

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Deteção do vírus da hepatite B e identificação de genótipos em  
grupos populacionais potencialmente expostos a infeções  
virais**

Carolina Lourenço Silva

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:

Investigadora Doutora Elizabeth Pádua - INSA

Professora Doutora Maria Teresa Rebelo - FCUL

# Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me apoiaram e incentivaram para a conclusão deste estudo.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Elizabeth Pádua pela oportunidade de realizar este projeto, pela sua orientação, conhecimentos científicos transmitidos, apoio e disponibilidade durante o estágio.

À Professora Doutora Maria Teresa Rebelo, muito obrigada por ter aceitado ser minha orientadora através da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pelo seu apoio, conselhos e disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas.

Ao Dr. Rodrigo Coutinho, em nome da Associação Ares do Pinhal para a Inclusão Social pelo trabalho desenvolvido no programa de metadona desenvolvido nas Unidades Móveis de Saúde.

Ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, agradeço a oportunidade que me foi oferecida para realizar a minha dissertação de mestrado, e por me ter proporcionado as condições necessárias para a realização da mesma. Em especial ao Dr. Luís Vieira, em nome da Unidade de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Saúde, pelo apoio na sequenciação automática dos produtos amplificados do HBV obtidos no estudo.

Ao Diogo e à Miriam, um grande obrigado por todo o apoio e incentivo que me ofereceram durante a realização da dissertação, e por todos os bons momentos que passámos juntos, sem a vossa ajuda a realização deste estudo teria sido muito mais difícil.

Por fim, quero agradecer à minha família e a todos os meus amigos pelo apoio que me ofereceram durante estes meses e sem o qual não teria conseguido terminar este projeto. Em especial, gostaria de agradecer aos meus pais e avós que tiveram sempre orgulho em mim, sem eles, não teria chegado onde cheguei.

A todos, um sincero obrigado.

## Resumo

A vacinação contra o vírus da hepatite B (VHB) começou a ser administrada a adolescentes em 1994, e a recém-nascidos em 2000. Contudo, populações vulneráveis, nomeadamente utilizadores de drogas injetáveis (UDI) e reclusos, são suscetíveis a adquirirem infeção por VHB devido aos seus comportamentos de risco.

Este estudo teve como objetivo detetar a presença de DNA viral em UDI com anticorpos para hepatite C, determinar os genótipos de VHB em circulação numa população de reclusos, e identificar mutações de resistência ao tratamento da hepatite B.

Foram analisadas amostras de dois subgrupos de UDI, distribuídos segundo a sua origem geográfica, 140 nascidos em Portugal (antes de 1971) e 31 nascidos fora de Portugal, e ainda de 41 reclusos com hepatite B crónica. Metodologias utilizadas englobaram a pesquisa de AgHBs em *pools* de plasma, extração de DNA dos plasmas positivos, amplificação por PCR, e sequenciação das regiões S e Core do genoma do VHB. As sequências obtidas foram genotipadas por análise filogenética e submetidas a análise de mutações de resistência ao tratamento.

Nos UDI nascidos em Portugal (idade média de 50,3 anos), presumivelmente não vacinados, foi detetado DNA viral em dois (1,4%) indivíduos, um deles infetado com o genótipo E. A infeção por VHB não foi detetada em UDI nascidos fora de Portugal (45,2% de naturalidade africana). A população de reclusos apresentou uma variedade de genótipos (A, 41,5%; D, 29,3%; E, 26,8% e F, 2,4%), nomeadamente em reclusos portugueses (idade média de 37,4 anos), supostamente vacinados na adolescência. Não foram detetadas mutações de resistência ao tratamento.

Embora a prevalência do VHB em Portugal seja baixa, este vírus continua bastante presente noutros países e casos de infeção podem ser importados para Portugal. Assim sendo, vigilância do VHB combinada com estratégias de vacinação, é essencial para evitar a disseminação deste vírus em populações vulneráveis.

**Palavras-chave:** VHB, prevalência, genótipos, mutações de resistência, grupos de risco

## Abstract

Vaccination against hepatitis B virus (HBV) began to be administered to adolescents in 1994, and to newborns in 2000. However, vulnerable populations, namely injecting drug users (IDUs) and inmates, are at risk of infection by VHB due to their harmful behaviors.

This study aimed to detect the presence of HBV DNA in IDUs with antibodies for hepatitis C, identify the HBV genotypes in circulation among inmates, and assess resistance mutations treatment of hepatitis B.

Samples from two IDU subgroups, distributed according to their geographical origin, 140 born in Portugal (before 1971) and 31 born outside Portugal, and from 41 inmates with chronic hepatitis B were analyzed. The methodologies used included the screening of HBsAg in plasma pools, DNA extraction from positive plasmas, PCR amplification, and sequencing of the S and Core regions of the HBV genome. The sequences obtained were genotyped by phylogenetic analysis and checked for treatment resistance mutations.

In IDUs born in Portugal (average age of 50.3 years), likely not vaccinated, viral DNA was detected in two (1.4%) individuals, one of them infected with the genotype E. HBV infection was not detected in IDUs born outside Portugal (45.2% born in Africa). The inmate population showed a variety of genotypes (A, 41.5%; D, 29.3%; E, 26.8% and F, 2.4%), namely in Portuguese inmates (average age of 37.4 years), who were expected to be vaccinated in adolescence. No treatment resistance mutations were detected.

Although the prevalence of HBV in Portugal is low, this virus is still very present in other countries and cases of the infection can be imported into Portugal. Therefore, HBV surveillance combined with vaccination strategies is essential to prevent the spread of this virus in vulnerable populations.

**Keywords:** HBV, prevalence, genotyping, resistance mutations, risk groups

## Elementos Bibliográficos

O presente projeto de mestrado originou os seguintes artigos do tipo *Brief report*, para comunicação dos resultados obtidos no estudo das duas populações analisadas:

Silva C, Ramos D, Quina M, Pádua E. Prevalence of Hepatitis B virus in a high-risk behaviors group of Drug Users. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. (submetido para revisão dia 27 de setembro de 2022);

Silva C, Ramos D, Quina M, Pádua E. Genotypes of Hepatitis B Virus Circulating in a Group of Infected Inmates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. (submetido para revisão dia 27 de setembro de 2022).

O presente projeto foi também submetido para apresentação na 3ª edição do Dia do Jovem Investigador INSA (8 de novembro de 2022) com o seguinte título: Silva, C, Pádua E. Detection and genotyping of hepatitis B virus in samples from vulnerable population with risk behavior to acquire viral infectious diseases. 2022.

# Índice geral

Agradecimentos .....	I
Resumo .....	II
Abstract .....	III
Elementos Bibliográficos .....	IV
Índice geral.....	V
Índice de figuras .....	VII
Índice de tabelas .....	VIII
Lista de siglas e abreviaturas .....	X
<b>1 Introdução aos aspetos gerais sobre a infeção por Vírus da Hepatite B .....</b>	<b>1</b>
1.1 Breve história da sua descoberta .....	1
1.2 Classificação taxonómica e morfologia do virião.....	1
1.3 Genoma .....	1
1.4 Prevalência e incidência da infeção pelo VHB global e em Portugal.....	2
1.5 Classificação e distribuição dos génotipos de VHB global e em Portugal .....	4
1.6 Vias de transmissão .....	6
1.7 Mecanismo de infeção .....	6
1.8 Hepatite aguda e hepatite crónica.....	7
1.9 VHB e interação com infeção por VHC ou VIH.....	8
1.10 Diagnóstico da infeção.....	8
1.10.1 Diagnóstico por métodos serológicos .....	8
1.10.2 Diagnóstico por métodos moleculares .....	9
1.11 Populações vulneráveis potencialmente expostas a infeções virais .....	10
1.11.1 População de utilizadores de drogas injetáveis.....	10
1.11.2 População de reclusos .....	11
1.12 Tratamento da infeção crónica.....	12
1.13 Mutações de resistências a fármacos .....	12
1.14 Impacto da vacinação no mundo e em Portugal.....	13
<b>2 Enquadramento e objetivos do estudo.....</b>	<b>15</b>
<b>3 Materiais e métodos.....</b>	<b>16</b>
3.1 Seleção e caracterização de grupos populacionais em estudo .....	16
3.1.1 UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal.....	16
3.1.2 Reclusos .....	16
3.2 Organigrama da metodologia desenvolvida no estudo .....	16

3.3	Elaboração de <i>pools</i> de plasma e rastreio do AgHBs .....	18
3.4	Extração do DNA VHB.....	18
3.5	Amplificação de fragmentos genómicos do VHB.....	19
3.5.1	Caracterização dos primers selecionados para o estudo.....	19
3.5.2	Condições da mistura de reação.....	20
3.6	Visualização dos produtos submetidos a amplificação .....	24
3.7	Purificação e sequenciação dos produtos amplificados.....	25
3.8	Análise bioinformática das sequências .....	26
3.8.1	Alinhamento e construção de sequências de consenso .....	26
3.8.2	Alinhamento e construção das árvores filogenéticas.....	26
3.8.3	Identificação de mutações de resistência a tratamento .....	27
4	Resultados .....	28
4.1	Caracterização da população de UDI estudada (nascidos em Portugal e fora do país) 28	
4.1.1	Análise demográfica, socioeconómica e educacional.....	28
4.1.2	Hábitos no consumo de drogas.....	30
4.1.3	Consumo de álcool.....	31
4.1.4	Análise do estado clínico da infeção VHC (crónica ou resolvida) e fibrose do fígado 32	
4.1.5	Análise do estado clínico da infeção VIH e coinfeção com VHC.....	32
4.1.6	Rastreio do AgHBs no subgrupo de UDI nascidos em Portugal .....	33
4.1.7	Amplificação da região S do genoma VHB .....	33
4.1.8	Classificação filogenética das sequências obtidas da região S.....	33
4.2	Caracterização da população de reclusos estudada .....	34
4.2.1	Distribuição dos reclusos por estabelecimento prisional e análise demográfica da população .....	34
4.2.2	Análise dos valores de carga viral VHB .....	36
4.2.3	Amplificação da região S e Core do genoma VHB.....	37
4.2.4	Classificação filogenética das sequências da região S e da região Core .....	37
4.2.5	Frequência dos genótipos VHB distribuídos de acordo com a região e naturalidade dos reclusos .....	40
4.2.6	Identificação de mutações de resistência .....	42
5	Discussão .....	43
6	Conclusão .....	46
7	Bibliografia .....	47
8	Anexos .....	53

## Índice de figuras

### 1.Introdução

Figura 1.1 Estrutura genómica do VHB .....	2
Figura 1.2 Mapa descritivo da prevalência da infeção crónica por hepatite B nas diferentes regiões designadas pela OMS .....	3
Figura 1.3 Distribuição dos indivíduos de acordo com os resultados obtidos na pesquisa de anti-HB ..	4
Figura 1.4 Ciclo de vida do VHB .....	7

### 3.Materiais e métodos

Figura 3.1 Organigrama descritivo da metodologia utilizada para determinar a prevalência e identificar os genótipos do VHB nos grupos populacionais estudados .....	17
---	----

### 4.Resultados

Figura 4.1 Distribuição de indivíduos UDI de naturalidade portuguesa por classes etárias .....	28
Figura 4.2 Distribuição de indivíduos UDI de naturalidade estrangeira por classes etárias .....	29
Figura 4.3 Produtos de PCR da região S na população UDI visualizados em gel de agarose .....	33
Figura 4.4 Árvore filogenética da região S do genoma VHB na população UDI. ....	34
Figura 4.5 Distribuição de indivíduos da população de reclusos por classes etárias .....	35
Figura 4.6 Distribuição de indivíduos da população de reclusos por região do país onde se encontram detidos .....	35
Figura 4.7 Distribuição dos indivíduos da população de reclusos de acordo com a sua carga viral .....	36
Figura 4.8 Produtos de PCR das regiões S e Core na população de reclusos visualizados em gel de agarose.....	37
Figura 4.9 Árvore filogenética da região S do genoma VHB na população de reclusos .....	38
Figura 4.10 Árvore filogenética da região Core do genoma VHB na população de reclusos .....	39
Figura 4.11 Proporção dos genótipos na população de VHB obtida na população de reclusos estudada. ....	40
Figura 4.12 Proporção dos genótipos de VHB obtida na população de reclusos de acordo com a localização da prisão .....	40
Figura 4.13 Proporção dos genótipos de VHB obtida na população de reclusos de acordo com a naturalidade .....	41

## Índice de tabelas

### 1.Introdução

Tabela 1.1 Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos de VHB.....	5
Tabela 1.2 Comparação dos métodos de genotipagem para a deteção de mutações .....	10

### 3.Materiais e métodos

Tabela 3.1 Caracterização dos primers para amplificação das regiões alvo do genoma VHB.....	20
Tabela 3.2 Mistura de reação utilizada na amplificação de fragmentos das regiões Pol/RT (1ª ronda) e S (2ª ronda) do VHB em amostras da população de UDI nascidos em Portugal.....	21
Tabela 3.3 Programa de amplificação das regiões Pol/RT (1ª ronda) e S (2ª ronda) do VHB em amostras da população de UDI nascidos em Portugal.....	21
Tabela 3.4 Mistura de reação utilizada na amplificação das regiões Pol/RT (1ª ronda) e S (2ª ronda) do VHB em amostras da população de UDI nascidos fora de Portugal .....	22
Tabela 3.5 Programa de amplificação das regiões Pol/RT (1ª ronda) e S (2ª ronda) do VHB em amostras da população de UDI nascidos fora de Portugal .....	23
Tabela 3.6 Mistura de reação utilizada na amplificação de fragmentos Core do VHB em amostras da população de reclusos.....	24
Tabela 3.7 Programa de amplificação de fragmentos Core do VHB em amostras da população de reclusos.....	24
Tabela 3.8 Mistura de reação para sequenciação dos fragmentos de interesse amplificados para VHB .....	25
Tabela 3.9 Programa de sequenciação dos fragmentos amplificados do genoma VHB .....	26

### 4.Resultados

Tabela 4.1 Distribuição dos UDI nascidos fora de Portugal pelos diferentes continentes de origem ...	29
Tabela 4.2 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com o seu nível educacional.....	29
Tabela 4.3 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com a sua situação laboral.....	30
Tabela 4.4 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com a sua situação habitacional .....	30
Tabela 4.5 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com os seus hábitos de consumo de drogas .....	31
Tabela 4.6 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com os seus hábitos de partilha de materiais usados no consumo de drogas .....	31
Tabela 4.7 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com os seus hábitos de consumo de álcool .....	32
Tabela 4.8 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com o grau de fibrose do seu fígado .....	32
Tabela 4.9 Distribuição dos indivíduos da população de reclusos pelos diferentes continentes.....	36
Tabela 4.10 Aminoácidos presentes nas posições associadas a mutações de resistência da região da transcriptase reversa .....	42

## 8. Anexos

Tabela 8.1 Dados epidemiológicos da população de reclusos estudada.....	53
Tabela 8.2 Tabela de códigos IUPAC .....	54

## Lista de siglas e abreviaturas

AgHBc – Antígeno do core do vírus da hepatite B

AgHBe – Antígeno “e” da hepatite B

AgHBs – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

anti-HBc - Anticorpo contra o antígeno do core do vírus da hepatite B

anti-HBs - Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B

APRI – do inglês, *AST to Platelet Ratio Index*

cccDNA – Ácido desoxirribonucleico circular covalentemente fechado, do inglês *covalently closed circular DNA*

CHC – Carcinoma hepatocelular

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

DGGE – do inglês, *denaturating gradient gel electrophoresis*

dNTPs - Desoxirribonucleico 5'-trifosfatados

EUA – Estados Unidos da América

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IgM - Imunoglobulinas M

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

KCL - Cloreto de Potássio

L-HBs – do inglês, *large surface antigen*

MEGA - Do inglês, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MgCL<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

M-HBs - do inglês, *middle surface antigen*

min - Minuto

mL - Mililitro

mM – Milimolar, equivalente a 1 mol/m<sup>3</sup>

MSSCP – do inglês, *multitemperature single -strand conformation polymorphism*

NA - Análogos de nucleosídeos, do inglês *nucleoside analogues*

NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica, do inglês *National Center for Biotechnology Information*

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORFs - Grelha de leitura aberta, do inglês Open Reading Frame

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

Peg-a-INF - Interferão alfa-peguilado, do inglês *Pegylated Interferon Alpha*

Pg-RNA - Ácido ribonucleico pré-genômico, do inglês *Pre-genomic Ribonucleic Acid*

Pol – Polimerase do vírus da hepatite B

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

rcDNA - Ácido desoxirribonucleico circular relaxado, do inglês *Relaxed circular Deoxyribonucleic Acid*

RFLP – do inglês, *restriction fragment length polymorphism*

RT - Transcriptase reversa, do inglês *Reverse Transcriptase*

s - Segundos

S-HBs - do inglês, *small surface antigen*

SSCP – do inglês, *single-strand conformation polymorphism*

SVPs – Partículas subvirais, do inglês *subviral particles*

T.A – Temperatura ambiente

Tris-HCL - Tris Hidrocloro

UDI - Utilizadores de Drogas Injetáveis

UI – Unidades internacionais

UTI - Unidade de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

VHB – Vírus da Hepatite B

VHC – Vírus da Hepatite C

°C - Graus Celsius

µL - Microlitro, equivalente a 10<sup>-6</sup> litros

µM - Micromolar, equivalente a 10<sup>-3</sup>mol/m<sup>3</sup>

# 1 Introdução aos aspetos gerais sobre a infeção por Vírus da Hepatite B

## 1.1 Breve história da sua descoberta

O vírus da hepatite B (VHB) foi descoberto por Baruch Blumberg e os seus colegas em 1965, através da deteção de um antígeno no soro de um aborígine australiano. Devido ao local de origem deste primeiro caso identificado, o antígeno foi originalmente denominado de “antígeno Austrália”<sup>1</sup>, sendo atualmente conhecido como antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs). Cinco anos após a descoberta do AgHBs, em 1970, as partículas virais do VHB foram visualizadas por Dane e os seus colegas com o auxílio de um microscópio eletrónico usando técnicas de coloração negativa, o que permitiu observar a morfologia e posteriormente fazer a classificação deste vírus<sup>2</sup>. As atuais metas estabelecidas pela OMS a serem cumpridas até 2030 incluem: alcançar uma taxa de cobertura da vacinação contra o VHB de 90%, reduzir a prevalência do AgHBs em crianças para 0,1%, e aumentar a taxa de tratamento da hepatite B para 80%<sup>3,4</sup>.

## 1.2 Classificação taxonómica e morfologia do virião

O VHB é um pequeno vírus de DNA pertencente ao género *Orthohepnavirus* e à família *Hepadnaviridae*<sup>5</sup> e caracteriza-se pelo seu hepatotropismo. Dane e os seus colegas observaram três tipos de partículas de VHB distintas no soro de pacientes infetados: estruturas esféricas com diâmetros de 42 nm e 22 nm, e estruturas filamentosas com um diâmetro de 22 nm<sup>2</sup>. As partículas esféricas de 42 nm de diâmetro, apelidadas de partículas de Dane, são viriões infecciosos constituídos por um invólucro externo, apresentando uma membrana lipídica com três antígenos de superfície de tamanho grande (L-HBs), médio (M-HBs) e pequeno (S-HBs), envolvendo a nucleocápside de forma icosaédrica composta pela proteína do *core*, pela polimerase viral (Pol) e pelo DNA viral. As partículas esféricas e filamentosas de 22 nm de diâmetros são mais abundantes no soro dos pacientes e incluem partículas subvirais (SVPs) que não possuem nucleocápside sendo, por essa razão, partículas não infecciosas<sup>2,6,7</sup>.

## 1.3 Genoma

O genoma do VHB é formado por um DNA circular relaxado (rcDNA) com um comprimento aproximado de 3,2 kb, e uma cadeia dupla parcial, tendo uma cadeia direta incompleta e uma cadeia reversa completa. O genoma codifica quatro *open reading frames* (ORFs) que se encontram parcialmente sobrepostas, denominadas de C (*core*), P (polimerase), S (superfície) e X (proteína HBx), a partir das quais as proteínas virais são produzidas<sup>3,6,8</sup>. A ORF C codifica a proteína *core* (AgHBc) e o antígeno “e” (AgHBe), a ORF P é responsável pela produção da polimerase viral, os três antígenos de superfície, L-HBs, M-HBs e S-HBs, são codificados pela ORF S, e finalmente, a ORF X produz a proteína *trans*-ativadora transcricional X<sup>8</sup> (Figura 1.1).



