

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



Infecção oculta por vírus da hepatite B em doentes com anti-HBc isolado e
coinfecção por vírus da imunodeficiência humana, Maputo, Moçambique

Awa Abdul Carimo

Orientador: Prof. Doutor Francisco Antunes

Coorientador: Doutor Nilesh Bhatt

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas
Emergentes

2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



Infecção oculta por vírus da hepatite B em doentes com anti-HBc isolado e
coinfecção por vírus da imunodeficiência humana, Maputo, Moçambique

Awa Abdul Carimo

Orientador: Prof. Doutor Francisco Antunes, Faculdade de Medicina de Lisboa

Coorientador: Doutor Nilesh Bhatt, Instituto Nacional de Saúde

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas
Emergentes

Mestrado financiado pela Associação para Investigação e Desenvolvimento da Faculdade de
Medicina da Universidade de Lisboa e à Clínica Universitária de Doenças Infecciosas.

2016

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 22 de Novembro de 2016.

Escrito segundo o acordo ortográfico antigo.

Resumo

Introdução

Na África subsariana, a prevalência da infecção por vírus da hepatite B (VHB) varia entre 9-20% e da coinfeção VHB/vírus da imunodeficiência humana (VIH), entre 10-20%. VHB tem a patogénese centrada na resposta imunitária e VIH tem impacto na infecção por VHB por induzir maior risco de cronicidade e por acelerar a progressão da doença hepática. Por outro lado, a imunodepressão causada por VIH pode condicionar que a infecção por VHB seja, apenas, detectada pela positividade da carga vírica, com AgHBs negativo, o que se denomina de hepatite B oculta. A prevalência da infecção oculta por VHB é desconhecida em infectados por VIH, em Moçambique.

Metodologia

Em infectados por VIH, com AgHBs negativo, foi feito o estudo no soro do anti-HBs e anti-HBc, usando técnicas imunoenzimáticas. Nas amostras com anti-HBc isolado foi feita a avaliação da infecção oculta por VHB, definida por níveis de ADN de VHB ≥ 20 UI / mL, usando o teste Cobas Ampliprep / Cobas TaqMan HBV 96, versão 2.0 (Roche Diagnostics, Alemanha). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para Saúde.

Resultados

Dos 518 infectados por VIH, 471 (90,9%) eram AgHBs negativo e, destes, 213 (45,2%) tinham anti-HBc total, isoladamente, positivo. A hepatite B oculta foi identificada em 17 (8,2%) destes indivíduos.

Conclusões

Em Moçambique o risco de hepatite B oculta é de 8,2% em coinfectados por VIH o que pode ter implicações na prática clínica, em particular no que diz respeito à terapêutica da infecção por VIH, dando preferência por regimes que incluam dois fármacos activos contra VHB.

Palavras-chave

Hepatite B oculta, coinfeção VIH/VHB, VIH, Moçambique, África subsariana.

Abstract

Introduction

The prevalence of occult hepatitis B in Mozambique is unknown. Nevertheless, coinfection with HBV/HIV is endemic in Sub-Saharan Africa. It is responsible for rising morbidity related to chronic liver disease as well as thousands of deaths. National Health Policies don't cater for routine testing for the presence of HBV in HIV-positive patients, making the assessment for cases of co-infection challenging. The aim of this study is to evaluate the prevalence of occult hepatitis B as well as the isolated core antibody in HIV-positive patients, the factors associated in cases of co-infection, and the clinical and laboratorial correlations between occult hepatitis B and HIV in Mozambique.

Methodology

In this study, patient demographics and clinical data were collected from five hundred and eighteen HIV-positive patients, between June and October 2012, at two Health Centers in Maputo. Serological tests using *ELISA* were conducted to determine the presence of HBVAg, anti-HBs and anti-HBc, as well as the Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV 96, version 2.0 (Roche Diagnostics, Germany) for DNA sequencing. The study has ethical approval from the National Bioethics Committee for Health of Mozambique.

Results

Four hundred and seventy-one serum samples (90,9%) were HBsAg negative and, of those, 213 (45,2%) were isolated anti-HBc positive. From these occult Hepatitis B was identified in 17 samples (8,2%).

Conclusions

We found a high prevalence of isolated anti-HBc and occult hepatitis B infection with low levels of DNA viral load (64,7% between 20-100UI/mL). These results shows that we need to use, preferably, therapeutic regimes that include two drugs with double action against HIV and HBV.

Key-words

Occult hepatitis B, coinfection HIV/HBV, HIV, Mozambique, Sub-Saharan Africa.

Agradecimentos

A Deus, pela minha existência, pela protecção durante todos os momentos difíceis da minha vida e por me agradecer com presentes valiosos.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Francisco Antunes e Doutor Nilesh Bhatt, por todo apoio, orientação, paciência, disponibilidade, compreensão e ensinamentos que me proporcionaram nesta caminhada tão complicada e nova.

A todos que colaboraram neste projecto, em especial, ao Professor Doutor Eduardo Samo Gudo, Dra Lúcia Chambal, Dr Cremildo Gomes, Dr Nédio Mabunda, Ana Flora e Euclides Malemuane, pelo árduo trabalho executado, valiosas questões colocadas, sugestões, críticas, processamento e conservação das amostras, análise de dados e tudo quanto foi necessário, a minha gratidão.

À Direcção dos Centros de Saúde, em particular, a Dra Chamila Adam, a Dra Suzana Da Cruz, a Maria Enosse, ao António, ao Tembe e a dona Ana, pelo apoio, profissionalismo, competência e eficiência no trabalho de campo árduo, o meu reconhecimento.

Aos meus amados pais, meu marido, minhas irmãs e cunhados, pelo apoio, confiança, conselhos e força em todos momentos da minha vida.

Aos doentes que participaram no estudo, sem os quais não poderia realizar este projecto.

À Associação para Investigação e Desenvolvimento da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e à Clínica Universitária de Doenças Infecciosas, pelo apoio técnico, profissional e financeiro para realização do presente trabalho.

Siglas e acrónimos

ADN	ácido desoxirribonucleico
AgHBc	antigénio do <i>core</i> de vírus da hepatite B
AgHBe	antigénio <i>e</i> de vírus da hepatite B
AgHBs	antigénio de superfície de vírus da hepatite B
ALT	alanina-aminotransferase
anti-HBc	anticorpo contra o antigénio do <i>core</i> de vírus da hepatite B
anti-HBs	anticorpo contra antigénio de superfície de vírus da hepatite B
ARN	ácido ribonucleico
ARVs	antirretrovíricos
AST	aspartato-aminotransferase
cccADN	ácido desoxirribonucleico circular fechado covalente
CHC	carcinoma hepatocelular
CNBS	Comité Nacional de Bioética para Saúde
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FTC	emtricitabina
GPC	do inglês <i>good clinical practice</i>
IgG	imunoglobulina da classe G
IgM	imunoglobulina da classe M
INS	Instituto Nacional de Saúde
LAM ou 3TC	lamivudina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
SIDA	síndrome de imunodeficiência adquirida
TARV	terapêutica antirretrovírica
TCD4 ⁺	linfócitos T da linhagem CD4
TCD8 ⁺	linfócitos T da linhagem CD8
TDF	tenofovir
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C

VIH

vírus da imunodeficiência humana

Figuras

	Página
Figura 1. Distribuição geográfica global da infecção crónica por vírus da hepatite B.....	1
Figura 2. Prevalência estimada de indivíduos com infecção por VIH, em 2012, de acordo com a região geográfica.....	2
Figura 3. Representação esquemática de vírus da hepatite B.....	3
Figura 4. História natural da infecção crónica por vírus da hepatite B.....	6
Figura 5. Representação esquemática dos perfis de hepatite B oculta na infecção por VHB.....	13
Figura 6. Fluxograma dos resultados obtidos nos indivíduos seleccionados para o estudo da hepatite B oculta.....	24
Figura 7. Representação gráfica da proporção de indivíduos com cargas víricas de VHB negativas e positivas nos 207 indivíduos AgHBs ⁻ , anti-HBs ⁻ e anti-HBc total ⁺	25

Quadros

	Página
Quadro 1. Perfil serológico e carga vírica da infecção por vírus da hepatite B (ADN-VHB) e sua interpretação clínica	5
Quadro 2. Impacto da infecção por VIH na coinfeção por VHB	8
Quadro 3. Diagnóstico, epidemiologia e clínica da hepatite B oculta.....	11
Quadro 4. Estratificação das cargas vírica (ADN-VHB) em 17 infectados por VIH, com hepatite B oculta	25
Quadro 5. Características demográficas, clínicas e laboratoriais de 471 infectados por VIH, não-imunes por VHB (A), imunes (B), com anti-HBc+ isolado (C), com hepatite B oculta (D).....	27

Índice

	Página
1. Introdução.....	1
2. Marcadores da infecção por VHB.....	3
3. Coinfecção VHB-VIH.....	6
4. Hepatite B oculta.....	8
5. Objectivos.....	14
5.1 Objectivos principais.....	14
5.2 Objectivos específicos.....	14
6. Metodologia do estudo.....	15
6.1 Desenho do estudo.....	15
6.2 População em estudo.....	15
6.3 Metodologia usada no recrutamento da amostra para o estudo.....	16
6.4 Grupos de estudo.....	20
7. Considerações éticas.....	21
8. Resultados.....	23
9. Discussão.....	28
10. Conclusões.....	30
 BIBLIOGRAFIA.....	 32

1. Introdução

A infecção por vírus da hepatite B (VHB) revela-se como a 10ª causa de morte em todo Mundo, estimando-se que a mortalidade anual seja de 0,5 a 1,2 milhões, constituindo um dos mais graves e importantes problemas de saúde pública [1-3]. Aproximadamente, um terço da população mundial (cerca de dois bilhões), teve contacto com VHB e 240 milhões de indivíduos são portadores crónicos do antigénio de superfície de vírus da hepatite B (AgHBs), apesar de estar disponível uma vacina eficaz, desde 1982 [1, 4-6]. A prevalência da infecção por VHB é elevada no Sudoeste Asiático, na China e em África. Na África subsariana, a prevalência da infecção por VHB varia entre 9% e 20% [7] (figura 1).

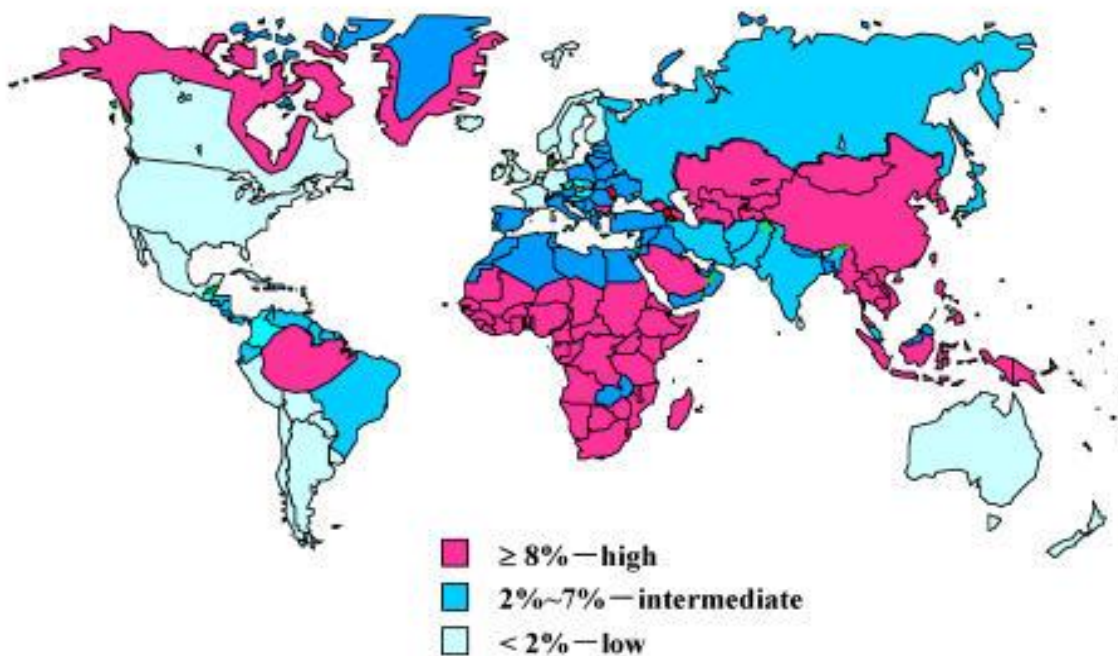


Figura 1. Distribuição geográfica global da infecção crónica por vírus da hepatite B (adaptado da refª 8)

Em 2009, cerca de 33,3 milhões de indivíduos estavam infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH), a maioria na Ásia e em África. Aproximadamente 10% destes infectados era portador crónico de VHB, o que corresponde a cerca de quatro milhões de indivíduos [5, 8, 9]. No Brasil e na Índia,

os resultados dos estudos são controversos, variando a prevalência entre 6% e 24%, respectivamente [10, 11].

