíduos anti-HBe reagente a maioria dos indivíduos (84,4%) apresentou títulos de anti-HBs protetores (≥10 UI/L), considerados, assim, imunizados. No grupo de 55 indivíduos anti-HBe não-reagente, 70,9% estavam imunizados. A análise estatística do grupo anti-HBe reagente evidenciou um predomínio de títulos anti-HBs protetores com um OR 2,220 (IC 95%; 1,019-4,837) e $P=0,042$ (Tabela 5).

A relação entre os títulos de anti-HBs, classificados em fraco e forte-protetor, e os resultados de anti-HBe é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Títulos de anti-HBs fraco (≥ 10 a < 100 UI/L) e forte (≥ 100 UI/L) protetores x resultado de anti-HBe

Títulos de anti-HBs (UI/L)	Anti-HBe		
	Total n	Reagente n (%)	Não-reagente n (%)
≥ 10 a < 100	33	21 (63,6)	12 (36,4)
≥ 100	98	71 (72,4)	27 (27,6)
Total	131	92	39

$P=0,338$

A distribuição dos 92 indivíduos anti-HBe reagentes quanto aos títulos de anti-HBs protetores fraco ou forte foi semelhante, assim como nos 39 do grupo de anti-HBe não-reagente. Comparando o resultado de anti-HBe reagente entre os indivíduos com título fraco e forte para o anti-HBs, não foi observada diferença estatisticamente significativa $P=0,338$ (Tabela 6).

6 DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta há mais de 30 anos, a infecção pelo HBV tem sido reconhecida como uma das maiores causas de doença hepática crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular em todo mundo, principalmente em países asiáticos e em determinadas regiões da África. Apesar do desenvolvimento e do uso de vacinas altamente protetoras contra o HBV, estima-se que mais de um terço da população mundial mostra evidências sorológicas de contato prévio com o vírus e que um milhão de mortes ocorram anualmente em decorrência direta dos efeitos da infecção. Portanto, a infecção pelo HBV é considerada um sério problema de saúde pública mundialmente. Ao contrário da Hepatite pelo vírus C, a Hepatite B raramente cronifica nos adultos e muitos que tem contato com o vírus desenvolvem imunidade detectada por títulos elevados de anti-HBs. Esta observação se faz freqüentemente em doadores de sangue que, por se considerarem saudáveis, procuram bancos de sangue para doação e são rejeitados por apresentarem anti-HBc total reagente isolado. A verificação de títulos elevados de anti-HBs demonstra imunidade e, apesar desse indivíduo ser excluído para futuras doações, é informado que no passado teve contato com o vírus, mas que já o eliminou e desenvolveu anticorpos contra o HBV e não necessita de acompanhamento clínico via de regra.

Desde que o anti-HBc total foi adicionado ao HBsAg como teste de triagem para

identificar o HBV em bancos de sangue brasileiros, ele tem sido apontado como a principal causa de rejeição entre os marcadores avaliados de doenças transmitidas pelo sangue (65). Isto só reforça que realmente a infecção pelo HBV atinge uma grande parcela da população, visto que sua transmissão é extremamente fácil pelo contato com sangue contaminado ou por contato sexual, além da transmissão mãe-filho no momento do parto. Entretanto, somente uma pequena proporção de HBsAg negativo e anti-HBc total reagente, proveniente de doações de sangue e rotineiramente descartada, é potencialmente infecciosa (57).

O impacto de doações sangüíneas rejeitadas é enorme, pois ainda há uma grande deficiência no número de doadores voluntários. Por outro lado, são necessários, cada vez mais, testes apurados para evitar o risco de se contrair uma infecção viral através do recebimento de sangue de uma bolsa liberada.

A interpretação dos inúmeros testes sorológicos do HBV, antígenos e anticorpos serve para definir o perfil imunológico do indivíduo e diferenciar a infecção aguda da crônica. A presença de anti-HBc total isolado pode estar associada a quatro situações: (1) um caso onde o nível de HBsAg é muito baixo e não detectável nos testes de rotina, (2) uma situação onde, apesar de o anti-HBs e o anti-HBe serem indetectáveis, o indivíduo está imunizado; (3) falso positivo ou reação cruzada do anti-HBc total para outros vírus; (4) um período de janela imunológica onde o HBsAg já é indetectável e o anti-HBs ainda não está presente. Nas três primeiras situações nenhuma conclusão é possível sobre a presença ou ausência do HBV sem utilizar algum método molecular (52, 55, 56, 66, 67).

Este estudo foi planejado para uma amostra de no mínimo 240 indivíduos para que houvesse uma aceitação máxima de 1,5% de positividade para o HBV-DNA.

Neste período de 26 meses foram selecionados, a partir de doações no Banco de Sangue do HSL-PUCRS, 244 indivíduos anti-HBc total reagente isolado. Todos eram negativos para o antígeno de superfície do HBV (HBsAg), bem como para outros marcadores sorológicos rotineiramente testados numa doação sangüínea. A grande maioria (85,7%) já apresentava títulos de anti-HBs superiores a 10 UI/L que lhes conferiam imunidade contra o HBV. O marcador sorológico que expressa replicação viral - o HBeAg - foi não-reagente em todas as amostras testadas, demonstrando que nesta população não havia, provavelmente, replicação viral detectável. O anti-HBe foi reagente em grande parte das amostras testadas (66,5%), provavelmente indicando que houve no passado replicação viral com produção de HBeAg, mas que no momento ela não estava presente. A pesquisa do HBV-DNA através de método da PCR foi negativa em todas 241 amostras em que foi realizada. Isso conferiu uma margem de segurança de 98,5% de que estas amostras seriam apenas anti-HBc total reagente isolado sem a presença viral detectável. Entre os 164 indivíduos em que foram realizados todos os marcadores que faziam parte dos objetivos do estudo, 16 (9,8%) não apresentavam qualquer marcador sorológico ou molecular para o HBV, além do anti-HBc total reagente.

Um dos primeiros estudos sobre o impacto do anti-HBc total reagente isolado em doadores de Banco de Sangue foi conduzido por Schifman e colaboradores, onde foi avaliado o significado da resposta sorológica à vacinação em doadores de sangue que eram positivos somente para o anti-HBc total, sem títulos de anti-HBs detectáveis e comparados com um grupo de controle que não apresentava qualquer marcador para o HBV. Após trinta semanas da primeira dose de vacina, observaram que a taxa de títulos de anti-HBs maior que 10 UI/L havia sido semelhante nos dois grupos. Por esta observação, a conclusão do estudo foi de que um anti-HBc total

isolado poderia ser apenas um falso positivo, pois se o indivíduo fosse realmente portador do HBV, não teria uma resposta imunológica à vacinação tão eficaz como a observada no grupo controle (52). Entretanto, o estudo não pesquisou o HBV-DNA para excluir a possibilidade de infecção crônica, mesmo com HBsAg negativo. No presente estudo não foi realizada a vacinação dos indivíduos não imunizados - 14,3% da amostra - por não ser este um dos objetivos, mas que poderá ser complementado posteriormente. Cerca de 10% dos indivíduos desta amostra que realizaram todos os testes sorológicos não apresentavam qualquer marcador positivo, além do anti-HBc total reagente. Este grupo poderia ser considerado falso positivo como no estudo de Schifman, mas também poderia significar que o anti-HBc total reagente isolado representasse um marcador sorológico de contato prévio com o vírus, seguido de eliminação espontânea. Deve-se ressaltar que a pesquisa do HBV-DNA neste grupo também foi negativa.

Em publicação no ano de 1995, Mosley e colaboradores fazem uma discussão sobre a rejeição de doações anti-HBc total reagente em Bancos de Sangue nos EUA. O questionamento do estudo é sobre o custo do uso de testes suplementares ao HBsAg na identificação de infecção pelo HBV. A discussão foi baseada em estudo conduzido na década de 1970 pelo mesmo grupo, onde 64 doadores de sangue tinham sido associados a 15 casos de infecção pelo HBV em indivíduos receptores de sangue. Os soros de 61 doadores foram reavaliados e, posteriormente, revisados com a pesquisa de HBsAg, HBV-DNA, anti-HBc total e anti-HBs em diferentes momentos. O HBsAg foi posteriormente detectado em quatro soros que eram negativos no momento da doação e o HBV-DNA detectado em três destes. O anti-HBc total foi detectado em seis amostras HBsAg negativas. As demais amostras eram negativas para todos os marcadores de infecção pelo HBV.