### Prevalência da infeção de hepatite B crónica (positividade do AgHBs) por regiões da OMS, 2019

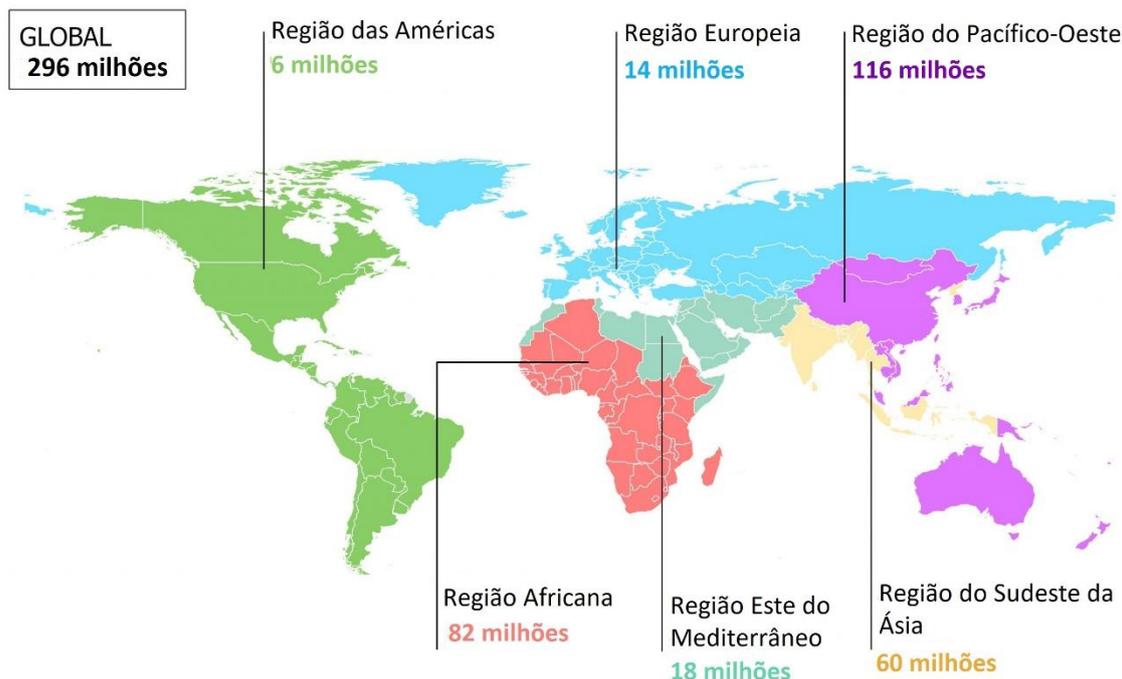


Figura 1.2 Mapa descritivo da prevalência da infeção crónica por hepatite B nas diferentes regiões designadas pela OMS. Adaptado de <sup>3</sup>

A revisão de dados publicados entre 1965 e 2013, correspondentes a 161 países do mundo, permitiu estimar uma prevalência global de positividade para AgHBs em 3,6%. O mesmo estudo identificou a região do Pacífico Ocidental como contendo o maior número de indivíduos infetados (mais de 95 milhões de indivíduos), seguida da região Africana (mais de 75 milhões de indivíduos) <sup>11</sup>.

Nas regiões designadas pela OMS, a prevalência do VHB variou nas Américas entre 0,2% (México e Guatemala) a 13,6% (Haiti), e 22,4% na região africana (Sudão do Sul) <sup>11</sup>. Um estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA) mostrou que, em 2016, a prevalência da infeção por VHB no país era de 0,29%, no entanto existiam disparidades raciais/étnicas consideráveis. A prevalência entre indivíduos asiáticos foi de 3,4% e, entre indivíduos negros não hispânicos, foi de 0,7%, por outro lado, entre indivíduos não asiáticos e não negros foi inferior a 0,2% <sup>12</sup>. Na Europa, a prevalência da infeção por VHB na população geral variou de 0,1% na Irlanda a 4,4% na Romênia. Uma alta prevalência de VHB de 3,3% foi descrita para a Grécia, no entanto, a grande maioria dos países europeus apresenta uma prevalência de HBV próxima ou inferior a 1% <sup>13</sup>.

Raros estudos sobre a prevalência do VHB foram realizados em Portugal. Em 2016, um estudo revelou uma prevalência de 1,45% na população geral testada para o antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs), o que classifica Portugal como um país de baixa endemia (prevalência de AgHBs <2%). O mesmo estudo reportou ainda que havia uma maior prevalência deste antígeno em homens e indivíduos entre os 35 a 64 anos de idade. Verificou-se que esta prevalência variava entre diferentes regiões do país, sendo maior na região Norte (2,6%), seguida das regiões do Centro (1,6%), Algarve (1,6%), Alentejo (0,4%) e Lisboa e Vale do Tejo (0,1%) <sup>14</sup>.

Dados obtidos a partir do Inquérito Serológico Nacional 2015-2016 realizado pelo INSA, onde se planeou estudar uma população de 3563 indivíduos, tendo sido apenas possível estudar 2959 (83% da população planeada para o estudo) indivíduos residentes em Portugal mostraram que 1402 indivíduos apresentavam anticorpos de superfície para o vírus da hepatite B (anti-HBs) com concentrações superiores a 10 mUI/mL. Atendendo a estes dados estimou-se que 40,1% da população tinha imunidade comprovada para hepatite B (Figura 1.3).

Resultado	n	%	IC95%
Negativo	1557	59,9	[56,9; 62,9]
Positivo	1402	40,1	[37,1; 43,1]

Figura 1.3 Distribuição dos indivíduos de acordo com os resultados obtidos na pesquisa de anticorpos de superfície para o vírus da hepatite B (anti-HBs). Foi utilizado um intervalo de confiança (IC) no nível 95%. Figura obtida de <sup>4</sup>

Observou-se que a seroprevalência para anti-HBs era maior em indivíduos do sexo feminino (43,2%) e em indivíduos com idade entre os 20 e 29 anos (78,7%) e entre os dois e quatro anos (65,9%). Verificou-se também uma maior seroprevalência de anti-HBs na região Norte do país (43,3%) e uma menor seroprevalência na Região Autónoma da Madeira (28,8%).

Adicionalmente, foram pesquisados os marcadores serológicos anti-HBc e AgHBs para avaliar o perfil serológico dos indivíduos. Esta avaliação concluiu que 41,3% dos indivíduos portugueses com mais de 44 anos não apresentava evidência serológica de imunidade para a hepatite B (anti-HBc e anti-HBs negativos). Por outro lado, 37,1% dos indivíduos da população geral portuguesa adquiriram a imunidade por vacinação (anti-HBs positivo e anti-HBc negativo) e 3,2% adquiriram imunidade natural através de uma infeção prévia por VHB (anti-HBc e anti-HBs positivos). Por fim, o mesmo inquérito identificou a presença do AgHBs e do anti-HBc IgM em 0,4% da população geral analisada, sendo confirmada a presença de uma hepatite B crónica <sup>15</sup>.

## 1.5 Classificação e distribuição dos génotipos de VHB global e em Portugal

Até à data, foram identificados dez génotipos de VHB, denominados de A a J, que apresentam uma distribuição etno-geográfica, com uma maior predominância dos génotipos A, B, C e D <sup>16-18</sup>.

Os génotipos A e D são os mais frequentes na Europa, África e América do Norte. Por outro lado, os génotipos B e C são mais comuns nas regiões leste e sudeste da Ásia e na Oceânia <sup>17,19</sup>. Um estudo realizado no Azerbaijão, localizado na fronteira entre a Europa e Ásia mostrou que os génotipos identificados na população infetada por VHB eram o génotipo D (93,2%) seguido do génotipo A (5,8%) <sup>19</sup>. Outro estudo realizado no Norte da Índia mostrou que os génotipos mais comumente encontrados nesta região eram o génotipo D, seguido do génotipo A e C <sup>16</sup>. Por fim, um estudo realizado no Quénia só descreveu infeções pelo génotipo A, mais especificamente, o subgénotipo A1 <sup>20</sup>.

Os restantes génotipos de E a J apresentam uma distribuição geográfica mais restrita: o génotipo E nas regiões da África Central e Ocidental e arábia Saudita; o génotipo F é encontrado na América Central e na América do Sul, bem como no Alasca; o génotipo G é encontrado em indivíduos naturais do sudoeste

da Europa e dos Estados Unidos da América; o genótipo H é originário da América Central e México<sup>18</sup>; o genótipo I foi isolado em indivíduos naturais de Laos, Vietname e China<sup>18,21</sup>; e o genótipo J só foi encontrado, até à data, no Japão<sup>18</sup> (Tabela 1.1). Existe evidência de que a distribuição geográfica dos genótipos de VHB possa estar relacionada com o seu modo de transmissão. Os genótipos B e C são os mais prevalentes em áreas endémicas onde as vias de transmissão perinatais e verticais têm um papel extremamente importante na disseminação da infeção. Os restantes genótipos, pelo contrário, são frequentemente descritos em áreas onde o principal modo de transmissão é a transmissão horizontal<sup>16</sup>.

Para cada um dos genótipos A, B, C, D e F, foram determinados 35 subgenótipos de VHB cuja classificação se baseia na monofilia das estirpes e na distância genética dentro dos genótipos e subgenótipos<sup>22</sup>. A distribuição geográfica encontra-se descrita na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos de VHB. Adaptado de<sup>5</sup>

Genótipos	Subgenótipos	Localização geográfica
A	A1	África Sub-sariana, Índia
	A2	Norte da Europa, Índia
	A3	África Ocidental
	A4-A7	Gâmbia, Nigéria
B	B1	Japão
	B2-B5	Ásia Oriental, Taiwan, China, Indonésia, Vietname, Filipinas
	B6	Alasca, Norte do Canadá, Gronelândia
C	C1-C3	Taiwan, China, Coreia, Japão, Sudeste da Ásia
	C4	Austrália
	C5	Filipinas, Vietname
	C6-C11	Indonésia
D	D1-D7	África, Europa, Países Mediterrâneos, Índia, Indonésia, Austrália, África Central e Ocidental, Arábia Saudita
E		África Central e Ocidental, Arábia Saudita
F	F1-F4	América Central e do Sul
G		França, Alemanha, Estados Unidos da América
H		América Central
I		Vietname, Laos
J		Japão

Estudos em realizados em Portugal identificaram uma predominância dos genótipos A e D<sup>23-25</sup>. Porém, outros estudos realizados na população atendida em hospitais de Lisboa descreveram uma prevalência significativa da infeção pelo genótipo E, maioritariamente em indivíduos de naturalidade africana, de onde este genótipo é originário<sup>26,27</sup>. Dados da distribuição dos genótipos de VHB em Portugal parecem identificar diferenças entre as diferentes regiões do país, sendo que estudos realizados no Norte indicam uma maior prevalência do genótipo D, e uma menor prevalência do genótipo E quando comparados com estudos das regiões Centro e Sul<sup>23,26</sup>. Por fim, a distribuição dos genótipos de VHB em Portugal não parece depender do sexo dos indivíduos e corresponde ao chamado “padrão mediterrâneo”<sup>23</sup>.

## 1.6 Vias de transmissão

No organismo, o VHB encontra-se presente no sangue e em algumas secreções corporais, como o sêmen, as secreções vaginais e a saliva. A transmissão deste vírus depende da troca destes fluídos corporais entre indivíduos, e as vias de transmissão mais frequentes são a via sexual, a via parentérica e a via vertical. A via sexual é a forma mais comum de transmissão na Europa Ocidental e a infecção é frequentemente diagnosticada em indivíduos não vacinados. Para além disso, a existência de múltiplos parceiros sexuais e a ausência da utilização de preservativos aumentam significativamente o risco de transmissão por esta via. A via de transmissão parentérica resulta da troca de sangue contaminado, e pode ocorrer através de transfusão de sangue não rastreado, da partilha de seringas ou agulhas utilizadas em injeção de drogas, tatuagens, acupuntura, *piercings* ou em contexto hospitalar quando não há desinfecção do material usado no tratamento dos doentes. A transmissão por esta via pode também ocorrer pela partilha de escovas de dentes, lâminas de barbear ou de outros utensílios de uso pessoal. A transmissão vertical, de mãe infetada para o filho, é a via de transmissão mais comum em zonas endémicas da infecção VHB e ocorre principalmente durante ou imediatamente após o parto, sendo que 95% das crianças verticalmente infetadas em idades inferiores a 5 anos desenvolvem uma infecção crónica. O parto por cesariana não impede a transmissão deste vírus da mãe infetada ao filho <sup>9,28</sup>.

## 1.7 Mecanismo de infeção

A infeção por VHB começa pela sua ligação a um recetor presente nos hepatócitos, esta interação é responsável pela internalização do vírus na célula por endocitose e subsequente perda do seu invólucro. Após a sua entrada na célula, a nucleocápside viral é direcionada para o núcleo, através de microtúbulos presentes no citoplasma e é translocada através de poros nucleares para o interior do mesmo. Uma vez no interior do núcleo, o rcDNA viral vai ser modificado por fatores celulares criando DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) que serve de molde para a transcrição de genes virais, permitindo assim, uma replicação viral contínua e os RNA resultantes são posteriormente traduzidos em várias proteínas virais no citoplasma. O RNA pré-genómico (pgRNA), em conjunto com a polimerase viral, é encapsulado dentro de uma cápside formada por dímeros de AgHBc, sendo este processo facilitado por chaperonas do hospedeiro, nomeadamente, Hsp90, Hsp40 e Hsc70. Após a incorporação do RNA, este sofre a ação do enzima transcriptase reversa de modo a formar o DNA viral. Neste processo inclui-se a síntese da cadeia inversa, a degradação do RNA intermédio e a síntese incompleta da cadeia direta. As nucleocápsides contendo genoma viral têm dois destinos finais: podem ser enviadas de novo para o núcleo da célula para repor a *pool* de cccDNA (reciclagem), ou podem ligar-se a proteínas de invólucros maduras e serem excretadas da célula (saída do vírus). Partículas subvirais não infecciosas também podem ser excretadas, no entanto a eficácia da sua saída é variável <sup>6,17,29</sup> (Figura 1.4).

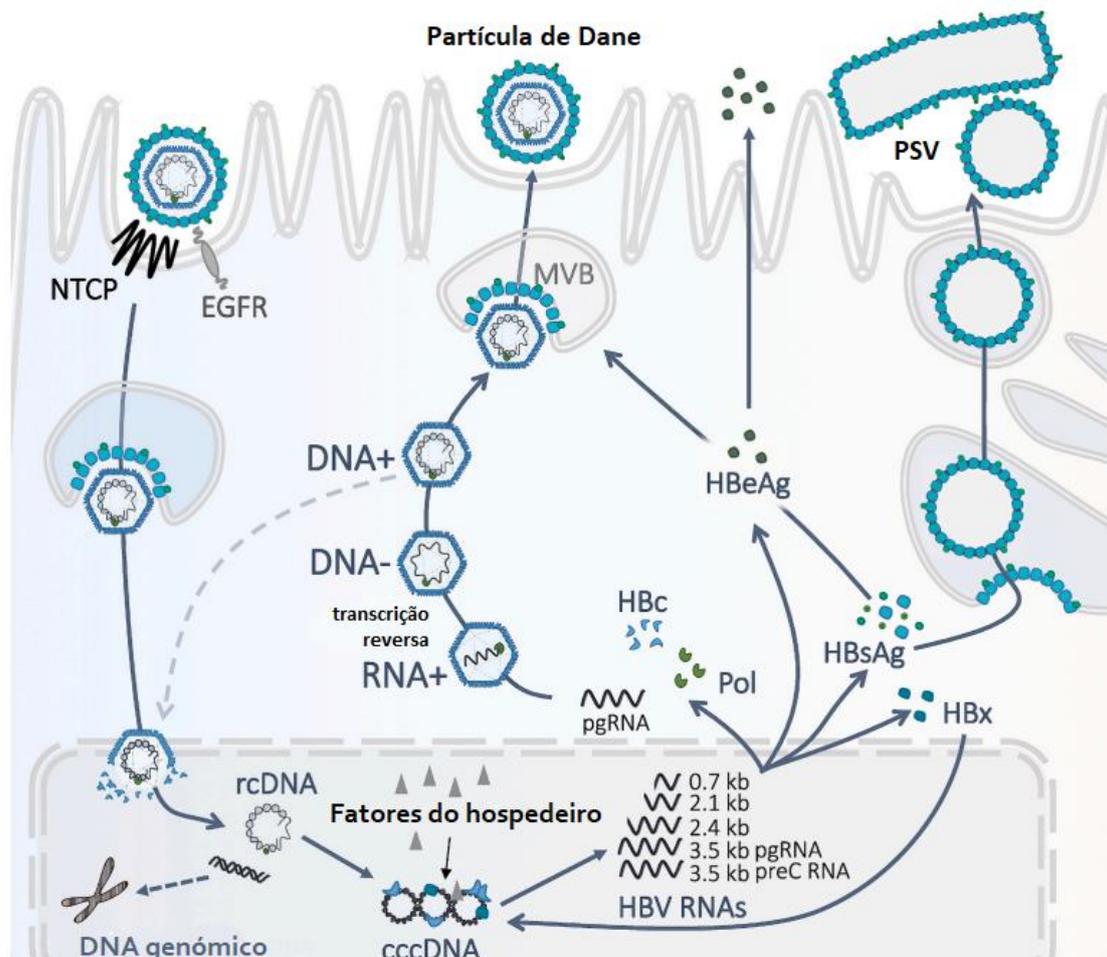


Figura 1.4 Ciclo de vida do VHB: a entrada do vírus na célula, a formação do DNA circular covalentemente fechado (cccDNA), a formação de um novo vírião e saída da célula e a saída de partículas subvirais. Adaptado de <sup>6</sup>

O período de incubação do VHB varia entre 45 dias a seis meses <sup>20,30</sup>, resultando numa hepatite aguda ou crónica, podendo a progressão da doença conduzir a cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular <sup>17,18,30</sup>.

## 1.8 Hepatite aguda e hepatite crónica

A hepatite aguda conduz a uma inflamação do fígado que pode variar entre algumas semanas a seis meses <sup>31</sup>. Metade dos casos de hepatite aguda são assintomáticos, especialmente quando a infeção ocorre em crianças. No caso de pacientes sintomáticos, estes podem apresentar sintomas semelhantes a uma gripe, com febre, mal-estar, dor abdominal, náuseas e vómitos <sup>30</sup>. Raros casos de infeção aguda desenvolvem insuficiência hepática, sendo a taxa de mortalidade elevada. Nesta situação o tratamento pode conduzir ao transplante do fígado <sup>30-32</sup>.

Por outro lado, a infeção crónica pelo VHB, descrita pela contínua deteção do AgHBs no plasma de pacientes após 6 meses de infeção, apresenta um risco elevado de morbidade nos doentes <sup>20,30</sup>. A evolução da infeção para um estado crónico depende maioritariamente da idade do indivíduo quando exposto ao vírus. Os recém-nascidos têm uma probabilidade de 70 a 90% de virem a desenvolver uma

hepatite B crónica, as crianças entre um a cinco anos de idade têm uma probabilidade de 25 a 50%, e após seis anos de idade essa probabilidade é de 10%, sendo que em adultos o risco baixa para 5% <sup>30,32</sup>. A maior prevalência de hepatite por VHB crónica também pode ser influenciada por fatores virológicos, como a carga viral, os genótipos e as variantes do VHB <sup>16,19</sup>.

## **1.9 VHB e interação com infeção por VHC ou VIH**

Por possuírem vias de transmissão semelhantes ao VHB, a coinfeção com outros vírus causadores de hepatites, nomeadamente o vírus da hepatite C (VHC), e ainda a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) é frequente, especialmente em áreas endémicas onde estes vírus circulam na população <sup>17,33,34</sup>.

Estudos demonstram que, em pacientes coinfetados cronicamente com VHB/VHC, as manifestações da doença são normalmente mais severas do que em pacientes mono-infetados <sup>35,36</sup>. Pacientes com coinfeção VHB/VHC tendem a ter lesões hepáticas mais graves com um nível de fibrose significativamente mais elevado e uma maior probabilidade de desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Indivíduos coinfetados VHB/VHC demonstram uma dominância do VHC, com inibição da replicação do VHB, em indivíduos não asiáticos, e contrariamente, uma dominância do VHB, com supressão da replicação do VHC, em indivíduos asiáticos <sup>17,33,34</sup>. Tendo em conta a elevada taxa de eficácia do tratamento e eliminação do VHC em indivíduos mono-infetados, este vírus é o alvo prioritário da terapia em casos de coinfeção <sup>34</sup>, no entanto, é necessário ter em atenção que a eliminação do VHC pode levar à reativação da replicação do VHB <sup>33</sup>.

Estima-se que aproximadamente 8% (7,4%) dos indivíduos infetados com VIH estão coinfetados com VHB <sup>17,37</sup>. Em regiões onde a infeção por VHB é endémica, como a África Subsariana <sup>17,20</sup>, a infeção por VHB ocorre na infância. Porém, a infeção por VIH é normalmente adquirida por via sexual na idade adulta. O VIH pode modificar a história natural do VHB, levando a um aumento da replicação e reativação do VHB, maior probabilidade de desenvolver doença crónica e uma aceleração para fibrose e cirrose hepática. Para além do mais, em indivíduos com replicação VHB ativa, a imunodeficiência induzida pelo VIH pode ser agravada <sup>17</sup>. Embora a hepatite B possa ser prevenida através da vacinação, a resposta à vacina é menor em crianças infetadas com VIH <sup>38</sup>. Ainda existem muitos desafios a ultrapassar em relação ao diagnóstico e acesso ao tratamento para a infeção por VHB em regiões onde o tratamento do VIH é seletivamente apoiado. Existe a necessidade de englobar o tratamento do VHB nos programas implementados de tratamento do VIH <sup>17</sup>.

## **1.10 Diagnóstico da infeção**

### **1.10.1 Diagnóstico por métodos serológicos**

O rastreio para deteção da infeção pelo VHB é feito por métodos serológicos <sup>17</sup>. Estes testes podem ser realizados no soro ou no plasma humano e são usados de modo a confirmar a presença ou ausência de antigénios e anticorpos específicos produzidos no organismo em resposta à infeção por VHB <sup>32</sup>. Os antigénios AgHBs e AgHBe são marcadores importantes no diagnóstico. A pesquisa de AgHBs

diagnostica a infecção por VHB, podendo ser aguda ou crônica. A detecção do AgHBs seis meses após ocorrer a exposição ao vírus caracteriza a infecção na fase crônica<sup>20,32</sup>.