A África subsariana é considerada endêmica para os dois vírus, sendo a prevalência da coinfeção VHB-VIH de 10-20% [7, 12] (figuras 1 e 2). VIH induz imunossupressão global, que, se por um lado, acelera a progressão da infecção por VHB, constitui, por outro lado, um factor de risco para a ocorrência de infecção oculta por VHB, situação esta em que o AgHBs negativo não exclui a infecção por este vírus [4, 13-17].

Moçambique, País endêmico para VIH, tem poucos dados publicados sobre a frequência de VHB. Nos dois estudos realizados em Moçambique, em doadores de sangue, as prevalências do AgHBs e de VIH foram de 9,3% e de 13,8% e de 10,6% e de 8,5%, respectivamente, na região de Maputo e de Tete [18, 19]. Até ao presente momento, não existem estudos publicados sobre a hepatite B oculta em Moçambique (Fonte Instituto Nacional de Saúde, Moçambique, 2009).

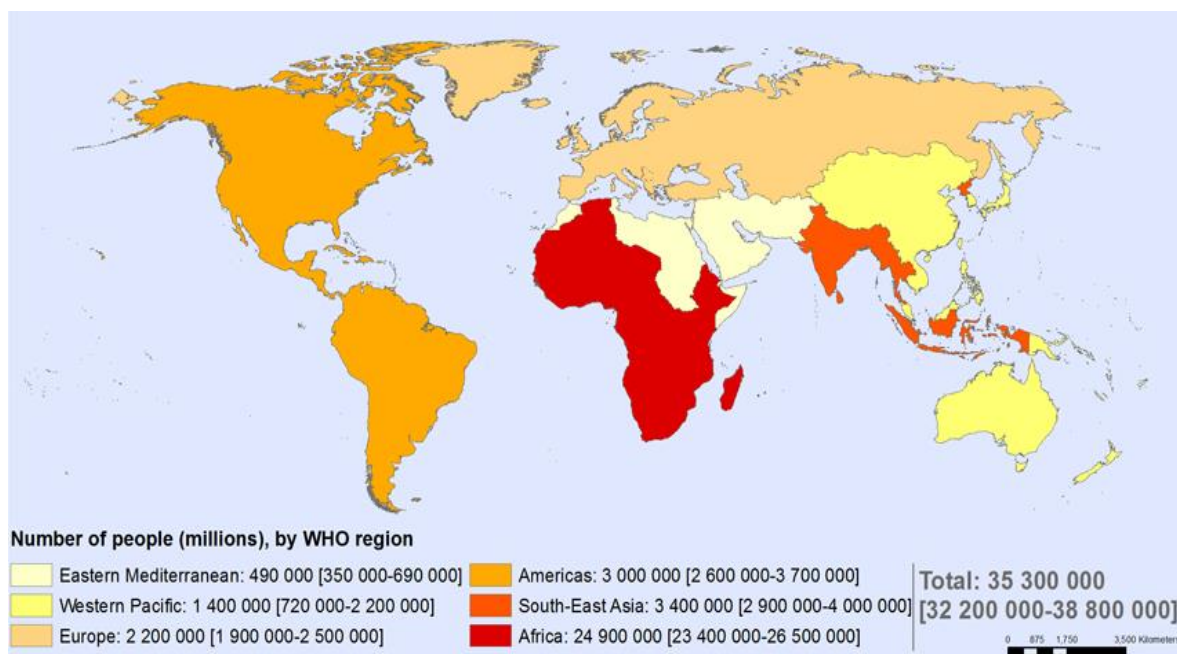


Figura 2. Prevalência estimada de indivíduos com infecção por VIH, em 2012, de acordo com a região geográfica (fonte OMS 2013)

VHB pertence à família Hepadnaviridae, hepatotrópico, não citopático, sendo a lesão hepática causada pela resposta imunitária mediada por linfócitos T e por anticorpos, em resposta aos antígenos víricos.

A partícula vírica possui 42-45nm de diâmetro e é constituída por um envelope externo lipoproteico, que contém glicoproteínas (antígenos de superfície) e um nucleocapsídeo proteico que envolve o ácido desoxirribonucleico (ADN) vírico e a ADN polimerase [19] (figura 3).

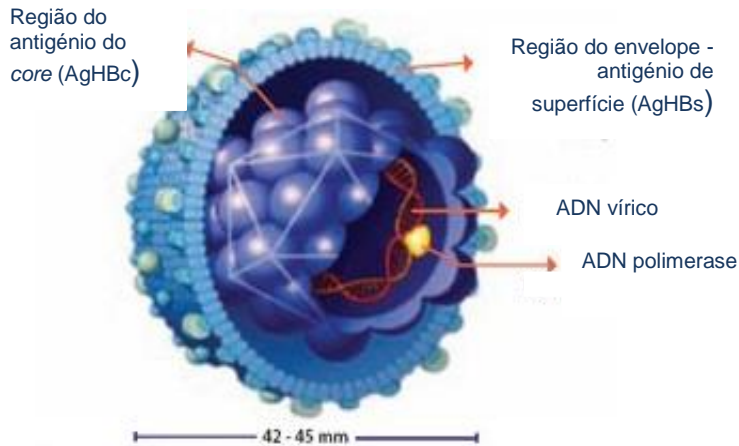


Figura 3. Representação esquemática de vírus da hepatite B (adaptado de <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-b>).

O seu genoma é constituído por uma dupla cadeia de ADN, que se integra no núcleo do hepatócito, convertido em ADN circular fechado covalente (cccADN), o qual serve de molde para a transcrição em ácido ribonucleico (ARN) vírico, que é sintetizado em ADN, através da enzima transcriptase reversa, com translação das proteínas víricas, incluindo o AgHBs e o antígeno *e* de vírus da hepatite B (AgHBe) [20].

2. Marcadores da infecção por VHB

O AgHBs, cuja primeira descrição foi feita em 1971, anteriormente conhecido como antígeno *australis* torna-se positivo, por regra, entre a 2ª e a 10ª semanas após o contacto com VHB, o que revela a presença de vírus no organismo, independentemente da duração da infecção (quadro 1) [21]. Em 1-5% dos casos, este marcador pode ser negativo, por exemplo, em indivíduos com infecção aguda, com títulos baixo do AgHBs, dada a boa supressão vírica e, por outro lado, em casos de imunodepressão severa, por fraca resposta imunitária [20]. O anticorpo contra o antígeno de superfície de vírus da hepatite B (anti-HBs),

anticorpo protector, está presente, no geral, após a eliminação do AgHBs, sendo interpretado como indicador de imunidade activa quer por infecção resolvida, quer por vacinação eficaz (quadro 1) [1, 14, 20, 22].

O antígeno do *core* de vírus da hepatite B (AgHBc) não é solúvel, não sendo, por isso, detectável no sangue periférico, devido à sua localização intracelular, porém constitui a porção mais imunogénica de VHB [23]. O anticorpo contra o antígeno do *core* de vírus da hepatite B (anti-HBc) indica a presença de resposta imune a VHB por contacto recente [imunoglobulina da classe M (IgM)] ou remoto [imunoglobulina da classe G (IgG)]. Geralmente, a IgM do anti-HBc é detectável uma a duas semanas após o aparecimento do AgHBs, persistindo até seis meses, se a infecção evolui para a resolução, ou durante a replicação vírica crónica, perdurando em níveis baixos e desaparecendo quando a IgG do anti-HBc se torna positiva, mantendo os níveis altos de anti-HBc total, durante anos (quadro 1 e figura 4) [20, 21, 24]. Estão descritas algumas situações, em 10-20% dos casos, em que o anti-HBc total é o único marcador serológico presente [15, 20, 23]:

- a) Infecção aguda resolvida, após o desaparecimento do AgHBs e antes da detecção do anti-HBs (período de janela), sendo a componente IgM predominante.
- b) Infecção remota e resolvida, com anti-HBs não detectável, sendo mais frequente em populações com alta prevalência de infecção por VHB.
- c) Infecção oculta (10-45%), em que o AgHBs não é detectável, em coinfectados por VIH ou VHC, ou, ainda, em região endémica.
- d) Por erro no resultado das técnicas laboratoriais (falsos positivos).

Os marcadores de replicação, que representam o expoente máximo de infecciosidade, são dois, um qualitativo, o AgHBe e, o outro quantitativo, o ADN de VHB que está acima a níveis de 100.000 (10^5) a 1.000.000 (10^6) cópias/mL ou mais (quadro 1). O ADN de VHB é útil para o diagnóstico da hepatite B crónica replicativa *versus* não replicativa, para a monitorização e para a tomada de decisões terapêuticas,

devendo ser expresso em UI/mL [20, 21, 24]. O ADN-VHB tem sido detectado em cerca de 10% dos indivíduos com anti-HBc isolado, dependendo a sua variação da área geográfica e da população estudada [25]. Clinicamente, os casos mais interessantes relacionam-se com a possibilidade de se tratar de infecção oculta por VHB.

Quadro 1. Perfil serológico e carga vírica da infecção por vírus da hepatite B (ADN-VHB) e sua interpretação clínica (adaptado da ref^a 21).

AgHBs	anti-HBs	anti-HBc (IgM)	Anti-HBc (IgG)	AgHBe	anti-HBe	ADN-VHB (UI/mL)	Interpretação
+	-	+	-	+	-	$> 10^5$	Início da infecção aguda
-	+	-	+	-	+	Neg	Recuperação da infecção aguda
+	-	-	+	-	+	$< 2 \times 10^3$	Portador crónico inactivo
+	-	-	+	+	-	$> 2 \times 10^4$	Hepatite crónica AgHBe ⁺
+	-	-	+	-	+	2×10^3 - 10^4	Hepatite crónica AgHBe ⁻
-	+/-	-	+	-	+	$< 2 \times 10^2$	Hepatite oculta

AgHBs – antígeno de superfície de vírus da hepatite B; anti-HBs – anticorpo contra o antígeno de superfície de vírus da hepatite B; anti-HBc (IgM) – anticorpo contra antígeno do *core*, imunoglobulina M; anti-HBc(IgG) – anticorpo contra o antígeno do *core*, imunoglobulina G; AgHBe – antígeno *e* de vírus da hepatite B; anti-HBe – anticorpo contra o antígeno *e* de vírus da hepatite B; ADN-VHB – ácido desoxirribonucleico de vírus da hepatite B.

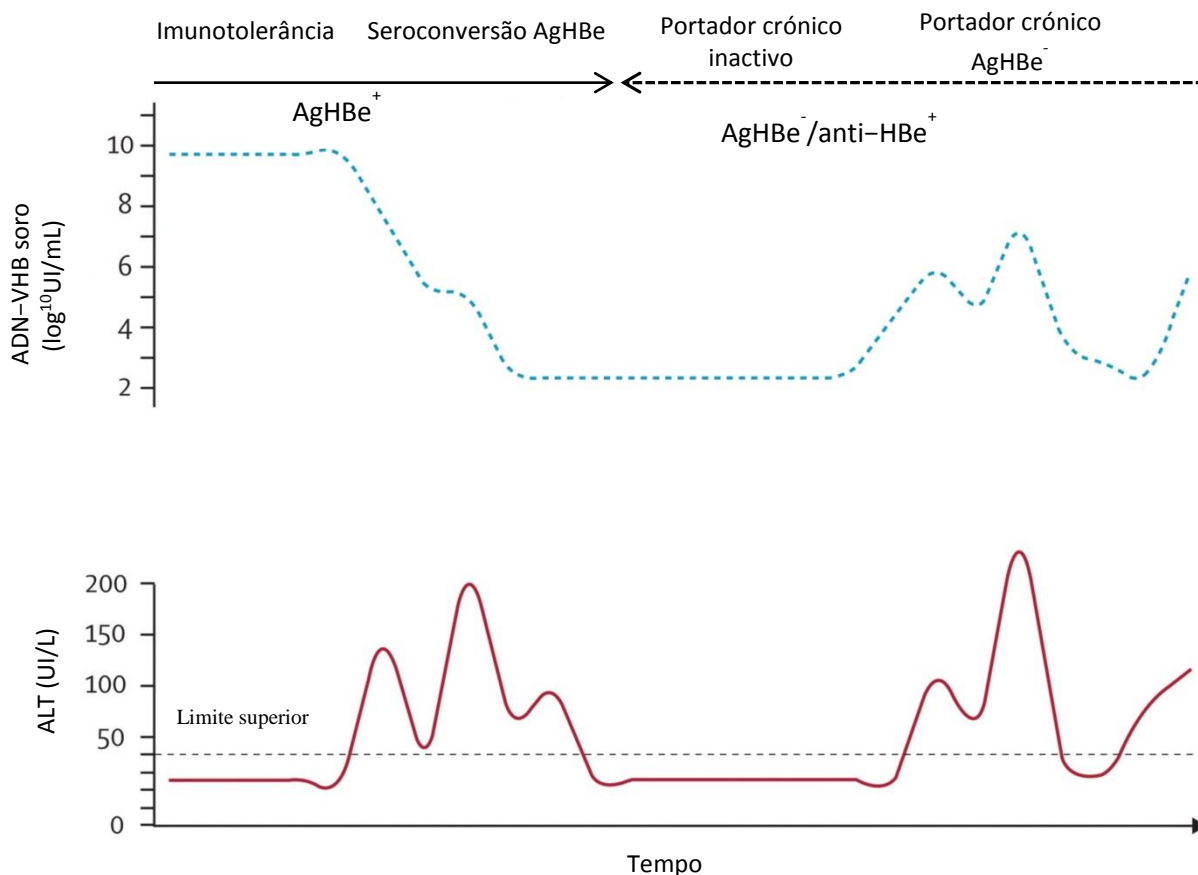


Figura 4. História natural da infecção crônica por vírus da hepatite B (adaptado da ref^a 24). ADN-VHB – ácido desoxirribonucleico de vírus da hepatite B; AgHBe – antígeno *e* de vírus da hepatite B; ALT- alanina-aminotransferase; anti-HBe – anticorpo contra o antígeno *e* de vírus da hepatite B.