Portanto, em cinco dos quinze casos de receptores infectados não havia explicação para infecção pelo HBV a partir de recebimento de sangue. Também não foi observada transmissão do HBV quando as amostras apresentavam anti-HBs maior que 10 UI/L. A conclusão do estudo é que o anti-HBc total pode prevenir em 33 a 50% dos casos de infecção pelo HBV em que o HBsAg seja negativo. Todavia, os indivíduos anti-HBc total reagente com um *cutoff* elevado (no método empregado) e títulos protetores de anti-HBs deveriam ser considerados não-infecciosos para o HBV e poderiam ser realocados para a doação, principalmente em áreas de alta endemicidade do HBV, em que é grande o número de indivíduos anti-HBc total reagente, mas com títulos de anti-HBs protetores. Com isso, se poderia diminuir a taxa de exclusão de doadores de sangue por anti-HBc total reagente isolado (57). Além disso, a pesquisa do HBV-DNA seria uma possibilidade de aumentar o entendimento do porquê de um indivíduo ser excluído da doação sangüínea por ser apenas um anti-HBc total reagente, o que foi evidenciado no presente estudo. Apesar de onerosa, a pesquisa do HBV-DNA através da PCR aumentaria a chance de definir melhor o significado virológico desses indivíduos e poder melhor orientá-los sobre como proceder a partir de um anti-HBc total reagente. O limite de detecção da técnica da PCR empregada neste trabalho foi estimado em 10^3 cópias/mL, limite semelhante ao apresentado pela maioria dos *kits* para detecção de HBV disponíveis no mercado. Cabe ressaltar que 85,7% das amostras já apresentavam imunidade ao HBV com títulos de anti-HBs superiores a 10 UI/L. Quando houve separação em três categorias de imunidade (não-protetor, fraco e forte-protetor), cerca de dois terços dos indivíduos – 173 (70,9%) – apresentavam títulos de anti-HBs considerados forte-protetor. Este achado, associado à PCR negativa, sugere que estes indivíduos podem ser apenas um anti-HBc total reagente isolado e que, por terem eliminado o

vírus espontaneamente, desenvolveram imunidade competente.

No ano de 2001, quando realizado o projeto e a elaboração do presente estudo, investigou-se num projeto piloto com 100 indivíduos, se havia alguma relação do valor de anti-HBc total reagente e títulos anti-HBs, mas não houve associação, pois o *cutoff* empregado atualmente nos testes de anti-HBc total é considerado reagente quando o valor está entre zero e um, ao contrário do estudo de Mosley e colaboradores. Este intervalo foi considerado muito pequeno para tentar fazer uma curva de associação entre o valor de anti-HBc total reagente e títulos de anti-HBs.

O papel da pesquisa de anti-HBc total em doadores de sangue nos bancos de sangue do Brasil foi abordado por Martelli e colaboradores numa publicação no ano de 1999. Os autores salientaram a necessidade do teste como triagem para evitar a aceitação de um sangue que poderia ser liberado por apenas um HBsAg negativo. Afirmaram que os estudos nos bancos de sangue brasileiros demonstraram que a principal causa de rejeição da doação é um anti-HBc total reagente isoladamente e, numa taxa variável de 0,8% nos doadores de sangue a 23,4% em indivíduos atendidos em clínicas médicas no estado de São Paulo, apresentavam positividade para o HBV-DNA. Portanto, em se tratando o Brasil de um país de endemicidade intermediária, a pesquisa do anti-HBc total deveria ser mantida em todas as doações e a realização em larga escala da PCR para o HBV em bancos de sangue deve ser considerada para diminuir o risco de transmissão do vírus (58). Entretanto, os autores não chegam a uma conclusão clara sobre como viabilizar tal medida e nem, tampouco, a uma posição sobre como acompanhar, ao longo do tempo, os indivíduos anti-HBc total reagente e rejeitados da doação sangüínea. No Banco de Sangue do HSL-PUCRS, a presença isolada do anti-HBc total reagente também é a principal causa de exclusão de doações sangüíneas, e esta observação foi um dos

motivos para o desenvolvimento e execução deste estudo. Nos últimos dez anos, entretanto, essa taxa vem diminuindo no Rio Grande do Sul e questiona-se: são os títulos de anti-HBc total que estão se modificando e passando para um *cutoff* não-reagente? Pode-se considerar essa possibilidade e pensar que um indivíduo com anti-HBc total reagente isolado há cinco anos poderia ser impedido de ter a sua doação aceita, mas, hoje, se o anti-HBc total se modificou e passou a ser não-reagente, o seu sangue seria prontamente aceito. As novas políticas de vacinação de recém-nascidos e de adolescentes pela rede pública, certamente, também contribuíram em muito para diminuir o risco de transmissão do HBV e, conseqüentemente, o número de indivíduos anti-HBc total reagente.

Um estudo japonês publicado na revista *Transfusion*, no ano 2001, verificou a presença do HBV em doadores HBsAg negativo e anti-HBc total reagente. O ponto de partida foi a observação de que os pacientes que receberam órgãos de indivíduos anti-HBc total reagente e HBsAg negativo apresentaram positividade para o HBsAg após a cirurgia, sugerindo que a replicação do HBV poderia continuar no órgão de indivíduos com história de infecção pelo HBV. Em um grupo de 50 doadores, foi detectada a presença do HBV-DNA em 19 (38%) amostras, e não houve diferença entre os indivíduos HBV-DNA positivo e negativo quanto aos títulos de anti-HBc total e anti-HBs. O nível de quantificação do HBV foi de 10^3 cópias por mL. O estudo mostrou que indivíduos HBsAg negativos podem apresentar baixos níveis de HBV livres da formação do complexo imune e, portanto, devem ser excluídos da doação. É levantada a hipótese de que alguns possam ter sofrido mutação no determinante "a" do HBsAg, motivo pelo qual o teste seria negativo no momento da doação. O fato de que tais doadores aparentemente não apresentavam doença hepática, sugere que não há patogenicidade desse HBV oculto. Portanto, a

conclusão do estudo é de que a necessidade de se realizar teste para detectar o HBV-DNA no indivíduo anti-HBc total reagente e HBsAg negativo e que se positivam a PCR, não deveriam doar órgãos para transplante e também deveria haver cautela na indicação do uso do sangue de tais doadores (61). É importante ressaltar que o estudo foi desenvolvido numa área de alta endemicidade para o HBV ao contrário deste. Também se considera que a pesquisa do HBV-DNA possa definir melhor o perfil do doador e evitar um risco mínimo de transmissão viral. O que ainda gera questionamento e insegurança é como proceder com este indivíduo após a identificação de anti-HBc total reagente isolado, mesmo com título de anti-HBs, o que lhe confere imunidade e HBV-DNA negativo. Se ele tem uma mutação no HBsAg que fez com que o teste fosse negativo, tem anti-HBc total reagente e HBV-DNA negativo, como acompanhá-lo a longo prazo? Que testes devem ser realizados e com que frequência? Qual o impacto econômico desta medida para o indivíduo e para a saúde pública? Hoje, esses indivíduos com anti-HBc total reagente e com títulos protetores de anti-HBs não são acompanhados e nem orientados a realizar futuros exames. Talvez os resultados do presente estudo possam ser mais um subsídio para que se mantenha esta conduta.

Hennig e colaboradores desenvolveram um estudo na Universidade de *Lübeck*, Alemanha, utilizando uma PCR de alta sensibilidade para detectar o HBV, e encontraram o HBV-DNA em três casos (1,52%) de um total de 189 doadores de sangue que eram HBsAg negativo, anti-HBc total reagente e com títulos de anti-HBs superiores a 100 UI/L. A quantificação do HBV nestes casos foi inferior a 10^3 UI/mL (62). Essa taxa de positividade para o HBV-DNA é muito semelhante à margem de segurança no cálculo da amostra (1,5%) do nosso estudo, onde nenhum dos 241 indivíduos pesquisados foi positivo. Essa observação mostra que os estudos de

populações geograficamente distintas podem encontrar diferentes resultados e que ainda há muita dúvida sobre o assunto. Portanto, ainda são necessários estudos adicionais referentes a este tema para uma possível recomendação para um procedimento padrão.

