



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

Departamento de Ciências Biológicas

Curso de Licenciatura em Biologia e Saúde

Trabalho de Culminação de Estudos

**Frequência, Caracterização Genotípica e Viroológica do Vírus de Hepatite B
em Dadores de Sangue do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo**

Autora: Flora Inalda Jaime Mula

Maputo, Agosto de 2015



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

Departamento de Ciências Biológicas

Curso de Licenciatura em Biologia e Saúde

Trabalho de Culminação de Estudos

Frequência, Caracterização Genotípica e Viroológica do Vírus de Hepatite B em Dadores de Sangue do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo

Autora:

Flora Inalda Jaime Mula

Supervisores:

dra. Mariamo Parruque

dr. Nédio Mabunda

Maputo, Agosto de 2015

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Jaime Mula e Anabela Maússe pelo apoio incondicional e aos meus irmãos, Celso Mula, Aires Mula, Yolanda Mula, Dércio Mula, Edno Mula e Edson Mula pelo carinho e por estarem do meu lado durante a minha vida estudantil.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me concedido a dádiva da vida, pela saúde e pela força, pois sem ele na minha vida nada teria feito.

Aos meus supervisores, dra Mariamo Parruque e o dr Nédio Mabunda pela excelente orientação e sabedoria que me foi concedida durante toda etapa do trabalho. Que Deus os ilumine.

A todos colegas e amigos do Curso de Licenciatura em Biologia e Saúde pelo companheirismo e compreensão em especial ao Arlindo Manguane, Mirela pale, Atália Cuna, Teodora Vaz, Iraque Chilaule e Orlando Maulana.

Á toda equipe do Laboratório de Virologia Molecular do INS, em especial a dra. Nália Ismael pelo apoio, incentivo e ensinamento para o meu conhecimento técnico profissional. Minha sincera e profunda gratidão.

Á todos funcionários do Banco de sangue do Hospital Central de Maputo, em especial a dra. Sandra e ao enfermeiro Orlando Mahotas.

Palavras jamais serão suficientes para expressar o meu agradecimento.

Declaração de Honra

Declaro por minha honra, que este trabalho com o tema “ *Frequência, Caracterização Genotípica e Viroológica do Vírus de Hepatite B em Dadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo*” é fruto da minha pesquisa e dedicação, e cujo conteúdo é original.

Maputo, Agosto de 2015

(Flora Inalda Jaime Mula)

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência dos <i>Primers</i> específicos para a genotipagem de HBV.....	20
Tabela 2: Master Mix para o conjunto 1 e 2 na genotipagem de Hepatite B.....	20
Tabela 3: Condição do PCR para a amplificação do ADN.....	21
Tabela 4. Análise das características sócio- demográficas de dadores do BSHCM.....	25
Tabela 5. Prevalência do HBV em dadores de sangue.....	26

Lista de Figuras

Figura 1. Organização do genoma de HBV.....	7
Figura. 2: Ciclo de Replicação viral do HBV.....	11
Figura. 3: História natural do HBV.....	12
Figura 4: Ilustra o HCM, onde se localiza o BSHCM.....	15
Figura 5: Imagem de gel de agarose com as bandas para cada genótipo.....	22

Lista de Anexos

Anexo1: Folha de Consentimento Informado.....	42
Anexo 2: Questionário usado no pré-inquérito nos Bancos de Sangue.....	43
Anexo 3: Ficha de Dados Demográficos.....	44
Anexo 4: Teste Serológico (ELISA).....	45
Anexo 5: Aprovação do Comité Nacional de Bioética para Saúde do Ministério da Saúde...	46

Lista de Abreviaturas

ADN- Ácido Desoxibonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*)

ALT- Alanina aminotransferase (*Alanine Aminotransferases*)

Anti-HBc- Anticorpo contra o HBcAg (*Hepatitis c antibody*)

anti-HBe- Anticorpo contra o HBeAg

anti-HBs- Anticorpo contra o HBsAg (*Hepatitis B Surface antibody*)

ARN- Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

AST- Aspartato Aminotransferase (*Aspartic Acid Aminotransferases*)

BSHCM- Banco de sangue do Hospital Central de Maputo

cccDNA- ADN circular covalentemente fechado (*Covalently Closed Circular DNA*)

ELISA- Ensaio imunoenzimático (*Enzyme- Linked Immunosorbent Assay*)

ETV- Entecavir (*Entecavir*)

HBcAg- Antígeno central ou core de Hepatite B

HBeAg- Antígeno de Hepatite B (*Hepatitis B “e” antigen*)

HBsAg- Antígeno de Superfície de Hepatite B (*Hepatitis B Surface antigen*)

HBV- Vírus de Hepatite B (*Hepatitis B Virus*)

HAV- Vírus de Hepatite A (*Hepatitis A Virus*)

HCV- Vírus de Hepatite C (*Hepatitis C Virus*)

HCC- Carcinoma hepatocelular (*Hepatocellular Carcinoma*)

HCM- Hospital Central de Maputo

HDV- Vírus de Hepatite D (*Hepatitis D Virus*)

HEV- Vírus de Hepatite E (*Hepatitis E Virus*)

HGV- Vírus de Hepatite G (*Hepatitis G Virus*)

HIV- Vírus de Imunodeficiência Adquirida (*Human Immunodeficiency Virus*)

INS- Instituto Nacional de Saúde

LMV- Lamivudina (*Lamivudine*)

NA- nucleotídeos análogos (*Nucleotide analogues*)

ORF- Regiões de Leitura Aberta (*Open Reading Regions*)

PCR- Reacção em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reactions*)

pgARN- ARN pre-genómicos

TDF- Tenofovir (*Tenofovir*)

WHO- Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

Resumo

O Vírus de Hepatite B (HBV) é um dos agentes infecciosos mais comuns a nível mundial. E, estima-se que seja responsável por um milhão de mortes por ano, sendo a África-Subsaariana tida como endémica pois, mais de 8% da população encontra-se infectada pelo vírus (Hubschen, *et al.*, 2008; Kew, 2010). Os genótipos de HBV e a carga viral, são cada vez mais reconhecidos como factores importantes na progressão, e evolução clínica da doença hepática (Alcalde *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2008). Existindo poucos estudos sobre o assunto em Moçambique, houve a necessidade de investigar o perfil virológico e genotípico do HBV em dadores de sangue do Banco de sangue do Hospital Central de Maputo (BSHCM).

O estudo foi de carácter transversal, tendo decorrido de Novembro de 2014 á Março de 2015, com um tamanho amostral de 500 dadores, provenientes maioritariamente da Cidade de Maputo. Para a colheita de amostras, os dadores assinaram um termo de consentimento, de seguida foram administrados um questionário com vista a obter os dados sócio- demográficos e posterior testagem das amostras para o marcador HBsAg no Banco de Sangue. E todas amostras positivas para o marcador HBsAg, foram submetidas á genotipagem e a carga viral, no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Nacional de Saúde (INS).

Segundo a análise estatística feita, pelo programa SPSS versão 20, a prevalência encontrada para o HBV foi de 7,8%, onde os indivíduos de 25-34, do sexo masculino e de raça

negra apresentavam maior frequência. A carga viral foi detectada em 89,2%, e não se identificou nenhum genótipo de HBV nos dadores de sangue. No entanto, o alto nível de HBV na população estudada, pode estar associada a falta ou inadequadas medidas de prevenção do HBV, aumentando deste modo o risco de transmissão deste vírus numa transfusão. Diante dos resultados obtidos, sugere-se a realização de estudos similares e com um tamanho amostral maior.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Justificação.....	3
2. Objectivos.....	4
2.1 Objectivos Geral.....	4
2.2 Objectivos Específicos.....	4
3. Hipóteses	5
4. Revisão Bibliográfica.....	6
4.1 Classificação e organização genómica do HBV.....	6
4.1.2 Variabilidade genética do HBV.....	7
4.1.3 Epidemiologia do HBV.....	9
4.1.4 Ciclo de Replicação viral do HBV.....	9
4.1.5 Transmissão e patogénese do HBV.....	11
4.1.6 Diagnóstico da infecção por HBV	12
4.1.7 Tratamento e a resposta dos genótipos de HBV.....	13
5. Área de Estudo.....	15
5.1 Local de Análise Laboratorial.....	16
6. Metodologia.....	16
6.1 Desenho de estudo.....	16

6.1.1 Tamanho da amostra e Variáveis do Estudo.....	17
6.1.2 Colheita de Amostras.....	17
6.2 Análise Laboratorial da amostra.....	17
6.2.1 Rastreamento de Hepatite B.....	18
6.2.2 Determinação da Carga Viral.....	18
6.2.3 Genotipagem de HBV através do PCR com primers específicos.....	19
6.2.3.1 Extração de ADN.....	19
6.2.3.2 Mix para o PCR	19
6.2.3.3 Electroforese em gel de agarose.....	21
6.3 Análise de dados.....	22
6.4 Considerações Éticas.....	22
7. Resultados.....	23
7.1 Características sócio- demográficas da população de estudo.....	24
7.2 Frequência de HBV em dadores do BSHCM	24
7.3 Genótipos de Hepatite B.....	27
8. Discussão.....	28
9. Conclusão	32
10. Recomendações.....	32
11. Limitações.....	33
12. Comentário.....	33
13. Referências Bibliográficas.....	34
Anexo.....	40
Anexo1: Folha de Consentimento Informado.....	41
Anexo 2: Questionário usado no pré-inquérito nos Bancos de Sangue.....	42
Anexo 3: Ficha de Dados Demográficos.....	43
Anexo 4:	44
Anexo 5: Aprovação do Comité Nacional de Bioética para Saúde do Ministério da Saúde.....	45

1. Introdução

A Hepatite é uma inflamação do fígado, que pode ser causada por diferentes vírus de hepatite e outros factores como, drogas e bactérias (WHO, 2002)

No mundo, as hepatites virais são as causas mais importantes da doença hepática e constituem um dos principais problemas de saúde pública (Liu *et al.*, 2002; WHO, 2002).

Os agentes etiológicos das diferentes hepatites virais humanas são, os Vírus da Hepatite A (HAV), B (HBV), C (HCV), D (HDV), E (HEV), e G (HGV). Estes vírus diferem na sua estrutura, mecanismos de replicação e de transmissão, mas apresentam em comum um tropismo primário pelas células do fígado e são vírus de Ácido Ribonucleico (ARN), com excepção do HBV (Murray *et al.*, 2007).

Dentre os diferentes vírus causadores da hepatite, destaca-se o Vírus de Hepatite B (HBV), com maior distribuição a nível mundial (Sofian *et al.*, 2010). Estima-se que, cerca de 350 milhões de indivíduos são portadores crónicos do HBV e, a região Subsaariana apresenta uma prevalência elevada de hepatite crónica, com mais de 8% da população infectada pelo vírus (Kew, 2010; OMS, 2012).

O continente Africano enfrenta as maiores necessidades de transfusão no mundo, devido a recursos limitados como a falta de dadores regulares, mas também a maior prevalência de agentes transmitidos pelo sangue, associado aos programas mais fracos de controlo na transfusão sanguínea (Noubiap *et al.*, 2013).