3. Coinfecção VHB-VIH

Dada a partilha das vias de transmissão (predominantemente, por via percutânea ou por exposição inaparente mucocutânea ao sangue ou a outros fluídos orgânicos contaminados e, ainda, por via transplacentária), nalgumas regiões de endemicidade elevada da infecção por VIH é frequente o diagnóstico da infecção por VHB em infectados por VIH [15, 20, 26, 27]. Alguns estudos demonstraram que 6-13% dos infectados por VIH estão coinfectados por VHB [28]. Esta coinfecção tem um impacto relevante nos aspectos epidemiológicos, de diagnóstico e de tratamento da infecção por VHB (quadro 2).

VHB parece não alterar a progressão da infecção por VIH. Pelo contrário, VIH acelera a evolução e induz maior risco de cronicidade da infecção por VHB (aproximadamente, cinco vezes mais), comparando com a evolução nos monoinfectados por VHB [5]. Nestes doentes, a gravidade da situação é,

particularmente, relevante naqueles com contagens de linfócitos TCD4⁺ baixas e excessivo consumo de álcool, pelas seguintes razões [9, 27, 29, 30]:

- a) Perda rápida da protecção do anticorpo contra o antígeno de superfície de vírus da hepatite B (anti-HBs) e risco de reactivação da hepatite B crónica [5, 13].
- b) Valores da alanina-aminotransferase (ALT) mais baixos, comparativamente, aos monoinfectados (perdendo, assim, este marcador, valor como indicador para início da terapêutica da infecção por VHB) [30].
- c) Maior risco de morbidade e mortalidade, por cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC) [8, 9, 13].

A correlação de cirrose hepática e CHC não foi, ainda, avaliada nos coinfectados VHB-VIH, o mesmo acontece em relação à correlação entre os genótipos de VHB e a resposta à terapêutica, comprovada nos monoinfectados por VHB [30].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que infectados por VIH elegíveis para a terapêutica antirretrovírica (TARV) sejam testados para o AgHBs [31]. Todavia, os coinfectados VHB-VIH, em África, são, raramente, diagnosticados com hepatite B crónica, dado que os testes para o AgHBs não estão disponíveis na prática clínica. Como resultado do acesso difícil aos testes de diagnóstico e a antivíricos eficazes, os coinfectados VHB-VIH raramente iniciam a TARV com regimes em que se inclui a lamivudina (LAM ou 3TC) ou a emtricitabina (FTC) mais tenofovir (TDF), como recomendado pela OMS [32].

Se bem que a TARV tenha diminuído a taxa de mortalidade e a incidência das doenças definidoras de síndrome de imunodeficiência humana adquirida (sida), em infectados por VIH, a doença hepática, principalmente devida a coinfeção por VHB ou vírus da hepatite C (VHC) tem emergido como uma das principais causas de morbidade e de mortalidade não associadas á sida [33].

A TARV pode induzir a síndrome de reconstituição imunitária (SRI) de que pode resultar doença hepática imuno-mediada no contexto da infecção por VHB (quadro 2). Em coinfectados, a instituição da TARV, pode resultar em vários cenários, tais como:

- a) Risco de ocorrência de episódios de hepatite severa, como resultado do início da TARV, no contexto da SRI [28].
- b) Desenvolvimento da cirrose hepática pelo aumento da sobrevida (risco seis vezes aumentado) [15].
- c) Dificuldade para o diagnóstico de VHB, pelo uso de antirretrovíricos (ARVs) com actividade cruzada (contra VHB), que pode contribuir para a redução das cargas víricas de VHB.
- d) Desenvolvimento de resistência de VHB aos ARVs (com acção simultânea sobre VHB), pelo uso descontinuado ou inadequado [13].

Quadro 2. Impacto da infecção por VIH na coinfeção por VHB.

-
- Maior risco de infecção e reactivação por VHB e de evolução para a cronicidade
 - Progressão mais rápida para cirrose e para CHC
 - Maior mortalidade da doença hepática
 - Diminuição da resposta ao tratamento da infecção por VHB
 - Actividade cruzada de antivíricos para VIH e VHB (3TC, TDF e FTC), com risco de resistência, quando 3TC é utilizado, na TARV, como o único fármaco com acção sobre VHB
 - Toxicidade hepática acrescida por efeito directo dos ARVs ou devido à SRI, com aumento da ALT ou hepatite fulminante (quando os ARVs utilizados na TARV não têm acção sobre VHB)

ALT – alanina-aminotransferase; ARVs – antirretrovíricos; CHC – carcinoma hepatocelular; FTC – emtricitabina; SRI – síndrome de reconstituição imunitária; TARV – terapêutica antirretrovírica; TDF – tenofovir; VHB – vírus da hepatite B; VIH – vírus da imunodeficiência humana; 3TC – lamivudina.

4. Hepatite B oculta

A hepatite B oculta que foi, inicialmente, descrita nos finais dos anos 70, do século passado, é um dos tópicos mais controversos das hepatites víricas, com a sua relevância vírica e clínica a ser debatida há mais de 30 anos. Porém, nos últimos 20 anos a aplicação de técnicas de biologia molecular ao estudo da hepatite B oculta tem permitido caracterizar melhor os seus padrões víricos e as potenciais implicações clínicas. Apesar destes progressos, muitos dos aspectos da hepatite B oculta não estão, ainda, clarificados,

como a sua própria definição e, também, a identificação de uma técnica laboratorial padronizada para o seu diagnóstico. Desde os anos 90 do século passado, com a descoberta da infecção por VHC, tem sido demonstrado que uma percentagem elevada de indivíduos com infecção por VHC são AgHBs – negativos e ADN-VHB positivos [34].

Em 2008, um grupo de peritos reunidos em Taormina, elaborou uma série de declarações e de recomendações sobre vários aspectos relacionados com a hepatite B oculta, versando: a) Aspectos víricos, imunológicos, de diagnóstico e epidemiológicos; b) o risco de transmissão por transfusão de sangue ou por transplantação hepática; c) o risco de reactivação em condições de imunossupressão; d) o significado potencial na promoção da progressão da hepatite B crónica; e) o possível papel no desenvolvimento de CHC (quadro 3) [35]. Como definição assumiu-se que a hepatite B oculta é caracterizada pela presença de ADN-VHB no fígado (com ADN-VHB detectável ou indetectável no soro) em indivíduos com AgHBs – negativo [a hepatite B oculta está associada à presença de anticorpos anti-VHB (anti-HBc e anti-HBs), todavia mais de 20% dos casos são negativos para todos os marcadores de VHB] [4, 13, 35]. A hepatite B oculta pode estar associada a: a) Persistência do cccADN-VHB no núcleo do hepatócito; b) supressão muito forte da actividade replicativa do vírus e da expressão genética, de que resulta redução significativa da produção de VHB; c) infecção por mutantes de VHB – produzindo AgHBs antigenicamente modificado, não reconhecido pelas técnicas disponíveis, ou mostrando actividade replicativa deficiente por mutações no gene *Pol* (seleccionadas por pressão da terapêutica antivírica) ou, ainda, por incapacidade de síntese da proteína S por mutações das regiões genómicas do promotor S; d) formação de imunocomplexos AgHBs e anti-HBs, impedindo a detecção do AgHBs pelas técnicas laboratoriais de rotina; e) integração do ADN-VHB no genoma da célula hospedeira; e) persistência (anos depois da recuperação de hepatite B aguda) da resposta imunitária específica dos linfócitos T memória contra epítopos de VHB [14, 34, 36-42]. Assim, vários mecanismos podem estar envolvidos na alteração da regulação da biologia de VHB, relacionados com a resposta imunitária e a epidemiologia, que condicionam a replicação de VHB em níveis em que a

expressão do AgHBs esteja abaixo do limiar de detecção, mas com infecciosidade residual e com risco de transmissibilidade da hepatite B oculta [43].

A hepatite B oculta tem sido associada a níveis baixos de replicação de VHB na ausência de AgHBs detectável, como referido. As técnicas de PCR (*polimerase chain reaction*) têm permitido a detecção destes níveis baixos de replicação. No entanto, na circunstância de não se disponibilizar de técnicas de biologia molecular, a seropositividade para anti-HBc, isoladamente, pode servir como marcador de hepatite B oculta nalgumas circunstâncias (quadro 3).

Na hepatite B oculta é, do ponto de vista dos marcadores para VHB, possível distinguir os seropositivos (anti-HBc e/ou anti-HBs positivo) e os seronegativos (anti-HBc e anti-HBs negativos) (figura 5). Nos seropositivos para a hepatite B oculta, a eliminação do AgHBs pode ter ocorrido pouco tempo depois da resolução da hepatite aguda ou anos ou décadas depois da infecção crónica, enquanto os seronegativos para a hepatite B oculta podem ter perdido, progressivamente, todos os marcadores de VHB ou podem ter sido negativos para VHB logo no início da infecção, tal como acontece com o modelo animal (marmota) infectado por *woodchuck hepatitis virus* (WHV) [44].

Quadro 3. Diagnóstico, epidemiologia e clínica da hepatite B oculta (adaptado da ref³⁵).

Características	Aspectos relevantes	Observações/comentários
Diagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> • detecção ADN-VHB (fígado e sangue) 	<ul style="list-style-type: none"> • a identificação de ADN-VHB no fígado é o método mais apropriado para o diagnóstico de HBO, com limitações (pequeno nº de amostras e técnicas estandardizadas e validadas não disponíveis) • a identificação de ADN no plasma é o método mais utilizado para o diagnóstico de HBO, por PCR, com limitações (não identifica todos os casos e a PCR mais sensível é vulnerável à contaminação, sendo difícil de excluir os falsos-positivos) • identificação do anti-HBc, se ADN-VHB não for exequível, no caso de dádivas de sangue ou de órgãos e de terapêutica imunossupressora; o anti-HBc é marcador menos fiável (nem todos anti-HBc têm ADN-VHB detectável e os testes anti-HBc podem ser falsos positivos)
Epidemiologia	<ul style="list-style-type: none"> • a HBO parece mais frequente em indivíduos de risco para VHB e com doença hepática 	<ul style="list-style-type: none"> • prevalência em diferentes regiões difíceis de comparar, pelas diferenças nas populações estudadas, pela heterogeneidade da sensibilidade e da especificidade dos métodos utilizados para a detecção de HBO, pelo tipo de amostras e pelo critério utilizado na sua selecção e pela endemicidade da infecção por VHB
Clínica	<ul style="list-style-type: none"> • dádivas de sangue AgHBs – negativo com ADN-VHB devem ser consideradas como infecciosas • há risco de transmissão de VHB no transplante hepático de um dador com HBO, se o receptor é negativo para todos os marcadores de VHB • doentes com HBO sob quimio-radioimunoterapia estão em risco de 	<ul style="list-style-type: none"> • o risco real de transmissão da infecção por VHB em dadores com HBO e o custo/benefício de um teste para ADN-VHB necessitam de validação futura • a profilaxia com antivíricos como o 3TC previne a infecção por VHB na maioria dos casos (mas não em todos). Se bem que possível, não há evidência de transmissão de VHB, através de órgãos de dadores com HBO • os doentes em quimio-imunoterapia devem ser testados para anti-HBc e devem ser monitorizados para a ALT. Se bem que conhecido

	<p>reactivação da infecção por VHB</p> <ul style="list-style-type: none"> • nos coinfectados VIH-VHB é conhecido o risco de reactivação grave de VHB, quando se interrompem os ARVs que são activos contra VHB • é conhecido o contributo de VHB (em monoinfectados e em coinfectados por VHC) em favorecer ou em acelerar o desenvolvimento de cirrose • estudos molecular-oncológicos e epidemiológicos sugerem que a HBO pode ser um factor de risco para o desenvolvimento do CHC, em particular em indivíduos infectados por VHC e com consumo abusivo de álcool 	<p>o risco de reactivação da infecção por VHB nos doentes hemato-oncológicos AgHBs – positivos, na HBO não está definido este risco</p> <ul style="list-style-type: none"> • a possível influência da HBO na doença hepática crónica nos infectados por VIH é desconhecida • o papel da HBO no desenvolvimento de cirrose não está, ainda, clarificado • a HBO mantém vários dos mecanismos pró-oncogénicos de VHB – por mecanismos directos, tais como a capacidade de integração no genoma da célula hospedeira e de produção de proteínas transformadoras, e indirectos, pela actividade necroinflamatória crónica que promove a progressão para cirrose (lesão pré-neoplásica). Porém, para se concluir que a HBO tem um papel importante na transformação hepatocelular são necessários mais estudos de patogénese e de epidemiologia moleculares
--	--	---

ADN-VHB – ácido desoxirribonucleico de vírus da hepatite B; AgHBs – antigénio de superfície de vírus da hepatite B; ALT – alanina-aminotransferase; anti-HBc – anticorpo do *core* de vírus da hepatite B; ARVs – antirretrovíricos; CHC – carcinoma hepatocelular; HBO – hepatite B oculta; VHB – vírus da hepatite B; VHC – vírus da hepatite C; VIH – vírus da imunodeficiência humana.