No ano de 2001, a revista *Hepatology*, em uma seção denominada *Clinical Challenge*, publicou uma revisão organizada por um grupo do *Pasteur Institute* (Paris), procurando definir se havia significado clínico na persistência do HBV ou se o vírus estava meramente “oculto” em indivíduos sem o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B. A revisão analisou trabalhos de diferentes áreas geográficas sobre a presença do HBV-DNA em pacientes HBsAg negativos com Hepatite crônica, carcinoma hepatocelular, associação com Hepatite C, Hepatite aguda e sem doença hepática. As conclusões foram que o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular com maior sensibilidade para detecção do HBV como a PCR, levou a reconhecer que a infecção pelo HBV pode persistir mesmo na presença de resposta imunológica ao vírus. A co-infecção com HCV tem impacto importante na evolução da Hepatite C, tanto na severidade da doença como na resposta ao tratamento. Também há evidências do efeito direto do HBV na carcinogênese hepática e que a persistência do HBV-DNA representa um fator de risco importante para subsequente expansão clonal nos hepatócitos e o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. As sugestões do grupo são que a pesquisa do HBV-DNA deva ser feita, preferencialmente, em paciente HBsAg negativo e anti-HBc total reagente e que tenham Hepatite crônica sem outra etiologia definida, uma vez que se deve considerar os custos e limitações técnicas para expandir este teste a todos aqueles com anti-HBc total reagente isolado. Também a pesquisa do HBV-DNA deve ser considerada no contexto de transplante de órgãos, no caso em que o

indivíduo que irá doar medula óssea ou rim seja anti-HBc total reagente isolado com enzimas hepáticas normais. O tratamento com interferon ou outro agente antiviral deve ser feito somente no indivíduo HBsAg negativo, HBV-DNA positivo, com Hepatite crônica em atividade inflamatória e fibrose e que não tenha nenhuma outra causa identificável para a lesão hepática. A monitoração da resposta ao tratamento deve ser feita seis meses após o tratamento com nova pesquisa de HBV-DNA. Como a co-infecção com HCV pode influenciar no curso desta, a pesquisa do HBV-DNA deve ser considerada no indivíduo que persiste com atividade inflamatória no fígado, apesar de ter HCV-RNA negativo no soro após o tratamento da Hepatite C e na ausência de outros fatores patogênicos. O grupo também ressalta o impacto da diminuição no risco de hepatite pós-transfusional no momento em que se realiza a pesquisa do HBV-DNA no indivíduo doador de sangue e com HBsAg negativo e anti-HBc total reagente. Entretanto, apesar da técnica da PCR, ainda existiria um risco residual de transmissão viral e este é maior com o HBV (cerca 1/100.000), comparado com HCV (cerca 1/700.000) e o HIV (cerca 1/2.000.000), pois os testes para a detecção do HBV não têm uma acurácia de 100%. Esta é uma observação importante dos autores, pois mesmo com as melhores técnicas moleculares sempre haverá uma dúvida se há vírus armazenado em alguma célula ou tecido humano e que possa, ao longo do tempo, se replicar e desenvolver doença hepática (56). O presente estudo foi realizado a partir de um delineamento transversal, mas nada impede que estes indivíduos, apesar de serem HBsAg negativos, anti-HBc total reagentes, HBeAg não-reagentes e HBV-DNA negativos possam participar de um novo estudo de acompanhamento para identificar se haverá modificação nesse perfil de marcadores sorológicos e molecular determinados neste momento. Também se poderia avaliar o risco de desenvolvimento de doença hepática relacionada a uma

possível infecção oculta pelo HBV. Assim, considera-se que este seguimento deva ser sempre cogitado, principalmente em regiões de risco intermediário e alto para o HBV.

A análise de indivíduos anti-HBc total reagente isoladamente e primariamente, identificados em doações de sangue demonstra que, na maioria das vezes (até 80%), há presença de anticorpos para o HBsAg (68). Estes indivíduos já apresentam imunidade adequada contra o HBV, mesmo não tendo sido vacinados. Um estudo de Ural e Findik, desenvolvido na Turquia, avaliou e comparou a resposta à vacinação de indivíduos isoladamente anti-HBc total reagente, provenientes de bancos de sangue (n=48), com um grupo de indivíduos sem nenhum marcador para Hepatite B (n=50). Todos os indivíduos eram negativos para o HBsAg e HBV-DNA e não-reagentes para o HBeAg e anti-HBe. Após três doses da vacinação, a taxa de resposta - títulos de anti-HBs > 10 UI/L - foi semelhante nos dois grupos (89,6% e 94%, respectivamente). Os autores concluíram que o desenvolvimento de níveis de proteção contra o HBV, identificado pela titulação do anti-HBs após três doses foi elevado e semelhante nos grupos. É salientado que indivíduos com anti-HBc total reagente isolado deveriam ser testados para anti-HBc IgM e realizada a pesquisa para o HBV-DNA, a fim de afastar a possibilidade de que possa ser um portador do HBsAg em níveis tão baixos que a pesquisa do antígeno fosse negativa ou que possa se encontrar numa fase de janela imunológica. Como todos os marcadores foram negativos para o HBV, inclusive títulos anti-HBs, neste grupo de anti-HBc total isolado, os autores reforçam a possibilidade de falso positivo para o anti-HBc total reagente ou infecção prévia pelo HBV que pode ser detectada pela excelente titulação do anti-HBs após a vacinação contra o HBV (66). Na presente pesquisa, nas amostras de anti-HBc total reagentes, nas quais foram aplicados os testes para

o HBeAg, nenhuma amostra foi reagente. Nas amostras investigadas para o anti-HBe, dois terços apresentaram reatividade positiva (66,5%), demonstrando que esses indivíduos tiveram contato, provavelmente com o HBV em algum momento; houve replicação viral, mas atualmente não apresentam teste sorológico que identifique esta replicação e sim a parada desta. Quanto aos casos de anti-HBe não-reagentes, existe a possibilidade de que os mesmos façam parte de um grupo em que houve queda da titulação de anti-HBe para um *cutoff* não-reagente como parte da história natural dos marcadores sorológicos do vírus. No grupo de 16 indivíduos em que o anti-HBc total reagente foi o único marcador presente com HBsAg negativo, HBeAg não-reagente, anti-HBe não-reagente e títulos de anti-HBs abaixo de 10 UI/L pode-se tecer duas considerações: a primeira, de que há a possibilidade de falso reagente para o anti-HBc total e a segunda, de que possa ter ocorrido uma queda dos títulos dos marcadores por conta da evolução natural de uma infecção passada pelo HBV, estando estes indivíduos apenas com uma cicatriz sorológica por terem tido contato com o HBV em algum momento de suas vidas. Para demonstrar esta evolução sorológica seria necessário um estudo prospectivo, o qual não foi objetivo do presente estudo.

Um grupo de pesquisadores da Grécia avaliou o valor do anti-HBc total na triagem de doadores de sangue. Tal estudo selecionou os indivíduos de bancos de sangue de uma determinada região grega (*Epirus*), considerada de endemicidade intermediária para o HBV, que apresentavam HBsAg negativo, anti-HBc total reagente, anti-HBe reagente ou não e títulos anti-HBs menores que 20 UI/mL. Do total de 6.696 doadores identificados num período de três anos, 282 doadores (4,2%) preenchiem estes critérios. Todos eram HBV-DNA negativos. Nenhum caso de infecção pelo HBV pós-transfusional foi relatado a partir do recebimento do

sangue destes indivíduos com acompanhamento clínico-laboratorial dos receptores em média de oito meses. O percentual de indivíduos HBsAg positivo na região do estudo foi estimado em 0,85%, muito inferior em aos dados prévios, cuja taxa nos dez anos anteriores era de 2,1%. Os autores concluem que não deveria ser incluído o anti-HBc total como teste de triagem em doadores de uma região em que a prevalência do HBsAg tenha baixado ao longo dos anos sob o risco de ter altos índices de rejeição de doações sangüíneas de indivíduos saudáveis, mesmo que apresentem taxas elevadas de anti-HBc total reagentes isolados. Antes de considerar a triagem de doadores, todos os esforços deveriam ser focados para eliminar o número de anti-HBc total falsos positivos (59). A análise dos resultados do presente estudo sobre casos de anti-HBe reagente e títulos considerados forte-protetores de anti-HBs (≥ 100 UI/L), mostrou uma associação positiva, estatisticamente significativa ($P=0,026$), para este achado. Quando feita a comparação dos indivíduos que eram anti-HBe reagente com aqueles que já estavam protegidos do HBV através de um anti-HBs maior que 10 UI/L, observou-se que esta associação estava mantida, pois a razão de chance de um indivíduo anti-HBe reagente já estar imunizado é de aproximadamente duas vezes (OR 2,220; IC 95%; 1,019-4,837 e $P=0.042$). Isso suscita o pensamento de que se a pessoa for HBsAg negativo, anti-HBc total reagente, HBeAg não-reagente, anti-HBe reagente e HBV-DNA negativo haverá uma chance maior de que já esteja imunizada contra o HBV. Uma vez imunizado, dificilmente esse indivíduo desenvolverá doença hepática pelo HBV.