Estudos realizados por Cunha *et al.*, (2007) e Stokx *et al.*, (2011), mostram que, Moçambique faz parte dos países mundiais com maior prevalência de HBV em dadores de sangue, com uma prevalência estimada em 4,5% e 10,6% entre mulheres e homens respectivamente.

Geralmente, o HBV é transmitido principalmente pela via sexual com pessoas infectadas, seguido pelo contacto sanguíneo, e pelo contacto directo ou indirecto com fluidos corporais contaminados (Murray *et al.*, 2007).

O diagnóstico da infecção pode ser realizado com base nos sintomas, clínicos e/ou laboratorialmente através de métodos sorológicos (ELISA) (Murray *et al.*, 2007), que revelam-se fundamentais não apenas para o diagnóstico, mas também para o seguimento da infecção viral (Souza e Foster, 2004). Usa-se também, a técnica de reacção em cadeia de polimerase (PCR) para, a monitorização quantitativa da carga viral, e para a indicação da linha terapêutica (Deny e Zoulim, 2010).

O tratamento da Hepatite B é feito através de duas linhas terapêuticas, que são os supressores virais (Nucleotídeos Análogos) e, os moduladores do sistema imunológico como, interferon α (INF- α) e interferon-alfa peguilado (PEG-INF- α) (Lai *et al.*, 2003). Portanto, cerca de 60-70% de indivíduos que se beneficiam do tratamento antiviral contra a infecção por HBV, desenvolvem resistência, provocando o reaparecimento da carga viral em níveis similares aos observados antes do início do tratamento (Conjeevaram e Lok, 2003).

A diversidade genética do HBV, permite a sua classificação em dez genótipos, nomeadamente A, B, C, D, E, F, G, H, I e J (Kao, 2011b; Zhang *et al.*, 2013). Esta classificação é baseada nas divergências de sequências acima de 8% no genoma completo, ou mesmo acima de 4% em genes específicos (Kao, 2011b; Liaw e Chu, 2009). Estes genótipos diferem na severidade da doença e na resposta ao tratamento, sendo relacionados com maior ou menor risco da evolução clínica da infecção por este vírus (Erhardt *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013). Entretanto, para além dos genótipos de HBV a da carga viral, também constituem um factor de risco para o desenvolvimento da cirrose hepática e do carcinoma hepatocelular (HCC) (Alcalde *et al.*, 2009; Kew, 2010).

O perfil virológico de dadores com positividade para HBV, ainda não foi descrito em Moçambique e por outro lado, dados sobre os tipos de genótipos de HBV circulantes no País, são escassos, sendo que o único reporte foi feito por Cunha *et al.*, (2007). Este estudo é importante porque dará a conhecer o alto nível de transmissibilidade de HBV e a influência dos genótipos no decurso da infecção e na resposta ao tratamento.

1.1 Justificação

A prevalência de agentes transmitidos pelo sangue (HIV, HBV e HCV), e a dispersão geográfica do HBV tem aumentado acentuadamente com a imigração, o contacto directo entre as pessoas e o rastreio serológico inadequado (Cunhas *et al.*, 2007). Por outro lado, a linha terapêutica disponível actualmente não é eficaz para o tratamento da infecção por HBV, favorecendo assim a evolução da infecção hepática (Deny e Zoulim, 2010).

Assim sendo, o conhecimento dos genótipos em dadores de sangue, é importante para o desenvolvimento de formas específicas de prevenção, e direccionar o tratamento de acordo com o genótipo infectante em cada indivíduo. Também, no desenvolvimento de testes de diagnóstico eficazes e, estimar a progressão da infecção pelos diferentes genótipos.

Por outro lado, a caracterização virológica irá indicar a probabilidade de transmissão do HBV através duma transfusão sanguínea, avaliar a infectividade do vírus de modo, a reduzir o impacto deste na saúde através da implementação de melhores medidas de controlo.

2. Objectivos

2.1 Objectivos Geral

Determinar a frequência, caracterizar os genótipos e o perfil virológico dos dadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo.

2.2 Objectivos Específicos

- Descrever os factores associados a transmissão do HBV na transfusão em dadores de sangue do Hospital Central de Maputo;
- Determinar a carga viral em dadores de sangue positivos para HBV do Hospital Central de Maputo;
- Identificar os genótipos de hepatite B circulantes em dadores de sangue do Hospital Central de Maputo;
- Relacionar os genótipos de hepatite B e a carga viral em dadores de sangue do Hospital Central de Maputo.

3. Hipóteses

O genoma do HBV é classificado em 10 genótipos, nomeadamente de A á J. E encontram-se, distintamente distribuídos pela população (Kew, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

Nos dadores de sangue da Cidade de Maputo foi encontrado o genótipo A, como sendo o mais frequente, com cerca de 86,3%, seguido do genótipo E e D (Cunha *et al.*, 2007). Portanto, sendo os dadores de sangue provenientes de diferentes regiões geográficas espera-se que:

Hipótese nula: Os genótipos de HBV variem nos dadores de sangue do Hospital Central de Maputo

Hipótese Alternativa: O genótipo A seja o mais circulante nos dadores de sangue do Hospital Central de Maputo

Estudos feitos por Perrillo (2009) e Deny e Zoulim (2010) sugerem que, o genótipo C é o mais resistente e associado á complicações mais graves da doença hepática. Sendo assim:

Hipótese nula: Os dadores de sangue do Hospital Central de Maputo com o genótipo C, apresentam menor carga viral e menor risco de transmissão de HBV.

Hipótese Alternativa: Os dadores de sangue do Hospital Central de Maputo com o genótipo C, apresentam maior carga viral e maior risco de transmissão de HBV.

4. Revisão Bibliográfica

4.1 Classificação e organização genômica do HBV

O vírus de Hepatite B (HBV) é um vírus de Ácido Desoxirribonucléico (ADN), pertencente à família Hepadnaviridae e ao género *Orthohepadnaviruses*. Esta família é assim designada devido ao peso do genoma, pelo arranjo das regiões de leitura aberta (ORF's) e pelo mecanismo de replicação, pois precisa da acção da enzima transcriptase reversa para incorporar-se no genoma do hospedeiro (Knipe e Howley 2007).

Tendo apenas 3200pb no seu genoma, o HBV é o vírus de ADN mais pequeno que infecta o Homem (Kao e [Chen](#), 2002; Guettouche e Hnatyszyn, 2005). O seu genoma é compacto e constituído por ADN circular de fita parcialmente dupla, organizado em quatro regiões de leitura aberta (ORF's) parcialmente sobrepostas e denominadas: PréS1/S2, Pré-Core, P e X (Hatzakis *et al.*, 2006; Pujol *et al.*, 2009; Kao, 2011b).

A fita de ADN incompleta é de polaridade positiva e a completa de polaridade negativa. Esta molécula adopta a forma circular, devido á sobreposição das duas cadeias complementares na região coesiva. Sendo que, a extremidade 5' da fita negativa encontra-se covalentemente ligada á porção N-terminal da enzima transcriptase ou polimerase e, a extremidade 5' da fita positiva esta ligada ao oligonucleotídeo de ARN derivado da extremidade 5' do ARN pre-genómico (pgARN), que serve como iniciador para a síntese acrescida da cadeia do ADN (WHO, 2002; IARC, 2010).

O gene S codifica a principal proteína do envelope viral, o antígeno de superfície (HBsAg) e, é dividido em três regiões pre-S1, pre-S2 e S. A tradução destas regiões darão origem á três glicoproteína Maior (L), Média (M) e pequena (S), responsáveis pela ligação dos vírus nas células hepáticas, montagem de novas partículas virais, absorção e pela indução de respostas imunes do hospedeiro (Guettouche e Hnatyszyn, 2005; Murray *et al.*, 2007; IARC, 2010).

4.1.2 Variabilidade genética do HBV

A evolução do HBV levou à existência de vários genótipos, subtipos, mutações, recombinantes e *quasi espécies* na população (Kao, 2011b). Esta variabilidade genética resulta de vários factores, como a falta de capacidade de leitura (3'-5') da enzima polimerase, levando assim ao aparecimento de altas taxas de mutações e de uma população viral *quasi espécies* (Pujol *et al.*, 2009; Kew, 2010; Deny e Zoulim, 2010).

A classificação do HBV em seis (A-F), e depois em oito genótipos (A-H) diferentes identificados pelas letras do alfabeto foi, descrita anteriormente com base nas divergências acima de 8% no genoma completo ou mesmo de 4-8% em genes específicos (Hannoun *et al.*, 2000; Kao, 2011b; Pujol *et al.*, 2009). Actualmente são conhecidos dez genótipos (A-J), sendo os genótipos J, encontrado recentemente num paciente Japonês e o I evidenciado no noroeste da China, na Índia e no Vietnã. Presume-se que, este genótipo (I) seja resultante de uma recombinação inter-genotípica entre os genótipos A, C e G (Deny e Zoulim, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Aparicio *et al.*, 2014).

Para além da classificação genotípica, o HBV também é classificado em 4 serotipos (*adw*, *ayw*, *adr*, e o *ayr*), baseado em determinantes antigénicos do HBsAg. Esta glicoproteína, possui dois pares de antígenos mutuamente exclusivos (d/y e w/r) e, um determinante comum para todos serotipos “a”, contra o qual se dirigem a maior parte das respostas imunológicas. Sendo assim, a combinação destas variações constituem óptimos marcadores epidemiológicos da infecção por HBV (Norder *et al.*, 1992; Kao e [Chen](#), 2002; Chu e Lok, 2002; Murray *et al.*, 2007).

Por sua vez, estes serotipos podem ser classificados em 9 subtipos denominados *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4q-*, *adrq+* e *adrq-* (Chu e Lok, 2002; Pujol *et al.*, 2009). O subtipo *adw* é encontrado nos genótipos A,B,C,F e G, o *ayw* codifica os genótipos A,B,D, E e, o *adr* e *ayr* correspondem o genótipo C (Kao e [Chen](#), 2002)

Os genótipos de HBV encontram-se, distintamente distribuídos pela população (Kew, 2010 e Farazmandfar *et al.*, 2012). O genótipo A é frequente na Ásia, região norte da Europa e América, África subsaariana e ocidental, o genótipo B e C são maioritariamente encontrados nos

países asiáticos. Apesar do genótipo *D* apresentar uma distribuição mundial, ele é mais comum na região Mediterrânea e na Índia. O genótipo *E* é restrito à região Oeste e Ocidental de África, o genótipo *F* é prevalente na população indígena da América do Sul, o genótipo *G* foi descrito na França, e Estados Unidos, o genótipo *H* é mais encontrado na América Central. E os genótipos *I* e *J* são observados nos países asiáticos, como China, Vietnam e no Japão respectivamente (Hubschen, *et al.*, 2008, Kao, 2011b; Pujol *et al.*, 2009; Saeed *et al.*, 2014).

Em Moçambique, um estudo realizado por Cunha *et al.*, (2007), detectou os genótipos *A* *D* e *E*, num total de 212 dadores de sangue da cidade de Maputo. Onde, o genótipo *A* foi considerado o mais frequente com 86,3% (n=183), seguido do genótipo *E* (8,5%), *D* (0,5%). E, cerca de 4,7% (n=10) estavam co-infectados pelos genótipos *A* e *E*

4.1.3 Epidemiologia do HBV

O HBV é um dos vírus infecciosos mais comum em todo o mundo e, a sua prevalência varia consideravelmente em diferentes regiões geográficas (Saeed *et al.*, 2014). Segundo a OMS (2012), estima-se que 2 bilhões de pessoas, o que correspondem a um terço da população mundial estão infectados pelo HBV, 350 milhões de pessoas são portadores crónicos do vírus e estão em risco de desenvolver complicações por cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC).