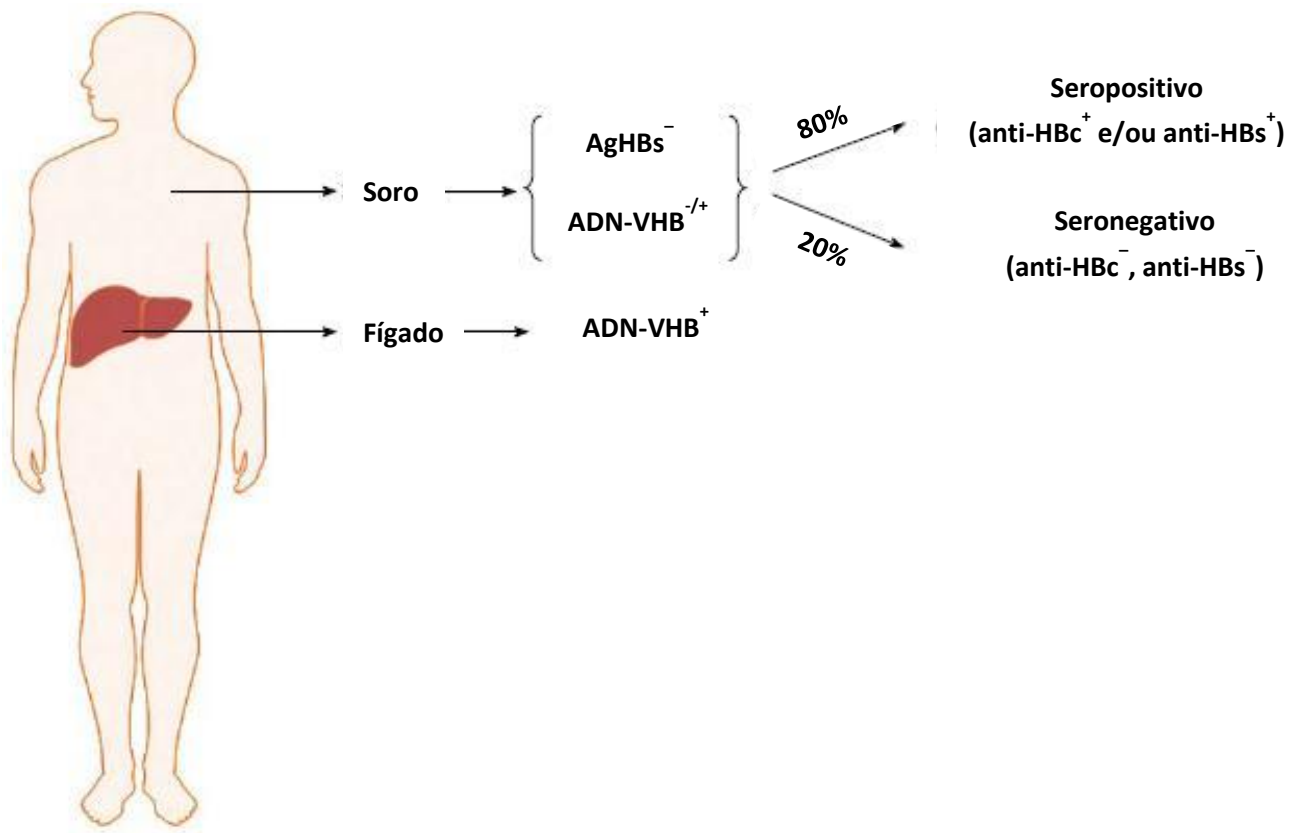


Figura 5. Representação esquemática dos perfis de hepatite B oculta na infecção por VHB (adaptado da ref^a 44).

O ADN-VHB tem sido detectado em cerca de 10% dos indivíduos com anti-HBc isolado, mostrando, no entanto, os resultados grandes disparidades [25]. As discrepâncias dos resultados encontrados podem ser explicadas pelas diferenças nas populações estudadas, pela heterogeneidade na sensibilidade e na especificidade dos métodos usados para detectar ADN-VHB, pelo critério de escolha das amostras para os testes moleculares e pela endemicidade de VHB [23, 45].

5. Objectivos

5.1 Objectivos principais

- Investigar a prevalência de anti-HBc isolado em infectados por VIH.
- Investigar a prevalência de ADN-VHB (hepatite B oculta) em coinfectados por VIH.

5.2 Objectivos específicos

- Determinar as características demográficas e clínicas dos infectados por VIH com anti-HBc isolado.

6. Metodologia do Estudo

6.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo observacional, transversal, em seropositivos para VIH, sem TARV prévia, atendidos, consecutivamente, na Consulta Externa de Doença Crónica, dos Centros de Saúde da área de Mavalane, Polana Caniço e Mavalane, Cidade de Maputo, no período compreendido entre Junho e Outubro de 2012. Aqueles que deram o consentimento informado, para participar no estudo, foram submetidos a um questionário, após o qual foi colhida uma amostra de sangue, para determinação do hemograma, das aminotransferases, da contagem de linfócitos da linhagem CD4 (TCD4⁺), da serologia e da carga vírica para VHB.

6.2 População em estudo

Para este estudo foram recrutados adultos (com idades ≥ 18 anos), infectados por VIH, sem TARV prévia, seguidos nos Centros de Saúde da área de Mavalane, em Consulta Externa de Doença Crónica. Como rotina, estes seropositivos para VIH são submetidos a uma avaliação mensal, por forma a serem caracterizados, tendo em conta o estágio clínico, a presença de infecções oportunistas, alterações analíticas, incluindo a contagem de linfócitos TCD4⁺, para tomada de decisão no que concerne a medidas de intervenção terapêutica, incluindo o início da TARV.

Critérios de inclusão

- Idade ≥ 18 anos.
- Infecção por VIH.
- Sem TARV prévia.
- Em avaliação na Consulta Externa de Doença Crónica, dos Centros de Saúde da área de Mavalane.

Critérios de exclusão

- Grávidas.
- Incapacitados de prestar consentimento informado.
- Os que recusaram participar do estudo.

Tamanho da amostra

Dos 610 indivíduos inquiridos, 39 não foram elegíveis, tendo em conta os critérios de inclusão e de exclusão, previamente definidos. Assim, foram recrutados 571 seropositivos para VIH e incluídos 518 na análise estatística (os que tinham disponível o questionário e os resultados laboratoriais completos) (anexo1).

O cálculo da amostra teve em conta a prevalência de hepatite B oculta de 7,5%, de acordo com um estudo conduzido na África do Sul, em 2009 [46]. Para tal foi utilizada a fórmula seguinte, assumindo:

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

Significância (alfa) = 0.05

Prevalência (p) = 7.5%

Erro (E) = 2% (erro máximo aceitável para a estimativa)

Com base neste cálculo o “n” estimado foi de 469. Admitindo-se que a estimativa da taxa de recusa para a participação rondasse cerca de 10%, o tamanho previsto da amostra final foi de 515.

6.3 Metodologia usada no recrutamento da amostra para o estudo

Ação de esclarecimento

Foi programada uma acção de esclarecimento diária aos potenciais participantes, onde se transmitia informação sobre a infecção por VHB, no que respeita à sua importância, à sua prevalência, ao significado da coinfeção com VIH, às interacções entre VHB-VIH e às vantagens e desvantagens na participação no estudo.

Consentimento informado

Após a acção de esclarecimento foram convidados a participar no estudo e conduzidos para o local onde se procedia à assinatura do consentimento, sendo no momento disponibilizada uma cópia do mesmo ao participante, contendo contactos dos elementos da equipa de investigação, destacando o investigador principal, para o caso de dúvidas não totalmente esclarecidas, garantindo assim a voluntariedade da participação (anexo 2).

Colheita de dados dos participantes

No local, os participantes eram submetidos a um questionário fechado, com vista a obter informação sobre (anexo3):

- Dados sociodemográficos.
- Factores de risco relacionados com as infecções por VIH e VHB.
- Comorbilidades.

Posteriormente, procedia-se ao exame físico sumário, que tinha em vista a caracterização do(s) (anexo3):

- Estado geral e sinais vitais.
- Sinais de potencial doença hepática, tais como icterícia, ascite e esplenomegalia.
- Estádio clínico da infecção por VIH, de acordo com a classificação da OMS (anexo 4).

Colheita de amostras de sangue

Depois, era colhido um volume aproximado de 12 mL de sangue, dos quais 9 mL foram distribuídos por três tubos com anticoagulante K2E EDTA (BD vacutainer, Inglaterra) e os restantes 3 mL para um tubo sem anticoagulante (BD vacutainer, Inglaterra). Após a colheita, os tubos eram, devidamente, rotulados e identificados com as iniciais do participante, código e número de estudo. As amostras eram conservadas no local da colheita por um período máximo de seis horas.

Com as amostras de dois tubos, um seco e um com EDTA, fez-se a determinação do hemograma, das aminotransferases e da contagem de linfócitos TCD4⁺, no Laboratório do respectivo Centro de Saúde. Os restantes dois tubos, com anticoagulante EDTA, foram enviados para o Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Saúde (INS), para a determinação da carga vírica para VHB.

a) Hemograma completo

A contagem total das séries sanguíneas (eritrograma, leucograma e plaquetograma) foi efectuada nas primeiras seis horas, após a colheita da amostra, utilizando reagentes comercialmente disponibilizados para o Centro de Saúde – Automated Hematology Analyzer Sysmex SF 3000 (Sysmex, Japão).

b) Aminotransferases

As aminotransferases [ALT e aspartato-aminotransferase (AST)] foram determinadas, dentro das primeiras seis horas, após a colheita da amostra, utilizando reagentes comercialmente disponibilizados para o Centro de Saúde, com o recurso a um autoanalisador de bioquímica.

c) Imunofenotipagem das subpopulações dos linfócitos T.

A imunofenotipagem de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ foi determinada por citometria de fluxo, utilizando o instrumento FACSCalibur e reagentes Multitest [Beckton Dickinson, Estados Unidos da América (EUA)], através de uma plataforma, seguindo o protocolo do fabricante.

Resumidamente, o fenótipo dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ foi analisado usando o sangue total colhido em tubo de 5mL, com anticoagulante EDTA. Os tubos, contendo as amostras de sangue, foram, previamente, colocados num agitador orbital durante alguns minutos para a sua homogeneização. Em tubos truCOUNT (Becton Dickinson, EUA) foram, inicialmente, adicionados 20µl de uma mistura de anticorpos monoclonais Multitest CD3/CD4/CD45/CD8 e, posteriormente, 50µl de sangue homogeneizado, do respectivo tubo EDTA. Os tubos truCOUNT foram agitados num vórtex por 5 segundos e, depois, incubados no escuro por 15 minutos. De seguida, foram adicionados 450µl da solução FACSLysing (Becton Dickinson, EUA), para a lise dos eritrócitos. Posteriormente, os tubos foram agitados num vórtex por 5 segundos e incubados por 15 minutos no escuro. Depois, as amostras foram levadas para a análise do fenótipo no citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, EUA).

Depois do processamento nos Centros de Saúde, as amostras foram centrifugadas, o plasma e soro alicotados e enviados para o Laboratório de Serologia do INS, para determinação da serologia de VHB (AgHBs, anti-HBs, e anti-HBc total) (anexo 3).

d) Serologia da infecção por VHB

Para a determinação da presença de AgHBs, foi usado o teste rápido *Determine* HBsAg, (Allere, Japão), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 60ul de plasma no local de deposição de amostra, na tira do teste e, de seguida, adicionada uma gota de tampão no mesmo local, esperando-se 15 minutos para a leitura, interpretação e registo do resultado.