A heterogeneidade antigénica do AgHBs permitiu a identificação inicial de quatro serotipos (adw, adr, ayw, ayr), onde o “a” representa o determinante comum para todos os serotipos. Para além deste determinante comum, também existem dois subdeterminantes, mutuamente exclusivos, d/y e w/r, cuja expressão específica é determinada por substituições de aminoácidos. Com a adição destes subdeterminantes de “a”, foram identificados nove serotipos (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adwq, adr, adrq-) <sup>8</sup>.

O antígeno “e” da hepatite B (AgHBe) é atualmente utilizado para definir a fase de infecção do paciente. Pacientes positivos para AgHBe podem encontrar-se na fase de tolerância imunológica ou no início da fase de imunoativação, ambas as fases associadas com um aumento dos níveis de DNA viral. Após a seroconversão do AgHBe a maioria dos indivíduos tornam-se portadores inativos crónicos da infecção, com baixos níveis de DNA. Apesar disso, alguns indivíduos AgHBe negativos podem ter uma hepatite ativa e altos níveis de DNA, normalmente descrita como a fase de reativação. Por outro lado, a ausência do AgHBe pode significar a presença de mutantes <sup>39,40</sup>.

A mutação mais comumente encontrada acontece no nucleótido (nt) 1896 da região pre-core onde uma adenina é substituída por uma guanina criando um codão STOP prematuro que termina a síntese do AgHBe. Para além disso, no promotor da região core, que regula a transcrição da região pre-core, podem ocorrer mutações que afetem a síntese do AgHBe. Mais especificamente existe uma mutação dupla que envolve a substituição de uma timina por uma adenina no nucleótido 1762 e a substituição de uma adenina por uma guanina no nucleótido 1764 que vai reduzir a produção do mRNA pre-core e do AgHBe<sup>41</sup>.

### **1.10.2 Diagnóstico por métodos moleculares**

A detecção do VHB também é realizada através de testes genómicos e moleculares. Com estes testes é possível confirmar a presença de DNA do vírus da hepatite B, que pode representar um marcador viral e é o principal alvo de quantificação para a monitorização do tratamento da infecção. Altos níveis de DNA viral estão fortemente relacionados com o futuro desenvolvimento de cirrose e CHC, sendo que a supressão do DNA de VHB até um nível não detetável nos testes é associada com a redução do risco de desenvolvimento da doença <sup>17</sup>. Os principais métodos para quantificar o DNA incluem métodos de hibridação, onde o DNA é ligado a diferentes tipos de sondas e a sua deteção feita através da sua fluorescência em substratos específicos, e métodos de amplificação de alvos, onde se encontra incluído o PCR em tempo real <sup>42</sup>.

Com os testes moleculares o genótipo e subgenótipo do VHB podem ser identificados, sendo esta determinação importante visto que os diferentes genótipos, como por exemplo os genótipos C e F e o subgenótipo A1, podem influenciar a resposta ao tratamento antiviral e a intensidade da doença <sup>43</sup>. Para além disso, a realização de testes moleculares também permite detetar mutações que possam causar resistência ao tratamento através de métodos como sequenciação direta, INNOLipa e “fingerprinting” molecular <sup>42,44</sup> (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 Comparação dos métodos de genotipagem para a deteção de mutações. Adaptado de <sup>6</sup>

Técnica	Limite de deteção de variantes minoritárias	Detetibilidade de mutações	Custos	Vantagens	Desvantagens
Sequenciação direta	20%	Mutações conhecidas e novas mutações	Aceitáveis	Standart, método mais confiável, deteta mutações desconhecidas	Processo demorado, menos eficiente na deteção de populações virais mixas
Ensaio INNOLipa	5%	Mutações conhecidas	Caro	Altamente específico, deteta mutações minoritárias, acessível como kit comercial	Relativamente caro, tem um baixo limite de deteção
Métodos de fingerprinting molecular	RFLP (5%)	Mutações conhecidas	Barato	Baixos custos de análise, simplicidade no design de novos ensaios, não requer equipamentos avançados	Processo demorado, requer um design específico para cada mutante de interesse
	DGGE (desconhecida)				
	SSCP (3%)				
	MSSCP (2%)				

Legenda: RFLP – *restriction fragment length polymorphism*; DGGE – *denaturating gradient gel electrophoresis*; SSCP – *single -strand conformation polymorphism*; MSSCP – *multitemperature single -strand conformation polymorphism*.

## 1.11 Populações vulneráveis potencialmente expostas a infeções virais

Os utilizadores de drogas injetáveis (UDI) e os reclusos são considerados grupos populacionais vulneráveis que apresentam comportamentos de risco que aumentam a probabilidade de aquisição de doenças infecciosas. Devido a diversos fatores, em especial à dificuldade em acederem a estruturas de saúde convencionais, não existem dados relativos à prevalência do VHB, bem como à identificação dos genótipos em circulação, nestes grupos populacionais.

### 1.11.1 População de utilizadores de drogas injetáveis

A população de utilizadores ou ex-utilizadores de drogas injetáveis é considerada ser um dos grupos populacionais mais afetados por infeções virais de transmissão sanguínea, nomeadamente por VHC, VIH, e também, VHB. Os comportamentos de inalação e partilha de seringas/agulhas contaminadas e de outros equipamentos de injeção, muito frequentes nos anos 90 do século passado, conduziram à disseminação destas infeções, particularmente das infeções VIH e VHC.

No caso do VHB, a prevalência do AgHBs rondava os 19,6% na década de 1990 do século passado, mas em 2014, essa prevalência baixou para 4,75% <sup>26</sup>. Diversas causas têm contribuído para o declínio da prevalência destas infecções virais, nomeadamente o tratamento em unidades de saúde não convencionais, acesso ao diagnóstico precoce, à educação para a Saúde, bem como a implementação de programas de metadona.

Após o diagnóstico da infecção viral, muitos indivíduos adotaram comportamentos para a redução de riscos, ou iniciaram tratamento, melhorando a sua saúde e reduzindo o nível de risco de transmissão dos vírus <sup>45</sup>.

Um dos tratamentos mais acessíveis a estes indivíduos é a terapia com recurso a agonistas de opióides, nomeadamente metadona, de modo a combater o vício destas drogas <sup>45,46</sup>. Estes programas de tratamento oferecem uma oportunidade única para interagir com um grande número de pessoas muitas vezes difíceis de contactar e em risco de infecção <sup>45</sup>. Porém, embora haja uma tentativa de diagnóstico precoce das infecções virais, a prevalência do vírus da hepatite B entre os indivíduos que atendem estes programas não está bem documentada.

### **1.11.2 População de reclusos**

A população de reclusos apresenta uma maior taxa de transmissão de doenças transmitidas sexualmente e por sangue relativamente à população em geral. Vários fatores podem ser responsáveis por este fenómeno, entre eles, o baixo estatuto socioeconómico, dificuldade no acesso a serviços de saúde e comportamentos de risco para aquisição destas infecções virais, especialmente observados em homens, que incluem existência de múltiplos parceiros sexuais e consumo de drogas injetáveis <sup>47</sup>.

De facto, um estudo de 2004 concluiu que cerca de 72,9% dos reclusos em meio prisional foram detidos por motivos relacionados direta ou indiretamente com posse ou tráfico de drogas ilícitas <sup>48</sup>. Para além do mais, em ambiente prisional, existem fatores de risco adicionais que contribuem para a disseminação destas infecções, como a convivência de reclusos em espaços com condições de lotação esgotadas e sistemas de ventilação fracos, assédio sexual, stress psicológico e realização de tatuagens e *piercings* sem condições de higiene e segurança <sup>47</sup>.

A maior parte dos estudos realizados na população de reclusos indicam existir uma maior taxa de prevalência de AgHBs nesta população, quando comparada com a população geral (1,96 – 17,0%). Um estudo realizado em estabelecimentos prisionais da região Norte de Portugal revelou uma prevalência de 1,9% para hepatite B. É também necessário salientar que, de acordo com um questionário realizado em 2005, só 44% dos reclusos do sexo masculino e 13% dos reclusos do sexo feminino cronicamente infetados estavam cientes do seu estado de saúde <sup>26</sup>. O desconhecimento do seu estado de saúde, em conjunto com os comportamentos de risco, constitui um grave risco para a saúde pública em geral.

## 1.12 Tratamento da infeção crónica

Atualmente, a terapia utilizada para a gestão da hepatite B crónica inclui o interferão alfa peguilado (Peg- $\alpha$ -INF) e fármacos análogos de nucleosídeos (NA) administrados oralmente <sup>17,49</sup>. O objetivo do tratamento é obter uma “cura funcional” da doença, definida pela perda do AgHBs, preferencialmente com o desenvolvimento de anticorpos contra este antígeno (anti-HBs) no soro, a normalização das enzimas hepáticas, e melhoria da histologia do fígado <sup>49</sup>.

Globalmente, os NA são considerados a melhor escolha. Estes fármacos são inibidores da transcriptase reversa de segunda geração, assemelhando-se aos nucleosídeos de ocorrência natural e causam a terminação da cadeia de DNA nascente quando são integrados. Este grupo de fármacos incluem: entecavir (análogo de guanosina), lamivudina (análogos da citidina), adefovir, tenofovir (análogos da adenosina) e telbivudina (análogo da timidina) <sup>17,50</sup>. Estes fármacos suprimem os níveis de DNA do VHB, previnem ou revertem a progressão da doença para cirrose, e reduzem o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Por outro lado, o Peg- $\alpha$ -INF é administrado por um curto período de tempo e atua em diferentes fases do ciclo de vida do VHB <sup>49</sup>.

No entanto, o tratamento da hepatite B tem algumas limitações. No caso do Peg- $\alpha$ -INF, o seu uso como a terapia primária é limitado pela sua baixa eficácia e tolerância ao interferão e só pode ser utilizado durante cerca de 48 semanas. No fim deste período de tempo de tratamento apenas um terço dos pacientes pode alcançar uma cura funcional <sup>17</sup>. Por outro lado, embora os NA suprimam os níveis de DNA e previnam a progressão da doença, eles não atuam diretamente no DNA viral e a sua preservação no organismo oferece uma fonte contínua de transcritos de RNA viral que impede a eliminação de AgHBs e a cura na maioria dos pacientes. Este facto faz com que o tratamento se prolongue indefinidamente <sup>17,49</sup> podendo conduzir a toxicidade cumulativa que pode causar problemas hepáticos <sup>17,50</sup>.

Devido às limitações do tratamento da hepatite B, novos fármacos têm sido desenvolvidos, embora ainda nenhum tenha sido aprovado para o tratamento dos pacientes. Entre os novos fármacos desenvolvidos encontram-se: NA potenciadores que têm como objetivo aumentar a eficácia dos fármacos já administrados, e inibidores da ligação do VHB aos recetores nas células hepáticas. Outro tipo de terapias englobam técnicas de edição genética de modo a inibir a formação do DNA viral, intervenções que ativam a resposta imune inata, como agonistas de recetores do tipo Toll, e intervenções que regulam o sistema imune adaptativo, como vacinas terapêuticas estão também a ser investigadas para tratamento da hepatite B crónica <sup>17,49</sup>.

## 1.13 Mutações de resistências a fármacos

Outro problema relacionado com a terapia com recurso a análogos de nucleosídeos é o desenvolvimento de resistências. Atualmente as resistências a NA podem ser divididas em quatro categorias, as quais podem ser agrupadas em dois grupos: mutações clássicas e mutações não clássicas <sup>51</sup>.

O grupo das mutações clássicas é constituído pela primeira categoria de mutações, denominada de mutações de resistência primária em que a alteração de aminoácidos resulta na redução da suscetibilidade ao agente antiviral, e pela segunda categoria de mutações, denominada de mutações de

resistência secundária, que engloba substituições de aminoácidos que restauram defeitos funcionais na atividade de transcriptase reversa do VHB causados pela resistência primária<sup>51,52</sup>. O grupo das mutações não clássicas é formado pela terceira categoria de mutações, denominada de mutações de resistência putativas que se podem relacionar com um tratamento prolongado com NA, e a quarta categoria, mutações que podem ser detetadas antes do início do tratamento. Porém, ao contrário das mutações clássicas não existem muitos dados sobre a resistência fenotípica nem é conhecido o significado clínico deste último grupo de mutações não clássicas<sup>51</sup>.

De acordo com a literatura foram identificados oitos codões associados a mutações de resistência primária (rtI169T, rtA181T/V, rtT184S/C/G/A, rtA194T, rtS202G/C/I, rtM204V/I, rtN236T e rtM250V) e três codões associados a mutações de resistência secundária (rtL80I, rtV173L e rtI180M), localizados na região da transcriptase reversa (RT) do genoma VHB<sup>52</sup>, estando as mutações associadas a um determinado fármaco.

O entecavir é um dos fármacos mais utilizados no tratamento da hepatite B devido à sua elevada barreira genética, ou seja, é necessário um grande número de mutações para que ocorra uma diminuição significativa da suscetibilidade ao fármaco. No caso específico de resistência ao entecavir, será necessário que inicialmente ocorra a mutação primária rtM204V/I, seguida de uma ou mais das mutações primárias seguintes: rtI169T, rtT184A/G/I/S, rtS202G/I ou rtM250V. A combinação destas mutações diminui 100x a suscetibilidade ao fármaco. Para além disso, a este fármaco também foram relacionadas a mutação secundária rtL180M/C<sup>53,54</sup>.

Outro fármaco com uma alta barreira genética é o tenofovir, sendo que ainda nenhuma mutação genotípica específica foi associada a esta droga<sup>53</sup>. Em 2020 Thai e colaboradores sugeriram que a capacidade das estirpes VHB persistirem na presença de tenofovir é uma característica complexa geneticamente associada com mutações em vários locais do genoma do VHB<sup>55</sup>. Esta afirmação pode ser corroborada por dados publicados num artigo em 2019 onde Park e colaboradores mostraram que a presença da mutação quádrupla CYEI (rtS106C [C], rtH126Y [Y], rtD134E [E] e rtL269I [I]) conferiu uma completa resistência do VHB ao fármaco tenofovir, e que a mutação tripla CYE resulta numa diminuição da suscetibilidade do vírus ao fármaco<sup>56</sup>.

Os fármacos adefovir e telbivudina têm uma barreira genética intermédia. Ao adefovir foram associadas as mutações de resistência primárias rtA181T/V e rtN236T, que diminuem a suscetibilidade ao fármaco entre 5x a 10x, e à telbivudina foram associadas as mutações primárias rtA181T/V e rtM204I/V, e mutação de resistência secundária rtL80I/V<sup>53,54</sup>.

Por fim, a lamivudina tem uma baixa barreira genética, sendo que 70% dos pacientes tratados adquirem resistência ao fim de cinco anos, apresentando as mutações de resistência secundárias rtL80I/V, rtV173L e rtL180M/C, e as mutações de resistência primárias rtA181T/V e rtM204V/I/S associadas, e esta última diminui a suscetibilidade ao fármaco em 1000x<sup>53,54</sup>.

## 1.14 Impacto da vacinação no mundo e em Portugal

Devido à baixa taxa de eficácia do tratamento, a luta contra o VHB baseia-se maioritariamente na sua prevenção, a qual é feita principalmente através da vacinação, que apresenta uma eficácia descrita de 95 a 99%<sup>57,58</sup>. Esta vacina foi criada na década de 80 do século passado e é administrada no início da infância<sup>9,28</sup>, sendo este o método de imunização mais eficaz. Por essa razão, em 1997 a Organização

Mundial de Saúde recomendou que a vacina contra o VHB fosse incluída nos programas nacionais de vacinação dos países para serem administradas a crianças <sup>58</sup>.

Atualmente, 190 estados-membros instituíram a vacinação global contra a hepatite B. Esta imunização é efetuada com a administração de três doses da vacina a crianças, sendo que, em 2020, a taxa de cobertura global da vacina para hepatite B era de 83%. Destes 190 estados-membros, só 113 introduziram a administração da primeira dose da vacina a recém-nascidos durante as primeiras 24 horas de vida, em 2020, a taxa de cobertura global nestes 113 países era de 42%, com uma taxa de cobertura de 84% nos países da região do Pacífico Oeste, e só de 6% na região de África <sup>59</sup>.

Em Portugal, a vacina contra a hepatite B está integrada no Programa Nacional de Vacinação desde 1994 e, seguindo as indicações da OMS, desde 2000 que começou a ser administrada a todos os recém-nascidos com o esquema de administração de três doses: a primeira dada nas primeiras 24h de vida, a segunda aos dois meses e a terceira aos seis meses de vida. Em 2018, a taxa de cobertura vacinal contra o VHB aos 12 meses era de 98% <sup>57</sup>.

## 2 Enquadramento e objetivos do estudo

A infeção pelo VHB é uma das principais causas de cirrose e carcinoma hepatocelular e afeta milhares de pessoas mundialmente, sendo por isso considerada um grave problema de saúde pública, particularmente sentido nos países em desenvolvimento onde ainda não foi implementada a vacinação contra a hepatite B na população em geral. Atendendo às vias de transmissão do VHB, existem grupos populacionais que potencialmente possuem uma maior probabilidade de serem expostos ao vírus e adquirirem a infeção por VHB, nomeadamente os utilizadores de drogas injetáveis. Os comportamentos de risco como relações sexuais desprotegidas e a partilha de material contaminado, como seringas ou agulhas utilizadas no consumo de drogas, tatuagens e *piercings* podem ser as vias de transmissão do VHB. É também reconhecido que uma parte significativa dos reclusos distribuídos em estabelecimentos prisionais no país são indivíduos detidos por consumo ou posse de drogas ilícitas não sendo excluídos comportamentos de risco associados à potencial aquisição da infeção por VHB, ou de outras infeções virais infecciosas.

Em Portugal, a vacinação da Hepatite B foi introduzida no Plano Nacional de Vacinação em 1994. Desde 2000 que é administrada a todas as crianças, sendo a primeira dose dada logo aos recém-nascidos nas primeiras 24h de vida. Embora tenha havido um esforço para combater a disseminação deste vírus, através da vacinação, ainda existem indivíduos não vacinados, muitos integrados em grupos com comportamentos de risco cuja prevalência da infeção e determinação de genótipos do VHB em circulação não é conhecida. Para além do mais, o aparecimento de mutantes virais com capacidade de se evadir da ação protetora da vacina pode ser um problema bastante real que dificulta a eliminação deste vírus da população. Assim sendo, o diagnóstico e a caracterização molecular do VHB com a possível vigilância epidemiológica de variantes virais na população infetada continuam a ser de extrema importância para permitir tratamento precoce e monitorização desta infeção, e ainda contribuir para alcançar a meta traçada pela OMS de eliminação das hepatites virais até 2030.

O presente estudo teve como principal objetivo conhecer a prevalência do VHB numa população de 171 UDI frequentadores do programa de metadona desenvolvido em unidades de saúde móveis da cidade de Lisboa, com anticorpos para VHC, e identificar os genótipos em circulação numa população de 41 reclusos retidos em instituições prisionais de diferentes regiões do país com diagnóstico de hepatite B.

Foram ainda estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Caracterizar os grupos populacionais estudados com base em variáveis demográficas epidemiológicas, clínicas, educacionais e socioeconómicas conhecidas e de acordo com os critérios de seleção dos indivíduos.
2. Determinar a prevalência da infeção por VHB na população de UDI em estudo através do uso de técnicas de rastreio e moleculares
3. Classificar os genótipos de VHB para os casos diagnosticados na população de reclusos, através da análise de sequências das regiões S e Core do VHB com recurso à construção de árvores filogenéticas
4. Analisar posições aminoacídicas específicas nas sequências da RT obtidas para identificar alterações que possam conduzir a resistências ao tratamento da hepatite B

## **3 Materiais e métodos**

### **3.1 Seleção e caracterização de grupos populacionais em estudo**

#### **3.1.1 UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal**

No presente estudo foi selecionada uma amostra de conveniência constituída por plasmáticas de indivíduos frequentadores do programa de substituição de metadona desenvolvido em Unidades de Saúde Móvel na cidade de Lisboa. A maioria era utilizadora ou ex-utilizadora de drogas injetáveis ou inaladas (UDI), tendo sido exposta à infeção por VHC no passado <sup>60</sup>. Esta amostra de conveniência foi distribuída por dois subgrupos: um subgrupo de 140 UDI de naturalidade portuguesa com idade superior a 45 anos (nascidos antes de 1971) altura em que a vacina para VHB ainda não estava disponível, e um subgrupo de 31 UDI de indivíduos de qualquer idade, nascidos fora de Portugal (europeus, asiáticos, americanos e africanos). As amostras foram recebidas no laboratório entre julho de 2015 e maio de 2016. O consentimento informado dos indivíduos foi obtido através dos psicólogos e assistentes sociais da equipa da Associação de Recuperação de Toxicodependentes - Ares do Pinhal que apoiam diariamente os frequentadores do programa de metadona.

A informação disponível para a caracterização das amostras de UDI em estudo incluiu sexo, idade, naturalidade, utilização de drogas ilícitas (injetáveis ou não), consumo de álcool, diagnóstico de hepatite C crónica ou resolvida, e ainda, valores dos marcadores bioquímicos do fígado.

#### **3.1.2 Reclusos**

O segundo grupo populacional em estudo incluiu uma seleção de 47 amostras obtidas de 41 de indivíduos detidos em instituições prisionais da região de Lisboa e do Norte do país, com infeção de hepatite B ativa (seis amostras colhidas aos mesmos indivíduos em diferentes períodos de tempo). As amostras foram recolhidas em laboratório entre janeiro de 2017 e setembro de 2021. A realização do estudo de Hepatite B obteve a aprovação da Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

A caracterização da população de reclusos incluiu sexo, idade, naturalidade, estabelecimento prisional, e valores de carga viral (Anexo 1).