A infecção por HBV é a décima causa de morte em todo mundo, sendo responsável por 520 mil e 1,2 milhões de mortes anualmente. A região Subsaariana, a Bacia Amazónica e a Ásia apresentam uma prevalência elevada de hepatite crónica, com mais de 8% da população infectada pelo vírus. Nestas regiões cerca de 70-95% da população apresentam marcadores sorológicos e 55% de todo HCC é causado pelo HBV (Kew, 2010 e Saeed *et al.*, 2014).

A co-infecção HBV/HCV e HIV é cada vez mais prevalente e reconhecida como um problema de saúde pública. Em determinadas regiões, até 10% das pessoas que vivem com HBV estão co-infectados com HIV (OMS, 2012).

Em Moçambique, o estudo realizado em dadores de sangue por Cunha *et al.*, (2007) demonstrou que, entre homens e mulheres a taxa de prevalência para HBV e HCV foi de 10,6%-4,5% e 1,2%-1% respectivamente e 2% dos dadores estavam co-infectados (HIV/HBV). E o

estudo de Stokx *et al.*, (2011), que visava determinar a soro prevalência de infecções virais em dadores de sangue de Tete, também encontrou uma prevalência de HBV de 10,6%. E, Numa população de indivíduos HIV positivos (1137) da cidade de Maputo, foi observada uma prevalência de HBV de 16%, onde 44,8% tinham 25-34 anos, seguido de 30,1% na faixa etária dos 35-44 e 10,9% entre os 18-24 anos (Semá, 2011).

4.1.4 Ciclo de Replicação viral do HBV

O HBV é um vírus caracteristicamente não citopático, que codifica uma transcriptase reversa e se multiplica mediante um intermediário de ARN (Murray *et al.*, 2007; Aparicio *et al.*, 2014).

A entrada do vírus na célula hospedeira depende da sua ligação com a molécula do envelope viral, pre-S1. Após a ligação, o vírus perde o seu envelope e o ADN viral é transportado para o núcleo da célula do hospedeiro e convertido em ADN circular covalentemente fechado (cccDNA). Pela acção da enzima polimerase II, o cccDNA é transcrito em ARN's virais, subgenómicos e ARN pre-genómicos (pgARN) que incluem 4 ARNm de 3,5, 2,4, 2,1 e 0,7kb (Guettouche, e Hnatyszyn, 2005; Locarnini e Zoulim 2010).

Posteriormente, os ARNm são transportados para o citoplasma e traduzidos em proteínas do nucleocapsídeo e pre-core, proteínas de transactivação, polimerase e do envelope (maior, média e pequena). De seguida, as proteínas do envelope vão inserir-se integralmente na membrana do retículo endoplasmático, enquanto isso, a pgARN é empacotado em conjunto com a polimerase viral dentro da proteína *core*, formando nucleocapsídeos imaturos. No interior do nucleocapsídeo ocorre a conversão do pgARN em ADN pela acção da enzima transcriptase reversa, seguida da formação da fita de polaridade negativa e depois a síntese da fita de incompleta de polaridade positiva através da degradação do pgARN pela enzima ribonuclease H (RNase H). Assim, o nucleocapsídeo adquire o envelope, formando-se novos vírus que são secretados da célula hospedeira através do aparelho de Golgi e uma parte do cccDNA permanece no interior da célula infectada tornando-se uma reserva da infecção, e por outro lado o pre-core é transportado para retículo endoplasmático e secretado em forma de HBeAg (Figura. 2) (WHO, 2002; Guettouche e Hnatyszyn 2005; Murray *et al.*, 2007).

A infecção aguda pode ser assintomática autolimitada, sintomática e fulminante (Liaw e Chu, 2009). Na fase assintomática os sinais são leves e habitualmente inespecíficos acompanhados por náuseas, vômitos e dores abdominais, apenas um terço de indivíduos infectados evoluem para a fase sintomática caracterizada pelo aparecimento de icterícia, urina escuras devido ao aumento dos níveis da bilirrubina no sangue (acima de 20-40mg/ml) e coloração amarelada das mucosas. E a fase fulminante caracteriza-se pela insuficiência hepática grave, que pode ocorrer em 1% dos casos. (WHO, 2002; Deny e Zoulim, 2010)

A evolução da infecção consiste de fases distintas, e resulta da interacção entre o vírus, hepatócitos e a resposta imunológica do hospedeiro. Onde apenas 5-10% de indivíduos adultos e 90% das crianças com infecção aguda evoluem para a infecção crónica (Liaw e Chu, 2009; Pujol *et al.*, 2009). Durante a hepatite crónica verifica-se a persistência do HBsAg no plasma por mais de 6 meses, concentrações elevadas de HBeAg e ADN viral ($> 10^5$ cópias), presença do anti-IgG de HBcAg (WHO, 2002; Pujol *et al.*, 2009).

Existem quatro fases de hepatite crónica, fase imunitolerante, imunoclarescência, fase de portador inactivo ou não replicativo do HBV e fase de reactivação (Otta *et al.*, 2012) (Figura 3).

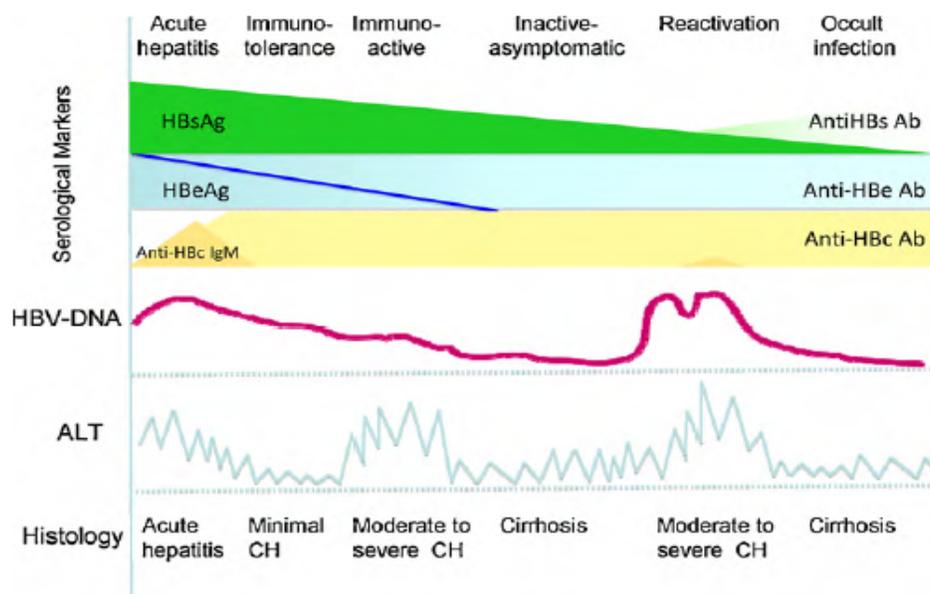


Figura. 3: História natural do HBV. Os marcadores sorológicos (HBsAg, HBeAg Anti-HBc) e os níveis elevados de ADN viral caracterizam a fase aguda e a persistência do HBsAg caracteriza a fase crónica (CH- hepatite crónica. Fonte: Deny e Zoulim, 2010).

4.1.6 Diagnóstico da infecção por HBV

Para se avaliar a seropositividade dum paciente, recorre-se á sintomas clínicos e/ou laboratorialmente através da detecção de marcadores sorológicos como os antígenos (HBsAg, HBeAg) e os seus respectivos anticorpos (anti-HBs, anti-HBe e HBc) (WHO 2002; Murray *et al.*, 2007; Liaw e Chu, 2009,). E através de exames bioquímicos para detecção dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transpeptidase e fosfatase alcalina, tempo de protrombina e albumina no soro (Deny e Zoulim, 2010). O HBsAg é o primeiro marcador serológico encontrado no plasma portanto, a sua permanência por mais de 6 meses indica uma infecção crónica (Lai *et al.*, 2003).

Muitas técnicas moleculares como a de Reacção em Cadeia de Polimerase (PCR), são usadas para a monitorização quantitativa da carga viral, verificação da reactivação viral, indicação do tratamento e para a genotipagem (Lai *et al.*, 2003; Deny e Zoulim, 2010).

4.1.7 Tratamento e a resposta dos genótipos de HBV

O sistema nacional de saúde implementou a vacina (DPT-Hepatite B) contra a infecção por HBV em 2001, esta vacina é intramuscular e possui três doses que são administradas aos dois, três e quatro meses de vida (MISAU, 2001).

Ainda não existe um tratamento para a hepatite aguda, mas no que concerne a hepatite crónica, existem dois principais grupos de medicamentos disponíveis actualmente: imunomoduladores do sistema imunológico (que incluem o INF e PEG-INF) e Nucleotídeos Análogos (NA) como, lamivudina (LMV), adenofovir (ADV), entecavir (ETV), tenofovir (TDF) e telbivudina (LDT) (Deny e Zoulim, 2010).

O objectivo do tratamento é suprimir a replicação viral e deste modo, diminuir as complicações e a progressão da doença do fígado em cirrose e insuficiência hepática, bem como o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e subsequente morte. No entanto, os fármacos disponíveis actualmente não são eficazes para o tratamento da infecção por HBV, devido a resposta imune contra os hepatócitos infectados e a persistência do ADN circular covalentemente fechado (cccDNA) no fígado (Erhardt *et al.*, 2005; Deny e Zoulim, 2010).

O INF- α e PEG-INF- α apresentam, uma taxa baixa de resposta ao tratamento e, a sua acção pode ser observada em aproximadamente 30-40% dos pacientes que toleram esta droga (Erhardt *et al.*, 2005). Seguindo esta linha, alguns estudos sugerem o genótipo C, como o mais resistente e associado á complicações mais graves da doença hepática (Perrillo, 2009; Deny e Zoulim, 2010).

A diferença de prognóstico na resposta ao tratamento, devido ao tipo de genótipo de HBV infectante foi demonstrada com o uso de IFN- α , onde portadores dos genótipos A e B (45%-49%) apresentaram melhor resposta em relação aos pacientes infectados pelos genótipos C e D (26%) (Erhardt *et al.*, 2005; Deny e Zoulim, 2010; Kao, 2011b)

Outro estudo similar feito em 1200 pacientes demonstrou que, as melhores taxas de respostas virológicas são observadas em pacientes com os genótipos A (36%) e B (21%), do que em pacientes com os genótipos C e D (9%) (Perrillo, 2009).

Entre os nucleotídeos análogos (NA) disponíveis para o tratamento, a menor incidência de resistência corresponde ao entecavir (ETV) e o tenofovir (TDF), em contraste á lamivudina. A resistência em pacientes tratados com a lamivudina ocorre em aproximadamente 14% á 36% após um ano, e esta frequência aumenta progressivamente ao longo do tratamento (Zollner *et al.*, 2004; Deny e Zoulim, 2010). Por outro lado, o genótipo A apresenta maior risco de desenvolver resistência á lamivudina se comparado com o genótipo D (Zollner *et al.*, 2004).