Para a testagem dos anticorpos (anti-HBs e anti-HBc total) foram usados *kits* comerciais do método de *Enzyme Linked ImmunoAssay* (ELISA), (DiaSorin, S.p.A. - Saluggia, Itália), sendo a técnica executada e interpretada de acordo com as indicações do fabricante. Resumidamente, em microplacas de 96 poços impregnados com antigénios HBs e HBc, respectivamente, foram depositados 25µl do diluente de amostras, parte integrante do *kit*, de seguida, 75 µl do plasma e dos controlos nos respectivos poços. As misturas foram homogeneizadas através de três pipetagens reversas. As placas foram cobertas e incubadas a seco durante uma hora \pm 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. De seguida, foram removidas as coberturas das placas, as quais foram lavadas no mínimo cinco vezes com tempo de imersão de 30 segundos com um volume total da solução de lavagem de 0.370mL (370 µl), através de uma lavadora de placas (Biotech, EUA). Foram adicionados, rapidamente, 100 µl da solução de conjugado em todos os poços das placas e incubadas por 30 ± 5 minutos, a temperatura ambiente. Depois, as placas foram lavadas no mínimo cinco vezes e, posteriormente, foram depositados 80 µl da solução de revelação em todos poços das placas, as quais foram, de seguida, incubadas no escuro, a temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos. Findo este período, foram depositados 100 µl da solução de paragem, na mesma sequência e rapidez, com que foi adicionada a solução de revelação e, por fim, foi feita a leitura num intervalo de 30 minutos com um aparelho leitor de microplacas, com filtros de comprimento de onda de 450 a 620 nm, para a obtenção das densidades ópticas da corrida. Através de um painel de interpretação de resultados foram determinadas as amostras positivas e negativas, para cada um dos marcadores de acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante.

e) Determinação da carga vírica para VHB

Os dois tubos com EDTA foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm, e 1100µl de plasma foram transferidos para criotubos de 1,5 mL, [*micro tubes type C, with skirted base, neutral cap* (Sarsted, Alemanha)], previamente identificados com o número de registo do participante e a data de colheita da amostra biológica. Estes foram armazenados no INS, em congeladores a -20°C até a data do seu processamento.

A carga vírica para VHB foi determinada por PCR em tempo real, utilizando o sistema automático Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV 96, versão 2.0, (Roche Diagnostics, Alemanha), de acordo com o manual do fabricante.

Este teste quantitativo pode detectar cargas víricas acima de 20 UI/mL. O factor de conversão de UI/mL para cópias/mL recomendado pela OMS, é 5,82 cópias/mL.

O INS em Moçambique procedeu ao controle de qualidade das amostras de sangue.

6.4 Grupos de estudo

Após a análise serológica e determinação da carga vírica para VHB, os participantes foram distribuídos por quatro grupos, todos eles com serologia positiva para VIH:

- Grupo A- não imunes (AgHBs⁻, anti-HBc⁻, anti-HBs⁻).
- Grupo B- imunes (AgHBs⁻, anti-HBc⁺, anti-HBs⁺).
- Grupo C- anti-HBc⁺ isolado (AgHBs⁻, anti-HBc⁺, anti-HBs⁻, ADN-VHB <20UI/mL).
- Grupo D- hepatite B oculta (AgHBs⁻, anti-HBc⁺, anti-HBs⁻, ADN-VHB ≥20UI/mL).

7. Considerações éticas

a) Comité Nacional de Bioética

O protocolo do estudo foi submetido para a aprovação pelo Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS), Maputo, Moçambique. Tendo este acesso directo a toda a documentação relevante do estudo sempre que solicitado (anexos 5 e 6).

O investigador principal foi responsável por garantir que o questionário, o formulário do consentimento informado e qualquer outra informação que foi apresentada aos potenciais participantes foram revistas e aprovadas pelos Comités de Ética.

Este estudo foi realizado de acordo com as Boas Práticas Clínicas (*GCP – good clinical practice*) e todos os requisitos regulamentares aplicáveis, incluindo, quando aplicável, a versão 2008 da Declaração de Helsínquia.

b) Consentimento informado

O consentimento informado é um documento escrito que foi lido para todos os indivíduos elegíveis ou para os seus guardiões, pelo investigador ou pelo clínico treinado, usando uma linguagem clara e acessível ao destinatário.

De todos os voluntários foi obtido um consentimento escrito e assinado (ou com impressão digital), após um esclarecimento de dúvidas, discussão do conteúdo do estudo com membros da família ou da comunidade, antes da decisão de participar.

A inclusão no estudo foi voluntária e, sempre, após se ter obtido o consentimento informado. A possibilidade de desistência e saída dos participantes do estudo, em qualquer fase do processo, não constituiu motivo para discriminação, relativamente, ao tratamento e seguimento de rotina, no Centro de Saúde.

c) Confidencialidade

O questionário, as requisições e as amostras laboratoriais foram identificados, por um código do estudo (HBOG ou CSPC e uma referência numérica de três algarismos), as iniciais do participante (do primeiro, do segundo e do último nome) e o número do processo clínico do Centro de Saúde, de modo a garantir a confidencialidade.

Os dados de identificação dos participantes foram restritos ao pessoal médico e investigadores, directamente ligados ao estudo, para os casos de necessidade de confirmação de alguma informação pertinente.

Os questionários codificados foram arquivados e enviados para o INS e, posteriormente, introduzidos na base de dados, não tendo sido difundidos fora do local de estudo.

d) Biossegurança

As amostras de sangue foram colhidas seguindo normas de biossegurança e todo o cuidado foi tomado para evitar acidentes com os participantes e com o pessoal de saúde.

e) Implicações e benefícios

Será proposta a vacinação contra a hepatite B àqueles que não estejam, ainda, protegidos. É importante referir, que todos os participantes, com critérios para vacinação, serão encaminhados ao Programa de Vacinação do Ministério da Saúde, particularmente os indivíduos com contagens de linfócitos TCD4⁺ acima de 200 células/ μ L.

Os participantes em que for detectada hepatite B activa ou oculta serão referenciados para tratamento da infecção por VIH, de acordo com as normas nacionais que consiste na administração de dois ARVs, activos contra VHB (TDF, 3TC ou FTC).

A equipa do estudo irá convidar os parceiros dos indivíduos seropositivos para VIH e com infecção crónica por VHB (activa ou oculta) para uma sessão de aconselhamento e testagem de ambos os vírus, sempre que possível.

8. Resultados

Para o estudo foram seleccionados 610 indivíduos com infecção por VIH, dos quais 39 não foram elegíveis por diversos motivos, nomeadamente exposição prévia aos ARVs (15), gravidez (12), abandono (7) e recusa em assinar o consentimento informado (5). Portanto, restaram 571 (94%) que assinaram o consentimento informado, responderam ao questionário, submeteram-se à observação clínica e à colheita de amostras para os estudos laboratoriais. Destes, 53 foram excluídos por volume insuficiente da amostra (42) ou amostra em más condições (11), restando, assim, 518 indivíduos (85% da população inicial), validamente testados e com resultados laboratoriais, incluindo os testes serológicos que foram utilizados para o diagnóstico da infecção por VHB (figura 6).

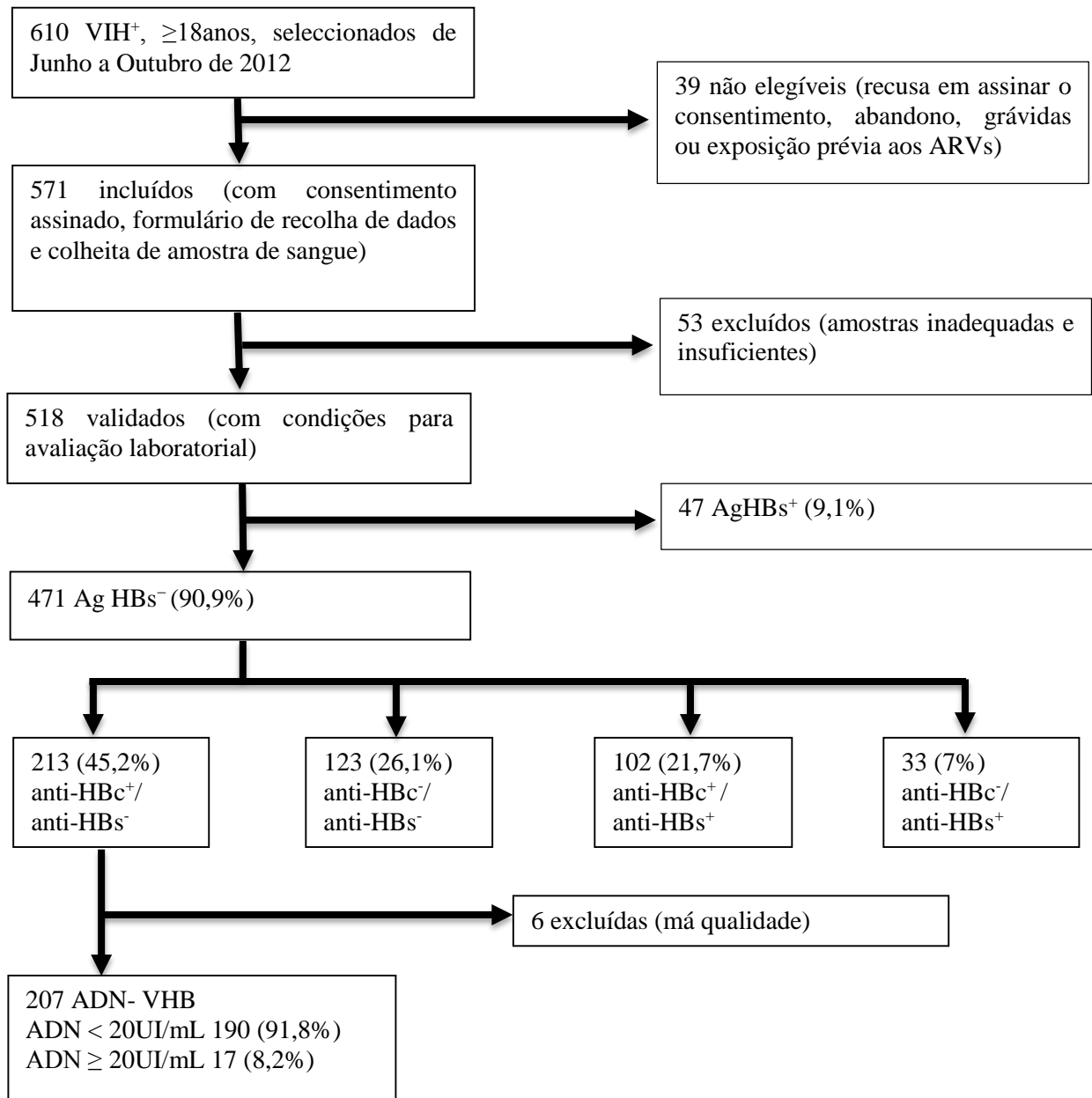
Com os resultados serológicos obtidos (AgHBs, anti-HBc e anti-HBs), 47 (9,1%) apresentavam AgHBs positivo, pelo que considerámos portadores crónicos de VHB.

Das restantes 471 amostras, 123 (26,1%) mostravam anti-HBc e anti-HBs negativos, 102 (21,7%) anti-HBc e anti-HBs positivos, 213 (45,2%) anti-HBc positivo e anti-HBs negativo e 33 (7%) anti-HBc negativo e anti-HBs positivo, marcadores estes últimos compatíveis com vacinação anti-VHB, pelo que foram excluídas da análise final.

Deste modo, restaram 438 a que corresponderam os quatro grupos de infectados por VIH que incluímos na análise final do estudo. Assim, ao grupo A correspondem 123 dos indivíduos (anti-HBc e anti-HBs negativos), designados de não-ímmunes, ao grupo B 102 (anti-HBc e anti-HBs positivos), designados de ímmunes e ao grupo C com anti-HBc positivo e anti-HBs negativo, designados de anti-HBc positivo isolado e com possível hepatite B oculta (figura 6).

Das 213 amostras, correspondentes à possível hepatite B oculta, foram excluídas seis delas, por má qualidade, restando, assim 207 em que foi determinada a carga vírica (ADN-VHB) para VHB, das quais 190 (91,8%) tinham ADN-VHB < 20 UI/mL e 17 (8,2%) com ADN-VHB \geq 20 UI/mL, que incluímos no grupo D, com o diagnóstico de hepatite B oculta (figuras 6 e 7).

Figura 6. Fluxograma dos resultados obtidos nos indivíduos seleccionados para o estudo da hepatite B oculta



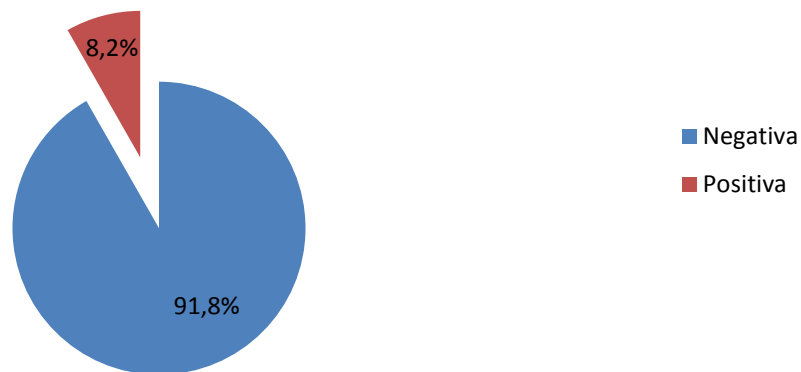


Figura 7. Representação gráfica da proporção de indivíduos com cargas víricas de VHB negativas e positivas nos 207 indivíduos AgHBs⁻, anti-HBs⁻ e anti-HBc total⁺.
 AgHBs⁻ – antígeno de superfície negativo; anti-HBs⁻, anticorpo contra antígeno de superfície negativo; anti-HBc total⁺ – anticorpo contra antígeno do *core* positivo.