### **3.2 Organigrama da metodologia desenvolvida no estudo**

As amostras correspondentes a UDI de naturalidade portuguesa foram inicialmente rastreadas pela pesquisa de antígeno AgHBs utilizando *pools* de plasma. As amostras dos restantes UDI selecionados que nasceram fora de Portugal foram diretamente submetidas a metodologia molecular, tal como as amostras correspondentes a reclusos que apresentavam infeção ativa para VHB. Esta estratégia foi delineada atendendo ao número de amostras a testar, disponibilidade de reagentes no laboratório e limite de tempo para executar o programa de trabalhos.

A metodologia molecular aplicada diretamente a plasmas individualizados correspondentes a cada um dos indivíduos começou pela extração do DNA, seguida da amplificação da região S do VHB (1ª linha de *primers*) ou da região Core do VHB (2ª linha de *primers*). Posteriormente, foi feita a visualização dos resultados por eletroforese em gel de agarose, purificação e sequenciação dos produtos de PCR obtidos e respectiva análise bioinformática das sequências com construção da árvore filogenética para genotipagem do VHB (Figura 3.1).

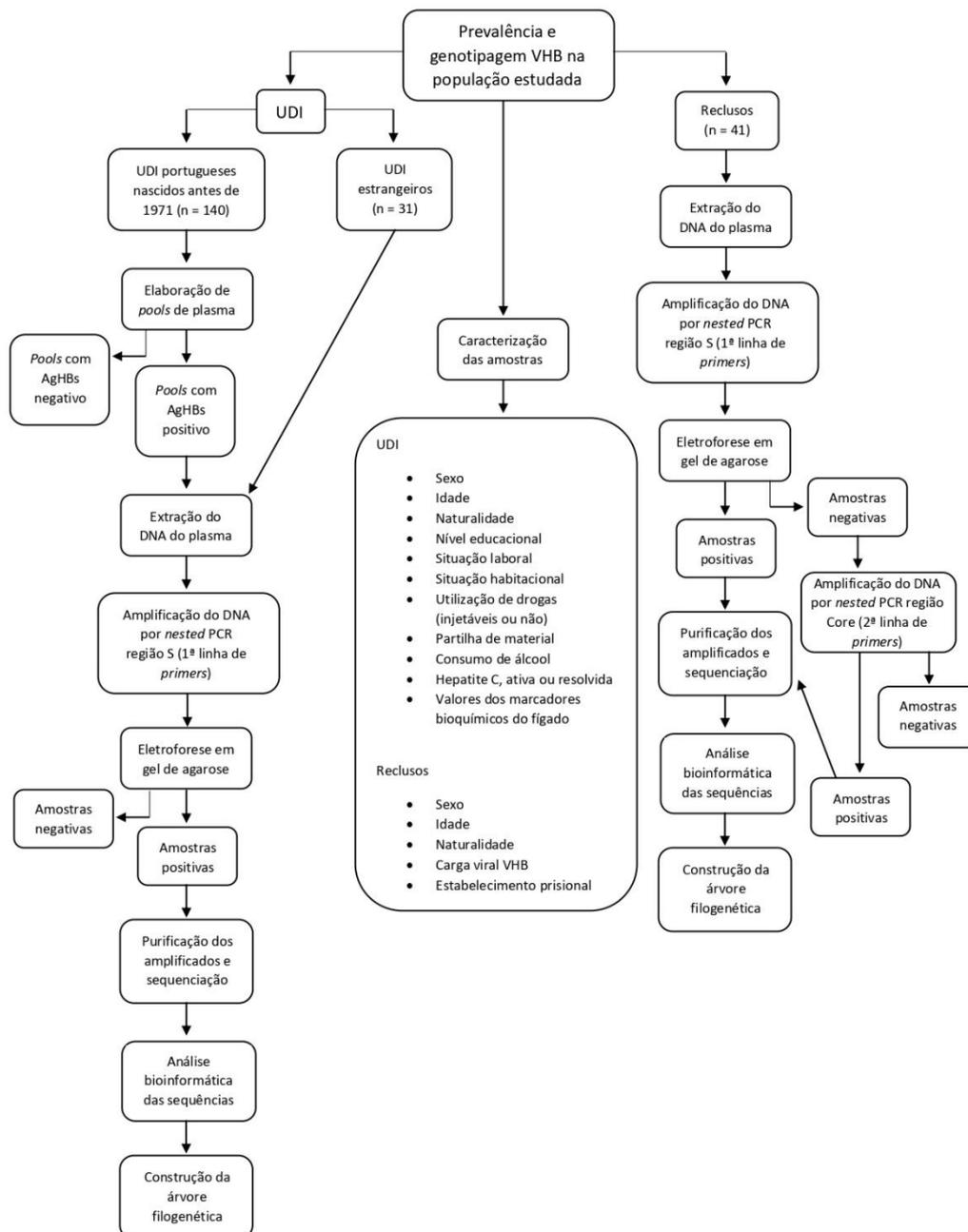


Figura 3.1 Organograma descritivo da metodologia utilizada para determinar a prevalência e identificar os genótipos do VHB nos grupos populacionais estudados

### 3.3 Elaboração de *pools* de plasma e rastreio do AgHBs

De modo a apurar o efeito da diluição de amostras aquando testadas em *pools* foram consultados estudos na literatura em que foi realizado este procedimento para a pesquisa de AgHBs. Rabenau e colaboradores em 1996, analisaram a presença de AgHBs em sete *pools*, cada uma constituída por cerca de 14 000 amostras. Os resultados obtidos mostraram existir uma diminuição da sensibilidade do teste explicada pela formação de complexos antigénio-anticorpo nas *pools* <sup>61</sup>. Por outro lado, Mele e colaboradores em 2000, realizaram testes de validação para o uso de *pools* de plasma, sendo estas criadas com elevado número de amostras (entre 5 000 e 10 000 plasmas). Neste estudo, mais uma vez foi verificada a diminuição da sensibilidade do teste, no entanto, observou-se que amostras com baixa reatividade para AgHBs eram ainda identificadas através de *pools* de 5 000 plasmas <sup>62</sup>.

Tendo em conta os resultados dos estudos acima descritos, optou-se pela elaboração de *pools* para rastreio de AgHBs nas amostras de UDI de naturalidade portuguesa (n = 140) incluídas no presente estudo. As *pools* criadas continham dez plasmas de dez indivíduos diferentes (25 µl de cada amostra perfazendo um volume final total de 250 µl) sendo o total das 14 *pools* sujeitas a uma pesquisa de AgHBs utilizando o kit “ARCHITECT HBsAg Qualitative II Reagent Kit” (Abbott Laboratories, Chicago, EUA) com recurso ao analisador automático de imunoensaios Architect Plus (Abbott Laboratories, Chicago, EUA).

Os plasmas que constituíram as *pools* testadas com resultados de AgHBs negativos foram considerados negativos para infeção VHB. *Pools* com resultados positivos foram desdobradas nos respetivos plasmas que as constituíram, sendo cada um deles submetido a metodologia molecular iniciada pela extração do DNA para identificação dos casos positivos de VHB.

### 3.4 Extração do DNA VHB

Os plasmas correspondentes aos UDI nascidos fora de Portugal e aos reclusos foram submetidos individualmente e diretamente ao procedimento de extração de DNA VHB. A extração do DNA foi realizada com o kit “QIAamp® DNA Mini Kit” (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações gerais do fabricante. Foram feitas pequenas alterações relativamente ao volume de plasma inicial a extrair, sendo ajustado o volume de tampão de lise e de proteinase K a usar, mantendo as proporções descritas no procedimento do fornecedor. Deste modo, apenas para as amostras com carga VHB baixa (< 1000 UI) foi extraído DNA VHB partindo de um volume de plasma de 400 µl. Para todas as restantes amostras com valores de carga viral para VHB superiores a 1000 UI a extração de DNA foi feita a partir de 200 µl de plasma.

Os plasmas foram lisados com tampão de lise e proteinase K, homogeneizados num vortex durante 15 segundos e incubados num banho seco a 56 °C durante 10 minutos, seguindo-se a precipitação do DNA com etanol.

Cada uma destas amostras preparadas foi transferida para uma coluna do kit, com o respetivo tubo de recolha, e centrifugada a 8 000 rpm (5415D Digital Centrifuge, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) durante um minuto à temperatura ambiente (T.A), sendo posteriormente o tubo de recolha descartado e a coluna com o DNA já fixado colocada num novo tubo.

De seguida, procedeu-se a duas lavagens consecutivas da amostra com o tampão de lavagem AW1 e AW2, sendo feita uma centrifugação (8 000 rpm durante um minuto, e 13 200 rpm durante 3,5 minutos

pós a adição de cada um dos tampões, respetivamente). O tubo de recolha foi substituído após cada uma das lavagens.

Por fim, foi adicionado à coluna 25 µl tampão de eluição AE, tendo este sido incubado, na coluna, durante um minuto à T.A. De modo a eluir o DNA retido na coluna esta foi centrifugada a 8 000 rpm durante um minuto. Este passo foi repetido, mantendo as mesmas condições, sendo transferido o volume final de 50 µl de eluído obtidos para um tubo de rosca de fundo cónico devidamente identificado e conservado a menos 20 °C até à sua utilização.

### **3.5 Amplificação de fragmentos genómicos do VHB**

Todas as amostras extraídas foram submetidas a amplificação da região S (nt 155-835) do VHB por *nested* PCR. As amostras em que não foi possível amplificar com sucesso a região S foram submetidas a amplificação da região Core (nt 1814-2452) do VHB por *nested* PCR. Todos *primers* utilizados foram obtidos a partir de um *stock* com uma concentração de 100 µM, diluídos em alíquotas de 10 µM para as soluções de trabalho utilizadas nas reações de amplificação.

Nos protocolos de amplificação foram também adicionados controlos positivos e negativos, de modo a validar os protocolos experimentais realizados e controlar a eventual ocorrência de contaminações.

#### **3.5.1 Caracterização dos primers selecionados para o estudo**

Na amplificação de fragmentos alvo do genoma de VHB por *nested* PCR foram utilizados primers descritos em Osiowy *et al.*, 2011<sup>63</sup>. Para a região S utilizaram-se dois *primers* externos, HBVpolyDF (direto) e HBVpolyDR (reverso) na primeira ronda de amplificação e dois *primers* internos HBVsF01in (direto) e HBVR743as (reverso), na segunda ronda de amplificação.

Para a região Core, foram utilizados dois *primers* externos, HBVC2f (direto) e HBVC2r (reverso) na primeira ronda de amplificação e dois *primers* internos HBVSurvCF (direto) e HBVSurvCR (reverso), na segunda ronda de amplificação.

As características dos primers e a sua localização no genoma determinada a partir da sequência de referência NC\_003977.2 encontra-se descrita na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Caracterização dos primers para amplificação das regiões alvo do genoma VHB

	Região genómica	Designação dos primers	Sequência (5'-3')	Posição no genoma (nt)	Tamanho do fragmento (pb)
1ª linha de primers	Pol/RT	HBVpolyDF HBVpolyDR	CCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAG GCCAAGTGTTTGCTGACGCAAC	58-79 1177-1198	1140
	S	HBVsF01in HBVR743as	ACCCTGYRCCGAACATGGA CAACTCCCAATTACATARCCCA	143-161 880-901	758
2ª linha de primers	Core	HBVC2f HBVC2r	ATGGMRACCACCGTGAACGC YCCCACCTTATGWGTCCAAGG	1610-1629 2459-2479	869
		HBVSurvCF HBVSurvCR	GGCTTTRGGGCATGG GACGCGGYGATTGAG	1892-1906 2405-2419	527

### 3.5.2 Condições da mistura de reação

a) Para as amostras da população de UDI portuguesas

Para amplificação das regiões Pol/RT e S do VHB utilizou-se a enzima AmpliTaq® Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Waltham, EUA) em ambas as rondas de amplificação.

Na primeira ronda de amplificação, para além da enzima, a mistura de reação consistiu na adição dos primers externos HBVpolyDf e HBVpolyDr com concentrações de 10 µM, água ultrapura, e os restantes componentes necessários para a reação (Tabela 3.2). Seguidamente foram adicionados 10 µl de DNA, perfazendo um volume final de 50 µl.

Para a segunda ronda de amplificação foi usada uma mistura de reação semelhante à mistura acima descrita, e usados os primers internos HBVsF01in e HBVR743as. Foram adicionados 2 µl do produto amplificado na primeira ronda de amplificação perfazendo um volume total de reação final de 25 µl.

As misturas de reação e os programas de amplificação estão descritos respetivamente nas Tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2 Mistura de reação utilizada na amplificação de fragmentos das regiões Pol/RT (1ª ronda) e S (2ª ronda) do VHB em amostras da população de UDI nascidos em Portugal

Primeira ronda - <i>Primers</i> externos		Segunda ronda - <i>Primers</i> internos	
Stock de reagentes	Volume de reação (μL)	Stock de reagentes	Volume de reação (μL)
10x PCR Buffer	5	10x PCR Buffer	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5	25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
10 mM dNTPs	1	10 mM dNTPs	0,5
10 μM Primer (HBVpolyDf)	2	10 μM Primer (HBVsF01in)	1
10 μM Primer (HBVpolyDr)	2	10 μM Primer (HBVR743as)	1
5U/μl Taq Gold	0,25	5U/μL Taq Gold	0,125
H <sub>2</sub> O	24,75	H <sub>2</sub> O	15,375
Amostra de DNA extraído de plasma: 10 μL		Amostra de produto de 1ª ronda PCR: 2 μL	
<b>Volume final de reação: 50 μL</b>		<b>Volume final de reação: 25 μL</b>	

Tabela 3.3 Programa de amplificação das regiões Pol/RT (1ª ronda) e S (2ª ronda) do VHB em amostras da população de UDI nascidos em Portugal

1ª ronda de amplificação		
Desnaturação inicial	95 °C, 5 min	x1
Etapas de amplificação	94 °C, 30 seg; 50 °C, 30 seg; 72°C, 45 seg	x5
	94 °C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 72 °C, 45 seg	x35
Extensão	72 °C; 7 min	x1
2ª ronda de amplificação		
Desnaturação inicial	95 °C, 10 min	x1
Etapas de amplificação	95 °C, 30 seg; 45 °C, 45 seg; 72°C, 45 seg	x25
	95°C, 30 seg; 45 °C + 0,3 °C/ciclo, 45 seg; 72 °C, 45 seg	x20
Extensão final	72 °C; 7 min	x1

b) Para as amostras da população de UDI nascidos fora de Portugal

Na primeira ronda de amplificação foi utilizado o sistema “illustra™ puReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). Este sistema é composto por microtubos

contendo microesferas de reagentes liofilizados aos quais se adicionam os *primers* referentes à reação de amplificação pretendida e água ultrapura, de modo a reconstituir para um volume final de 25 µl. Após a efetuada a reconstituição obtém-se uma solução com a concentração final 200 µM dNTP, Tris-HCl a 10 µM, KCl a 50 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, e 2,5 U de PuRe Taq DNA polimerase. Aos microtubos contendo as microesferas foram adicionados os *primers* externos HBVpolyDf e HBVpolyDr com concentrações de 10 µM e perfez-se o volume com 15 µl água ultrapura, sendo posteriormente adicionados 10 µl de DNA.

Para a segunda ronda de amplificação recorreu-se novamente à enzima AmpliTaq® Gold DNA polymerase. A mistura de reação consistiu, para além da enzima, dos *primers* internos HBVsF01in e HBVR743as com as concentrações de 10 µM, de água ultrapura, bem como dos restantes componentes necessários à reação (Tabela 3.4), sendo posteriormente adicionados 2 µl do produto proveniente da primeira ronda de amplificação. Esta mistura de reação foi feita para um volume de reação final de 25 µl.

As misturas de reação e os programas de amplificação estão descritos respetivamente nas Tabelas 3.4 e 3.5.

Tabela 3.4 Mistura de reação utilizada na amplificação das regiões Pol/RT (1ª ronda) e S (2ª ronda) do VHB em amostras da população de UDI nascidos fora de Portugal

Primeira ronda - <i>Primers</i> externos		Segunda ronda - <i>Primers</i> internos	
Stock de reagentes	Volume de reação (µL)	Stock de reagentes	Volume de reação (µL)
10 µM Primer (HBVpolyDf)	1	10x PCR Buffer	2,5
10 µM Primer (HBVpolyDr)	1	25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
H <sub>2</sub> O	13	10 mM dNTPs	0,5
		10 µM Primer (HBVsF01in)	1
		10 µM Primer (HBVR743as)	1
		5U/µL Taq Gold	0,125
		H <sub>2</sub> O	15,375
Amostra de DNA extraído de plasma: 10 µL		Amostra de produto de 1ª ronda PCR: 2 µL	
<b>Volume final de reação: 25 µL</b>		<b>Volume final de reação: 25 µL</b>	

Tabela 3.5 Programa de amplificação das regiões Pol/RT (1ª ronda) e S (2ª ronda) do VHB em amostras da população de UDI nascidos fora de Portugal

1ª ronda de amplificação		
Desnaturação inicial	95 °C, 5 min	x1
Etapas de amplificação	95 °C, 30 seg; 50 °C, 30 seg; 72°C, 45 seg	x5
	95 °C, 30 seg; 55 °C, 30 seg; 72 °C, 45 seg	x35
Extensão final	72 °C; 7 min	x1
2ª ronda de amplificação		
Desnaturação inicial	95 °C, 5 min	x1
Amplificação	94 °C, 30 seg; 55 °C, 30 seg; 72°C, 40 seg	x35
Extensão final	72 °C; 7 min	x1

c) Para as amostras da população de reclusos

O protocolo de amplificação usado para o estudo de amostras de reclusos foi semelhante ao utilizado para amostras de UDI estrangeiros (Ver a tabela 3.4 e 3.5). No entanto, uma segunda abordagem foi implementada para as amostras de reclusos que não amplificaram para a região S do VHB, sendo por isso usados primers de segunda linha com alvo na amplificação da região Core do VHB.

Para amplificação da região Core do VHB utilizou-se a enzima AmpliTaq® Gold DNA polymerase, já anteriormente usada, em ambas as rondas de amplificação.

Na primeira ronda de amplificação da região Core, a mistura de reação consistiu, para além da enzima, dos *primers* externos HBVC2f e HBVC2r com concentrações de 10 µM, água ultrapura, e os restantes componentes necessários para a reação (Tabela 3.6). Seguidamente foram adicionados 10 µl de DNA, perfazendo um volume de reação final de 25 µl.

Para a segunda ronda de amplificação da região Core, a mistura de reação foi semelhante à acima descrita, exceto os *primers* adicionados que, neste caso, foram os *primers* internos HBVSurvCF e HBVSurvCR. À mistura de reação foram adicionados 2 µl do produto amplificado na primeira ronda de PCR perfazendo um volume de reação final de 25 µl.

As misturas de reação e os programas de amplificação para a região Core estão descritos respetivamente nas Tabelas 3.6 e 3.7.

Tabela 3.6 Mistura de reação utilizada na amplificação de fragmentos Core do VHB em amostras da população de reclusos

Primeira ronda - <i>Primers</i> externos		Segunda ronda - <i>Primers</i> internos	
Stock de reagentes	Volume de reação (μL)	Stock de reagentes	Volume de reação (μL)
10x PCR Buffer	2,5	10x PCR Buffer	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5	25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
10 mM dNTPs	0,5	10 mM dNTPs	0,5
10 μM Primer (HBVC2f)	1	10 μM Primer (HBVSurvCF)	1
10 μM Primer (HBVC2r)	1	10 μM Primer (HBVSurvCR)	1
5U/μL Taq Gold	0,125	5U/μL Taq Gold	0,125
H <sub>2</sub> O	7,375	H <sub>2</sub> O	15,375
Amostra de DNA extraído de plasma: 10 μL		Amostra de produto de 1ª ronda PCR: 2 μL	
<b>Volume final de reação: 25 μL</b>		<b>Volume final de reação: 25 μL</b>	

Tabela 3.7 Programa de amplificação de fragmentos Core do VHB em amostras da população de reclusos

1ª ronda de amplificação		
Desnaturação inicial	95 °C, 10 min	x1
Etapas de amplificação	94 °C, 30 seg; 55 °C, 30 seg; 72°C, 40 seg	x40
Extensão final	72 °C; 7 min	x1
2ª ronda de amplificação		
Desnaturação inicial	95 °C, 5 min	x1
Etapas de amplificação	94 °C, 30 seg; 45 °C, 30 seg; 72°C, 40 seg	x35
Extensão final	72 °C; 7 min	x1

### 3.6 Visualização dos produtos submetidos a amplificação

Todos os produtos da segunda ronda de amplificação obtidos foram observados por eletroforese em gel de agarose a 1,8% em tampão TAE 1x contrastado com o corante Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Waltham, EUA) de forma a ser possível a visualização dos fragmentos sob luz ultravioleta. A cada poço do gel foi adicionada uma mistura contendo 5 μl da amostra amplificada e 2 μl do corante azul de bromofenol. Para estimar a massa molecular dos fragmentos obtidos foi adicionado um marcador de referência que consistiu numa amostra de controlo de qualidade que apresentava banda correspondente a um fragmento de massa molecular igual ao esperado. A eletroforese foi efetuada para uma voltagem média de 120V e durante um tempo médio de corrida de uma hora.

Após a corrida eletroforética, os produtos foram visualizados com recurso ao transiluminador ultravioleta “Gel Doc XR System” (Bio-Rad, Califórnia, EUA) e a posição das bandas no gel foi comparada com a posição da banda do marcador observada. As amostras amplificadas que apresentavam banda numa posição semelhante à do marcador de referência foram selecionadas para serem purificadas e sequenciadas.