O estudo de Roque-Afonso e colaboradores que acompanharam receptores de fígado de doadores anti-HBc total reagente demonstrou que um indivíduo imunizado dificilmente desenvolverá doença hepática. Os receptores que apresentaram títulos

circulantes de anti-HBs não apresentaram HBV-DNA detectável no soro e este fato seria um controlador da replicação viral no pós-transplante, quando são utilizadas drogas imunossupressoras que podem reativar um HBV oculto (69). Sendo assim, este indivíduo deve ser descartado de futuras doações? Até o presente momento, esta é a conduta assumida pela classe médica para evitar uma possível transmissão de HBV oculto. O estudo de Wang e colaboradores em uma área de alta endemicidade para o HBV projetou, a partir de um caso de Hepatite B pós-transfusional com HBsAg negativo, que aproximadamente 200 infecções pelo HBV poderiam ocorrer em um milhão de unidades de sangue transfundido em *Taiwan* e, portanto, seria necessário considerar a implantação de testes mais apurados no diagnóstico da infecção pelo HBV como a PCR (70). Esta também foi a observação de Roth e colaboradores: a utilização da PCR foi suficientemente mais sensível para identificar em doador de sangue HBsAg negativo e anti-HBc total reagente e que demonstrava ser portador do HBV. (71) Assim, ambos os trabalhos concluem que é necessário se acrescentar à rotina dos bancos de sangue a pesquisa do HBV-DNA pela técnica da PCR. Mesmo não evidenciando positividade para o HBV-DNA nas amostras de indivíduos anti-HBc total reagente e HBsAg negativo e impedidos da doação sangüínea numa área de baixa endemicidade para o HBV como no Rio Grande do Sul, consideramos importante a realização de testes complementares àqueles de rotina para tentar identificar um possível HBV oculto.

O risco de que um indivíduo anti-HBc total reagente isolado possa desenvolver doença hepática está documentado em artigo de Yano e colaboradores que estudaram 284 pacientes japoneses com carcinoma hepatocelular e identificaram que 5,6% dos casos eram somente anti-HBc total reagente, 6,7% HBsAg positivo e 83,1% HCV positivo. A comparação entre o grupo de anti-HBc total reagente isolado

com o grupo positivo somente para o HBsAg demonstrou que naquele grupo a neoplasia se apresentou numa idade mais avançada e que os níveis de alfa-proteína eram mais baixos. O estudo concluiu que nesta população de pacientes, provenientes de uma região de alta endemicidade para o HBV como o Japão, a história natural da Hepatite aguda pelo HBV deve ser acompanhada mesmo naqueles indivíduos que eliminaram o vírus espontaneamente em seis meses, pararam com a replicação, desenvolveram anticorpos de imunidade e permaneceram apenas com o anti-HBc total reagente (72). Hsu e colaboradores identificaram que num grupo de pacientes de *Taiwan*, o qual fez espontaneamente a soroconversão do HBeAg em anti-HBe reagente no curso clínico da Hepatite B, 24% dos indivíduos apresentavam o HBV-DNA detectável e em 7,8% houve o desenvolvimento de cirrose num período médio de oito anos (73). Entretanto, estes dois estudos devem ser analisados com a lembrança de que se tratam de populações de alta endemicidade para o HBV, e que a soroconversão do HBeAg em anti-HBe reagente não significa a eliminação do vírus, mas sim a demonstração de que houve uma mudança sorológica no marcador que representa a replicação viral. Também se deve atentar para o fato de que o indivíduo HBeAg não-reagente possa ter doença hepática ativa por ser um mutante do HBV. A realidade da região sul do Brasil é diferente quanto à prevalência do HBV. Estudos semelhantes deveriam ser conduzidos para verificar se, mesmo numa população de baixa endemicidade para o HBV, pode ocorrer algum risco de doença hepática em indivíduos apenas com anti-HBc total reagente como a Hepatite crônica ou o carcinoma hepatocelular.

Arraes e colaboradores desenvolveram um estudo pesquisando o HBV-DNA em 120 doadores de sangue com HBsAg negativo e anti-HBc total reagente e identificaram três indivíduos que apresentavam HBV-DNA positiva, em uma região

do Brasil (nordeste) considerada de alta prevalência para o HBV e que tem, também, altas taxas de rejeição de doações sanguíneas por anti-HBc total reagente. (74)

O estudo de Drosten e colaboradores demonstrou que a prevalência do HBV-DNA em 160 indivíduos anti-HBc total reagentes e HBsAg negativos foi de 18%. Entretanto, muitos eram co-infectados com o vírus da Hepatite C (HCV) e o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) e, utilizando a regressão logística para correlacionar a co-infecção, os autores observaram que a chance de detectar o HBV-DNA foi maior no grupo de pacientes portadores do HCV do que naqueles com HIV (75). No nosso estudo, a presença de marcador positivo para o HCV e HIV foi um dos critérios de exclusão na pesquisa.

A história natural de indivíduos considerados apenas HBsAg positivos e identificados em bancos de sangue do norte da Itália foi recentemente publicada. Este estudo conduzido por Manno e colaboradores mostrou que, ao longo de trinta anos, não houve desenvolvimento significativo de doença hepática, carcinoma hepatocelular ou outra morbimortalidade relacionada à doença hepática se comparado com um grupo controle. Nos casos em que houve doença hepática relacionada ao HBV, a presença de outras doenças, o aumento da gama glutamil transpeptidase e a idade avançada no diagnóstico da infecção pelo HBV foram os fatores preditores independentes de mortalidade nesse grupo de portadores do HBsAg. Este estudo reforçou a impressão de que em uma zona de baixa endemicidade para o HBV, apenas um anti-HBc total reagente pode não ter um significado clínico maior, reforçando a necessidade de que a pesquisa do HBV-DNA tenha sido negativa (76). O nosso estudo não foi delineado para fazer um seguimento destes indivíduos, mas aplicando o estudo de Manno na região sul, onde a endemicidade para o HBV é baixa, pode-se supor que dificilmente um

indivíduo anti-HBc total reagente isolado de banco de sangue vá desenvolver doença hepática relacionada com o HBV ao longo dos anos, principalmente se apresentar titulação de anti-HBs que lhe confere imunidade e a pesquisa do HBV-DNA for negativa.

Por outro lado, o estudo de Kuhns e colaboradores focalizou a correlação entre a presença do HBsAg e do HBV-DNA numa amostra de 200 indivíduos com HBsAg positivo e anti-HBc total reagente identificados em doação de sangue. O resultado mostrou que em seis indivíduos (3%) a pesquisa do HBV-DNA foi negativa. Portanto, o achado de HBV-DNA negativo em indivíduos HBsAg positivos demonstra que os marcadores virológicos não estão totalmente compreendidos e sujeitos a falhas, mesmo mínimas (77). O presente estudo foi composto apenas de indivíduos HBsAg negativos e a pesquisa do HBV-DNA foi negativa em todos eles. O limite de detecção do HBsAg na técnica empregada foi de 0,09 ng/mL, considerado baixo e aceito pela OMS.

O nosso trabalho com indivíduos rejeitados após tentativa de doação sangüínea, de uma região de baixa endemicidade para a infecção pelo vírus da Hepatite B, por apresentarem nos testes rotineiros um anti-HBc total não-reagente isolado, suscita algumas considerações quando estudado os demais marcadores sorológicos e molecular. Em primeiro lugar, a maioria já estava imunizada, provavelmente como curso natural de um contato prévio com o HBV. O anti-HBc total reagente que motivou a rejeição, talvez represente tão somente um marcador sorológico de uma infecção passada. Isto deve ser considerado na análise do resultado e interpretação destes marcadores em indivíduos provenientes de zonas de baixa endemicidade para o HBV, assintomáticos e que, na maioria das vezes, já apresenta imunidade ao vírus. Em segundo lugar, todos os indivíduos foram voluntários na doação e, ao