5. Área de Estudo

O estudo foi realizado no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo (BSHCM), que se encontra no recinto do Hospital Central de Maputo, no Bairro da Polana Cimento á Sul de Moçambique (figura. 4). O BSHCM é um Banco de referência á nível Nacional, têm como finalidade a colecta de sangue para o devido processamento (rastreio de agentes infecciosos), com vista a abastecer as enfermarias do HCM assim como, de outras unidades hospitalares.

O HCM localiza-se na cidade de Maputo, no Bairro Central entre as Avenidas Eduardo Mondlane, Salvador Allende, Tomás Nduda e Agostinho Neto. É um hospital de nível quaternário, o mais diferenciado do país, com estatuto de Hospital Universitário. Funciona com capacidade de 1487 camas oficiais e apresenta vários serviços clínicos como medicina, ortopedia, pediatria, cirurgia, ginecologia-obstetrícia, oncologia. Serve directamente a uma população de 1.684.142 habitantes da cidade de Maputo e Matola.

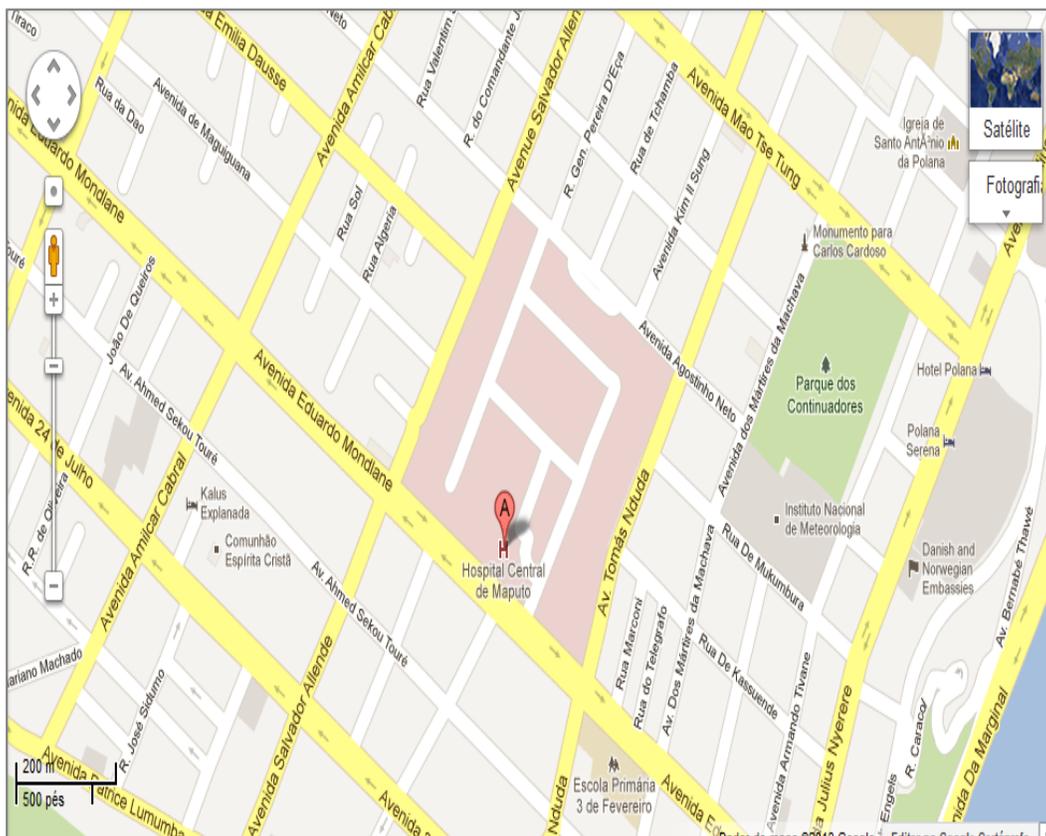


Figura 4: Ilustra o HCM, onde se localiza o BSHCM. Este é delimitado por quatro avenidas, sendo que o BSHCM esta em frente a Av. Agostinho Neto (Fonte: <http://maps.google.co.mz/maps>).

5.1 Local de Análise Laboratorial

As análises laboratoriais foram feitas no laboratório de Virologia Molecular do Instituto Nacional de Saúde (INS), localizado no recinto do Hospital Central de Maputo (HCM).

O Laboratório de Virologia Molecular do INS, é referência Nacional para o Diagnóstico Precoce Infantil de HIV-1, diagnóstico molecular de HIV-2 e HTLV, Carga Viral de HIV-1 e HBV. Para além destas actividades, o laboratório dedica-se na pesquisa de doenças virais, determinantes imunogenéticos das doenças virais, avaliação de tecnologias de diagnóstico e na formação dos técnicos de saúde.

6. Metodologia

6.1 Desenho de estudo

O estudo foi de carácter transversal, e todos participantes aprovados para o estudo foram administrados questionários (anexo 3), para a obtenção de dados sócio demográficos.

O recrutamento dos dadores foi de forma consecutiva, após a sua aprovação na etapa de inquérito (anexo 2), realizada no Banco de Sangue. Os critérios de inclusão usados para o estudo foram os mesmos que de elegibilidade do dador nos Bancos de Sangue (Anexo 3). Para que um dador seja elegível para doação de sangue, deve preencher as seguintes características:

- Estar bem de saúde;
- Ter idade entre 18 a 65 anos;
- Ter um peso igual ou superior a 50 Kg;
- Temperatura não superior a 37,5°C;
- Pressão arterial sistólica até 180mmHg e diastólica até 100mmHg;
- Hematócrito mínimo de 41% (sexo masculino) e 38% (sexo feminino);
- Hemoglobina mínima de 12,0 g/dl (homens) e 11,0 g/dl (mulheres)
- Não ter tomado aspirina em menos de 24 horas;
- Nunca ter sido excluído definitivamente para doação de sangue;
- Não ser usuário de drogas;
- Não ter feito transfusão há menos de um ano.

6.1.1 Tamanho da amostra e Variáveis do Estudo

Durante o período de Novembro de 2014 á Março de 2015, foram seleccionados 500 dadores de sangue de forma consecutiva, respeitando os critérios de inclusão acima descritos e consideradas as seguintes variáveis:

- Idade
- Género
- Cor de pele
- Profissão
- Tipo de dador
- Estado Civil
- Local de Residência
- Grau de escolaridade
- Genótipos de hepatite B
- Carga viral

6.1.2 Colheita de Amostras

Foram colhidos pelos enfermeiros do BSHCM, 8ml de sangue total de cada participante, usando tubos de vácuo com anticoagulante K₃EDTA, devidamente etiquetados com o nome, data, número do dador e código do estudo.

No final da colheita, as amostras eram enviadas ao Laboratório de Virologia Molecular do INS, em condições adequadas de biossegurança (em colmem), de modo a evitar qualquer contacto com o meio externo. No Laboratório as amostras receberam novos códigos, e foram processadas de modo a separar o plasma para a carga viral e sangue total para a genotipagem. Por fim, as amostras eram mantidas sob refrigeração á -80°C, até a data do processamento.

6.2 Análise Laboratorial da amostra

Todas amostras foram submetidas ao teste sorológico (ELISA) e, as amostras com resultado positivo neste teste, foram submetidas a genotipagem a carga viral.

6.2.1 Rastreo de Hepatite B

O rastreo, foi feito usando o kit comercial ADVANCED® HBsAg ELISA (Referência 361022, China), para a determinação qualitativa do HBsAg em soro ou plasma sanguíneo (Anexo 4).

6.2.2 Determinação da Carga Viral

A carga viral foi determinada usando o teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® versão 2.0 que consiste na amplificação do ácido nucleico *in vitro* para a quantificação do RNA/DNA de vírus no plasma humano. Este teste é baseado em três fases principais que incluem: preparação da amostra para a obtenção do ácido nucléico viral, transcrição reversa do RNA-alvo para a obtenção do DNA complementar (cDNA) por fim amplificação por PCR do cDNA alvo e detecção de sonda oligonucleotídica duplamente marcada e clivada específica do alvo

Para isso, primeiro colocou-se os clips de código de barras e os tubos-S na bandeja de amostras. De seguida as amostras e os controis (negativo, positivo-baixo e positivo-alto) foram descongelados, agitados por 10-20s no vortex e aliquotados 1100µl das respectivas amostras para os tubos-S nas posicoes 4-24 e também oscontrois nas posicoes 1, 2 e 3 respectivamente.

Depois seguiu-se com a amplificação, onde as cassetes (CS1) dos reagentes foram colocadas no COBAS Ampliprep da seguinte maneira: HBV v2.0 CS1 numa bandeja de reagentes na posição A, CS2, CS3 e CS4 noutra bandeja de reagentes nas posições B, C, D do COBAS Ampliprep. Colocou-se a bandeja de amostras nas posições F, G ou H, os SPU's nas respectivas bandejas e introduziu-se nas posições J, K ou L, a bandeja de tubos-K na posição M, N, O ou P no COBAS Ampliprep. E por fim a maquina Ampliprep e o TaqMan foi iniciada para a análise.

a. Interpretação dos resultados

Sequência alvo não detectada (TND) - sequência viral não detectada.

<20.000cp/ml - Resultado abaixo do limite de detecção, ácido nucleico detectado.

>20.000cp/ml - <10.000.000 cp/ml – Resultados dentro dos limites de detecção.

> 10.000.000 cp/ml - Resultado acima do limite de detecção.

* 1UI/mL= 5 Cópias/ mL

6.2.3 Genotipagem de HBV através do PCR com *primers* específicos

6.2.3.1 Extracção de ADN

O ADN genómico das amostras positivas para Hepatite B foi extraído do sangue total, usando o kit comercial “*QIAamp blood ADN extraction kit*” (Referência 51306, QIAGEN, Germany) de acordo com o manual do fabricante. E após a extracção as amostras de ADN foram conservadas a -2°C até a data de genotipagem.

Para o processo de extracção, primeiro efectuou-se a lise das partículas virais através da adição de 20 microlitros (µl) de proteinase K, 200µl de sangue total e 200µl de tampão de lise num tubo, e com a ajuda do vórtex os três componentes foram misturados por 15s, deixados a incubar á 56°C durante 10mim e depois centrifugada á 8.000 rpm por 1mim.

De seguida, adicionou-se 200µl de etanol absoluto ao tubo, este foi agitado em vortex por 15mim e centrifugado á 8.000 rpm durante 1mim. Esta solução foi depois transferida para uma coluna de eluição e novamente centrifugada á 8.000 rpm por 1mim.

Colocou-se a coluna num tubo colector, adicionou-se 500µl da solução AW1 e centrifugou-se á 8.000 rpm por 1mim, de seguida transferiu-se novamente a solução para outro tubo colector, de modo a fazer a segunda lavagem, adicionando-se 500µl da solução AW2 e então centrifugada á 14.000 rpm por 3mim, e 14.000 rpm por 1mim (O AW1 e AW2 permitem obter resultados com elevada sensibilidade e especificidade).