### **3.7 Purificação e sequenciação dos produtos amplificados**

Os fragmentos de interesse foram purificados de modo a eliminar o excesso de reagentes que não tenham sido gastos durante a amplificação e impedir que estes interferissem com a reação de sequenciação. A purificação foi feita utilizando 2  $\mu$ l do enzima “ExoSap-IT Clean-UP Kit” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) adicionados a 5  $\mu$ l do produto amplificado. De seguida, os tubos contendo esta mistura foram colocados num termociclador e sujeitos a uma incubação a 37 °C durante 15 minutos, seguida da inativação do enzima a 80 °C durante 15 minutos.

A sequenciação dos produtos purificados foi feita com recurso ao kit “BigDye™ Direct Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, Waltham, EUA), seguindo as recomendações gerais do fabricante.

A mistura foi constituída pelo reagente “BigDye”, pelo *primer* a 1  $\mu$ M (direto ou reverso, usado na segunda reação de amplificação), e do tampão de sequenciação (Applied Biosystems, Waltham, EUA), sendo o volume final da mistura de reação de 10  $\mu$ L ajustado com água ultrapura.

A mistura de reação e o programa de sequenciação estão descritos respetivamente, nas Tabela 3.8 e 3.9

Tabela 3.8 Mistura de reação para sequenciação dos fragmentos de interesse amplificados para VHB

Stock de reagentes		Volume de reação ( $\mu$ L)
1ª linha de <i>primers</i>	1 $\mu$ M <i>Primer</i> / tubo de reação (HBVsF01in ou HBVR743as)	1
2ª linha de <i>primers</i>	1 $\mu$ M <i>Primer</i> / tubo de reação (HBVSurvCF ou HBVSurvCR)	
	Big Dye	1
	H <sub>2</sub> O	Ajustado ao volume final
	Sequencing buffer 5x	2
Amostra de purificado: volume variável		
<b>Volume final de reação: 10 <math>\mu</math>L</b>		

Tabela 3.9 Programa de sequenciação dos fragmentos amplificados do genoma VHB

Desnaturação inicial	96 °C, 4 min	x1
Etapas de amplificação	96 °C, 10 seg; 50 °C, 5 seg; 60 °C, 4 min	x25
Extensão final	60 °C; 8 min	x1

Após a corrida do programa de sequenciação, as amostras foram entregues à Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do INSA, para serem corridas no equipamento de sequenciação automática. As sequências foram posteriormente enviadas para o laboratório para a sua análise.

Todas as sequências obtidas para as regiões S e Core do VHB neste estudo foram submetidas no GenBank com o número de acesso ON506925 e do número de acesso ON506695 a ON506741.

### 3.8 Análise bioinformática das sequências

#### 3.8.1 Alinhamento e construção de sequências de consenso

As sequências obtidas foram visualizadas e corrigidas com o auxílio do software *Chromas*, versão 2.6.6. De seguida, foram alinhadas com o programa *BioEdit*, versão 7.2.5, de modo a construir as sequências consenso para cada amostra e para cada região genómica do VHB em análise. Para cada posição de nucleotídeo, foi considerado o nucleotídeo correspondente ao pico de maior intensidade. No caso de serem observados dois picos sobrepostos, o código de nucleotídeos IUPAC foi usado para descrever a degenerescência das regiões consenso (Anexo 2). As sequências de consenso obtidas foram inicialmente classificadas por Blast utilizando a base de dados NCBI<sup>64</sup> e a base de dados do VHB, HBVdb<sup>65</sup>.

#### 3.8.2 Alinhamento e construção das árvores filogenéticas

Para a classificação molecular mais detalhada das sequências obtidas para cada amostra e região genómica do VHB foi efetuado um alinhamento de sequências de consenso com sequências de referência depositadas nas bases de dados correspondendo a diferentes genótipos do VHB em circulação na Europa, África e América do Sul usando o programa *BioEdit*, versão 7.2.5.

A construção das árvores filogenéticas para cada região genómica do VHB em estudo foi feita recorrendo ao software MEGA 11 selecionando o método *Neighbor-Joining* e o modelo de *Kimura* a dois parâmetros. De modo a avaliar a robustez dos ramos da árvore, utilizou-se o método de *bootstrapping* com base em 1000 réplicas sendo considerados estatisticamente significativos os valores de *bootstrap* quando iguais ou superiores a 70%.

### **3.8.3 Identificação de mutações de resistência a tratamento**

A análise das mutações de resistência foi realizada através da do alinhamento das sequências de aminoácidos da região RT para as amostras em estudo com o auxílio do software informático *BioEdit*, versão 7.2.5. As alterações de aminoácidos descritas como estando associadas com a resistência ao tratamento da hepatite B foram analisadas nas posições 80, 169, 173, 180, 181, 184, 194, 202, 204, 236 e 250 da transcriptase reversa.

## 4 Resultados

### 4.1 Caracterização da população de UDI estudada (nascidos em Portugal e fora do país)

#### 4.1.1 Análise demográfica, socioeconómica e educacional

Na população total de UDI estudada observou-se uma maior prevalência de indivíduos do sexo masculino nos dois subgrupos formados. Dos 140 UDI nascidos em Portugal, 113 (80,7%) indivíduos eram do sexo masculino e 27 (19,3%) eram do sexo feminino. Na subpopulação de 31 UDI nascidos fora de Portugal, 21 (67,7%) eram homens e 10 (32,3%) eram mulheres.

Dentro da subpopulação de UDI portugueses nascidos antes do ano de 1971, as idades variaram entre 45 e 64 anos, com idade média de 50,3 anos. A distribuição dos indivíduos por cada classe etária encontra-se descrita na Figura 4.1.

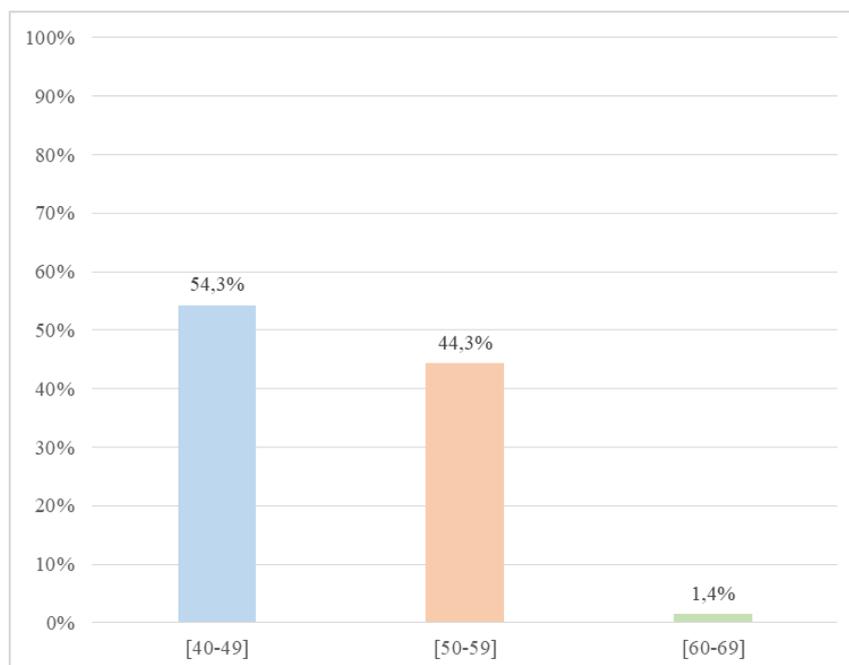


Figura 4.1 Distribuição de indivíduos UDI de nacionalidade portuguesa por classes etárias

Por outro lado, na subpopulação de UDI nascidos fora de Portugal, a seleção dos indivíduos para análise não foi dependente da idade, sendo que estas variaram entre 31 e 55 anos, com uma média de 42,1 anos de idade. A distribuição dos indivíduos por cada classe etária encontra-se descrita na Figura 4.2.

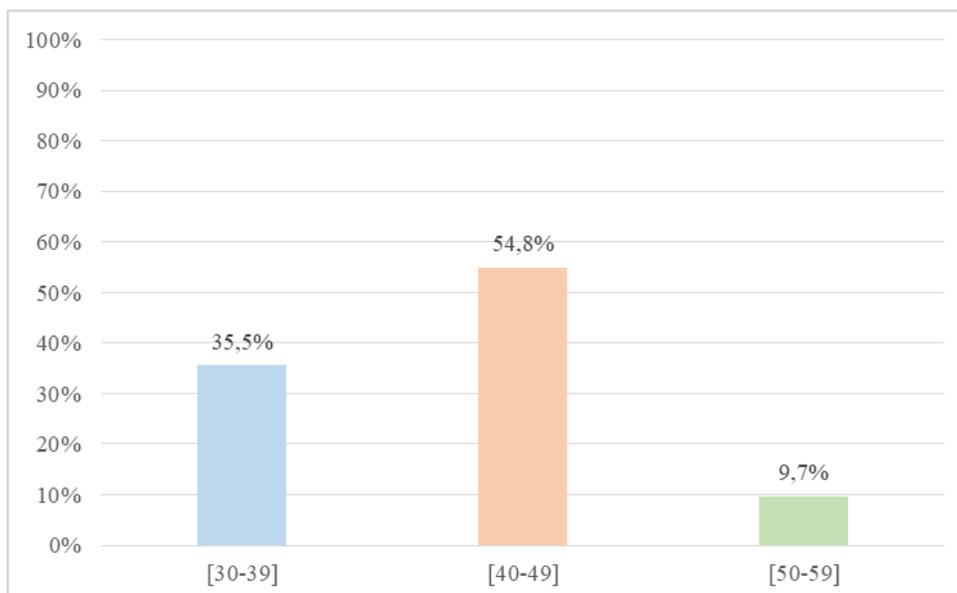


Figura 4.2 Distribuição de indivíduos UDI de nacionalidade estrangeira por classes etárias

Dos 31 UDI nascidos fora de Portugal, observou-se que a maioria dos indivíduos eram naturais do continente africano, sendo oito (25,8%) de Angola, quatro (12,9%) de Moçambique e dois (6,5%) de Cabo-Verde. Dos restantes indivíduos, verificou-se a proveniência de UDI do continente europeu, sendo quatro (12,9%) de Espanha, três (9,7%) de França, um (3,2%) da Roménia e quatro (12,9%) da Ucrânia; do continente asiático, foram incluídos dois (6,5%) indivíduos da Rússia e um (3,2%) da Arménia; e ainda do continente americano, dois (6,5%) indivíduos do Brasil (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Distribuição dos UDI nascidos fora de Portugal pelos diferentes continentes de origem

	Europa	África	América	Ásia	Total
Número de indivíduos	12	14	2	3	31
Proporção de indivíduos na população (%)	38,7	45,2	6,5	9,7	100

Em ambos os subgrupos populacionais estudados, verificou-se que a maioria dos indivíduos não tinha concluído o ensino básico (não concluíram o 9º ano de escolaridade) e foi observada uma baixa percentagem de UDI que concluiu o ensino superior (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com o seu nível educacional

	Não terminou ensino básico	Ensino básico	Ensino secundário	Ensino Superior	Não respondeu	Total
Número de indivíduos nascidos em Portugal (n, %)	79 (56,4)	42 (30,0)	12 (8,6)	6 (4,3)	1 (0,7)	140 (100,0)
Número de indivíduos nascidos fora de Portugal (n, %)	14 (45,2)	7 (22,6)	6 (19,4)	3 (9,7)	1 (3,2)	31 (100,0)

Observou-se que em ambos os subgrupos populacionais estudados a grande maioria dos indivíduos eram desempregados (mais de 70% dos casos). No entanto, entre os UDI nascidos em Portugal havia uma maior proporção de indivíduos com emprego estável, seguida de indivíduos com emprego temporário. Por outro lado, entre os UDI nascidos fora de Portugal observou-se que a percentagem mais significativa de indivíduos possuía apenas trabalho temporário (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com a sua situação laboral

	Estável	Temporário	Reformado/ Pensionista	Desempregado	Total
Número de indivíduos nascidos em Portugal (n, %)	20 (14,3)	13 (9,3)	6 (4,3)	101 (72,1)	140 (100,0)
Número de indivíduos nascidos fora de Portugal (n, %)	1 (3,2)	6 (19,4)	0	24 (77,4)	31 (100,0)

Quando analisada a situação habitacional dos UDI, observou-se que número de indivíduos com alojamento (casa ou quarto/pensão) era significativamente superior ao número de indivíduos sem alojamento em ambas as subpopulações. No entanto, cerca de 20% dos estrangeiros eram indivíduos sem-abrigo (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com a sua situação habitacional

	Com alojamento	Sem alojamento	Total
Número de indivíduos nascidos em Portugal (n, %)	134 (95,7)	6 (4,3)	140 (100,0)
Número de indivíduos nascidos fora de Portugal (n, %)	25 (80,6)	6 (19,4)	31 (100,0)

#### 4.1.2 Hábitos no consumo de drogas

Quando analisados os hábitos de consumo de drogas observou-se que mais de 70% dos casos, em ambos os subgrupos, admitiu ter consumido drogas injetáveis em algum momento da sua vida.

Entre os UDI nascidos em Portugal, sete (5,0%) indivíduos admitiram ter consumido somente drogas injetáveis, 32 (22,9%) admitiram consumir drogas injetáveis e fumadas, e 72 (51,4%) admitiram consumir drogas injetáveis, fumadas e inaladas. Não houve casos de indivíduos que tivessem consumido uma mistura de drogas injetáveis e inaladas sem o consumo de drogas fumadas. Por outro lado, neste subgrupo existiam indivíduos que referiram não consumir drogas injetáveis sendo que dez (7,1%) indivíduos admitiram consumir só drogas fumadas e 19 (13,6%) admitiram consumir drogas fumadas e inaladas. Nenhum dos indivíduos desta população referiu consumir só drogas inaladas.

No subgrupo dos UDI nascidos fora de Portugal, não foram identificados indivíduos que consumissem só drogas injetáveis ou uma mistura de drogas injetáveis e inaladas sem o consumo de drogas fumadas. No entanto, em algum momento da vida, oito (25,8%) indivíduos admitiram consumir drogas injetáveis e fumadas e 18 (58,1%) indivíduos consumiram os três tipos de drogas em simultâneo. Para além disso, quatro (12,9%) indivíduos admitiram consumir drogas fumadas e um (3,2%) admitiu ter simultaneamente consumido drogas fumadas e inaladas (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com os seus hábitos de consumo de drogas

	Consumo de drogas injetáveis	Sem consumo de drogas injetáveis	Total
Número de indivíduos nascidos em Portugal (n, %)	111 (79,3)	29 (20,7)	140 (100,0)
Número de indivíduos nascidos fora de Portugal (n, %)	26 (83,9)	5 (16,1)	31 (100,0)

O número de indivíduos que já partilharam o material de injeção e os que nunca partilharam é bastante semelhante entre os UDI portugueses. Por outro lado, entre os UDI nascidos fora de Portugal, a maior parte dos indivíduos que consumiu drogas injetáveis não apresentaram ter hábitos de partilha de materiais no consumo de drogas. O estatuto de “não aplicável” está relacionado com os indivíduos que não consumiram drogas injetáveis (Tabela 4.6)

Tabela 4.6 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com os seus hábitos de partilha de materiais usados no consumo de drogas

	Com partilha de material	Sem partilha de material	Não aplicável	Total
Número de indivíduos nascidos em Portugal (n, %)	56 (40,0)	55 (39,3)	29 (20,7)	140 (100,0)
Número de indivíduos nascidos fora de Portugal (n, %)	10 (32,3)	16 (51,6)	5 (16,1)	31 (100,0)

### 4.1.3 Consumo de álcool

Analisando a informação disponível foi possível observar que existiu uma proporção elevada de indivíduos com hábitos de consumo excessivo de álcool (mais de 4 bebidas por dia), com tendência superior nos estrangeiros, quando comparada com a proporção observada de indivíduos com consumo moderado ou baixo de álcool (4 ou menos bebidas por dia) (Tabela 4.7)

Tabela 4.7 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com os seus hábitos de consumo de álcool

	Consumo excessivo	Consumo moderado ou baixo	Não respondeu/NA	Total
Número de indivíduos nascidos em Portugal (n, %)	40 (28,6)	22 (15,7)	78 (55,7)	140 (100,0)
Número de indivíduos nascidos fora de Portugal (n, %)	13 (41,9)	4 (12,9)	14 (45,2)	31 (100,0)

#### 4.1.4 Análise do estado clínico da infeção VHC (crónica ou resolvida) e fibrose do fígado

Observou-se que entre os UDI nascidos em Portugal 70 (50%) indivíduos tinham uma infeção VHC resolvida e 70 (50%) indivíduos apresentavam uma hepatite C crónica. Por outro lado, verificou-se que no subgrupo de UDI nascidos fora de Portugal, 71% (n = 22) apresentavam uma hepatite C crónica, e apenas nove (29%) indivíduos apresentavam a infeção VHC resolvida.

O nível de fibrose do fígado dos indivíduos foi avaliado com base no cálculo do valor do APRI (AST to Platelet Ratio Index). Dos 140 indivíduos nascidos em Portugal, grande parte não apresentava lesões no fígado (F0-F1), no entanto, foram identificados 16 (11,4%) indivíduos com lesões graves no fígado (F3-F4). No subgrupo de UDI nascidos fora de Portugal observou-se que havia uma maior proporção de indivíduos já com lesões moderadas ou graves no fígado, correspondendo a mais de metade dos indivíduos (n = 17; 54,8%) (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 Distribuição dos UDI nascidos em Portugal e fora de Portugal de acordo com o grau de fibrose do seu fígado

	F0-F1	F2	F3-F4	Total
Número de indivíduos nascidos em Portugal (n, %)	93 (66,4)	31 (22,1)	16 (11,4)	140 (100,0)
Número de indivíduos nascidos fora de Portugal (n, %)	14 (45,2)	12 (38,7)	5 (16,1)	31 (100,0)

#### 4.1.5 Análise do estado clínico da infeção VIH e coinfeção com VHC

Verificou-se que no subgrupo de UDI portugueses, 24 (17,1%) indivíduos apresentavam infeção por VIH, estando dez (7,1%) deles coinfetados com VHC. No subgrupo de UDI estrangeiros, nove (29,0%) indivíduos estavam infetados por VIH, sendo que sete (22,6%) apresentavam coinfeção com VHC.

#### **4.1.6 Rastreamento do AgHBs no subgrupo de UDI nascidos em Portugal**

A pesquisa do AgHBs realizada nas 14 *pools* de plasma de indivíduos UDI portugueses testadas, resultou na obtenção de duas *pools* positivas para a presença deste antígeno, sendo a reatividade de cada uma das *pools* de 5386.9 S/CO (elevada reatividade) e de 1,57 S/CO (baixa reatividade)

#### **4.1.7 Amplificação da região S do genoma VHB**

As 20 amostras de plasma UDI que constituíram as *pools* positivas, juntamente com os plasmas dos UDI nascidos fora de Portugal foram isoladamente submetidas à amplificação da região S do genoma de VHB e os produtos obtidos observados em gel de agarose (Figura 4.3).

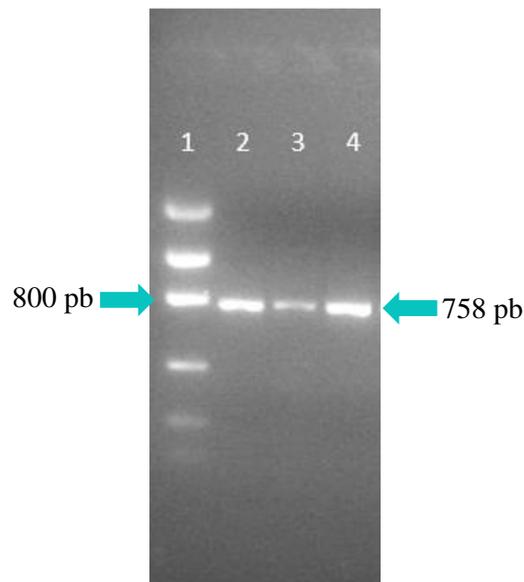


Figura 4.3 Produtos de PCR da região S visualizados em gel de agarose na população de UDI. No poço 1 foi adicionado o marcador “low DNA mass ladder (invitrogen)”. Nos poços 2 e 3 foram colocadas amostras para análise, no poço 4 foi colocado o controle positivo.

Na população de UDI portugueses foi confirmada a presença de DNA VHB em duas (1,4%) amostras (TX247 e TX248). Não tendo sido detetados a presença de DNA VHB na população de UDI estrangeiros.

#### **4.1.8 Classificação filogenética das sequências obtidas da região S**

Das duas amostras positivas para DNA VHB (TX247 e TX248) detetadas, apenas foi possível obter sequências de leitura clara para uma delas (TX247) e, por essa razão, o genótipo não foi determinado para TX248. A sequência de consenso da região S do genoma VHB obtida da amostra TX247, alinhada com 16 sequências de referência de diferentes genótipos de VHB (Anexo 3), agrupou de forma clara e robusta com sequências de referência do genótipo E (bootstrap 100%) o que permitiu uma classificação do genótipo VHB em causa (Figura 4.4).