responder o questionário que é aplicado pelo Banco de Sangue do HSL-PUCRS, desconheciam este contato bem como um quadro clássico de Hepatite viral aguda no passado. Todos os voluntários, provavelmente, se encontravam em perfeitas condições clínicas para uma doação, sem apresentar sintomas de uma infecção aguda no momento que pudesse justificar queda do nível de HBsAg e que os tornassem negativos, mas com anti-HBc total reagente. Realmente, este estudo não contemplou a realização do anti-HBc IgM para afastar uma situação de Hepatite viral aguda, porém o teste que demonstraria uma eventual replicação viral (HBeAg) foi não-reagente em todas as amostras testadas. Em terceiro lugar, diferentemente de alguns estudos recentes na literatura, todas as amostras investigadas neste estudo para a detecção do HBV-DNA foram negativas. O tamanho da amostra foi calculado para que houvesse, no máximo, uma chance de 1,5% de positividade máxima para o HBV-DNA, o que é um valor extremamente baixo e que a maioria dos estudos não considera para determinar o número de indivíduos avaliados. Quarto, o nível do teste de detecção para o DNA do HBV foi semelhante ao empregado pela maioria dos estudos descritos e é provável que todas estas amostras sejam negativas por se tratar de uma população de baixa endemicidade para o HBV, o que diminui o risco de novos contatos. Além disso, grande parte dos indivíduos já estava imunizada, dificultando a replicação de qualquer partícula viral e protegendo este indivíduo contra doença hepática pelo HBV. Fato semelhante foi observado em indivíduos que receberam fígados de um outro indivíduo anti-HBc total reagente, mas que no pós-transplante, em momento algum, desenvolveram a doença pelo HBV, apesar do uso de drogas imunossupressoras (69). Finalmente, a chance estatisticamente significativa encontrada de que um indivíduo anti-HBc total reagente e anti-HBe reagente já estar imunizado reforça a impressão de que o HBV-DNA realmente seja

negativo como evolução natural de um adulto que se infectou pelo HBV no passado, mas eliminou o vírus espontaneamente e desenvolveu anticorpos protetores.

Claro que estas observações devem fazer parte de um contexto de estudo acadêmico, pois a liberação para doação de sangue de um indivíduo que seja apenas anti-HBc total reagente poderia implicar em futuras complicações clínicas, apesar das evidências até o momento não apontarem para tal risco. Entretanto, a escassez de sangue por ainda haver um número reduzido de doações voluntárias e pelas altas taxas de rejeição por marcadores sorológicos de doenças transmissíveis pelo sangue como a Hepatite B, deve ser lembrada. Talvez a utilização desse sangue possa ser cogitada em situações extremas, com risco de morte eminente, em que a reposição de sangue é vital.

Portanto, mais estudos apurados em técnicas de identificação do HBV são necessários para que se possa tentar evitar o grande número de rejeições de doações a partir de um anti-HBc total reagente, em indivíduos HBsAg negativos, HBeAg não-reagentes, anti-HBe reagentes, títulos de anti-HBs superiores a 10 UI/L e HBV-DNA negativos. Também, deve haver protocolos de acompanhamento destes indivíduos numa região de baixa endemicidade para tentar avaliar uma possível ativação de um HBV oculto, se é que realmente existe tal situação, para definir o modo de seguimento, os testes necessários, a periodicidade e o impacto socioeconômico desta medida. Assim, se poderá tentar diminuir o efeito negativo que estes indivíduos sofrem ao serem rejeitados na tentativa de doação de sangue por apresentarem uma cicatriz sorológica referente a um contato com o HBV no passado.

CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho permitem concluir que o perfil sorológico e molecular de 244 indivíduos anti-HBc reagente e HBsAg negativo, provenientes de um Banco de Sangue de uma área de baixa endemicidade para o HBV, apresenta a configuração abaixo.

- A maioria dos indivíduos da amostra (85,7%) apresentava títulos de anti-HBs que lhes conferiam imunidade contra o vírus da Hepatite B.
- Quando classificados em três categorias de títulos de anti-HBs (não-protetor, fraco-protetor e forte-protetor), houve predomínio daqueles com títulos superiores a 100 UI/L (70,9%), classificando-os na categoria de forte-protetor.
- Todas as amostras testadas para o HBeAg foram não-reagentes e assim, não foi possível traçar uma relação com os títulos de anti-HBs.
- Dois terços das amostras testadas para anti-HBe foram reagentes e a relação dos resultados de anti-HBe reagente com a titulação de anti-HBs mostrou uma associação positiva, em que indivíduos anti-HBc total reagente e anti-HBe reagente têm uma razão de chance de duas vezes de já estarem imunizados ($P < 0,05$).
- A pesquisa do vírus da Hepatite B circulante, através da reação em cadeia de

polimerase, foi negativa em todas as amostras testadas com um poder de segurança de 98,5%. Por essa razão, não foi possível verificar a associação entre títulos de anti-HBs, HBeAg e anti-HBe e a presença de HBV circulante.

- Os indivíduos deste estudo, provenientes de uma zona considerada de baixa endemicidade para o HBV e excluídos de doação sanguínea por apresentarem anti-HBc total reagente isolado, apresentaram, na maioria das vezes, títulos de anti-HBs que lhe conferem imunidade contra o HBV, além de não apresentarem HBV-DNA circulante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "New" Antigen In Leukemia Sera. *Jama*. 1965 Feb 15;191:541-6.
2. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. 1997 Dec 11;337(24):1733-45.
3. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2001 Dec;34(6):1225-41.
4. Lin KW, Kirchner JT. Hepatitis B. *Am Fam Physician*. 2004 Jan 1;69(1):75-82.
5. Sacher RA, Schreiber GB, Kleinman SH. Prevention of transfusion-transmitted hepatitis. *Lancet*. 2000 Jan 29;355(9201):331-2.
6. Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976 Nov 18;295(21):1168-75.
7. Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology*. 1989 Feb;9(2):322-7.
8. Petit MA, Zoulim F, Capel F, Dubanchet S, Dauguet C, Trepo C. Variable expression of preS1 antigen in serum during chronic hepatitis B virus infection: an accurate marker for the level of hepatitis B virus replication. *Hepatology*. 1990 May;11(5):809-14.
9. Alberti A, Cavalletto D, Chemello L, Belussi F, Fattovich G, Pontisso P, et al. Fine specificity of human antibody response to the PreS1 domain of hepatitis B virus. *Hepatology*. 1990 Aug;12(2):199-203.
10. Kurai K, Iino S, Koike K, Mitamura K, Endo Y, Oka H. Serum titers of pre-S(2) antigen in patients with acute and chronic type B hepatitis: relation to serum aminotransferase activity and other hepatitis B virus markers. *Hepatology*. 1989 Feb;9(2):175-9.
11. Haruna Y, Hayashi N, Katayama K, Yuki N, Kasahara A, Sasaki Y, et al. Expression of X protein and hepatitis B virus replication in chronic hepatitis. *Hepatology*. 1991 Mar;13(3):417-21.
12. Lakhtakia R, Kumar V, Reddi H, Mathur M, Dattagupta S, Panda SK. Hepatocellular carcinoma in a hepatitis B 'x' transgenic mouse model: A sequential pathological evaluation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003 Jan;18(1):80-91.

13. McMillan JS, Bowden DS, Angus PW, McCaughan GW, Locarnini SA. Mutations in the hepatitis B virus precore/core gene and core promoter in patients with severe recurrent disease following liver transplantation. *Hepatology*. 1996 Dec;24(6):1371-8.
14. Thomas HC, Carman WF. Envelope and precore/core variants of hepatitis B virus. *Gastroenterol Clin North Am*. 1994 Sep;23(3):499-514.
15. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology*. 1998 Jun;27(6):1670-7.
16. Atkins M, Gray DF. Lamivudine resistance in chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 1998 Jan;28(1):169.
17. Chen WN, Oon CJ. Hepatitis B virus mutants: an overview. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Dec;17 Suppl:S497-9.
18. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*. 1989 Sep 9;2(8663):588-91.
19. Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, et al. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):889-96.
20. Lau JY, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet*. 1993 Nov 27;342(8883):1335-40.
21. Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B. (Second of two parts). *N Engl J Med*. 1976 Nov 25;295(22):1232-6.
22. Hoofnagle JH, Shafritz DA, Popper H. Chronic type B hepatitis and the "healthy" HBsAg carrier state. *Hepatology*. 1987 Jul-Aug;7(4):758-63.
23. Alter MJ, Hadler SC, Margolis HS, Alexander WJ, Hu PY, Judson FN, et al. The changing epidemiology of hepatitis B in the United States. Need for alternative vaccination strategies. *Jama*. 1990 Mar 2;263(9):1218-22.
24. Sherlock S DJ. *Virus Hepatitis. Diseases of the Liver and Biliary System*. 11th ed. London: Blackwell Science; 1997. p. 265-302.
25. Silveira TR, da Fonseca JC, Rivera L, Fay OH, Tapia R, Santos JI, et al. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 1999 Dec;6(6):378-83.
26. Moradpour D, Wands JR. Understanding hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. 1995 Apr 20;332(16):1092-3.
27. Mayans MV, Hall AJ, Inskip HM, Lindsay SW, Chotard J, Mendy M, et al. Do bedbugs transmit hepatitis B? *Lancet*. 1994 Mar 26;343(8900):761-3.