Depois de colocar a coluna num tubo de 1,5ml devidamente identificado, adicionou-se 100µl de água destilada ou tampão de eluição (AE), e foi incubada por 2mim á temperatura ambiente e centrifugou-se á 8.000 rpm por 2mim.

Por fim a coluna foi descartada e as amostras guardadas á -80°C até a data da genotipagem.

6.2.3.2 Mix para o PCR

A genotipagem de Hepatite B foi feita com base na técnica de PCR multiplex com *primers* específicos, descrito por Farazmandfar *et al.*, (2012). O mesmo preconiza que para cada amostra, o PCR será realizado com 2 conjuntos de *primers* específicos (Tabela 1).

O conjunto um (1) tem como finalidade detectar genótipos B, C, F e G e o conjunto dois (2) detectar os genótipos A, D, E e H (tabela 1).

Tabela 1. Sequência dos *Primers* específicos para a genotipagem de HBV

Primer	Sequência	Bandas a detectar
Conjunto 1		
Common2-F	5'CGTGTGCACTTCGCTTCACC 3'	B, C, F e G
F2-R	5'TCGATCCAGGTCATTGACCATC 3'	
G2-R	5'AGGCCATATGGCAAAGTTGTTC 3'	
B2-R	5'ACAGAATAGCTTGCCTTAGTGCC 3'	
C2-R	5'GCATTTGGTGGTCTGTAAGCGAT 3'	
Conjunto 2		
Common1-F	5'AGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGG3'	A, D, E, e H
E1-R	5'CTAGGGGCAAATATTCGTAGAGA3'	
H1-R	5'GTCCCATGCCCCCTTCTCGC 3'	
D1-R	5'AGGTGTCCTTGTTGGGATTGTAA3'	
A1-R	5'GGCAGGAGGAGGAATTGTTGA 3'	

De seguida a mistura foi feita com base nas concentrações e reagentes descritos na tabela 2, onde cada tubo continha 50µL da mistura da reacção.

Tabela 2: Master Mix para o conjunto 1 e 2 na genotipagem de Hepatite B

Reagentes	Vol (1x)	C. Final (22 Amostras)
Tampão 10x Taq amplification	5µL	110µL

dNTPs 10Mm	1µL	22µL
MgCl ₂ 25Mm	3µL	66µL
Set 1 (10µM) Mix	5µL	110µL
Taq AND polymerase 5U/µL	0,8µL	17,6µL
Água destilada	25,2µL	554,4µL
DNA	10µL	-
Total	50 µL	880µL

X- número de amostras a processar

A mistura foi, depois levada para amplificação no termociclador, obedecendo o programa de ciclagem da tabela 3:

Tabela 3: Condição do PCR para a amplificação do ADN

Etapa	Objectivo	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
1	Desnaturação inicial	95 °C	5min	1
2	Desnaturação	95 °C	1min	
3	Pareamento ou <i>annealing</i>	60 °C	1min	40
4	Extensão	72 °C	1min	
5	Extensão final	72 °C	5min	1

6.2.3.3 Electroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados foram sujeitos á electroforese em gel de agarose (2%), e as bandas visualizadas num transluminador de luz ultravioleta, sendo o tamanho dos produtos estimados de acordo com a cadeia de ADN de 100pb.

Para o gel de agarose, primeiro foi dissolvido o agarose em 100mL do tampão TBE (Tris Borate EDTA), aquecido no microondas e deixado a arrefecer até a uma temperatura suportável pelas mãos. Depois foi montado um suporte para o gel com o pente e verificado o equilíbrio.

De seguida adicionou-se 10µL do corante para cada 100ml de gel e este derramado sobre o suporte até uma altura de 5mm, depois deixado a endurecer e o pente retirado.

Foi adicionado no para filme, 2µL do Dye e acrescentado a elas 10µL de ladder somente nas primeiras duas gotas e depois misturado á 10µL do produto de PCR fazendo pipetagem reversa, e então adicionado esta solução aos poços.

A cuba de 80V foi ligada e deixou-se correr as bandas (tem uma cor amarela) até 10cm. O ADN sendo de carga negativa, irá migrar do polo negativo para o positivo.

O computador e o transluminador á ele conectado foi ligado, e com ajuda da espátula este gel foi transferido da cuba electroforética para o aparelho e de seguida fechado o compartimento.

Por fim, foi iniciado o programa *Quantity One*, accionado o comando *Expose* e a luz Ultra violeta (UV) de modo que se vejam as bandas de ADN.

As figuras abaixo mostram as bandas de interesse que foram esperadas para cada genótipo de Hepatite B.

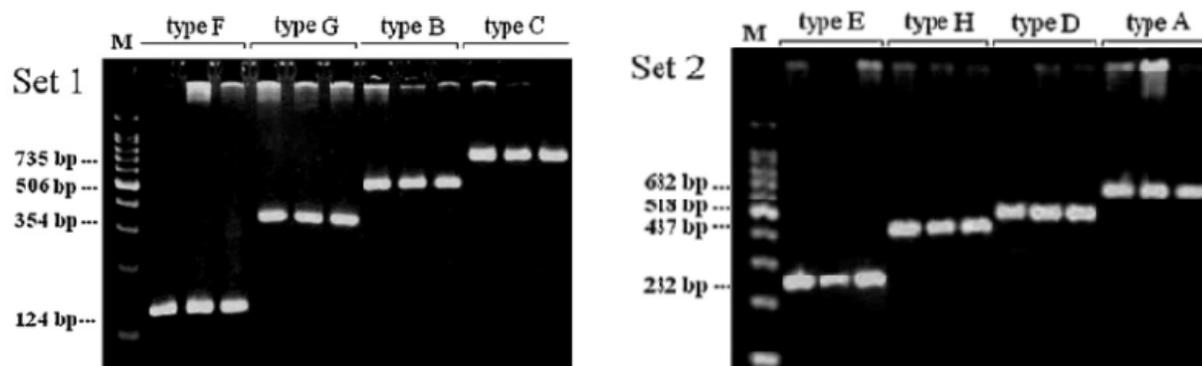


Figura 5: Imagem de gel de agarose com as bandas para cada genótipo. M representa o peso molecular, e os tipos de genótipos estão representados á direita da letra M (Fonte: Farazmandfar *et al.*, 2012)

6.3 Análise de dados

Os resultados foram organizados numa base de dados Excel tendo em conta as variáveis do estudo, e de seguida analisados pelo programa estatístico *SPSS, versão 20.0*. Posteriormente, calculou-se a frequência e as percentagens das variáveis do estudo com base no teste chi-quadrado. Para todas análises considerou-se um nível de significância menor que 0.05 ($p < 0.05$).

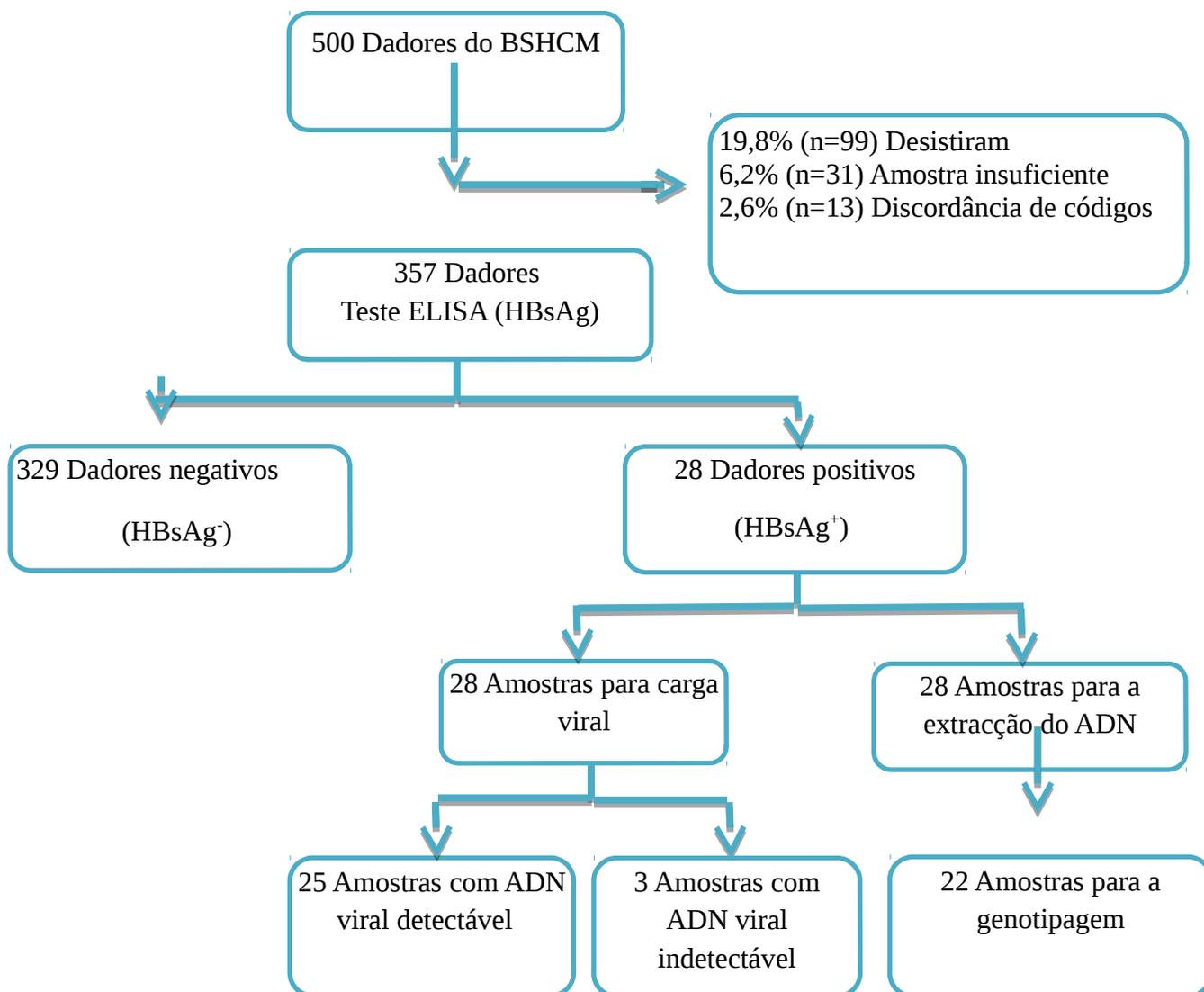
6.4 Considerações Éticas

Este estudo é componente de um trabalho intitulado “*Diversidade Genética e residual de transmissão de HIV,HBV,HCV por Transfusão Sanguínea em Moçambique*”, que teve aprovação por parte do Comité Nacional de Bioética para a Saúde do Ministério da Saúde (Anexo 5).

O recrutamento foi de carácter voluntário, e todos os participantes foram informados sobre o estudo e os que aceitaram participar, assinaram uma Folha de Consentimento Informado (anexo1). Todas as amostras dos participantes do estudo, foram alíquotadas utilizando apenas o código de estudo como identificação. Os questionários contendo os dados dos participantes e o código do estudo, foram manuseados apenas pelo investigador envolvido e arquivado em lugar seguro.