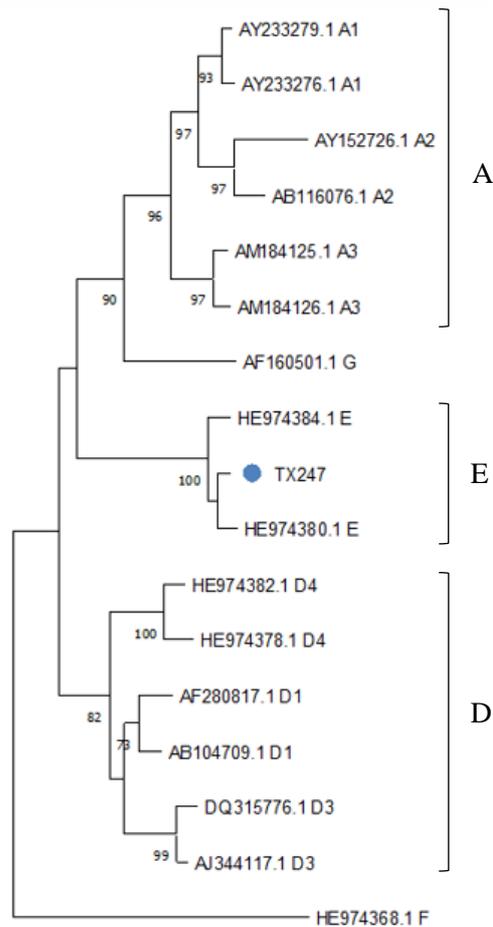


Figura 4.4 Árvore filogenética da região S do genoma VHB na população UDI. A árvore demonstra a relação filogenética entre a amostra estudada e as sequências de referência de diferentes genótipos de VHB. O círculo colorido sinaliza a sequência obtida a partir da amostra em estudo e a sua relação com as sequências de referência de diferentes genótipos do VHB. A classificação dos agrupamentos dos genótipos está destacada verticalmente à direita da figura.

## 4.2 Caracterização da população de reclusos estudada

### 4.2.1 Distribuição dos reclusos por estabelecimento prisional e análise demográfica da população

Na população de 41 reclusos com hepatite B estudados, observou-se que a grande maioria era do sexo masculino ( $n = 39$ ; 95,1%), havendo somente dois (4,9%) indivíduos do sexo feminino. A idade dos indivíduos variou entre 24 e 57 anos, sendo a idade média de 37,5 anos. A proporção de indivíduos em cada classe etária está descrita na Figura 4.5.

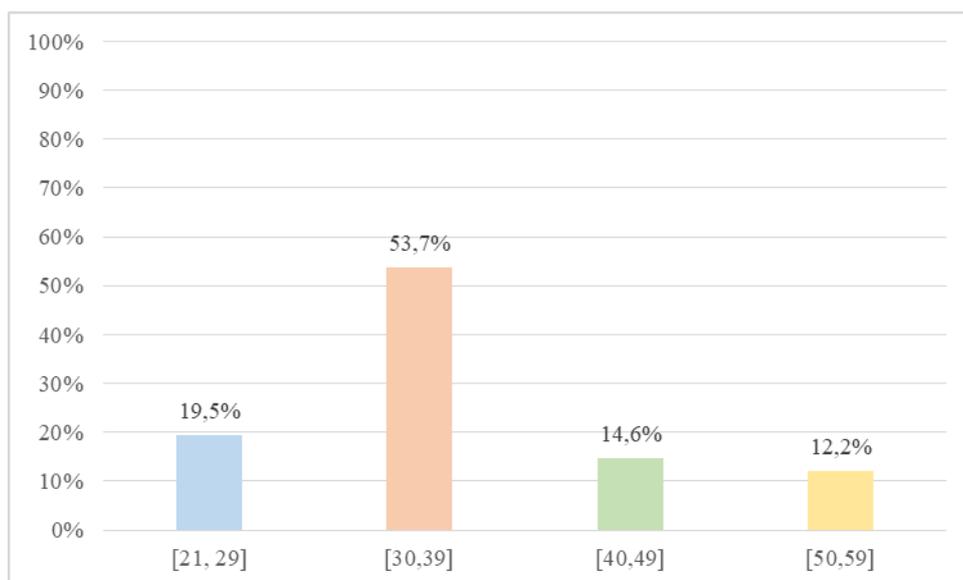


Figura 4.5 Distribuição de indivíduos da população de reclusos por classes etárias

Dentro da população de reclusos observou-se que 32 indivíduos estavam detidos em estabelecimentos prisionais na região metropolitana de Lisboa. Os restantes nove indivíduos encontravam-se detidos em estabelecimentos prisionais da região metropolitana do Porto (Figura 4.6).

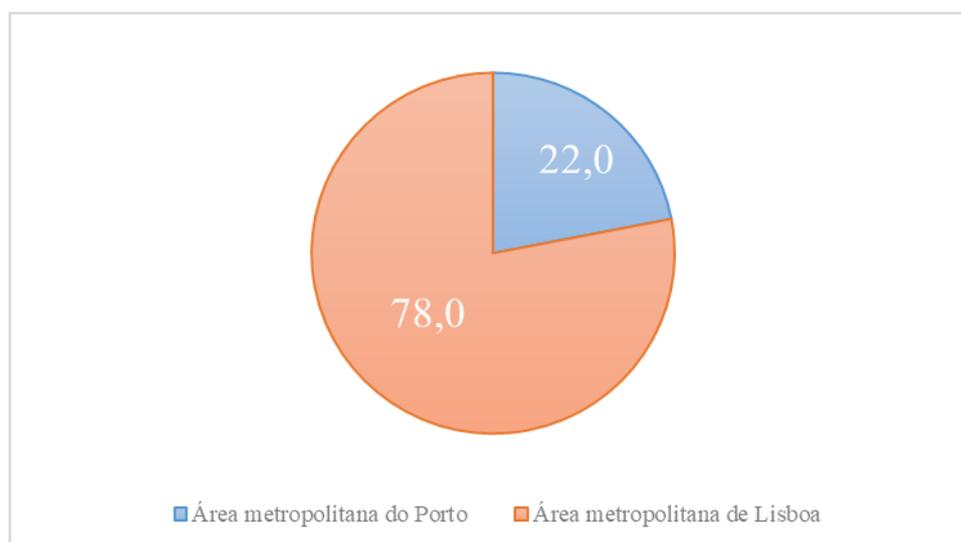


Figura 4.6 Distribuição de indivíduos da população de reclusos por região do país onde se encontram detidos

Vinte (48,8%) dos reclusos estudados nasceram em Portugal e quatro em outros países europeus, dois (4,9%) na Roménia e dois (4,9%) na Geórgia. Foram também identificados reclusos naturais do continente africano, dois (4,9%) de Angola, três (7,3%) de São Tomé e Príncipe, cinco (12,2%) de Cabo Verde, cinco (12,2%) da Guiné-Bissau e um (2,4%) de Moçambique, e ainda do continente americano, um (2,4%) indivíduo natural do Brasil (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 Distribuição dos indivíduos da população de reclusos pelos diferentes continentes

	Europa	África	América	Total
Número de indivíduos	24	16	1	41
Proporção na população (%)	58,5	39,0	2,4	100,0

#### 4.2.2 Análise dos valores de carga viral VHB

Todas as amostras de reclusos estudadas apresentavam valores de DNA de carga viral VHB detetáveis que variaram entre 119 e 62 500 000 UI/mL: 15 amostras apresentavam valores inferiores a 1000 UI/mL; 15 amostras tinham valores entre 1000 e 5000 UI/mL; duas apresentavam valores entre 5001 e 10 000 UI/mL e nove amostras tinham valores superiores a 10 000 UI/mL. A distribuição dos indivíduos de acordo com a variação dos intervalos de quantificação da carga viral do VHB encontra-se apresentada na Figura 4.7.

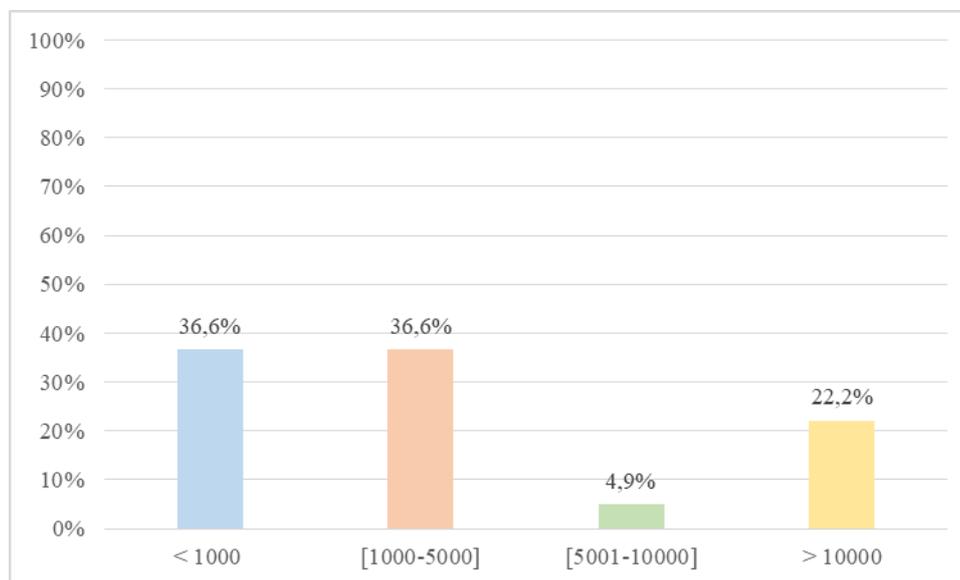


Figura 4.7 Distribuição dos indivíduos da população de reclusos de acordo com a sua carga viral (UI).

### 4.2.3 Amplificação da região S e Core do genoma VHB

As 47 amostras de plasma derivadas da população de reclusos foram amplificadas para a região S do genoma de VHB (Figura 4.8A). As 3 amostras que não amplificaram na região S foram amplificadas para a região Core do genoma de VHB (Figura 4.8B).

### 4.2.4 Classificação filogenética das sequências da região S e da região Core

As 44 sequências de consenso da região S obtidas foram alinhadas com 34 sequências de referência de diferentes genótipos do VHB (Anexo 3).

Pela topologia da árvore construída para a região S foi possível classificar 19 amostras com genótipo A (*bootstrap* de 70%), 13 amostras com genótipo D (*bootstrap* de 95%), 11 amostras com genótipo E (*bootstrap* de 99%) e uma amostra com genótipo F (*bootstrap* 100%). Porém, a informação molecular analisada não permitiu classificar todas as amostras ao nível dos respectivos subgenótipos, apresentando alguns subagrupamentos valores de *bootstrap* não significativos (< 70%).

Dentro do genótipo A nenhuma amostra agrupou no subgenótipo A1, seis amostras agruparam no subgenótipo A2 (*bootstrap* de 71%) e uma amostra agrupou no subgenótipo A3 (*bootstrap* de 89%). Relativamente ao genótipo D, uma amostra agrupou com sequências de referência do subgenótipo D1 (*bootstrap* de 93%), uma amostra agrupou no subgenótipo D3 (*bootstrap* de 85%) e quatro amostras agruparam com referências do subgenótipo D4 (*bootstrap* de 78%). Finalmente, dentro do genótipo F, foi possível observar uma amostra que agrupou com sequências de referência do subgenótipo F4 com um valor de *bootstrap* robusto (91%) (Figuras 4.9).

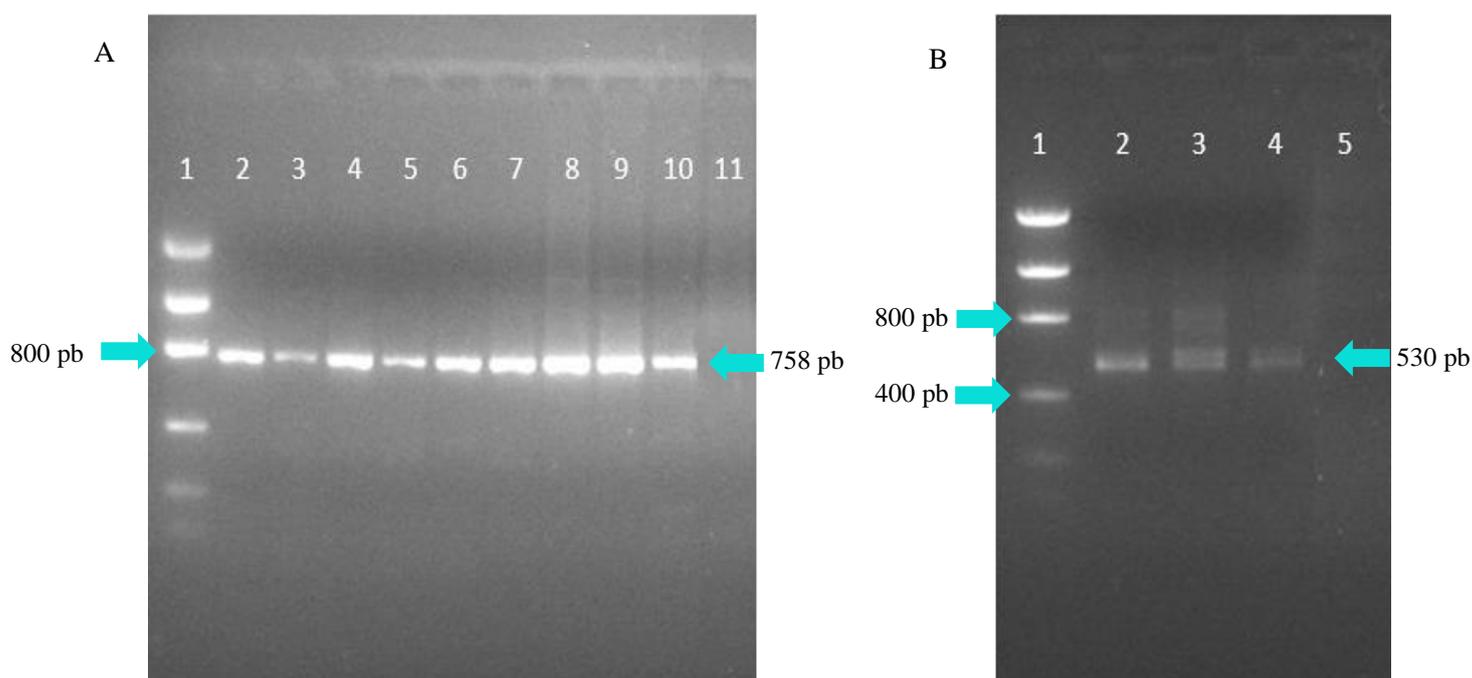


Figura 4.8 A) Produtos de PCR da região S visualizados em gel de agarose na população de reclusos. No poço 1 foi adicionado o marcador “low DNA mass ladder (invitrogen)”. Nos poços 2 a 9 foram colocadas amostras para análise, no poço 10 foi colocado o controle positivo e no poço 11 foi adicionado o controle negativo; B) Produtos de PCR da região Core visualizados em gel de agarose na população de reclusos. No poço 1 foi adicionado o marcador “low DNA mass ladder (invitrogen)”. Nos poços 2 a 4 foram colocadas amostras para análise e no poço 5 foi colocado o controle negativo da reação de amplificação.

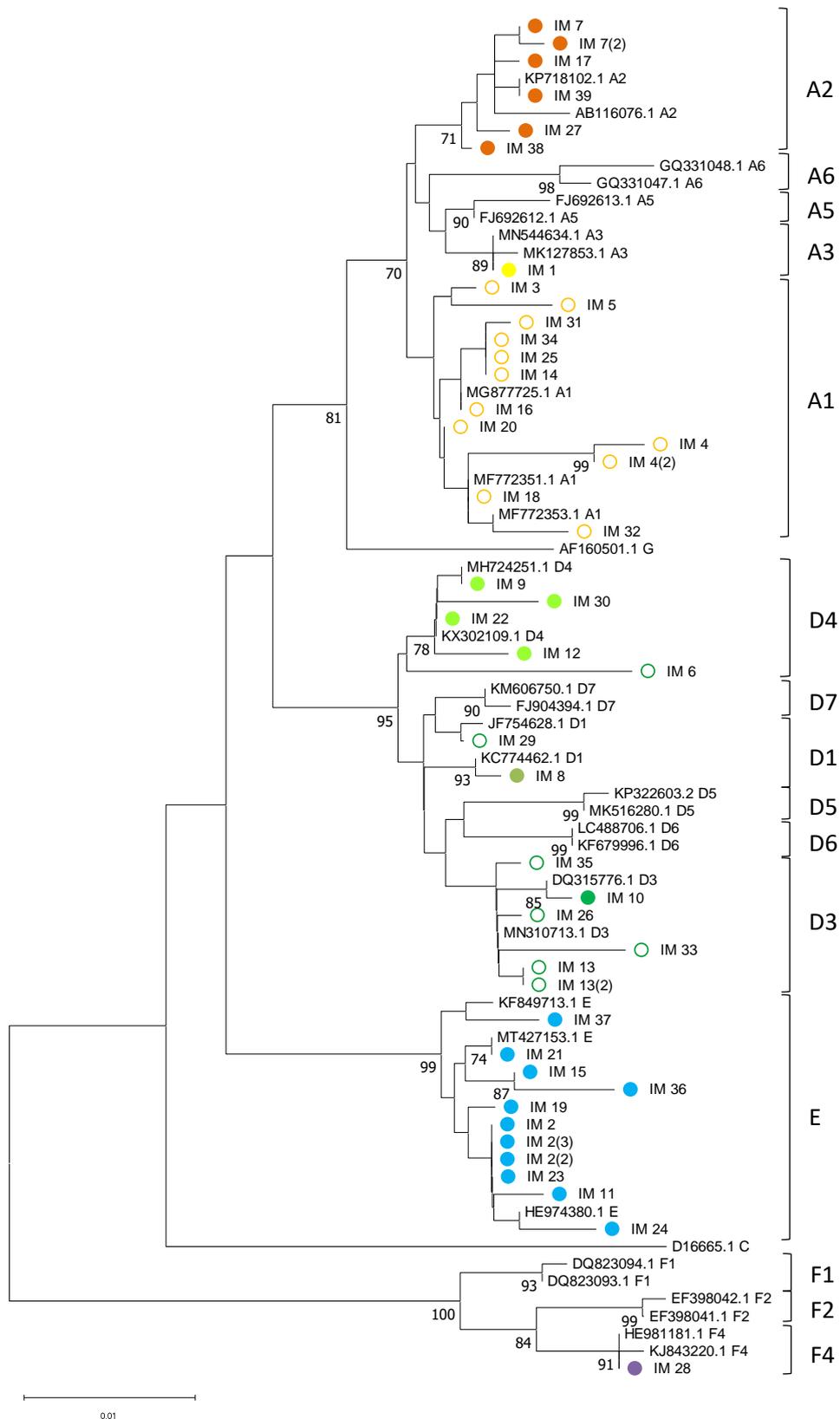


Figura 4.9 Árvore filogenética da região S do genoma VHB na população de reclusos mostrando a relação filogenética entre as sequências em estudo e as sequências de referência de diferentes genótipos de VHB. Os círculos coloridos sinalizam as sequências derivadas das amostras analisadas e a sua relação com as sequências de referência para os genótipos. A classificação dos agrupamentos dos genótipos e subgenótipos está destacada verticalmente à direita.

As 3 sequências de consenso da região Core do VHB foram alinhadas com 21 sequências de referência de diferentes genótipos do VHB (Anexo 3).

Pela topologia da árvore da região Core foi possível classificar duas com genótipo E (*bootstrap* de 99%). Foi ainda revelado que uma sequência agrupou com sequências de referência do genótipo A (*bootstrap* de 98%) e num subagrupamento de sequências de referência do subgenótipo A1 com um *bootstrap* robusto (95%) (Figura 4.10).

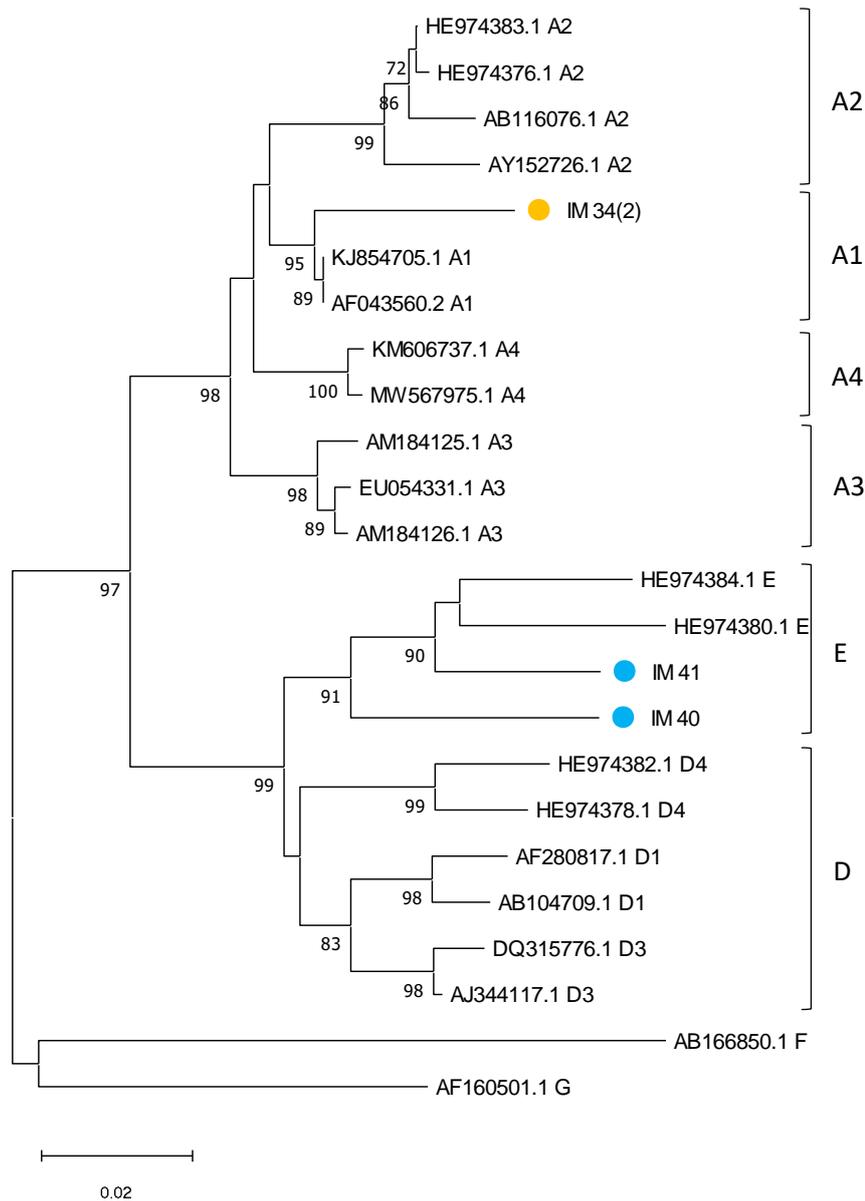


Figura 4.10 Árvore filogenética da região Core do genoma VHB na população de reclusos mostrando a relação filogenética entre as sequências em estudo e as sequências de referência de diferentes genótipos de VHB. Os círculos coloridos sinalizam as sequências derivadas das amostras analisadas e a sua relação com as sequências de referência para os genótipos. A classificação dos agrupamentos dos genótipos e subgenótipos está destacada verticalmente à direita.