As 17 amostras com carga vírica positiva, foram estratificadas em três grupos de acordo com a quantificação da sua carga vírica, um com carga vírica entre 20-100UI/mL correspondente a 64,7% (11/17), outro entre 101-1.000UI/mL (23,5%, 4/17) e o último >1.000UI/mL (11,8%, 2/17) (quadro 4).

Quadro 4. Estratificação das cargas víricas (ADN-VHB) em 17 infectados por VIH, com hepatite B oculta.

Carga vírica de VHB (UI/mL)	Número de amostras	%
20-100	11	64,7
101-1.000	4	23,5
>1.000	2	11,8

O quadro 5 descreve as características demográficas, clínicas e laboratoriais nos quatro grupos do estudo (A, B, C e D), respectivamente, o dos não-imunes (anti-HBs negativo e anti-HBc negativo), o dos imunes (anti-HBs positivo e anti-HBc positivo), o dos com anti-HBc isolado (anti-HBs negativo e anti-HBc positivo e ADN-VHB < 20UI/mL) e o dos com hepatite B oculta (anti-HBs negativo, anti-HBc positivo e ADN-VHB ≥ 20UI/mL).

No geral, foi identificada uma predominância de mulheres nos quatro grupos de estudo ($p=0,625$). A idade média encontrada foi de 32 anos (AIQ: 27-41), de 35 anos (AIQ: 39-42), de 34 anos (AIQ: 28-43) e de 31 anos (AIQ: 27-39), respectivamente, para os não-ímmunes, ímmunes, com anti-HBc isolado e com hepatite B oculta ($p=0,242$).

Os indivíduos com hepatite B oculta apresentaram a menor percentagem de consumo de álcool, 11,8% (2/17) comparativamente ao grupo dos não-ímmunes 37,4% (46/123), ímmunes 38,2% (39/102) e com anti-HBc isolado 36,8% (70/190) ($p=0,194$). Em relação ao tabaco, nenhum indivíduo do grupo com hepatite B oculta admitiu o seu consumo, tendo este sido reportado em 7,3% (9/123) dos participantes do grupo não-ímmune, em 8,8% (9/102) do grupo ímmune e em 11,1% (21/190) do grupo com anti-HBc isolado ($p=0,386$).

Em relação à infecção por VIH, verificou-se que o estágio clínico (OMS) foi semelhante nos quatro grupos, sendo o estágio menos prevalente o terminal (OMS IV) ($p=0,487$).

Os níveis séricos de ALT foram semelhantes nos quatro grupos, variando entre 21,4 e 24,7 (AIQ= 14,6–49,7) ($p=0,493$). A contagem total de leucócitos ($p=0,542$), linfócitos ($p=0,231$) e de linfócitos TCD4⁺ ($p=0,310$) foi, de igual modo, semelhante nos quatro grupos do estudo.

Quadro 5 – Características demográficas, clínicas e laboratoriais de 471 infectados por VIH, não-imunes por VHB (A), imunes (B), com anti-HBc⁺ isolado (C) e com hepatite B oculta (D)^a

	Grupo A Não-imunes (anti-HBc ⁻ e anti-HBs ⁻)	Grupo B Imunes (anti-HBc ⁺ e anti-HBs ⁺)	Grupo C Anti-HBc ⁺ isolado (anti-HBc ⁺ e anti-HBs ⁻ ADN-VHB<20UI/mL)	Grupo D Hepatite B oculta (anti-HBc ⁺ , anti-HBs ⁻ ADN-VHB≥20UI/mL)	<i>p-value</i>
Doentes (%)	123 (26,1)	102 (21,7)	190 (40,3)	17 (3,6)	
Mulheres (%)	89 (72,4)	64 (62,7)	129 (67,8)	13 (76,5)	0,625
Idade média (AIQ), anos	32 (27-41)	35 (29-42)	34 (28-43)	31 (27-39)	0,242
Consumo álcool (%)	46 (37,4)	39 (38,2)	70 (36,8)	2 (11,8)	0,194
Consumo tabaco (%)	9 (7,3)	9 (8,8)	21 (11,1)	0 (0,0)	0,386
Estádio de VIH (OMS) (%)					
I	57 (46,3)	37 (36,3)	94 (49,5)	6 (35,3)	
II	35 (28,5)	33 (32,4)	56 (29,5)	5 (29,4)	
III	30 (24,4)	29 (28,4)	37 (19,4)	5 (29,4)	0,487
IV	1 (0,8)	3 (2,9)	3 (1,5)	1 (5,9)	
ALT (UI/L)	21,8 (16,8-30,7)	21,4 (14,6-30,1)	21,7 (16,6-30,7)	24,7 (16,6-49,7)	0,493
Contagem leucócitos (10 ³ céls/mm ³) (AIQ)	4,7 (3,9-5,7)	4,5 (3,7-5,5)	4,8 (3,7-5,8)	4,3 (3,7-5,3)	0,542
Contagem linfócitos totais (10 ³ céls/mm ³) (AIQ)	2 (2 - 2)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)	0,231
Contagem de TCD4 ⁺ (céls/mm ³)	397 (220-538)	322 (204-477)	355 (203-509)	334 (86-543)	0,310

^a Da análise foram excluídas 33 amostras com marcadores de vacinação anti-VHB (anti-HBc negativo e anti-HBs positivo) e seis amostras para quantificação do ADN-VHB, por má qualidade.

AIQ – amplitude inter quartil; ALT – alanina-aminotransferase; anti-HBc⁻ – anticorpo contra o antígeno do *core* de vírus da hepatite B; anti-HBs⁻ – anticorpo contra o antígeno de superfície de vírus da hepatite B; OMS – Organização Mundial de Saúde; TCD4⁺ – linfócitos da linhagem CD4; UI/L – unidades internacionais por litro; VHB – vírus da hepatite B; VIH – vírus da imunodeficiência humana

9. Discussão

Este estudo foi o primeiro do género realizado em Moçambique, no qual foi demonstrada a frequência de hepatite B oculta em infectados por VIH. O significado clínico da hepatite B oculta identificada na Europa e nos Estados Unidos da América é controverso. Numa coorte de Filadélfia não se registou aumento significativo nas aminotransferases após controlo para exposição ao álcool é a hepatite C [47]. Numa coorte italiana foram encontradas complicações hepáticas, como aumento das aminotransferases nos infectados por VIH, com coinfeção por VHB. Nesta coorte registou-se aumento significativo da actividade necro-inflamatória (*flares*) do fígado durante o tratamento e após a descontinuação da LAM nos coinfectados por VHB, quando em comparação com os seropositivos para VIH, sem hepatite B oculta [48].

Se a hepatite B oculta, nos infectados por VIH, tiver impacto do ponto de vista clínico, a prevalência global da coinfeção VHB–VIH tem consequências significativas nos programas da TARV em regiões de recursos limitados, tal como é Moçambique.

A OMS recomenda para o tratamento da infecção por VHB mais do que um fármaco em combinação para a terapêutica da infecção por VIH [49]. Assim, a elevada prevalência da coinfeção por VHB (9,1%) e da hepatite B oculta (8,2%) deve ser tida em conta, em Moçambique, quanto da escolha do regime de TARV.

A LAM, um nucleosídeo inibidor da transcriptase reversa, é activa contra VIH e VHB. A LAM é um dos três ARVs utilizados, com frequência, na TARV em países de recursos limitados. Porém, enquanto a monoinfecção por VHB pode ser tratada com LAM, há referências a complicações quando utilizada na coinfeção VHB–VIH, como, por exemplo, a necro-inflamação quando se adiciona e/ou suspende a LAM, havendo citações, se bem que raras, a falência hepática [48, 50]. Uma outra consequência da utilização da LAM, como componente única da terapêutica da infecção por VHB, é o desenvolvimento de resistências. A incidência da resistência à LAM, nestas circunstâncias, é de, aproximadamente, 20% ao ano, sendo assim, no segundo ano de tratamento cerca de 40% dos doentes poderão desenvolver resistência. Estes dados

levaram a OMS a recomendar terapêutica com dois antivíricos com acção sobre VHB, usando TDF e LAM ou TDF e FTC [49].

Outro significado clínico de importância da hepatite B oculta em infectados por VIH, para além da terapêutica antivírica, é o impacto na gravidez. Em muitos países em que a prevalência da hepatite B é alta, não faz parte da avaliação da grávida o rastreio serológico da infecção por VHB, como é o caso de Moçambique. A transmissão perinatal da infecção por VHB é bem conhecida [51]. No entanto, desconhece-se o papel da hepatite B oculta na transmissão mãe-filho de VHB e de VIH e como tratar a infecção por VHB, na mulher grávida coinfectada por VIH.

A inexistência de significado estatístico na análise de regressão linear multivariada entre a carga vírica de VHB e o género, a contagem de linfócitos TCD4⁺ ou a idade pode ser devida, em parte, à dimensão reduzida da amostra e conseqüente falta de poder estatístico. Também, a carga vírica (ADN-VHB) foi, apenas determinada nas amostras com seropositividade isolada anti-HBc, como tem sido opção na generalidade dos estudos em infectados por VIH. Se toda a coorte tivesse sido testada para ADN-VHB, os resultados poderiam traduzir melhor a realidade da hepatite B oculta, em Moçambique.

Dada a prevalência elevada da coinfeção por VHB nesta população de infectados por VIH de Maputo, Moçambique, o tratamento com TDF e 3TC ou TDF e FTC não só melhora a segurança e a simplificação do tratamento para VIH, mas, também, trata eficazmente a infecção por VHB.

10. Conclusões

Este estudo confirma que os testes serológicos isoladamente não têm capacidade para identificar todas as coinfeções VHB-VIH e mostra que a hepatite B oculta não é rara em seropositivos para VIH, em Moçambique. Até agora, este é o primeiro estudo prospectivo da hepatite B oculta em seropositivos para VIH, em Moçambique. Nesta coorte, 9,1% (47/518) era AgHBs⁺ e classificados, tradicionalmente, como hepatite B crónica activa. Na mesma coorte, 45,2% (213/471) apresentava anti-HBc⁺ isolado e destes uma proporção significativa (8,2%, isto é 17/207) de infectados por VIH está coinfectada por VHB. A verdadeira taxa poderá ser mais elevada, dado tratar-se de uma estudo de corte transversal e os infectados cronicamente por VHB evoluem com intermitências de positividade do ADN-VHB. Tendo em consideração estes dados pode-se questionar se se justifica a determinação do ADN-VHB nos infectados por VIH, com risco elevado de coinfeção por VHB oculta (em regiões de prevalência elevada ou com serologia anti-HBc⁺) ou se o seu custo-efectividade está dependente do significado clínico da hepatite B oculta neste grupo de indivíduos – não existem dados definitivos sobre esta questão. Um estudo em África não demonstrou qualquer impacto negativo da coinfeção oculta na resposta à TARV. Dado que o risco de progressão da doença hepática é maior nos indivíduos com níveis de ADN-VHB > 2.000 UI/mL e no nosso estudo (e em muitos outros) os níveis médios estão bem abaixo deste limiar parece pouco provável que a maioria dos indivíduos com hepatite B oculta esteja em risco elevado de evoluírem para cirrose ou CHC. Todavia, é possível que aqueles com nível elevado de ADN-VHB, infectados em criança, estejam em risco de progredirem para cirrose e CHC, podendo beneficiar, por isso, de antivíricos activos contra VHB. Outro benefício potencial da identificação da hepatite B oculta, nesta população, é a da prevenção da transmissão de VHB (mãe-filho ou por contacto próximo) pela vacinação e evitando o 3TC em monoterapia (para VHB) na TARV com o risco de resistência de VHB a este antivírico. Mais estudos são necessários para quantificar o risco de evolução da doença hepática, hepatotoxicidade à TARV e o desenvolvimento de resistências na coinfeção

VIH-VHB oculta, assim como das razões de baixa sensibilidade para os testes de detecção do AgHBs, nesta população.