7. Resultados

No período compreendido entre Novembro de 2014 á Março de 2015, foram recrutados de forma voluntária 500 dadores de sangue. Dos quais, 19,8% (n=99) desistiram de participar do estudo e 8,8% (n=44) foram excluídos (6,2% por apresentarem sangue insuficiente e 2,6% por perda de ligação entre o código do estudo e do banco de sangue). Assim, foram incluídos 357 dadores de sangue conforme o esquema 1.



Esquema 1. Fluxograma dos testes feitos nos dadores de sangue. Dos 500 dadores iniciais, 357 foram submetidos á testes sorológicos dos quais, 329 foram negativos e 28 dadores submetidos a análise de carga viral e extracção de ADN.

7.1 Características sócio- demográficas da população de estudo

Dos 357 dadores de sangue que participaram do estudo, a média da idade foi de 31 anos. A maioria dos dadores pertenciam ao sexo masculino (76,5%), e 74,8% eram dadores repositores. Quanto á raça, 94,1% eram de pele negra e 0,8% de pele branca (Tabela 4).

Em relação ao estado civil, observou-se que 51% dos entrevistados eram casados ou relataram união marital e 0,8% eram viúvos. A maioria dos dadores afirmaram residir na Cidade de Maputo (36,1%) e 4,8% em outras províncias de Moçambique (Tabela 4).

No nível de escolaridade predominou o secundário/técnico com 64,4% dadores e 0,6% não apresentavam nenhum nível de escolaridade. As profissões dos indivíduos foram agrupadas em seis categorias onde, 32,8% pertenciam á função pública e os desempregados apresentaram a menor frequência com 1,4% (Tabela 4).

7.2 Frequência de HBV em dadores do BSHCM

A prevalência do HBV encontrada neste estudo foi de 7,8%. A maior parte dos dadores positivos eram repositores (74,2%), do sexo masculino (82,1%) com uma faixa etária de 25-34 (Tabela 5).

Dos indivíduos positivos, a maior percentagem observou-se nos casados (53,6%), no nível secundário/técnico com 57,1% e nos dadores de pele negra (96,4%). A maioria dos dadores positivos viviam na Cidade de Maputo (50%) destes e 32,1% eram trabalhadores de conta própria (Tabela 5).

De todos factores sócio- demográficos estudados no presente estudo (idade, sexo, tipo de dador, cor de pele, grau de escolaridade, estado civil, local de residência e profissão), nenhum mostrou associação significativa a infecção pelo HBV (Tabela 5).

Das 28 amostras positivas no teste sorológico, 89,3% (n=25) amostras tiveram a carga viral detectada e 10,7% (n=3) amostras a carga viral estava indetectável, como ilustra a tabela 5.

Tabela 4. Análise das características sócio- demográficas de dadores do BSHCM

Características	Total	%
<i>Faixa etária</i>		
18-24	98	27,5
25-34	149	41,7
35-44	69	19,3
> 45	41	11,5
<i>Género</i>		
Masculino	273	76,5
Feminino	84	23,5
<i>Tipo de Dador</i>		
Repositor	267	74,8
Voluntário	90	25,2
<i>Cor da pele</i>		
Negra	336	94,1
Mista	18	5
Branca	3	0,8
<i>Grau de escolaridade</i>		
Analfabeto	2	0,6
Primário	68	19
Secundário/Técnico	230	64,4
Superior	57	16
<i>Estado civil</i>		
Solteiro/a	167	46,8
Casado/a	182	51
Divorciado/a	5	1,4
Viúvo/a	3	0,8
<i>Local de Residência</i>		
Maputo-Cidade	211	59,1
Maputo-Província	129	36,1
Outras Províncias de Moçambique	17	4,8
<i>Profissão</i>		
Estudantes	80	22,4

Conta- Própria	86	24,1
Desempregados	5	1,4
Domésticas	27	7,6
Função-Pública	117	32,8
Sector-Privado	42	11,7

Tabela 5. Prevalência do HBsAg em dadores de sangue do BSHCM

Características	HBsAg⁻ n=329	HBsAg⁺ n= 28	Total	P_{Value}
Faixa etária				
18-24	89 (27,1)	9 (32,1)	98 (27,5)	0,577
25-34	137 (41,6)	12 (42,9)	149 (41,7)	
35-44	63 (19,1)	6 (21,4)	69 (19,3)	
≥45	40 (12,2)	1 (3,6)	41 (11,5)	
Género				
Masculino	250 (76)	23 (82,1)	273 (76,5)	0,461
Feminino	79 (24)	5 (17,9)	84 (23,5)	
Tipo de Dador				
Repositor	244 (74,2)	23 (82,1)	267 (74,8)	0,351
Voluntário	85 (25,8)	5 (17,9)	90 (25,2)	
Cor da pele				
Negra	309 (93,9)	27 (96,4)	336 (94,1)	0,818
Mista	17 (5,2)	1 (3,6)	18 (5,0)	
Branca	3 (0,9)	--	3 (0,8)	
Grau de escolaridade				
Analfabeto	2 (0,6)	--	2 (0,6)	0,589
Primário	60 (18,2)	8 (28,6)	68 (19,0)	
Secundário/Técnico	214 (65)	16 (57,1)	230 (64,4)	
Superior	53 (16,1)	4 (14,3)	57 (16,0)	
Estado civil				
Solteiro/a	154 (46,8)	13 (46,4)	167 (46,1)	0,868
Casado/a	167 (50,8)	15 (53,6)	182 (51,0)	
Divorciado/a	5 (1,5)	--	5 (1,4)	
Viúvo/a	3 (0,9)	--	3 (0,8)	
Local de Residência				
Maputo- Cidade	197 (59,9)	14 (50)	211 (59,1)	0,250
Maputo-Província	118 (35,9)	11 (39,3)	129 (36,1)	
Outras Províncias de Moçambique	14 (4,3)	3 (0,9)	17 (4,8)	
Profissão				

Estudantes	72 (21,9)	8 (28,6)	80 (22,4)	0,702
Conta- Própria	77 (23,4)	9 (32,1)	86 (24,1)	
Desempregado	5 (1,5)	---	5 (1,4)	
Domésticas	25 (7,6)	2 (7,1)	27 (7,6)	
Função-Pública	111 (33,7)	6 (21,4)	117 (32,8)	
Sector-Privado	39 (11,9)	3 (10,7)	42 (11,8)	

Características	Total	%
<i>Valores de carga viral (UI/mL)</i>		
Indetectável (TND)	3	10,7%
<2000	17	60,7%
>2000	3	10,7%
≥20,000	5	17,9%

Continuação (Tabela 5)

7.3 Genótipos de Hepatite B

Das 28 amostras positivas para o antígeno HBsAg, conseguiu-se extrair e amplificar o ADN viral de 22 através da técnica de PCR, as quais foram submetidas a genotipagem, onde não foi possível identificar os genótipos. Foi feito o gel de agarose porém, as bandas desejadas não foram observadas.

8. Discussão

A maioria dos participantes foi do sexo masculino (76,5%), com uma média de 31 anos de idade. Esta frequência de género foi verificada também no estudo realizado por Cunhas *et al.*, (2007) no mesmo banco de sangue (BSHCM), onde constatou que 78,1% dos dadores eram do sexo masculino. Também foi verificado no estudo realizado em Tete por Stokx *et al.*, (2011), onde 88% era do sexo masculino e a idade média era de 29 anos. Assim sendo, o resultado encontrado reflecte o perfil de um banco de sangue, onde a maior parte dos dadores são indivíduos jovens do sexo masculino. Este facto, é sustentado por Noubiap *et al.*, (2013) e Moukoko *et al.*, (2014) ao referirem que, os homens são considerados os mais adequados para a doação de sangue pois, as mulheres perdem o sangue devido á ciclo menstrual, a gravidez e a amamentação.

Por outro lado, Cunhas *et al.*, (2007) também verificaram que, a maioria dos dadores foi da Cidade de Maputo, com um nível secundário/técnico e pele negra. Portanto, esta tendência pode-se justificar pela distância que os indivíduos percorrem até ao Banco de Sangue, sendo que é mais fácil e perto para os indivíduos da Cidade de Maputo se dirigirem ao Banco de sangue do HCM do que indivíduos da Província de Maputo e por outro lado, o nível de escolaridade dos dadores pode ter influenciado na consciencialização da importância de uma doação. E a maioria era de nacionalidade Moçambicana razão pela qual a pele negra foi a mais predominante.

No presente estudo observou-se que a prevalência da infecção por HBV foi de 7,8%. Esta prevalência foi menor do que a já descrita no nosso país em 2007 e 2011 por Cunha *et al.*, (2007) e Stokx *et al.*, (2011), onde a taxa situou-se em torno de 10,6%. Esta diferença pode estar associada a diversos factores como, o tamanho maior da amostra usada por Cunha *et al.*, (2007) e Stokx *et al.*, (2011), onde recrutaram 2887 e 758 dadores respectivamente, contra 500 dadores neste estudo; a investigação de dadores excluídos da doação de sangue por diversos motivos, o que não se verificou no presente estudo, factor que pode ter reduzido a probabilidade de obter-se uma prevalência semelhante ou, maior da observada nos estudos dos autores acima mencionados; o espaço temporal que separa os três estudos, é provável que as medidas de prevenção e controlo demonstrados pela distribuição de panfletos e brochuras feitas pelo BSHCM podem ter melhorado, diminuindo assim a prevalência do HBV nos dadores.

Apesar da prevalência encontrada no presente estudo, ter sido menor que a observada em 2007 e 2011 em Moçambique e em alguns países Africanos, como Senegal (12,7%) e Nigéria (18,6%) (Buseri *et al.*, 2009; Tapko *et al.*, 2009), ela foi maior que a reportada em dadores indianos em 2012, que se estimou em 3,5% (Lavanya *at al.*, 2012). Entretanto, a localização geográfica pode estar associada a esta prevalência, sendo que a Índia localiza-se em uma região de prevalência intermédia (2-7%), enquanto Senegal, Nigéria e Moçambique situam-se na região de prevalência elevada (> 8%).

Os dadores foram distribuídos em quatro faixas etárias, sendo que os de 25-34 anos apresentaram maior prevalência á infecção por HBV, tendo-se verificado uma diminuição da frequência de indivíduos positivos com o aumento da idade. O mesmo facto, foi observado por Cunha *et al.*, (2007) e Stokx *et al.*, (2011), onde a maior prevalência esteve em dadores de 20-29 anos e 27-29 respectivamente, o que pode se considerar dentro do intervalo verificado no presente estudo. Esta tendência reflecte uma transmissão recente, devido ao comportamento de alto risco durante a juventude como, múltiplos parceiros sexuais, consumo de drogas endovenosas e o álcool (Okwesili *et al.*, 2014). Este facto é divergente ao demonstrado por Kramvis *et al.*, (2007) ao afirmar que, a prevalência de HBV aumenta com a idade, sendo que atinge os níveis máximos na faixa etária dos 40-67 anos.

Por outro lado, verificou-se uma prevalência elevada nos dadores repositores em relação aos voluntários. Este resultado vai de acordo com o estudo realizado por Cunha *et al.*, (2007) e Stokx *et al.*, (2011). Isto, pode ser explicado pelo facto de dadores voluntários doarem regularmente e, ser considerado o seu sangue seguro por não possuírem um comportamento de alto risco enquanto, dadores repositores doam por motivos urgentes e familiares portanto, são mais propensos a estar infectados por algum patógeno (Noubiap *et al.*, 2013; Buseri *et al.*, 2009; Lavanya *et al.*, 2012).