#### 4.2.5 Frequência dos genótipos VHB distribuídos de acordo com a região e naturalidade dos reclusos

Na análise da frequência dos genótipos de VHB identificados (n = 41) verificou-se que a maioria dos indivíduos apresentava infeção pelo genótipo A (n = 17) seguindo-se a infeção pelo genótipo D (n = 12), genótipo E (n = 11), e por fim, infeção pelo genótipo F (n = 1). A proporção de indivíduos infetados com os vários genótipos identificados encontra-se descrita na Figura 4.11.

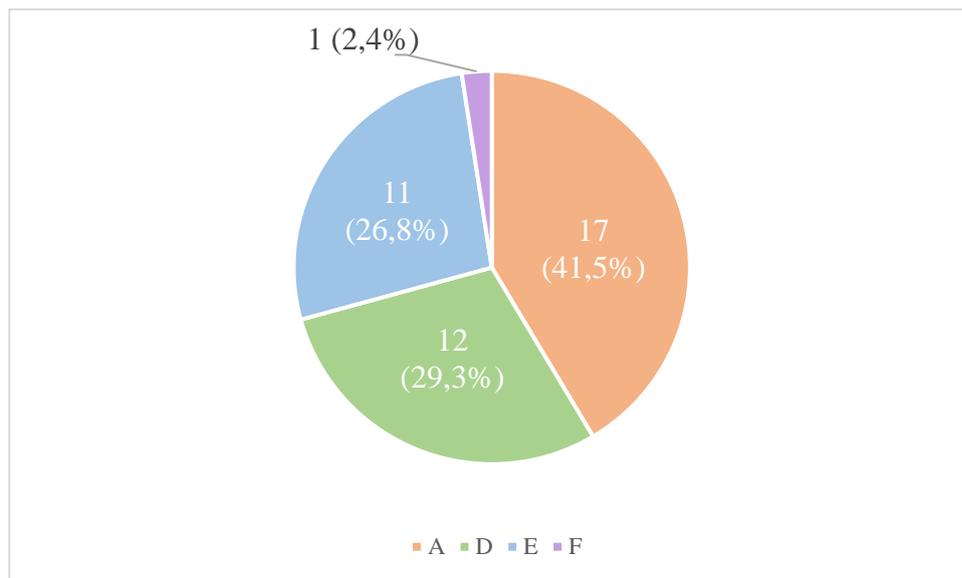


Figura 4.11 Proporção dos genótipos na população de VHB obtida na população de reclusos estudada [n (%)]

Observou-se que o genótipo mais comum detetado nos 32 reclusos na área da grande Lisboa foi o genótipo A (n = 16), seguido do genótipo E (n = 11) e, por fim, do genótipo D (n = 5) (Figura 4.12A). Não foi observado casos de reclusos oriundos da área de Lisboa infetados com o genótipo F na população estudada. Por outro lado, na região do grande Porto (n = 9), o genótipo de VHB mais comum foi o genótipo D (n = 7), seguido do genótipo A (n = 1) e do genótipo F (n = 1). Não houve casos de reclusos com origem na região do Porto infetados com o genótipo E na população estudada (Figura 4.12B).

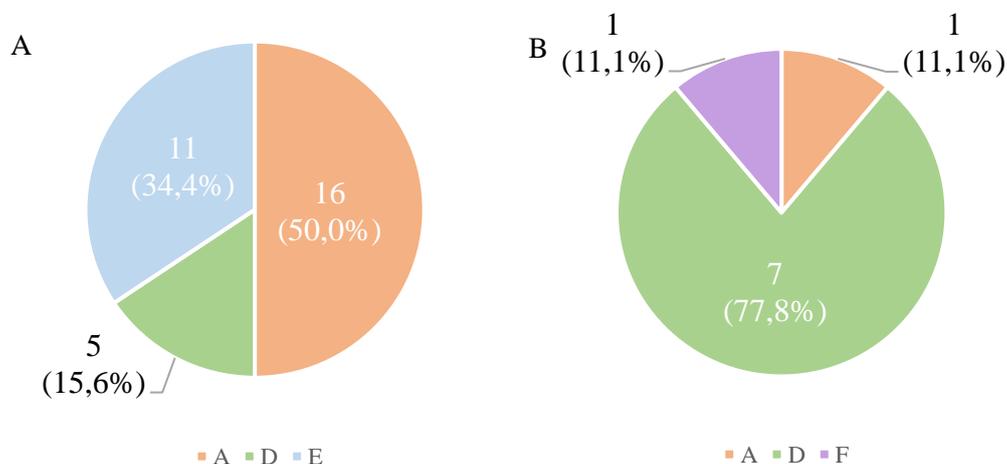


Figura 4.12 A) Proporção dos genótipos de VHB obtida na população de reclusos oriundos da área da grande Lisboa [n (%)]; B) Proporção dos genótipos de VHB obtida na população de reclusos oriundos da área do grande Porto [n (%)]

Observou-se também que entre os 24 indivíduos oriundos do continente europeu, 11 estavam infectados com o genótipo A, sendo a maioria dos indivíduos nativos de Portugal (n = 9; 37,5%), um (4,2%) da Roménia e um (4,2%) da Geórgia. Constatou-se também que dez indivíduos apresentavam uma infecção pelo genótipo D, sendo oito (33,3%) indivíduos naturais de Portugal, um (4,2%) natural da Roménia e um (4,2%) da Geórgia. Para além disso, dois (8,3%) indivíduos portugueses estavam infectados com o genótipo E e um (4,2%) indivíduo português apresentava infecção pelo genótipo F (Figura 4.13A).

Pelo contrário, entre os indivíduos oriundos do continente africano (n = 16) observou-se uma maior frequência de infecções pelo genótipo E (n = 9), sendo cinco (31,3%) indivíduos naturais da Guiné-Bissau, dois (12,5%) de São Tomé e Príncipe, um (6,3%) de Angola e um (6,3%) de Cabo Verde. Verificou-se também a presença de infecção pelo genótipo A em seis indivíduos, quatro (25%) naturais de Cabo Verde, um (6,3%) de Angola e um (6,3%) de São Tomé e Príncipe. Por fim um (6,3%) indivíduo de Moçambique estava infectado pelo genótipo D do VHB (Figura 4.13B).

O único indivíduo oriundo do continente americano, mais especificamente do Brasil, apresentava uma infecção pelo genótipo D.

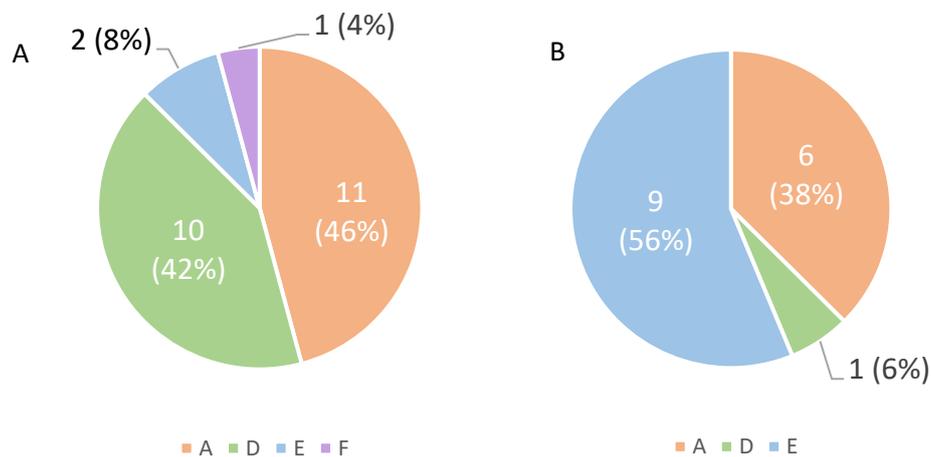


Figura 4.13 A) Proporção dos genótipos de VHB obtida na população de reclusos oriundos do continente europeu [n (%)]; B) Proporção dos genótipos de VHB obtida na população de reclusos oriundos do continente africano [n (%)]

## 4.2.6 Identificação de mutações de resistência

Os aminoácidos presentes nas posições 80, 169, 173, 180, 181, 184, 194, 202, 204, 236 e 250 da transcriptase reversa foram comparados com os aminoácidos da sequência de referência (Tabela 4.10). Não foi encontrada nenhuma mutação de resistência nas amostras analisadas (sombreadas a verde na tabela), no entanto, a amostra IM 2 (3) apresentou uma alteração, rtM250H (sombreada a amarelo na tabela). Porém, esta alteração aminoacídica específica não está descrita como associada a resistência ao tratamento da hepatite B.

Tabela 4.10 Aminoácidos presentes nas posições associadas a mutações de resistência da região da transcriptase reversa

	Mutações de resistência primária								Mutações de resistência secundária		
	rtI169T	rtA181T/V	rtT184S/C/G/A	rtA194T	rtS202G/C/I	rtM204V/I	rtN236T	rtM250V	rtL80I	rtV173L	rtL180M
IM 1	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 2	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 2 (2)	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 2 (3)	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250H	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 3	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 4	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 4(2)	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 5	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 6	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 7	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 7(2)	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 8	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 9	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 10	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 11	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 12	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 13	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 13(2)	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 14	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 15	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 17	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 19	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 21	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 22	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 23	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 24	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 25	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 26	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 27	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 28	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 29	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 30	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 31	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 32	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 33	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 34	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 36	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 37	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 38	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 39	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM40	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 41	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 43	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L
IM 44	rtI169I	rtI181A	rtI184T	rtI194A	rtI202S	rtI204M	rtI236N	rtI250M	rtI80L	rtI173V	rtI180L

## 5 Discussão

### Utilizadores de drogas injetáveis

No presente estudo, detetou-se a presença de DNA VHB em duas (1,2%) amostras da população total dos UDI. Desde 2004, tem sido observada uma diminuição da prevalência de AgHBs na população geral <sup>26</sup>. Em 2020, um relatório anual sobre a situação do país em relação a drogas e toxicodependências verificou que entre 6 e 10% dos UDI tratados em regime ambulatorio nesse ano testaram positivo para a presença de AgHBs <sup>66</sup>. A prevalência da infeção por VHB observada neste estudo é relativamente baixa quando comparada com estudos anteriores. No entanto a baixa prevalência observada no nosso estudo pode ser justificada pelo baixo número de indivíduos analisados.

Uma das amostras (TX247) estava incluída na *pool* positiva que apresentava maior reatividade (5386.9 S/CO), a outra (TX248) estava incluída na *pool* positiva com menor reatividade (1,57 S/CO). No entanto, somente a amostra TX247 foi sequenciada e genotipada para VHB com sucesso. Estes dados podem sugerir que estas amostras apresentam concentrações de DNA VHB diferentes. Este facto, juntamente com eventuais problemas de sensibilidade da técnica, poderá ser responsável pela dificuldade em obter uma sequência clara da região S na amostra TX248 que apresenta fraca concentração de DNA viral. Adicionalmente, a amostra TX248 foi obtida de um indivíduo com infeção de hepatite C ativa, sem infeção por VIH, e a amostra TX247 foi obtida de um UDI com infeção de hepatite C resolvida, mas com infeção por VIH. Em casos de coinfeção VHB/VHC em indivíduos não asiáticos, o VHC apresenta-se dominante, inibindo a replicação do VHB <sup>17,33,34</sup>. Por outro lado, a resolução da infeção VHC poderá resultar na reativação da replicação do VHB <sup>33</sup>. Por sua vez, em casos de coinfeção VHB/VIH, o VIH pode interagir com o VHB promovendo a sua reativação e replicação viral <sup>17</sup>. Assim, é possível que, no presente estudo, a baixa concentração de DNA na amostra TX248 se deva à supressão da replicação do HBV exercida pelo VHC. Contrariamente, a resolução da infeção VHC na amostra TX247 permitiu a reativação da replicação do VHB o que, em conjunto com a presença do VIH, resultou na obtenção de uma concentração de DNA viral mais elevada.

A análise filogenética da sequência obtida a partir da amostra TX247 agrupou-a com sequências de referência do genótipo E do VHB. Este genótipo é originário do continente africano <sup>67</sup>, no entanto, a sua presença entre indivíduos de naturalidade portuguesa pode estar relacionada com a imigração de indivíduos de naturalidade africana infetados, ou com a importação desta infeção para o país através indivíduos de naturalidade portuguesa infetados em países do continente africano <sup>68</sup>.

A vacina contra o VHB foi integrada no Plano Nacional de Vacinação em 1994, com o programa focado na vacinação de adolescentes com idades entre 11 e 13 anos. Em 2000, o plano foi atualizado para vacinar recém nascidos nas primeiras 24 horas de vida <sup>57</sup>. A amostra TX247 foi obtida de uma mulher nascida em 1970, e a amostra TX248 foi obtida de um homem nascido em 1969. Ambos admitiram ter iniciado o consumo de drogas com partilha de material para consumo de drogas antes de 1994, aumentando a sua suscetibilidade para a aquisição da infeção por VHB. Assim sendo, ambos os indivíduos já não eram adolescentes aquando da integração da vacina contra o VHB no Plano Nacional de Vacinação. Para além disso, em 2016, a proporção da população portuguesa sem evidência serológica de imunidade para o VHB era constituída maioritariamente por indivíduos com mais de 44 anos<sup>15</sup>, faixa etária em que ambos os indivíduos se encontram. Assim sendo, é pouco provável que os dois indivíduos tenham sido vacinados contra o VHB.

## Reclusos

Foram identificados reclusos nascidos em Portugal e em outros países europeus, africanos e americanos. A população de reclusos analisada estava infetada maioritariamente com os genótipos A e D, seguidos pelos genótipos E e F. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, onde foi observada uma prevalência de infeções pelos genótipos A e D em dadores de sangue e pacientes em hospitais do centro e norte do Portugal. Os mesmos estudos identificaram também uma frequência mais baixa de infeções pelos genótipos E e F <sup>23,25</sup>.

Embora tenha sido estudado um reduzido número de indivíduos detidos na região do Porto, o genótipo D foi o mais prevalente em reclusos nesta região, e a infeção pelo genótipo A foi a mais frequente em reclusos na região de Lisboa. Os resultados observados estão de acordo com dados anteriores que identificam uma predominância do genótipo D no norte de Portugal <sup>23,26</sup>. Adicionalmente, todas as infeções pelo genótipo E foram identificadas em reclusos detidos na região de Lisboa. Estes resultados estão de acordo com dados sobre a distribuição dos genótipos de VHB no país que identificaram uma prevalência elevada do genótipo E na região de Lisboa, e baixa na região norte de Portugal <sup>23,26,27</sup>. No entanto, é de salientar que este facto pode estar relacionado com a diferente concentração de imigrantes de naturalidade africana nestas duas regiões do país.

À exceção de Portugal, os reclusos nascidos em países europeus, estavam infetados exclusivamente pelos genótipos A e D. Estes resultados estão de acordo com dados referentes à Europa, onde é descrita uma elevada frequência destes dois genótipos no continente <sup>68, 69</sup>.

Infeções pelo genótipo E foram observadas maioritariamente em reclusos nascidos em países do continente africano. Este genótipo foi detetado em indivíduos oriundos da região oeste de África (Cabo Verde e Guiné-Bissau) e da região central de África (Angola, São Tomé e Príncipe), estando estes resultados de acordo com estudos realizados anteriormente no continente africano. No entanto, também foram identificadas infeções pelos genótipos A e D em reclusos africanos. Embora o genótipo A seja mais comum no sul e este do continente, todos os casos detetados na população estudada eram indivíduos oriundos das regiões ocidental e central de África. O único recluso nascido em Moçambique (região este de África) estava infetado pelo genótipo D, comumente encontrado no norte de África <sup>67, 70</sup>.

De acordo com dados na literatura, a maior parte dos países da América Latina apresenta uma prevalência de infeções pelo genótipo F. Porém existem exceções como o México, onde infeções pelo genótipo H prevalecem, e o Brasil, onde é observada uma prevalência do genótipo A, seguido pelo genótipo D e pelo genótipo F <sup>71,72</sup>. O único indivíduo natural do Brasil incluído no estudo estava infetado pelo genótipo D.

No presente estudo, infeções pelos genótipos E e F foram observadas nos reclusos nascidos em Portugal, porém, como já referido, o genótipo E é originário do continente africano. O genótipo F, por sua vez, é nativo da América do Sul e da América Central, bem como do Alasca. Deste modo, os resultados sugerem que ocorreu a possível entrada destes genótipos no país, provavelmente através de imigrantes vindos de fora do continente europeu <sup>68</sup>.

O elevado número de indivíduos portugueses com idades inferiores a 37 anos infetados com VHB foi surpreendente. Todos os indivíduos nasceram antes de 2000, altura em que a vacina contra o VHB era administrada aos 11-13 anos <sup>57</sup>. Embora não haja informação sobre o estado da vacinação destes reclusos, a maioria dos indivíduos deve ter sido vacinada na adolescência. Dados na literatura sugerem

que o atraso na administração da primeira dose da vacina contra o VHB pode resultar na diminuição da sua eficácia, o que poderia explicar o elevado número de indivíduos portugueses, relativamente jovens, infectados com VHB<sup>73</sup>.

Em África, apenas onze países administram a vacina contra o VHB nas primeiras 24 horas de vida, entre esses países encontram-se Angola, Cabo Verde, e São Tomé e Príncipe. No resto do continente esta vacina é administrada em conjunto com outras quatro vacinas em três doses às seis, 10 e 14 semanas de vida<sup>74</sup>. Porém, a taxa de cobertura de vacinação neste continente é relativamente baixa, rondando os 72%, comparativamente à dos países europeus<sup>75</sup>. Por essa razão, é provável que muitos indivíduos africanos englobados neste estudo não sejam vacinados contra a hepatite B.

Devido à estrutura do genoma do VHB, a ORF que codifica a região S e a ORF que codifica a polimerase viral, e consequentemente a transcriptase reversa, estão sobrepostas. Por essa razão, foi possível analisar as sequências consenso da região S na ORF de leitura para a RT para a pesquisa de mutações de resistência a tratamentos na região da transcriptase reversa. Todos os indivíduos desta população apresentaram níveis de DNA VHB detetáveis. Estes dados indicam que nenhum dos indivíduos terá alcançado uma “cura funcional” para a hepatite B<sup>49</sup>. No entanto, a ausência da deteção de mutações de resistência na região RT nas amostras analisadas estabelece um prognóstico favorável para estes indivíduos caso decidam receber tratamento para a hepatite B.

## 6 Conclusão

Na população de UDI, caracterizada por uma idade média de 50,3 anos, elevada frequência de infecção VHC e coinfeção VHC/VHI, e pela dificuldade em aderir a Estruturas de Saúde Convencionais, foi obtida uma baixa prevalência de infecções por VHB.

Estes resultados não eram os potencialmente esperados e podem ter sido enviesados pelo relativo baixo número de amostras incluídas no estudo, ou pelo tipo de população selecionada que está altamente afetada por VHC, por se tratar apenas de UDI da região de Lisboa, ou ainda, por estes indivíduos terem sido excepcionalmente vacinados contra a hepatite B. Seria importante conhecer a informação relativa à vacinação para VHB em futuras estudos de vigilância epidemiológica a desenvolver, alargando a dimensão da população e área de recrutamento.

Por outro lado, foi também observado, em reclusos, que havia uma prevalência significativa de infecções VHB entre indivíduos portugueses com idades inferiores a 40 anos. Estes resultados denotam a necessidade de melhorar estratégias de vacinação para estes grupos populacionais mais vulneráveis, de modo a diminuir a frequência de infecções nesta população.

Os genótipos A, D, E e F foram detetados na população em estudo. Estes resultados auxiliam no conhecimento da introdução destes genótipos na população, oferecendo dados importantes para o estudo epidemiológico do VHB no país.

A pesquisa de mutações de resistência ao tratamento na região da transcriptase reversa do genoma de VHB não identificou a presença de mutações de resistência na população estudada.

Em conclusão, embora a prevalência da hepatite B em Portugal tenha vindo a diminuir desde a implementação da vacinação contra o VHB, esta continua presente em populações com comportamentos de risco, como UDI e reclusos, podendo constituir uma fonte de infecção e disseminação do VHB.

Deste modo, é importante continuar a vigilância da infecção pelo VHB e desenvolver estratégias eficientes para a vacinação contra o VHB das populações vulneráveis de modo a conter sua possível disseminação, principalmente entre os grupos com comportamentos de alto risco cuja adesão às estruturas convencionais de prestação de saúde é muito baixa.