BIBLIOGRAFIA

1. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat.* 2004; 11 (2): 97-107.
2. Lai M, Liaw YF. Chronic hepatitis B: past, present, and future. *Clin Liver Dis.* 2010; 14(3): 531-46.
3. Tseng TC, Liu CJ, Yang HC. High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepatocellular carcinoma in patients with low HBV load. *Gastroenterology.* 2012; 142(5): 1140-9.
4. Júnior GM, Braga W, Oliveira C, Castilho M, Araújo J. Occult hepatitis B: prevalence and clinical characteristics in a population with high endemicity of hepatitis B infection in the western Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(6): 596-601.
5. Kourtis AP, Bulterys M, Hu D, Jamieson D. HIV-HBV coinfection: a global challenge. *N Engl J Med.* 2012; 366(19): 1749-52.
6. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine.* 2012; 30(12): 2212-9.
7. Burnett RJ, Francois G, Kew MC. Hepatitis B virus and human immunodeficiency virus co-infection in sub-Saharan Africa: a call for further investigation. *Liver Int.* 2005; 25(2): 201-13.
8. Weinbaum CM, Williams I, Mast E. Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection. *MMWR Recomm Rep.* 2008; 57(8): 1-20.
9. Hadler SC, Judson FN, O'Malley PM. Outcome of hepatitis B virus infection in homosexual men and its relation to prior human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 1991; 163(3): 454-9.
10. Lacombe K, Rockstroh J. HIV and viral hepatitis coinfections: advances and challenges. *Gut.* 2012; 61 (1): 47-58.
11. Jardim RN, Goncales NS, Pereira JS, Fais VC, Goncales FL. Occult hepatitis B virus infection in immunocompromised patients. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12(4): 300-5.
12. Gupta S, Singh S. Occult hepatitis B virus infection in ART-naive HIV-infected patients seen at a tertiary care centre in north India. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 53.
13. Hofer M, Joller-Jemelka HI, Grob PJ, Luthy R, Opravil M. Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. *Swiss HIV Cohort Study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17(1): 6-13.
14. Romero M, Madejón A, Rodríguez C. Clinical significance of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(12): 1549-52.
15. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2007; 46(1): 160-70.
16. Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat.* 2002; 9(4): 243-57.
17. Larrubia JR. Occult hepatitis B virus infection: a complex entity with relevant clinical implications. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(12): 1529-30.
18. Cunha L, Plouzeau C, Ingrand P. Use of replacement blood donors to study the epidemiology of major blood-borne viruses in the general population of Maputo, Mozambique. *J Med Virol.* 2007; 79(12): 1832-40.
19. Stokx J, Gillet P, De Weggheleire A. Seroprevalence of transfusion-transmissible infections and evaluation of the pre-donation screening performance at the Provincial Hospital of Tete, Mozambique. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 141.
20. Wiersma ST, McMahon B, Pawlotsky JM, Thio CL, Thursz M, Lim SG, et al. Treatment of chronic hepatitis B virus infection in resource-constrained settings: expert panel consensus. *Liver Int.* 2011; 31(6): 755-61.

21. European Association For The Study Of The Liver- EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2012; 57(1):167-85.
22. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 2004; 350(11): 1118-29.
23. Ponde RA, Cardoso DD, Ferro MO. The underlying mechanisms for the 'anti-HBc alone' serological profile. *Arch Virol.* 2010; 155(2): 149-58.
24. Papatheodoridis GV, Manolakopoulos S, Dusheiko G, Archimandritis A J. Therapeutic strategies in the management of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8(3): 167-78.
25. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W. Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J Med Virol.* 2000; 62(4): 450-5.
26. Barth RE, Huijgen Q, Taljaard, Hoepelman A. Hepatitis B/C and HIV in sub-Saharan Africa: an association between highly prevalent infectious diseases. A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2010; 14(12): 1024-31.
27. Thio CL. Hepatitis B in the human immunodeficiency virus-infected patient: epidemiology, natural history, and treatment. *Semin Liver Dis.* 2003; 23(2): 125-36.
28. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology.* 2009; 50(3): 661-2.
29. Thibault V, Graffin C, Colson P. Epidemiological, virological and clinical characteristics of HBV infection in 223 HIV co-infected patients: a French multi-centre collaborative study. *Virology.* 2013; 10: 87.
30. Shire NJ, Rouster SD, Rajcic N, Sherman KE. Occult hepatitis B in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004; 36(3): 869-75.
31. WHO. Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. 2015.
32. WHO. Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach. 2013.
33. Lewden C, Salmon D, Morlat P, Bevilacqua S, Jouglu E. Causes of death among human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults in the era of potent antiretroviral therapy: emerging role of hepatitis and cancers, persistent role of AIDS. *Int J Epidemiol.* 2005; 34(1): 121-30.
34. Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2007; 45(2): 277-85.
35. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2008; 49(4): 652-7.
36. Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology.* 2004; 127(5): 1356-71.
37. Vivekanandan P, Kannangai R, Ray SC, Thomas DL, Torbenson M. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of occult hepatitis B from liver tissue samples. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(8): 1227-36.
38. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini- Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology.* 2001; 34(1): 194-203.
39. Mason AL, Xu L, Guo L, Kuhns M, Perrilo RP. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. *Hepatology.* 1998; 27(6): 1736-42.
40. Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol.* 2005; 42(3): 302-8.

41. Blum HE, Galun E, Liang TJ, Von Weizsacker F, Wands JR. Naturally occurring missense mutation in the polymerase gene terminating hepatitis B virus replication. *J Virol.* 1991; 65(4): 1836-42.
42. Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology.* 2004; 127(5): S56-61.
43. Hoofnagle JH, Seeff LB, Bales ZB, Zimmerman HJ. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med.* 1978; 298(25): 1379-83.
44. Pollicino T, Saitta C. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014 (20): 5951-61.
45. Vitale F, Tramuto F, Orlando A. Can the serological status of anti-HBc alone be considered a sentinel marker for detection of occult HBV infection? *J Med Virol.* 2008; 80(4): 577-82.
46. Firnhaber C, Viana R, Reyneke A, Schultae D, Malope B, Maskew M, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with isolated core antibody and HIV co-infection in an urban clinic in Johannesburg, South Africa. *Int J Infect Dis.* 2009; 13(4): 488-92.
47. Lo Re V 3rd, Frank I, Gross R, Dockter J, Linnen JM, Grchetti C, et al. Prevalence, risk factors, and outcomes for occult hepatitis B virus infection among HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007; 44(3): 315-20.
48. Filippini P, Coppola N, Pisapia R, Scolastico C, Marrocco C, Zaccariello A, et al. Impact of occult hepatitis B virus infection in HIV patients naive for antiretroviral therapy. *AIDS.* 2006; 20(9): 1253-60.
49. WHO. Antiretroviral Therapy for HIV Infection in Adults and Adolescents: Recommendations for a Public Health Approach: 2010 Revision. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. 2010.
50. Drake A, Mijch A, Sasadeusz J. Immune reconstitution hepatitis in HIV and hepatitis B coinfection, despite lamivudine therapy as part of HAART. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(1): 129-32.
51. Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Int J Med Sci.* 2005; 2(1): 50-57.

Anexos

Anexo 1: Folha da informação e de consentimento informado.



**UNIVERSIDADE
DE LISBOA**

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



MINISTÉRIO DA SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE



HOSPITAL CENTRAL DE MAPUTO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

FOLHA DE INFORMAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Senhor(a),

O seu clínico oferece-lhe a oportunidade de participar num estudo. Antes de tomar a sua decisão é importante que leia com cuidado esta folha de informação de consentimento, que lhe dará o esclarecimento necessário sobre os vários aspectos do estudo.

Este estudo é resultante duma colaboração entre três instituições, nomeadamente: Instituto Nacional de Saúde (INS), Moçambique; Hospital Central de Maputo (HCM) e Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL), Portugal. O estudo foi aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) de Moçambique. Não hesite em colocar ao seu clínico qualquer questão que lhe ocorra.

Título do estudo

Frequência da hepatite B oculta em doentes infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH) 1/2, na área de Mavalane, Cidade de Maputo, Moçambique.

Objectivo do estudo

O estudo pretende determinar frequência da hepatite B oculta em doentes seropositivos para VIH, nas Unidades Sanitárias da área de Mavalane, Cidade de Maputo. Assim como pretende caracterizar os factores associados a esta doença, e a relação existente entre as diferentes fases da infecção por VIH com a infecção por hepatite B (VHB).

Porquê participar neste estudo

- Informação de base:
 - A hepatite B é muito comum em diversas regiões do Mundo, sendo a décima causa de morte. Este vírus é responsável por doença do fígado grave que pode levar ao cancro do fígado. Moçambique é considerado um País com elevadas taxas de frequência de VHB e de cancro do fígado.
 - A infecção por VIH é, igualmente, alta em Moçambique e em África. Estes doentes mais facilmente se infectam por VHB.
 - VIH acelera a progressão de VHB, para doenças graves e fatais e pode torná-lo indetectável pelos exames mais simples. O tratamento para VIH pode ter acção sobre VHB, por isso é necessário saber se VHB está presente em doentes com VIH.
 - Em Moçambique, ainda não se faz o despiste da hepatite B e não tem estudos sobre a frequência da infecção por VIH e VHB, nem da infecção oculta (não detectável).
- Com a sua participação, pretende-se mostrar que doentes com VIH tem, com muita frequência a infecção por VHB, e que têm maior possibilidade de não ser detectados pelos testes de rastreio. Se isto se verificar, no final, serão recomendadas alterações no esquema de tratamento antirretrovírico de VIH nesses doentes de modo a controlar melhor a infecção por VHB, evitando mortes por agravamento da doença do fígado.

Seleção dos participantes:

Um total de 515 doentes serão recrutados na Consulta de Doença Crónica dos Centros de Saúde da Polana Caniço e de Mavalane, na Cidade de Maputo.

- Para ser incluído no estudo terá de preencher os seguintes requisitos:
 - Idade ≥ 18 anos.
 - Infecção por VIH.
 - Sem terapêutica antirretrovírica prévia.
- Não serão incluídos aqueles que apresentem um dos seguintes critérios abaixo listados:
 - Gravidez.
 - Incapacidade de prestar consentimento informado.

Procedimentos do estudo

- Se concordar em participar, terá que responder a um questionário, de seguida submeter-se a um exame físico pelo clínico que o irá observar na consulta.
- Será colhida uma amostra de, aproximadamente, 12 mL de sangue, que será enviada ao Laboratório de Imunologia do INS em Maputo. Algumas amostras serão enviadas para Lisboa para se proceder o controlo de qualidade dos testes realizados em Moçambique.
- Com a amostra de sangue serão realizados um hemograma, testes bioquímicos (aminotransferases), testes serológicos de VHB (para detecção da presença da infecção activa, crónica ou oculta), testes imunológicos (linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺) e o ADN de VHB (carga vírica).

Todos os resultados do estudo serão discutidos consigo e serão arquivados no seu processo clínico.

Vantagens em participar no estudo

- Esta é uma oportunidade para o rastreio da infeção por VHB, diagnóstico precoce e seguimento na consulta médica ou de especialidade, caso indicado.
- Caso for identificada coinfeção VHB-VIH, o seu tratamento antirretrovírico poderá ser iniciado ou adaptado com os regimes terapêuticos mais adequados.
- Será proposta a vacinação contra a hepatite B aos doentes que não estejam protegidos contra o vírus.

Riscos associados à sua participação

Poderá apresentar algum desconforto ou dor ligeira no momento da colheita de sangue, e/ou alguns efeitos secundários como hematomas locais, que, geralmente, se resolvem por si. Este procedimento de colheita de sangue será feito por um técnico de saúde capacitado para a colheita de amostras.

Os seus direitos durante o ensaio e confidencialidade

- Os registos relativos à sua participação serão usados apenas para os efeitos deste estudo.
- O seu nome não será usado em formulários do estudo, rótulos de amostras laboratoriais ou em qualquer relatório resultante deste estudo. No início do estudo ser-lhe-á dado um número de identificação, que será usado em todos os formulários e amostras laboratoriais. Apenas membros do estudo e do Comité Nacional de Bioética para Saúde terão acesso a informação ligando o seu nome ao seu número do estudo. Os dados recolhidos serão tornados anónimos antes de introdução em qualquer computador.

- Poderá ter acesso à sua informação em qualquer altura, tendo o direito a rectificá-la ou opor-se a ela. Este direito pode ser exercido mediante o coordenador local do estudo ou do seu clínico, cujos nomes são mencionados abaixo. Após os pesquisadores analisarem os dados, os resultados e explicação das suas implicações serão apresentados na clínica para a informação de todos.

- A sua participação no estudo é completamente voluntária e não lhe trará custos adicionais. Todos os testes realizados no estudo serão gratuitos.

- Se recusar participar no estudo continuará a ser seguido no Centro de Saúde e a beneficiar do tratamento sem qualquer marginalização.

Quem pode contactar em caso de questões

Pode contactar qualquer pessoal do estudo se tiver questões sobre a pesquisa:

-Dra Awa Carimo, coordenadora do estudo (+258 82 403 0000), Departamento de Medicina, Hospital Central de Maputo.

- O seu clínico no local de estudo:

Sr/Sra Centro de Saúde Polana Caniço

Sr/Sra Centro de Saúde de Mavalane

- Ou o Comité Nacional Bioética de Moçambique, 2º andar, Ministério da Saúde, Telefone (+258) 21 430814 ou Fax (21) 426 547.