28. Bortolotti F, Cadrobbi P, Crivellaro C, Guido M, Rugge M, Noventa F, et al. Long-term outcome of chronic type B hepatitis in patients who acquire hepatitis B virus infection in childhood. *Gastroenterology*. 1990 Sep;99(3):805-10.
29. Berenguer M W, TL. Viral Hepatitis. In: Feldman M FL, Sleisenger MH, editor. *Gastrointestinal and Liver Disease*. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2002. p. 1278-341.
30. Zoulim F. *Virology of Hepatitis B*. Lyon: Elsevier 2004.
31. Baker BL, Di Bisceglie AM, Kaneko S, Miller R, Feinstone SM, Waggoner JG, et al. Determination of hepatitis B virus DNA in serum using the polymerase chain reaction: clinical significance and correlation with serological and biochemical markers. *Hepatology*. 1991 Apr;13(4):632-6.
32. Wong JB, Koff RS, Tine F, Pauker SG. Cost-effectiveness of interferon-alpha 2b treatment for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Ann Intern Med*. 1995 May 1;122(9):664-75.
33. de Franchis R, Meucci G, Vecchi M, Tatarella M, Colombo M, Del Ninno E, et al. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med*. 1993 Feb 1;118(3):191-4.
34. Dragosics B, Ferenci P, Hitchman E, Denk H. Long-term follow-up study of asymptomatic HBsAg-positive voluntary blood donors in Austria: a clinical and histologic evaluation of 242 cases. *Hepatology*. 1987 Mar-Apr;7(2):302-6.
35. Lok AS. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S303-9.
36. Stevens CE, Taylor PE, Tong MJ, Toy PT, Vyas GN, Nair PV, et al. Yeast-recombinant hepatitis B vaccine. Efficacy with hepatitis B immune globulin in prevention of perinatal hepatitis B virus transmission. *Jama*. 1987 May 15;257(19):2612-6.
37. Seeff LB, Koff RS. Passive and active immunoprophylaxis of hepatitis B. *Gastroenterology*. 1984 May;86(5 Pt 1):958-81.
38. Craven DE, Awdeh ZL, Kunches LM, Yunis EJ, Dienstag JL, Werner BG, et al. Nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in health care workers. Results of revaccination and genetic typings. *Ann Intern Med*. 1986 Sep;105(3):356-60.
39. Lok AS. New treatment of chronic hepatitis B. *Semin Liver Dis*. 2004;24 Suppl 1:77-82.
40. Lok AS, McMahon BJ. [AASLD Practice Guidelines. Chronic hepatitis B: update of therapeutic guidelines]. *Rom J Gastroenterol*. 2004 Jun;13(2):150-4.
41. Pramoolsinsup C. Management of viral hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Feb;17 Suppl:S125-45.
42. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology*. 2004 Mar;39(3):857-61.

43. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000--summary of a workshop. *Gastroenterology*. 2001 Jun;120(7):1828-53.
44. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004 Feb;2(2):87-106.
45. Gerlich WH. Diagnostic problems caused by HBsAg mutants-a consensus report of an expert meeting. *Intervirolgy*. 2004 Nov-Dec;47(6):310-3.
46. Sleisenger MH. *Viral Hepatitis. Gastrointestinal and Liver Disease*. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2002. p.1278-1341
47. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis*. 1991 May;11(2):73-83.
48. Kumar S, Pound DC. Serologic diagnosis of viral hepatitis. *Postgrad Med*. 1992 Sep 15;92(4):55-62, 5, 8.
49. Hadziyannis SJ, Hadziyannis AS, Dourakis S, Alexopoulou A, Horsch A, Hess G. Clinical significance of quantitative anti-HBc IgM assay in acute and chronic HBV infection. *Hepatogastroenterology*. 1993 Dec;40(6):588-92.
50. Kaneko S, Miller RH, Di Bisceglie AM, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Purcell RH. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. Application for clinical diagnosis. *Gastroenterology*. 1990 Sep;99(3):799-804.
51. Malter JS, Gerber MA. The polymerase chain reaction for hepatitis B virus DNA. *Hepatology*. 1991 Jan;13(1):188-90.
52. Schiffman RB, Rivers SL, Sampliner RE, Krammes JE. Significance of isolated hepatitis B core antibody in blood donors. *Arch Intern Med*. 1993 Oct 11;153(19):2261-6.
53. Douglas DD, Taswell HF, Rakela J, Rabe D. Absence of hepatitis B virus DNA detected by polymerase chain reaction in blood donors who are hepatitis B surface antigen negative and antibody to hepatitis B core antigen positive from a United States population with a low prevalence of hepatitis B serologic markers. *Transfusion*. 1993 Mar;33(3):212-6.
54. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med*. 1996 Jun 27;334(26):1685-90.
55. Draelos M, Morgan T, Schiffman RB, Sampliner RE. Significance of isolated antibody to hepatitis B core antigen determined by immune response to hepatitis B vaccination. *Jama*. 1987 Sep 4;258(9):1193-5.
56. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology*. 2001 Jul;34(1):194-203.

57. Mosley JW, Stevens CE, Aach RD, Hollinger FB, Mimms LT, Solomon LR, et al. Donor screening for antibody to hepatitis B core antigen and hepatitis B virus infection in transfusion recipients. *Transfusion*. 1995 Jan;35(1):5-12.
58. Martelli CM, Turchi M, Souto FJ, Saez-Alquezar A, Andrade AL, Zicker F. Anti-HBc testing for blood donations in areas with intermediate hepatitis B endemicity. *Rev Panam Salud Publica*. 1999 Jul;6(1):69-73.
59. Zervou EK, Dalekos GN, Boumba DS, Tsianos EV. Value of anti-HBc screening of blood donors for prevention of HBV infection: results of a 3-year prospective study in Northwestern Greece. *Transfusion*. 2001 May;41(5):652-8.
60. Kleinman SH, Busch MP. HBV: amplified and back in the blood safety spotlight. *Transfusion*. 2001 Sep;41(9):1081-5.
61. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, et al. Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion*. 2001 Sep;41(9):1093-9.
62. Hennig H, Puchta I, Luhm J, Schlenke P, Goerg S, Kirchner H. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2637-41.
63. Dreier J, Kroger M, Diekmann J, Gotting C, Kleesiek K. Low-level viraemia of hepatitis B virus in an anti-HBc- and anti-HBs-positive blood donor. *Transfus Med*. 2004 Apr;14(2):97-103.
64. Sambrook J RD. Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA. *Molecular Cloning - a laboratory manual*. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
65. Reiche EM, Vogler IH, Morimoto HK, Bortoliero AL, Matsuo T, Yuaehasi KK, et al. Evaluation of surrogate markers for human immunodeficiency virus infection among blood donors at the blood bank of "Hospital Universitario Regional Norte do Parana", Londrina, PR, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003 Jan-Feb;45(1):23-7.
66. Ural O, Findik D. The response of isolated anti-HBc positive subjects to recombinant hepatitis B vaccine. *J Infect*. 2001 Oct;43(3):187-90.
67. Weber B, Muhlbacher A, Melchior W. Detection of an acute asymptomatic HBsAg negative hepatitis B virus infection in a blood donor by HBV DNA testing. *J Clin Virol*. 2005 Jan;32(1):67-70.
68. Lok AS, Lai CL, Wu PC. Prevalence of isolated antibody to hepatitis B core antigen in an area endemic for hepatitis B virus infection: implications in hepatitis B vaccination programs. *Hepatology*. 1988 Jul-Aug;8(4):766-70.
69. Roque-Afonso AM, Feray C, Samuel D, Simoneau D, Roche B, Emile JF, et al. Antibodies to hepatitis B surface antigen prevent viral reactivation in recipients of liver grafts from anti-HBC positive donors. *Gut*. 2002 Jan;50(1):95-9.