Os dadores de pele negra e de nível secundário/técnico apresentaram uma prevalência elevada de HBV, como também foi observado no estudo realizado por Custer *et al.*, (2015). Mas, são dados discordantes com os resultados achados pelo Cunha *et al.*, (2007) onde, a maior prevalência foi ao nível primário e analfabeto. Assim, nota-se que o nível de escolaridade dos dadores não influenciou significativamente para a consciencialização de cuidados preventivos contra a infecção pelo vírus.

O facto do presente estudo ter obtido uma prevalência de HBV elevada em dadores da Cidade de Maputo e casados, como é o caso do estudo realizado pelo Cunha *et al.*, (2007) no mesmo banco de sangue, este facto, pode ser justificado pelo contacto com indivíduos oriundos de países vizinhos de prevalência elevada, em especial a África do sul, onde a prevalência é cerca de 22,9% (Lukhwareni *et al.*, 2009).

De todos factores de risco analisados no presente estudo, nenhum esteve significativamente associado á infecção pelo HBV, facto este verificado no estudo realizado em 2012 na Índia por Lavanya *et al.*, (2012) e em 2014 no Camarões por e Moukoko *et al.*, (2014) em dadores de sangue. Contrariamente ao observado no estudo de Cunha *et al.*, (2007) e colaboradores, estes demonstraram associação entre o nível de escolaridade, e o local de residência á infecção por HBV nos dadores de sangue. Facto que pode ser explicado, pela descentralização da cidade associado ao aumento do nível académico.

Em relação a carga viral, ela foi detectada em 89,3% das amostras HBsAg positivas. Este resultado esteve próximo do estudo desenvolvido em 2009 no Brasil por Alcalde *et al.*, (2009), onde observaram uma frequência de carga viral em torno de 68%. Estes resultados contrariam o

encontrado no estudo também realizado em 2009 no Brasil por Nita *et al.*, (2009), onde a frequência da carga viral foi baixa, estando em torno de 19,5%. Por outro lado, 10,7% das amostras apresentavam o ADN viral indetectável, provavelmente devido ao teste usado que, possui um limite de detecção de 20 cópias/mL -10 milhões de cópias/mL.

Cerca de 12,6% dadores brasileiros em 2009 tiveram a carga viral acima de 2000UI/mL (Nita *et al.*, 2009), resultado não distante também foi encontrado nos dadores do presente estudo (10,7%) no entanto, dadores que apresentam estes níveis estão associados ao maior risco de desenvolver cirrose e HCC. Por outro lado, a maioria dos dadores tiveram a carga viral abaixo de 2000UI/mL (60,7%) assim, são considerados portadores inactivos de HBV, onde o HBsAg está presente e o HBeAg está ausente no seu organismo, estes dadores não são recomendados ao tratamento mas sim, ao acompanhamento médico (Balanzo e Enriquez, 2007).

No presente estudo não foi possível identificar nenhum genótipo de Hepatite B. Vários factores podem ter influenciado este resultado como, o tipo de material biológico usado para o procedimento (o sangue total), sendo que muitos estudos têm usado o plasma para a genotipagem como é o caso dos estudos feitos pelo Cunha *et al.*, (2007) e Farazmandfar *et al.*, (2012). Outro factor é a carga viral, que foi baixa na maioria das amostras e falhas humanas.

Por outro lado, o PCR usado e as concentrações dos reagentes, também podem ter influenciado para a obtenção destes resultados pois, a maior parte dos estudos tem usado outras técnicas como o PCR-RT, Colorímetro, Polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) e o Ensaio de linha em sonda (LipA), como é o caso do estudo realizado em Moçambique pelo Cunha *et al.*, (2007), e por Valente *et al.*, (2010) em Angola.

Segundo, Bonin *et al.*, (2004) e Hess *et al.*, (2012), as falhas no processo de genotipagem são originadas em cada passo do processo (extração de DNA, análise molecular), e por outros factores como, as causas humanas e técnicas (artefactos de amplificação, material usado, qualidade e quantidade do ADN).

9. Conclusão

- Os factores sócio- demográficos estudados, nenhum demonstrou associação significativa á infecção pelo HBV;
- A prevalência do HBV encontrada foi de 7,8%, o que revela um nível elevado para a infecção de HBV em dadores do BSHCM;
- A carga viral foi observada em 89,3% amostras, e 10,7% das amostras foram indetectáveis;
- Não se identificou nenhum genótipo de hepatite B.

10. Recomendações

- Recomenda-se a realização de carga viral antes do processo de genotipagem;
- Para os investigadores sugere-se, a realização de estudos similares e com um tamanho amostral maior, acrescentando factores de risco associados ao HBV tais como: tatuagem, múltiplos parceiros e consumo de álcool ou de drogas para melhorar a avaliação da prevalência.

11. Limitações

- Perda de dadores durante o estudo, um facto que influenciou nos resultados do estudo;
- A falta de percepção por parte dos dadores, provavelmente devido ao nível de escolaridade dos mesmos;
- O factor tempo de estudo.

12. Comentário

Este é o primeiro estudo que aborda questões virológica nos dadores de sangue do BSHCM e investiga mas uma vez os genótipos existentes no País. Os resultados demonstrados revelam-se interessantes sob ponto de vista de prevenção e transmissão do HBV por transfusões sanguíneas.

13. Referências Bibliográficas

1. Aparicio, R.M.R., H.A.V. Salazar, G.A. Ozores, e M. R. Tachiquín (2014). Serotypes and Genotypes of the Hepatitis B Virus in Latim America, Science Domain, 4 (8): 1307-1318
2. Alcalde, R., F.L. Melo, A. Nishiya, S.C. Ferreira, M.D. Júnior, S.S. Fernandes, L.A. Marcondes, A.J. Duarte e J. Casseb (2009). Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes

and Viral Load Levels in BRAZILIAN Chronically Infected Patients in São Paulo City,
Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 51(5):269-272

3. Balanzo, J e J. Enriquez (2007). Hepatitis B vírus, 1ª edição, Morge Médica, 193Pp
4. Bonin A., E. Bellemain, P.B. Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann e P. Taberlet (2004). How to track and assess genotyping errors in population genetics studies, *Molecular Ecology*, 13:3261-3273
5. Buseri, F.I., M.A Muhibi e Z.A Jeremiah (2009). Sero-epidemiology of transfusion-transmissible infectious diseases among blood donors in Osogbo, south-west Nigeria, *Blood Transfus*; 7:293-299
6. Conjeevaram, H.S. e A.S.F Lok (2003). Management of chronic hepatitis B, *Journal of Hepatology* 38:90-103
7. Chu, C.J. e A. F. Lok (2002). Clinical Significance of Hepatitis B Virus Genotypes, *Hepatology*, 35:922-929
8. Cunha, L., C. Plouzeau, P. Ingrand, J.P. Gudo, I. Ingrand e J. Mondlane, (2007). Use of replacement blood donors to study the epidemiology of major bloodborne viruses in the general population of Maputo- Mozambique, *Journal of Medical Virology*, 79 :1832–1840
9. Custer, B., D. Kessler, F. Vahidnia, G. Leparc,4 David E. Krysztof, B. Shaz, H. Kamel, S. Glynn, R.Y. Dodd, S. L. Stramer (2015). Risk factors for retrovirus and hepatitis virus infections in accepted blood donors, *Transfusion* 55:1098-1107

10. Deny, P. e F. Zoulim (2010). Hepatitis B virus: From Diagnosis to Treatment, *Pathology Biology* 58:245-253
11. Erhardt, A., D. Blondin, K. Hauck, A. Sagir, T. Kohnle, T. Heintges e D. Haussinger, (2005). Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D *Hepatitis*, 54:1009-1013.
12. Farazmandfar, T., M.R. Haghshenas, G. Janbabai, H. Azadeh, R. Sharifian e M. Taghipour (2012). A Rapid and Reliable Genotyping Method for Hepatitis B Virus Genotypes (A-H) using type-specific primers, *Journal of Virological Methods*, 181:114-116
13. Guettouche, T., e H.J. Hnatyszyn (2005). Chronic hepatitis B and viral genotype: the clinical significance of determining HBV genotypes, *International Medical*, 10:593-604
14. Hannoun, C., H. Norder e M. Lindh (2000). An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam, *Journal of General Virology*, 81: 2267–2272
15. Hatzakis, A., E. Magiorkinis e C. Haida (2006). HBV virological assessment, *Journal of Hepatology*, 44:71-76
16. Hess A.M., J.G. Rhydderch, L. Leclair, R.M. Buckley, M. Kawase e L. Hauser (2012). Estimation of genotyping error rate from repeat genotyping, unintentional recaptures and known parent–offspring comparisons in 16 microsatellite loci for brown rockfish (*Sebastes auriculatus*), *Molecular Ecology Resources*, 10Pp

17. Hongbao M., K.J. Shieh e S.L. Lee (2006). Study of ELISA Technique, Nature and Science, 4(2):36-37
18. Hubschen, J.M., I.E. Andernach e C.P. Muller (2008). Hepatitis B virus Genotype E Variability in Africa, Journal of Clinical Virology 43: 376–380
19. IARC (2010). Hepatitis B Virus, Monographs Eval Carcinog Risks Hum, 93- 135pp
20. Kao, J.H (2002a). Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics, Journal of Gastroenterology and Hepatology. 17:643-650
21. Kao, J.H. (2011b). Molecular Epidemiology of Hepatitis B virus, The Korean Journal of Internal Medicine Vol. 26 (3)255-261
22. Kao, J.H., e [D.S Chen](#) (2002). Global control of hepatitis B virus infection, The Lancet Infectious Diseases, 2:395-403
23. Kew, M.C. (2010). Epidemiology of Chronic Hepatitis B Virus Infection, Hepatocellular Carcinoma, and Hepatitis B virus-induced Hepatocellular Carcinoma, Pathologies Biology 58:273-277
24. Knipe, M.D e P.M Howley (2007). Fields Virology, 15^a edição, Walters Kluwer: Lippincott Willians e Wilkins, 2889-2899Pp.
25. Klingler, C., A.I. Thoumi e V.S. Mrithinjayama (2012). Cost-effectiveness Analysis of an Additional Birth dose of Hepatitis B Vaccine to Prevent Perinatal Transmission in a Medical Setting in Mozambique, Elsevier 31:252-259

26. Kramvis, A. e M.C Kew (2007). Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes, *Hepatology Research*, 37: 9-19
27. Lai, C.L., [V. Ratziu](#), [M.F. Yuen](#) e [T. Poynard](#) (2003). *Viral Hepatitis B*, 362:2089-2094
28. Lavanya V., T. Viswanathan, S.A Malar, A. Malarvizhi e K. Moorthy (2012). Prevalence of hepatitis B virus infection among blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen, *International Journal of Medicine and Medical Sciences Vol. 4(6):128 - 137*
29. Liaw, Y.F. e C.M. Chu (2009). Hepatitis B virus infection, *Lancet* 373:582-592
30. Liu, C.J., J.H. Kao, P.J. Chen, M.Y. Lai e D.S. Chen (2002). Molecular Epidemiology of Hepatitis viral Serotypes and Genotypes in Taiwan, *Jornal of biomedical Science* 9:166-170
31. Locarnini. S., e F. Zoulim (2010). Molecular Virology of Hepatitis B Virus, *International Medical*, 3:3-14
32. MISAU (2001). Manual de Vigilância Epidemiológica para o Nível Distrital, v.1, 110pp
33. Moukoko, C.E., F.N Sack, E.G. Same, M. Mbangue e L.G. Lehman (2014). HIV, HBV, HCV and T. Pallidum infections among blood donors and Transfusion-related complications among recipients at the Laquintinie hospital in Douala, Cameroon, *BMC Hematology*
34. Murray, P.R., K.S. Rosenthal e M.A. Pfauer (2007). *Microbiologia Médica*. 7ª ed, F.L. Sevier, Madrid 675-690 Pp.