## 7 Bibliografia

1. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A “New” Antigen in Leukemia Sera. *Journal of the American Medical Association*. 1984; 252(2):252-257. doi:10.1001/jama.1984.03350020054026
2. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-Like Particles in Serum of Patients With Australia-Antigen-Associated Hepatitis. *The Lancet*. 1970; 295(7651):848. doi:10.1016/S0140-6736(70)92460-8
3. Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, et al. Hepatitis B virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018; 4:1-21. doi:10.1038/nrdp.2018.35
4. World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. Global Hepatitis Program Department of HIV/AIDS. Published 2016. Consultado em setembro de 2022. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246177/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxon Details | ICTV. Consultado em agosto de 2022. [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202103653](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202103653)
6. Tsukuda S, Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Research*. 2020; 182:104925. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104925
7. Mota A, Areias J, Cardoso MF. A expressão genotípica do vírus da hepatite B em Portugal e no mundo. *Acta Médica Portuguesa*. 2011; 24(4):587-594.
8. Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005;23(19):2409-2423. doi:10.1016/j.vaccine.2004.10.045
9. World Health Organization. Hepatitis B Virus (HBV) | WHO. Consultado em junho de 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
10. Centers for Disease Control and Prevention. Burden of chronic hepatitis B infection (HBsAg positivity) by WHO region, 2019. Published 2021. Consultado em junho de 2022. [https://www.cdc.gov/globalhealth/immunization/framework/WHO\\_Global-Hepatitis-Infographic-1.html](https://www.cdc.gov/globalhealth/immunization/framework/WHO_Global-Hepatitis-Infographic-1.html)
11. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: A systematic review of data published between 1965 and 2013. *The Lancet*. 2015; 386(10003):1546-1555. doi:10.1016/S0140-6736(15)61412-X
12. Le MH, Yeo YH, Cheung R, Henry L, Lok AS, Nguyen MH. Chronic Hepatitis B Prevalence Among Foreign-Born and U.S.-Born Adults in the United States, 1999-2016. *Hepatology*. 2020; 71(2):431-443. doi:10.1002/hep.30831
13. European Centre for Disease Prevention and Control. Systematic Review on Hepatitis B and C Prevalence in the EU / EEA. Publication Office; 2017. doi:10.2900/24396
14. Carvalhana SC, Leitão J, Alves AC, Bourbon M, Cortez-Pinto H. Hepatitis B and C prevalence in Portugal: Disparity between the general population and high-risk groups. *European Journal Gastroenterology Hepatology*. 2016; 28(6):640-644. doi:10.1097/MEG.0000000000000608

15. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Inquérito Serológico Nacional 2015-2016: Doenças Evitáveis Por Vacinação.; Lisboa: INSA IP; 2017. 17.
16. Borah B, Sharma A, Rabha D, et al. Co-circulation of different genotype, sub-genotype and serotypes of hepatitis B virus (HBV) and its epidemiology in Assam: A north-eastern state of India. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2021; 39(3):352-357. doi:10.1016/j.ijmmb.2021.04.012
17. Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clinical Microbiology Reviews*. 2020; 33(2):1-38. doi:10.1128/CMR.00046-19
18. Lin CL, Kao JH. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2017; 31(3):249-255. doi:10.1016/j.bpg.2017.04.010
19. Salim FB, Keyvani H, Monavari SH, et al. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes in Azerbaijani Patients with Chronic Hepatitis B Infection. *Hepatitis Monthly*. 2014; 14(12). doi:10.5812/hepatmon.25105
20. Webale MK, Budambula V, Lihana R, et al. Hepatitis B virus sero-profiles and genotypes in HIV-1 infected and uninfected injection and Non-injection drug users from coastal Kenya. *BMC Infectious Diseases*. 2015; 15(1):1-8. doi:10.1186/s12879-015-1060-3
21. Li GJ, Hue S, Harrison TJ, et al. Hepatitis B virus candidate subgenotype I1 varies in distribution throughout Guangxi, China and may have originated in Long An county, Guangxi. *Journal of Medical Virology*. 2013; 85(5):799-807. doi:10.1002/jmv.23533
22. Yin Y, He K, Wu B, et al. A systematic genotype and subgenotype re-ranking of hepatitis B virus under a novel classification standard. *Heliyon*. 2019; 5(10). doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02556
23. Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. Perfil epidemiológico e genotípico da infecção pelo vírus da hepatite B no Norte de Portugal. *Revista de Saúde Pública*. 2010; 44(6):1087-1093. doi:10.1590/s0034-89102010000600014
24. Ribeiro AMS. *Hepatite B Crónica No Adulto*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar Universidade do Porto; 2014. Consultado em agosto de 2022. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/76689/2/32794.pdf>
25. Sargento C, Ferreira C, Almeida A, Silva E, Neto P. Molecular epidemiology of HBV in Portugal. *Vox Sanguinis*. 2009; 96(s1):61.
26. Silva MJ, Valente J, Capela T, Russo P, Calinas F. Epidemiology of hepatitis B in Portugal. *European Journal of Gastroenterology Hepatology*. 2017; 29(3):249-258. doi:10.1097/MEG.0000000000000792
27. Valente R, Freitas M, Palmela C, et al. Hepatitis B—characterization of infection in a 3 year old outpatientclinic. In: *Semana Digestiva Abstract Book; Poster 173.*; 2015. Consultado em setembro de 2022. [http://www.sociedadesmedicas.pt/semanadigestiva/PDF/Resumos\\_175.pdf](http://www.sociedadesmedicas.pt/semanadigestiva/PDF/Resumos_175.pdf)
28. SNS24. Vírus da hepatite B (VHB) | SNS24. Consultado em agosto de 2022. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/vhb/#sec-5>

29. Hollinger FB. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays. *Journal of Viral Hepatitis*. 2007; 14(SUPPL. 1):11-15. doi:10.1111/j.1365-2893.2007.00910.x
30. Thuener J. Hepatitis A and B Infections. *Primary Care - Clinics in Office Practice*. 2017; 44(4):621-629. doi:10.1016/j.pop.2017.07.005
31. Kumar S. Hepatitis B, Acute. Published 2022. Consultado em setembro de 2022. <https://www.msmanuals.com/home/liver-and-gallbladder-disorders/hepatitis/hepatitis-b-acute>
32. Krajden M, McNabb G, Petric M. The laboratory diagnosis of hepatitis B virus. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2005; 16(2):65-72. doi:10.1155/2005/450574
33. Aydın Ö. Genotype Distributions and Hepatitis B Coinfection in Hepatitis C Patients at a University Hospital. *Viral Hepatitis Journal*. 2021; 27(1):13-18. doi:10.4274/vhd.galenos.2021.2021-1-1
34. Liu CJ. Treatment of patients with dual hepatitis C virus and hepatitis B virus infection: Resolved and unresolved issues. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2014; 29(1):26-30. doi:10.1111/jgh.12421
35. Sagnelli E, Coppola N, Messina V, et al. HBV superinfection in hepatitis C virus chronic carriers, viral interaction, and clinical course. *Hepatology*. 2002; 36(5):1285-1291. doi:10.1053/jhep.2002.36509
36. Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*. 1998; 75(3):347-354. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980130)75:3<347::AID-IJC4>3.0.CO;2-2
37. Platt L, French CE, McGowan CR, et al. Prevalence and burden of HBV co-infection among people living with HIV: A global systematic review and meta-analysis. *Journal of Viral Hepatitis*. 2020; 27(3):294-315. doi:10.1111/jvh.13217
38. Haban H, Benchekroun S, Sadeq M, et al. Assessment of the HBV vaccine response in a group of HIV-infected children in Morocco. *BMC Public Health*. 2017; 17(1). doi:10.1186/s12889-017-4776-8
39. Wong GLH, Wong VWS, Chan HLY. Virus and Host Testing to Manage Chronic Hepatitis B. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; 62(Suppl 4):S298-S305. doi:10.1093/cid/ciw024
40. Tabelas Triptico Peg/Co. Consultado em agosto de 2022. [https://www.roche.pt/hepatites/tabela\\_hepatite\\_b.pdf](https://www.roche.pt/hepatites/tabela_hepatite_b.pdf)
41. Funk ML, Rosenberg DM, Lok ASF. World-Wide Epidemiology of HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B and Associated Precore and Core Promoter Variants. *Journal of Viral Hepatitis*. 2002; 9(1): 52-61. doi: 10.1046/j.1365-2893.2002.00304.x
42. Vivekanandan P, Singh OV. Molecular methods in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Expert Review of Molecular Diagnostic*. 2010; 10(7):921-935. doi:10.1586/erm.10.75

43. Araujo NM, Waizbort R, Kay A. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: How viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011; 11(6):1199-1207. doi:10.1016/j.meegid.2011.04.017
44. Rybicka M, Stalke P, Bielawski KP. Current molecular methods for the detection of hepatitis B virus quasispecies. *Reviews in Medical Virology*. 2016;26(5):369-381. doi:10.1002/rmv.1897
45. Jessop AB, Hom JK, Burke M. Variation in the Viral Hepatitis and HIV Policies and Practices of Methadone Maintenance Programs. *Journal of Addiction Medicine*. 2017; 11(3):191-196. doi:10.1097/ADM.0000000000000296
46. Santen DK van, Boyd A, Matser A, et al. The effect of needle and syringe program and opioid agonist therapy on the risk of HIV, hepatitis B and C virus infection for people who inject drugs in Amsterdam, the Netherlands : findings from an emulated target trial. *Addiction*. 2021; 116(11): 3115-3126. doi:10.1111/add.15503
47. Marques NM, Margalho R, Melo MJ, Cunha JGS, Meliço-Silvestre AA. Seroepidemiological survey of transmissible infectious diseases in a Portuguese prison establishment. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2011; 15(3):272-275. doi:10.1016/S1413-8670(11)70188-X
48. Passadouro R. Prevalência e factores de risco das infeções por VIH, Hepatite B e C num estabelecimento prisional de Leiria. *Acta Médica Portuguesa*. 2004; 17(5): 381-384.
49. Alexopoulou A, Vasilieva L, Karayiannis P. New Approaches to the Treatment of Chronic Hepatitis B. *Journal of Clinical Medicine*. 2020; 9(10):3187. doi: 10.3390/jcm9103187
50. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012. Consultado em julho de 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>
51. Zhang X, Chen X, Wei M, et al. Potential resistant mutations within HBV reverse transcriptase sequences in nucleos(t)ide analogues-experienced patients with hepatitis B virus infection. *Scientific Reports*. 2019; 9:8078. doi:10.1038/s41598-019-44604-6
52. Zhao Y, Wu J, Sun L, et al. Prevalence of mutations in HBV DNA polymerase gene associated with nucleos(t)ide resistance in treatment-naïve patients with Chronic Hepatitis B in Central China. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016; 20(2):173-178. doi:10.1016/j.bjid.2015.12.006
53. Chotiayaputta W, Lok ASF. Hepatitis B virus variants. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2009; 6(8):453-462. doi:10.1038/nrgastro.2009.107
54. Geno2pheno [hbv]. Consultado em abril de 2022. <https://hbv.geno2pheno.org/>
55. Thai H, Lara J, Xu X, et al. Complex genetic encoding of the hepatitis B virus on-drug persistence. *Scientific reports*. 2010; 10:15574. doi:10.1038/s41598-020-72467-9
56. Park ES, Lee AR, Kim DH, et al. Identification of a quadruple mutation that confers tenofovir resistance in chronic hepatitis B patients. *Journal of Hepatology*. 2019; 70(6):1093-1102. doi:10.1016/j.jhep.2019.02.006
57. DGS. *Programa Nacional Para As Hepatites Virais.*; 2019. <https://www.sip-spp.pt/media/0r3pxisw/hepatites-virais-programa-nacional-2019-dgs.pdf>

58. Lin C-L, Kao J-H. Hepatitis B Immunization and Impact on Natural History and Cancer Incidence Hepatitis B virus Hepatitis B vaccination Hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology clinics of North America*. 2020; 49(2):201-214. doi:10.1016/j.gtc.2020.01.010
59. Flores JE, Thompson AJ, Ryan M, Howell J. The Global Impact of Hepatitis B Vaccination on Hepatocellular Carcinoma. *Vaccines (Basel)*. 2022; 10(5):793. doi:10.3390/vaccines10050793
60. Silva MJ, Pereira C, Loureiro R, et al. Hepatitis C in a Mobile Low-Threshold Methadone Program. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017; 29(6):657-662. doi:10.1097/MEG.0000000000000843
61. Rabenau H, Schutz R, Berger A, Doerr HW, Weber B. How accurate is Serologic Testing of Plasma Pools for Hepatitis B Virus Surface Antigen, anti-Human Immunodeficiency Virus 1 and 2, and anti-Hepatitis C Virus. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 1996; 23(3):124-130. doi:10.1159/000223281
62. Mele C, Puccinelli M, Bisso G, Gentili G. Plasma Pool Testing for Viral Markers. Validation Report.; 2000. Accessed December 7, 2022. [https://www.iss.it/documents/20126/45616/1123-3117\\_2000\\_I\\_00\\_15.1180951537.pdf/99cc86ca-07e8-104d-4ada-7ce68ba07c36?t=1581096227356](https://www.iss.it/documents/20126/45616/1123-3117_2000_I_00_15.1180951537.pdf/99cc86ca-07e8-104d-4ada-7ce68ba07c36?t=1581096227356)
63. Osiowy C, Larke B, Giles E. Distinct geographical and demographic distribution of hepatitis B virus genotypes in the Canadian Arctic as revealed through an extensive molecular epidemiological survey. *Journal of Viral Hepatitis*. 2011; 18(4). doi:10.1111/j.1365-2893.2010.01356.x
64. NCBI. *National Library of Medicine*. Consultado em maio de 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
65. Hayer J, Jadeau F, Deléage G, Kay A, Zoulim F, Combet C. HBVdb: A knowledge database for Hepatitis B Virus. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(D1). doi:10.1093/nar/gks1022
66. SICAD. *Relatório Anual 2020 - A Situação Do País Em Matéria de Drogas e Toxicodependências*.; 2020. [https://www.sicad.pt/BK/Publicacoes/Lists/SICAD\\_PUBLICACOES/Attachments/175/RelatorioAnual\\_2020\\_ASituacaoDoPaisEmMateriaDeDrogasEToxicodependencias\\_PT.pdf](https://www.sicad.pt/BK/Publicacoes/Lists/SICAD_PUBLICACOES/Attachments/175/RelatorioAnual_2020_ASituacaoDoPaisEmMateriaDeDrogasEToxicodependencias_PT.pdf)
67. Kramvis A, Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology Research*. 2007; 37(SUPPL. 1):9-19. doi:10.1111/j.1872-034X.2007.00098.x
68. Lunaček NK, Poljak M, Matičič M. Distribution of hepatitis B virus genotypes in Europe and clinical implications: A review. *Acta Dermatovenerologica APA*. 2018; 27(3):141-146. doi:10.15570/actaapa.2018.28
69. Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatology Research*. 2007; 37(SUPPL. 1):20-26. doi:10.1111/j.1872-034X.2007.00099.x
70. Kramvis A. Molecular characteristics and clinical relevance of African genotypes and subgenotypes of hepatitis B virus. *South African Medical Journal*. 2018; 108(8):17-21. doi:10.7196/SAMJ.2018.v108i8b.13495
71. Alvarado-Mora MV., Rebello Pinho JR. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antiviral Therapy*. 2013; 18(3 PARTB):459-465. doi:10.3851/IMP2599

72. Mello FCA, Souto FJD, Nabuco LC, et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: Molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiology*. 2007; 7:103. doi:10.1186/1471-2180-7-103
73. Marion SA, Pastore MT, Pi DW, Mathias RG. Long-term follow-up of hepatitis b vaccine in infants of carrier mothers. *American Journal of Epidemiology*. 1994; 140(8):734-746. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a117321
74. Moturi E, Tevi-Benissan C, Hagan JE, et al. Implementing a Birth Dose of Hepatitis B Vaccine in Africa: Findings from Assessments in 5 Countries. *Journal of Immunological Sciences*. 2018; Supplement(5): 31-40. doi: 10.29245/2578-3009/2018/si.1104
75. WHO. 91 million Africans infected with Hepatitis B or C | WHO | Regional Office for Afric. Consultado em agosto de 2022. <https://www.afro.who.int/news/91-million-africans-infected-hepatitis-b-or-c>
76. IUPAC nucleotide code. Consultado em setembro de 2022. <https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>

## 8 Anexos

### Anexo 1 – Tabela descritiva dos dados epidemiológicos da população de reclusos analisada

Tabela 8.1 Dados epidemiológicos da população de reclusos estudada

Referência da amostra	Idade	Sexo	Origem geográfica	Localização da prisão	Carga viral (UI/mL)	Classificação filogenética do VHB
IM1	39	M	Angola	Lisboa	80 000	A
IM2	39	M	S. Tomé e Príncipe	Lisboa	73 100	E
IM3	36	M	Portugal	Lisboa	386 000	A
IM4	35	M	Cabo Verde	Lisboa	4 450	A
IM5	30	M	Portugal	Lisboa	8 400	A
IM6	53	M	Portugal	Norte	1 110	D
IM7	38	M	Roménia	Lisboa	714	A
IM8	37	M	Geórgia	Norte	149	D
IM9	27	M	Portugal	Norte	1 820	D
IM10	57	M	Mozambique	Norte	547	D
IM11	24	M	S. Tomé e Príncipe	Lisboa	21 000	E
IM12	37	M	Portugal	Norte	1 350	D
IM13	53	M	Portugal	Lisboa	1 420	D
IM14	36	M	S. Tomé e Príncipe	Lisboa	35 400	A
IM15	34	M	Guiné-Bissau	Lisboa	4 420	E
IM16	34	M	Portugal	Lisboa	11 500	A
IM17	47	M	Cabo Verde	Lisboa	62 500 000	A
IM18	28	F	Portugal	Lisboa	619	A
IM19	44	M	Angola	Lisboa	384	E
IM20	34	M	Portugal	Lisboa	214	A
IM21	25	M	Guiné-Bissau	Lisboa	854	E
IM22	36	M	Portugal	Norte	736	D
IM23	37	M	Guiné-Bissau	Lisboa	119	E
IM24	29	M	Cabo Verde	Lisboa	146	E
IM25	35	F	Portugal	Lisboa	27 500	A
IM26	39	M	Brasil	Lisboa	242	D
IM27	32	M	Portugal	Lisboa	5 230	A
IM28	45	M	Portugal	Norte	1 440	F
IM29	48	M	Roménia	Lisboa	1 670	D
IM30	35	M	Portugal	Norte	1 480	D
IM31	38	M	Portugal	Lisboa	1 450	A
IM32	25	M	Cabo Verde	Lisboa	2 770	A
IM33	25	M	Portugal	Lisboa	16 900	D
IM34	40	M	Portugal	Lisboa	1 180	A
IM35	45	M	Portugal	Lisboa	405	D
IM36	41	M	Guiné-Bissau	Lisboa	159	E
IM37	37	M	Portugal	Lisboa	410	E
IM38	31	M	Cabo Verde	Lisboa	3 860	A
IM39	37	M	Geórgia	Norte	2 620	A
IM40	52	M	Guiné-Bissau	Lisboa	1 170	E
IM41	51	M	Portugal	Lisboa	3 020	E

## Anexo 2 - Tabela de códigos IUPAC

Tabela 8.2 Códigos IUPAC. Obtida de <sup>76</sup>

IUPAC nucleotide code	Base
A	Adenine
C	Cytosine
G	Guanine
T (or U)	Thymine (or Uracil)
R	A or G
Y	C or T
S	G or C
W	A or T
K	G or T
M	A or C
B	C or G or T
D	A or G or T
H	A or C or T
V	A or C or G
N	any base
. or -	gap

**Anexo 3** – Lista de referências usadas na construção das árvores filogenéticas. Retiradas da base de dados GenBank

Árvore S (UDI)

**Genótipo A1:** AY233279; AY233276. **Genótipo A2:** AY152726; AB116076. **Genótipo A3:** AM184125; 184126. **Genótipo D1:** AF280817; AB104709. **Genótipo D3:** DQ315776; AJ344117. **Genótipo D4:** HE974382; HE974380. **Genótipo E:** HE974384; HE974380. **Genótipo F:** HE974368. **Genótipo G:** AF160501.

Árvore S (reclusos)

**Genótipo A1:** MF772351; MG877725; MF772353. **Genótipo A2:** KP718102; AB116076. **Genótipo A3:** MN544634; MK127853. **Genótipo A5:** FJ692613; FJ692612. **Genótipo A6:** GQ331048; GQ331047. **Genótipo C:** D16665. **Genótipo D1:** KC774462; JF754628. **Genótipo D3:** DQ315776; MN310713. **Genótipo D4:** MH724251; KX302109. **Genótipo D5:** KP322603; MK516280. **Genótipo D6:** LC488706; KF679996. **Genótipo D7:** KM606750; FJ904394. **Genótipo E:** MT427153; KF849713; HE974380. **Genótipo F1:** DQ823094; DQ823093. **Genótipo F2:** EF398042; EF398041. **Genótipo F4:** KJ843220; HE981181. **Genótipo G:** AF160501.

Árvore Core

**Genótipo A1:** KJ854705; AF043560. **Genótipo A2:** AY152726; AB116076; HE974383; HE974376. **Genótipo A3:** AM184125; EU054331; AM184126. **Genótipo A4:** KM606737; MW567975. **Genótipo D1:** AF280817; AB104709. **Genótipo D3:** DQ315776; AJ344117. **Genótipo D4:** HE974382; HE974378. **Genótipo E:** HE974384; HE974380. **Genótipo F:** AB166850. **Genótipo G:** AF160501.