70. Wang JT, Lee CZ, Chen PJ, Wang TH, Chen DS. Transfusion-transmitted HBV infection in an endemic area: the necessity of more sensitive screening for HBV carriers. *Transfusion*. 2002 Dec;42(12):1592-7.
71. Roth WK, Weber M, Petersen D, Drosten C, Buhr S, Sireis W, et al. NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion*. 2002 Jul;42(7):869-75.
72. Yano Y, Yamashita F, Sumie S, Ando E, Fukumori K, Kiyama M, et al. Clinical features of hepatocellular carcinoma seronegative for both HBsAg and anti-HCV antibody but positive for anti-HBc antibody in Japan. *Am J Gastroenterol*. 2002 Jan;97(1):156-61.
73. Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, et al. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2002 Jun;35(6):1522-7.
74. Arraes LC, Ximenes R, Andrieu JM, Lu W, Barreto S, Pereira LM, et al. The biological meaning of anti-HBC positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003 May-Jun;45(3):137-40.
75. Drosten C, Nippraschk T, Manegold C, Meisel H, Brixner V, Roth WK, et al. Prevalence of hepatitis B virus DNA in anti-HBc-positive/HBsAg-negative sera correlates with HCV but not HIV serostatus. *J Clin Virol*. 2004 Jan;29(1):59-68.
76. Manno M, Camma C, Schepis F, Bassi F, Gelmini R, Giannini F, et al. Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: morbidity and mortality after 30 years; 2004.
77. Kuhns MC, Kleinman SH, McNamara AL, Rawal B, Glynn S, Busch MP. Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. *Transfusion*. 2004 Sep;44(9):1332-9.

ANEXOS

- Anexo A - tabela da Secretaria da Saúde do RS
- Anexo B - tabela da Secretaria da Saúde do RS
- Anexo C - banco de dados de todos participantes do estudo
- Anexo D - aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
- Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO A - Tabela da Secretaria da Saúde do RS



ANEXO A - Tabela da Secretaria da Saúde do RS

ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA SAÚDE - **DIVISÃO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**
SETOR DE CONTROLE DA QUALIDADE DO SANGUE

Número de soro reagentes para Lues, HIV, HTLV, Hepatite B, Hepatite C e ALT/TGP comparado ao total de doações/ano, informados por Núcleos de Hemoterapia, Hemocentros e Unidades de Coleta e Transfusão no Rio Grande do Sul, no período de 1994 a 2004.

ANO	No. de Doações/Ano	Lues	%	HIV	%	HTLV	%	Hepatite B *	%	Hepatite C	%	ALT/TGP	%
1994	163.888	738	0,45	201	0,12	300	0,18	7063	4,31	1496	0,91	720	0,44
1995	166.838	766	0,46	193	0,12	414	0,25	11397	6,83	1735	1,04	1169	0,7
1996	190.430	907	0,48	207	0,11	360	0,19	12770	6,71	1641	0,86	1198	0,63
1997	221.375	965	0,45	254	0,11	329	0,14	13773	6,22	1566	0,7	852	0,38
1998	235.145	622	0,26	170	0,07	244	0,1	11712	4,98	1414	0,6	773	0,32
1999	271.301	620	0,22	233	0,08	211	0,07	11497	4,23	1309	0,48	690	0,25
2001	277.258	654	0,23	278	0,1	174	0,06	9163	3,3	1002	0,36	744	0,26
2002	275.033	623	0,22	275	0,09	142	0,05	10155	3,69	905	0,32	1045	0,37
2003	265.626	631	0,23	170	0,06	94	0,03	8.046	3,03	728	0,27	**	
2004	280.181	605	0,21	169	0,06	138	0,04	7.477	2,66	576	0,20	**	

Setor de Controle da Qualidade do Sangue / Divisão de Vigilância Sanitária / SES / RS.

*Total de HBsAg + total de anti-HBc

** Exames abolidos pela RDC 343/03 / ANVISA / MS

ANEXO B - Tabela da Secretaria da Saúde do RS



ANEXO B - Tabela da Secretaria da Saúde do RS

ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA SAÚDE - **DIVISÃO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**
SETOR DE CONTROLE DA QUALIDADE DO SANGUE

Número de soro reagentes para HBsAg, anti-HBc, anti-HCV e ALT/TGP, comparado ao total de doações/ano, informados por Núcleos de Hemoterapia, Hemocentros e Unidades de Coleta e Transfusão no Rio Grande do Sul, no período de 1994 a 2004.

ANO	No. de Doações/Ano	HBsAg	%	Anti-HBc	%	Anti-HCV	%	ALT/TGP	%
1994	163.888	686	0,42	6377	3,98	1496	0,91	720	0,44
1995	166.838	540	0,32	10857	6,51	1735	1,04	1169	0,7
1996	190.430	722	0,38	12048	6,33	1641	0,86	1198	0,63
1997	221.375	884	0,4	12789	5,77	1566	0,7	852	0,38
1998	235.145	878	0,37	10597	4,54	1414	0,6	773	0,33
1999	271.301	795	0,29	10702	3,94	1309	0,48	690	0,25
2000	294.379	757	0,25	11060	3,75	1119	0,38	857	0,29
2001	277.258	783	0,26	9163	3,3	1002	0,26	744	0,26
2002	275.033	708	0,25	9447	3,43	905	0,32	1045	0,37
2003	265.626	517	0,19	7529	2,83	728	0,27	*	
2004	280.181	476	0,16	7001	2,49	576	0,20	*	

Setor de Controle da Qualidade do Sangue / Divisão de Vigilância Sanitária / SES / RS.

* Exames abolidos pela RDC 343/03 / ANVISA / MS

ANEXO C - Banco de dados de todos participantes do estudo

Paciente	Anti-HBc	HBsAg	Anti-HBs	HbeAg	Anti-HBe	HBV-DNA
1	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
2	reag	neg	996			neg
3	reag	neg	1.001			neg
4	reag	neg	377			neg
5	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
6	reag	neg	602	nãoreag	reag	neg
7	reag	neg	78	nãoreag	nãoreag	neg
8	reag	neg	392			neg
9	reag	neg	1.001			neg
10	reag	neg	94	nãoreag	reag	neg
11	reag	neg	1.001			neg
12	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
13	reag	neg	1.001			neg
14	reag	neg	5			neg
15	reag	neg	717			neg
16	reag	neg	1.001			neg
17	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
18	reag	neg	10			neg
19	reag	neg	274			neg
20	reag	neg	38	nãoreag	reag	neg
21	reag	neg	1.001			neg
22	reag	neg	349			neg
23	reag	neg	235	nãoreag	reag	neg
24	reag	neg	419			neg
25	reag	neg	821	nãoreag	reag	neg
26	reag	neg	630			neg
27	reag	neg	975	nãoreag	reag	neg
28	reag	neg	237			neg
29	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
30	reag	neg	1.001			neg
31	reag	neg	1.001			neg
32	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
33	reag	neg	302			neg
34	reag	neg	96			neg
35	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
36	reag	neg	646	nãoreag	reag	neg
37	reag	neg	82	nãoreag	nãoreag	neg
38	reag	neg	43	nãoreag	reag	neg
39	reag	neg	19	nãoreag	reag	neg
40	reag	neg	1.001			neg
41	reag	neg	1.001			neg
42	reag	neg	84	nãoreag	reag	neg
43	reag	neg	106	nãoreag	reag	neg
44	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
45	reag	neg	58	nãoreag	reag	neg
46	reag	neg	58	nãoreag	nãoreag	neg
47	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
48	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
49	reag	neg	1.001			neg
50	reag	neg	118			neg
51	reag	neg	409	nãoreag	nãoreag	neg

Paciente	Anti-HBc	HBsAg	Anti-HBs	HbeAg	Anti-HBe	HBV-DNA
52	reag	neg	1.001			neg
53	reag	neg	567	nãoreag	reag	neg
54	reag	neg	41	nãoreag	reag	neg
55	reag	neg	606			neg
56	reag	neg	1.001			neg
57	reag	neg	6			neg
58	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
59	reag	neg	919	nãoreag	nãoreag	neg
60	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
61	reag	neg	464			neg
62	reag	neg	1.001			neg
63	reag	neg	824	nãoreag	nãoreag	neg
64	reag	neg	34			neg
65	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
66	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
67	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
68	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
69	reag	neg	26	nãoreag	reag	neg
70	reag	neg	18	nãoreag	nãoreag	neg
71	reag	neg	1.001			neg
72	reag	neg	120	nãoreag	nãoreag	neg
73	reag	neg	190	nãoreag	reag	neg
74	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
75	reag	neg	99	nãoreag	reag	neg
76	reag	neg	37	nãoreag	reag	neg
77	reag	neg	509	nãoreag	reag	neg
78	reag	neg	415	nãoreag	reag	neg
79	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
80	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
81	reag	neg	1.001			neg
82	reag	neg	1.001			neg
83	reag	neg	713	nãoreag	reag	neg
84	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
85	reag	neg	443	nãoreag	reag	neg
86	reag	neg	182	nãoreag	reag	neg
87	reag	neg	6	nãoreag	reag	neg
88	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
89	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
90	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
91	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
92	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
93	reag	neg	1.001			neg
94	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
95	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
96	reag	neg	137			neg
97	reag	neg	1.001			neg
98	reag	neg	1.001			neg
99	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
100	reag	neg	129	nãoreag	reag	neg
101	reag	neg	344	nãoreag	reag	neg
102	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
103	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
104	reag	neg	223			neg