35. Nita, M.E., N.G. Junior, H. Cheinquer, G. Itaiier, E.S. Araujo, P. Mantilla, N. Balt e P.L. Lotufo (2009). Patterns of viral load in chronic hepatitis B patients in Brasil and their association with ALT levels and HBeAg status, *Annals of Hepatology* 8:339-345
36. Noubiap, J.J., W.Y.A. Joko, J.R. Nansseu, U. Tene e C. Siaka (2013). Sero-epidemiology of Human Immune Deficiency Virus, Hepatitis B and C Viruses, and Syphilis Infections Among first-time Blood Donors in Ede´a, Cameroon, *International Journal of Infectious Diseases*, 832-837 Pp.
37. Norder, H., A.M. Courouc e L.O. Magnius (1992). Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes, *Journal of General Virology*, 73:3141-3145
38. Ott, J.J., G.A. Stevens, J. Groegerb e S.T. Wiersma (2012). Global Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection: New Estimates of age-specific HBsAg Seroprevalence and Endemicity, *Vaccine*, 30:2212-2219
39. Okwesili A., U. Ismail, A. Wase, B. Hauwa, E. Osaro e O. Festus (2014). Prevalence of transfusion -transmissible hepatitis B infection among blood donors in Sokoto, North Western, Nigeria, *Health Sciences* 1(4): 113-118
40. Perrillo, Robert (2009). Benefits and Risks of Interferon Therapy for Hepatitis B, *Hepatology*, 49:103-111
41. Pompanon F., A. Bonin, E. Bellemain e P. Taberlet (2005). Genotyping Errors: Causes, Consequences and Solutions, *Nature genetics* 6: 847-859

42. Pujol, F.H, M.C. Navas, P. Hainaut e I. Chemin (2009). Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma, *Cancer letters*, 1-9pp
43. Saeed, U., Y. Waheed e M. Ashraf (2014). Hepatitis B and hepatitis C viruses: a review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2):88-96
44. Seeger, C., e W.S. Mason (2000). Hepatitis B Virus Biology, *Microbiology and Molecular biology*, 64 (1): 51-68
45. Semá, C.A. (2011). Estudo dos aspectos soro epidemiológicos e imunológicos da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) atendidos no centro de saúde do alto-maé, Maputo-Moçambique, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
46. Souza, R. e G.R. Foster (2004). Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B, *journal of the royal society of medicine* 97(7): 318–321
47. Sofian, M., A. Aghakhani, N. Izadi, M. Banifazl, E. Kalantar, A. Eslamifar e A. Ramezani (2010). Lack of occult hepatitis B virus infection among blood donors with isolated hepatitis B core antibody living in an HBV low prevalence region of Iran, *International Journal of Infectious Diseases* 14:308-310
48. Stokx, J., P. Gillet, A. Weggheleire, E.C. Casas, R. Maendaenda, A.J. Beulane, I.V. Jani, S. Kidane, C.D. Mosse, J. Jacobs e E. Bottieau (2011). Sero-prevalence of transfusion-transmissible infections and evaluation of the pre-donation screening performance at the Provincial Hospital of Tete, Mozambique, *BMC Infectious Diseases*, 11Pp
49. Tapko, J.B., P. Mainuka and A.J. e Diarra-Nama (2009). Status of Blood Safety in the WHO African Region: Report of the 2006 survey, Brazzaville

50. Valente, Fatima., B.V Lago, C.A.V Castro, A.J Almeida, S.A Gomes e C.C Soares (2010). Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda-Angola, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 105 (8): 970-977

51. WHO (2002). Hepatitis B, 76pp

52. WHO (2012). Values and Preferences report: Based on interviews with community members affected by and providers working on viral hepatitis,16Pp

53. Zhang, Y., T. Wanga, R. Zhao, F. Chen, K. Abe e X. Jin (2013). The Response to Interferon is Influenced by Hepatitis B virus Genotype in vitro and in vivo, Virus Research 171:65-70

54. Zollner., B., J. Petersen, E.P. Stockl, J. Kletzmayer, M. Sterneck, L.Fischer, M. Schroter, R. Laufs, e H.H. Feucht (2004). Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. Hepatology 39:42-5

Anexo

Anexo1: Folha de Consentimento Informado

MINISTÉRIO DA SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE

**Frequência, Caracterização Genotípica e Viroológica de Vírus de Hepatite B em Dadores de
sangue do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo**

Eu confirmo que li e entendi a informação do participante, que explica os objectivos e a natureza do estudo e possíveis riscos, e estes foram detalhadamente explicados.

1. Antes de assinar a folha de Consentimento informado, eu tive a oportunidade de pensar sobre a minha participação e de fazer as perguntas relacionadas com possíveis danos físicos ou mentais que poderei vir a sofrer como resultado da participação e recebi respostas satisfatórias.
2. Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu sou livre para desistir a qualquer momento, por qualquer razão sem que a minha relação com o hospital seja afectada.
3. Eu entendo que as informações sobre a minha história, colhidas durante o estudo, poderão ser consultadas por pesquisadores associados, autoridades de vigilância sanitária e epidemiológica.
4. Eu dou minha permissão para que os dados desta pesquisa sejam publicados sem que minha identificação seja divulgada.
5. Eu entendo que caso tenha qualquer dúvida relacionada com a minha participação nesta pesquisa, deverei entrar em contacto com a Flora Mula pelo telefone 823717354
6. Eu declaro que recebi uma cópia da folha do consentimento informado e da folha de informação do participante, e eu concordo em participar neste estudo.

Nome do Dador

Data

__/__/2015

Nome da pessoa que colhe o consentimento

Data

__/__/2015

Nome do Investigador Principal

Data

__/__/2015

Anexo 2: Questionário usado no pré-inquérito nos Bancos de Sangue

Questionário	Resposta		Se sim, especificar se necessário
	Sim	Não	
Perguntas de exclusão definitiva*			
Tem idade superior a 65 anos?			
Tem alguma doença sem cura (crónica)?			
Alguma vez foi suspeito de ter HIV?			
Alguma vez teve Hepatite/Icterícia?			
Alguma vez teve doença venérea?			
Pertence a um grupo de risco de infecção por HIV (ex.: Injecta-se drogas, tem relações sexuais ocasionais sem protecção, fez vacinas tradicionais com lamina usadas por mais de uma pessoa, transfusões repetidas, etc.)?			
Perguntas de exclusão temporária**			
Sabe que uma pessoa com HIV/SIDA não pode doar sangue?			
Tem doenças do Sistema Cardiovascular (ex.: Dor precordial)?			
Tem doenças do Sistema Respiratório (ex.:Asma)?			
Tem doenças do sistema Gastrintestinal (ex.:Úlcera péptica)?			
Tem doenças do Sistema Musculoesquelétrico/Articular?			
Tem doenças do Sistema Genitourinário?			
Tem doenças do Sistema Endócrino (ex.:Diabetes)?			
Tem doenças do sistema Imunitário (Ex.:Alergias)?			
Tem doenças do Sangue (ex.:Hemofilia)?			
Tem febre?			
Está grávida (para mulheres)?			
Está a tomar algum medicamento?			
Foi vacinado nas últimas 4 semanas?			
Foi operado nos últimos 6 meses?			
Alguma vez foi-lhe recusado doar sangue?			
EXAME FÍSICO			
			Sim
Verifica se tem sinais de doença infecciosa.			
Tem tensão arterial superior 150/100mmHg ou inferior a 90/70mmHg?			
Tem pulso superior a 120 bpm ou inferior a 60bpm?			
Tem Peso inferior a 50Kg?			
Tem Hemoglobina inferior a 12,5 gr/dl?			

(*) INFORMAR AO DADOR QUE NUNCA MAIS PODERÁ DOAR SANGUE EM LUGAR ALGUM.

() RESOLVIDO O “CASO” VOLTA A DOAR, MAS PODERÁ SER EXCLUÍDO DEFINITIVAMENTE, SE O CLÍNICO ASSIM DECIDIR.**

Anexo 3: Ficha de Dados Demográficos

(Assinatura do paciente)

(Assinatura do entrevistador)

Anexo 4.

Teste ELISA

É um teste que permite a detecção de antígeno-anticorpos específicos no plasma sanguíneo. É muito sensível e com especificidade de 99% para amostras de plasma (Hongbao *et al.*, 2006)

Procedimentos

- Adicionar 25µl de diluente da amostra a cada poço da placa
- Adicionar 75µl da amostra a cada poço e 75µl do controle negativo aos poços A1 e B1 e 75µl controle positivo ao poço C1.
- Incubar a placa durante 60 minutos a 37°C
- Adicionar 50µl de conjugado a cada poço
- Incubar a placa durante 30 minutos a 37°C
- Lavar a placa 5 vezes a placa com a solução de lavagem
- Adicionar 100µl da solução de substrato (Cor A e B) a cada poço
- Incubar novamente a placa durante 30 minutos a 37 °C enquanto se desenvolve a cor

- Adicionar 50µl da solução de paragem
- Fazer a leitura da placa a 450nm.

Resultados

1. Cálculo do controle negativo

Valor de Cut-off $\hat{=}$ $\frac{\text{média da absorvância para dois controles negativos}}{2} + 0,05$

2. Interpretação dos resultados

Positiva, se a amostra apresentar uma absorvância superior ou igual ao valor do Cut-off.

Negativa, se a amostra apresentar uma absorvância inferior ao valor do Cut-off.

Anexo 5. Aprovação do Comité Nacional de Bioética para Saúde do Ministério da Saúde


REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exma Senhora
Dr. Nédio Mabunda
INS

Ref: 263/CNBS/13 **Data 25 de Agosto de 2014**

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

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

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

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

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

Todavia, o CNBS informa que:

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


REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exma Senhora
Dr. Nédio Mabunda
INS

Ref: 263/CNBS/13 **Data 25 de Agosto de 2014**

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

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

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

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

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

Todavia, o CNBS informa que:

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

Com as nossas mais cordiais saudações,

O Presidente

Dr. João Fernando Lima Schwalbach



ENDEREÇO: MINISTÉRIO DA SAÚDE C. POSTAL 264 Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allenô MAPUTO – MOÇAMBIQUE	Telefones: 430814427131(4) Telex: 6-339 MISAU MO FAX: 258 (1) 426547 258 (1) 33320
--	---