Paciente	Anti-HBc	HBsAg	Anti-HBs	HbeAg	Anti-HBe	HBV-DNA
105	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
106	reag	neg	227			neg
107	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
108	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
109	reag	neg	5	nãoreag	nãoreag	neg
110	reag	neg	99	nãoreag	reag	neg
111	reag	neg	788	nãoreag	nãoreag	neg
112	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
113	reag	neg	389			neg
114	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
115	reag	neg	1.001			neg
116	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
117	reag	neg	198	nãoreag	reag	neg
118	reag	neg	9	nãoreag	reag	neg
119	reag	neg	1.001			neg
120	reag	neg	9	nãoreag	reag	neg
121	reag	neg	99	nãoreag	reag	neg
122	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
123	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
124	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
125	reag	neg	1.001			neg
126	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
127	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
128	reag	neg	803	nãoreag	reag	neg
129	reag	neg	252	nãoreag	reag	neg
130	reag	neg	4	nãoreag	reag	neg
131	reag	neg	23	nãoreag	reag	neg
132	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
133	reag	neg	328	nãoreag	reag	neg
134	reag	neg	1.001			neg
135	reag	neg	754			neg
136	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
137	reag	neg	25	nãoreag	reag	neg
138	reag	neg	5	nãoreag	nãoreag	neg
139	reag	neg	883			neg
140	reag	neg	1.001			neg
141	reag	neg	617	nãoreag	nãoreag	neg
142	reag	neg	24	nãoreag	nãoreag	neg
143	reag	neg	351	nãoreag	reag	neg
144	reag	neg	251	nãoreag	reag	neg
145	reag	neg	195	nãoreag	reag	neg
146	reag	neg	50	nãoreag	reag	neg
147	reag	neg	359	nãoreag	reag	neg
148	reag	neg	1.001			neg
149	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
150	reag	neg	94	nãoreag	reag	neg
151	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
152	reag	neg	1.001			neg
153	reag	neg	278			neg
154	reag	neg	969			neg
155	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
156	reag	neg	652	nãoreag	nãoreag	neg
157	reag	neg	6	nãoreag	nãoreag	neg

Paciente	Anti-HBc	HBsAg	Anti-HBs	HbeAg	Anti-HBe	HBV-DNA
158	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
159	reag	neg	839			neg
160	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
161	reag	neg	929	nãoreag	reag	neg
162	reag	neg	228	nãoreag	reag	neg
163	reag	neg	656			neg
164	reag	neg	169			neg
165	reag	neg	17	nãoreag	nãoreag	neg
166	reag	neg	82	nãoreag	reag	neg
167	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
168	reag	neg	975	nãoreag	reag	neg
169	reag	neg	1.001			neg
170	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
171	reag	neg	376	nãoreag	reag	neg
172	reag	neg	633			neg
173	reag	neg	15	nãoreag	nãoreag	neg
174	reag	neg	198			neg
175	reag	neg	1.001			neg
176	reag	neg	39	nãoreag	nãoreag	neg
177	reag	neg	1.001			neg
178	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
179	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
180	reag	neg	178			neg
181	reag	neg	1.001			neg
182	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
183	reag	neg	187			neg
184	reag	neg	45	nãoreag	nãoreag	neg
185	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
186	reag	neg	1.001			neg
187	reag	neg	162	nãoreag	nãoreag	neg
188	reag	neg	1.001			neg
189	reag	neg	543	nãoreag	reag	neg
190	reag	neg	1.001			neg
191	reag	neg	1.001			neg
192	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
193	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
194	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
195	reag	neg	3	nãoreag	nãoreag	neg
196	reag	neg	20	nãoreag	nãoreag	neg
197	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
198	reag	neg	7	nãoreag	reag	neg
199	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
200	reag	neg	1.001			neg
201	reag	neg	906			neg
202	reag	neg	860	nãoreag	nãoreag	neg
203	reag	neg	57	nãoreag	reag	neg
204	reag	neg	586	nãoreag	nãoreag	neg
205	reag	neg	4	nãoreag	nãoreag	neg
206	reag	neg	460	nãoreag	nãoreag	neg
207	reag	neg	185			neg
208	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
209	reag	neg	110	nãoreag	reag	neg
210	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg

Paciente	Anti-HBc	HBsAg	Anti-HBs	HbeAg	Anti-HBe	HBV-DNA
211	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	
212	reag	neg	255			neg
213	reag	neg	96	nãoreag	reag	
214	reag	neg	70	nãoreag	nãoreag	
215	reag	neg	81	nãoreag	reag	Neg
216	reag	neg	1.001			neg
217	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
218	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
219	reag	neg	1.001			neg
220	reag	neg	74	nãoreag	reag	neg
221	reag	neg	1.001			neg
222	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
223	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
224	reag	neg	776			neg
225	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
226	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
227	reag	neg	794	nãoreag	nãoreag	neg
228	reag	neg	414	nãoreag	reag	neg
229	reag	neg	1.001			neg
230	reag	neg	2	nãoreag	reag	neg
231	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
232	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
233	reag	neg	1.001			neg
234	reag	neg	366			neg
235	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
236	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
237	reag	neg	1.001			neg
238	reag	neg	77	nãoreag	nãoreag	neg
239	reag	neg	703	nãoreag	reag	neg
240	reag	neg	2	nãoreag	nãoreag	neg
241	reag	neg	1.001	nãoreag	reag	neg
242	reag	neg	1.001	nãoreag	nãoreag	neg
243	reag	neg	460	nãoreag	reag	neg
244	reag	neg	721	nãoreag	nãoreag	neg

**ANEXO D - Aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em
Pesquisa da PUCRS**



Ofício nº 652-CEP

Porto Alegre, 27 de julho de 2005.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou em 08 de novembro 2002, seu protocolo de pesquisa intitulado: "Pesquisa do vírus da hepatite B por PCR em doador de sangue Anti-HBc reagente".

Atenciosamente

Prof. Dr. Délio José Kipper

COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Carlos Kupski
N/Universidade

ANEXO E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Atualmente, sabe-se que milhares de pessoas são portadores de Hepatite B. Como é uma doença de transmissão por sangue contaminado, algumas pessoas são excluídas de doação sangüínea por exames que indicam Hepatite B ativa ou contato prévio com ela.

A maioria das pessoas é eliminada da doação por um exame chamado anti-HBc total reagente que, isoladamente, não define a presença de Hepatite B, podendo ser apenas uma “cicatriz” de quem já esteve em contato com o vírus.

Por estes motivos, estamos desenvolvendo uma pesquisa através de exames de sangue para verificar, naqueles que são impedidos de doar sangue por apresentarem um anti-HBc total reagente, se há algum vestígio de Hepatite B através de um exame de sangue chamado PCR do vírus B.

O estudo não oferece maiores riscos, exceto aquela de uma coleta de maior quantidade de sangue (cerca de 5mL), além daquele sangue que será coletado normalmente pelo Banco de Sangue para confirmar (segunda amostra) o exame que inicialmente impediu a doação (anti-HBc total reagente).

A interpretação e resultados serão fornecidos em consulta no Ambulatório de Hepatites do Hospital São Lucas da PUCRS, local onde rotineiramente são encaminhadas as pessoas que foram impedidas de doar sangue.

Portanto, ao concordar em participar do estudo, o paciente não sofrerá nenhum prejuízo na assistência médica. Mas, se resolver sair do acompanhamento não haverá alteração no acompanhamento já elaborado.

Eu, _____ (paciente ou responsável)
fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito do diagnóstico e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. O Dr. Carlos Kupski (pesquisador responsável – telefone (51-33391476/ 51) certificou-me que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais, bem como o meu acompanhamento e tratamento não serão modificados em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa em face destas informações.

Caso tiver novas perguntas sobre o estudo posso chamar o Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni no telefone (51) 3339-1476.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

_____	_____	___/___/___
Assinatura do Paciente	Nome	Data
_____	_____	___/___/___
Assinatura do Pesquisador	Nome	Data

Este formulário foi lido para _____ (nome do paciente) em ___/___/___ pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

_____	_____	___/___/___
Assinatura da Testemunha	Nome	Data