Declaração do participante:

Fui informado, verbalmente, e por escrito sobre este estudo e compreendo de que se trata. Sei também quem contactar se necessitar mais informação. Compreendo que a confidencialidade será mantida. Compreendo que sou livre de me recusar em participar no estudo sem que isto afecte os cuidados, normalmente, recebidos na clínica. Concordo participar neste estudo como voluntário.

Data/hora

__/__/20__ _____
__h:__m **Nome do doente** **Assinatura (impressão do polegar)**

Data/hora

__/__/20__ _____
__h:__m **Nome do acompanhante** **Assinatura (impressão do polegar)**

Declaração do investigador:

Eu, abaixo-assinado, defini e expliquei ao participante numa linguagem que ele compreendeu, os procedimentos do estudo, os seus objectivos e o risco e benefícios associados com a sua participação. Informei ao participante que a confidencialidade será mantida e que este é livre de se retirar do ensaio em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados que recebe no Centro de Saúde. Seguindo as minhas definições e explicações o participante concorda participar no estudo.

Data/hora

__/__/20__ _____
__h:__m **Nome do Investigador** **Assinatura**

Anexo 2: Formulário de recolha de dados e requisições laboratoriais



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE



HOSPITAL CENTRAL DE MAPUTO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

Frequência de hepatite B oculta em doentes infectados por vírus da imunodeficiência humana tipo 1/2,
na área de Mavalane, Cidade de Maputo, Moçambique

Investigador Principal:

Awa Carimo

Número de inclusão |__|_|_|_|_|_|

Formulário Sociodemográfico

Nº do Participante: |_|-|_|_|_|_|

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Iniciais do participante: ____ ____ ____

Unidade Sanitária: _____

Nº do Processo Clínico |_|_|_|_|_|_|

Data de nascimento (dd/mm/aa): |_|_|/|_|_|/19|_|_| Idade: |_|_|_| anos

Sexo: Masculino Feminino

Estado civil: Solteiro (a) Casado (a) Viúvo (a) Vive maritalmente Divorciado (a)

Profissão: _____ Trabalhador de saúde: Sim Não

Bairro: _____ Nº Casa _____

Morada(AV/Rua): _____ Quarteirão _____

Ponto de referência: _____

Nível de escolaridade: Analfabeto Primário Secundário Universitário

Telefone do participante: (+258)|_|_|-|_|_|_|_|_|_|_|_|, (+258)|_|_|-|_|_|_|_|_|_|_|_|

Nome da pessoa a contactar: _____

Telefone do participante: (+258)|_|_|-|_|_|_|_|_|_|_|_|, (+258)|_|_|-|_|_|_|_|_|_|_|_|

Nome do investigador _____

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

1.Nome do digitador _____

(iniciais)

2.Nome do digitador _____

(iniciais)

Formulário de Avaliação de Factores de Risco e Comorbilidades

Nº do Participante: |_|-|_|_|_|

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Factores de risco actuais	Sim	Não	Ano de início
Consumo álcool	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
Tabaco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
Consumo de drogas endovenosas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
Partilha de agulha/seringa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
Escarificações	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
Tatuagens/piercing	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
História de transfusão de sangue prévia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
História prévia de vacinação de hepatite B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
História familiar de hepatite B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
Parceiros ocasionais?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
Uso de preservativo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
Troca de sexo por dinheiro, bens ou serviços	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _
Relação sexual desprotegida nos últimos 6 meses com parceiro ocasional	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Relação sexual desprotegida entre últimos 6 - 12 meses com parceiro ocasional	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
No de parceiros sexuais actuais	Nenhum <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	>=1 <input type="checkbox"/>
Resultado de teste de VIH do parceiro	Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>	Desconhecido/Não testado <input type="checkbox"/>

Estado serológico e tratamentos feitos		
Alguma vez o teste de hepatite B	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Se sim qual foi o resultado	<input type="checkbox"/> Positivo	<input type="checkbox"/> Negativo
Se positivo fez algum tratamento	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Se sim qual e desde quando?	_____	_ _ - _ _ - _ _ _ _
Quando fez o teste de VIH	_ _ - _ _ - _ _ _ _	
Nessa altura apresentava alguma doença?	_____	

Co-morbidades	Sim	Não	Ano de início
Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _ _
IRC em diálise renal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _ _
Doença crónica conhecida			
Medicação habitual			
Outra: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_ _ _ _

Exame físico sumário		
Peso _____ kg	Altura _____	IMC _____
TA _____/_____ mmHg	FC _____ BPM	T ^a _____ °C
Icterícia	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Ascite	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Hepatomegália	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Esplenomegália	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não

2. BIOQUÍMICA

ALT : _____ U/L (5-40) AST : _____ U/L (5-40)

DATA DO PROCESSAMENTO ____/____/____ HORA ____:____

NOME DO ENFERMEIRO _____ ASSINATURA _____

COMENTÁRIOS _____

3. CD4 E CD8

CD4 _____ Células/ μ L (410-1590) **CD4 (%)** _____ % (27-57)

RACIO CD4/CD8 _____ (0.98-3.24)

CD8 _____ Células/ μ L (410-1590) **CD8 (%)** _____ % (14-34)

DATA DO PROCESSAMENTO ____/____/____ HORA ____:____

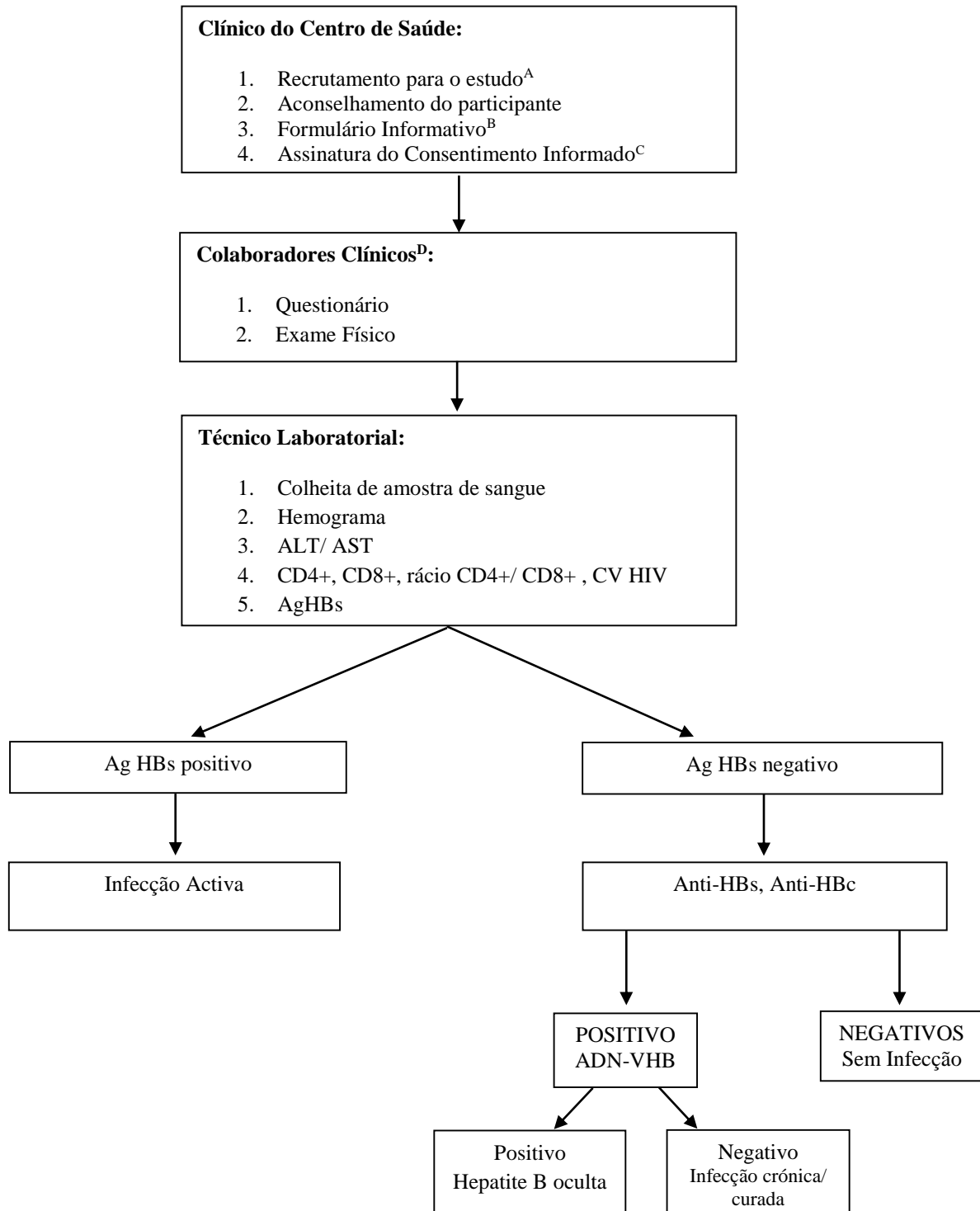
NOME DO TÉCNICO DE LABORATÓRIO _____ ASSINATURA _____

COMENTÁRIOS _____

Mod 2	INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA FREQUÊNCIA DE HEPATITE B OCULTA EM DOENTES INFECTADOS POR VÍRUS DA IMUNDEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1/2, NA ÁREA DE MAVALANE.	REQUISIÇÃO DE TESTES LABORATORIAIS CARGA VÍRICA DE VHB
----------------------------	--	---

Nome do Enfermeiro : _____ Assinatura do Enfermeiro _____ Data ___/___/___	
Nº de participante: __ _ _ _ _ _ _ _ _	Nº de processo clínico: __ _ _ _ _ _ _ _ _
Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	Idade _____ anos Iniciais do doente _ _ _ Hora de colheita _____:
CARGA VÍRICA DE VHB <input type="checkbox"/> .	
4. CARGA VÍRICA DE HBV	
_____ cópias/mL	
DATA DA CENTRIFUGAÇÃO ___/___/___ HORA _____:	
DATA DO PROCESSAMENTO ___/___/___ HORA _____:	
NOME DO T. DE LABORATÓRIO _____ ASSINATURA _____	
COMENTÁRIOS _____	

Anexo 3: Algoritmo de recolha de dados.



Anexo 4: Classificação clínica da infecção por VIH pela OMS.

Estágio 1

- Assintomático
- Linfadenopatia generalizada persistente (LGP)

Estágio 2

- Perda de peso < 10%
- Herpes Zoster < 5anos
- Lesão muco-cutânea menor
- Infecção do tracto respiratório alto recorrente

Estágio 3

- Acamado < 50% do
- Candidose oral
- Pneumonia bacteriana
- Tuberculose pulmonar (<1 ano)
- Febre persistente (> 1 mês)
- Perda de peso > 10%
- Leucoplasia pilosa oral
- Infecções bacterianas severas
- Diarreia crónica
- Outros: _____

Estágio 4 (Doença definidora de SIDA)

- Linfoma
- Sarcoma de Kaposi
- Candidose esofágica
- Criptosporidiose, crónico
- Acamado > 50% do dia
- Criptococos extra-pulmonar
- Herpes simplex disseminado (>1 mês)
- Sépsis por Salmonella (não-tifóide), recorrente
- Complexo *Mycobacterium Avium disseminado*
- Leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP)
- Toxoplasmose
- Wasting syndrome
- Demência associada VIH
- Tuberculose miliar/extra-pulmonar
- Citomegalovirus disseminado
- Pneumonia por *Pneumocystis carinii*
- Outros: _____

- A. O recrutamento foi feito pelos clínicos em serviço nos Centros de Saúde da área de Mavalane, dirigido aos doentes, que em seguimento na Consulta Externa da Doença Crónica, que foram aconselhados sobre VHB e convidados a participar no estudo.
- B. Os doentes receberão um folheto informativo sobre VHB, a importância do rastreio do mesmo e os detalhes da investigação.

- C. Todos os doentes que aceitarem participar no estudo tiveram que assinar um consentimento informado, que lhes foi fornecido, pelos clínicos, no momento do aconselhamento.

- D. Os colaboradores clínicos, são indivíduos capacitados sob ponto de vista clínico (os técnicos da clínica em questão, os colaboradores do projecto, biólogos) para realização do questionário e exame físico e/ou os investigadores.

- E. Para os doentes que aceitaram participar no estudo, foi colhida uma amostra de sangue de 12, dos quais 9 mL serão conservados num tubo com anticoagulante (K3EDTA) e os restantes 3 mL num tubo seco (sem anticoagulante). Essa amostra será utilizada para determinação do hemograma, da bioquímica (aminotransferases), da contagem de linfócitos TCD4⁺, da serologias e do ADN de VHB.

Anexo 5: Carta de Aprovação do CNB



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE IRB00002657

Exma Senhora
Dr^a Awa Abdul Carimo
HCM

Ref: 82/CNBS/12

Data 08 de Março de 2012

Assunto: *Aprovação do estudo "Prevalência de hepatite B oculta em doentes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1/2, na área de Mavalane, Cidade de Maputo, Moçambique."*

O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as correcções efectuadas no protocolo intitulado: "***Prevalência de hepatite B oculta em doentes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1/2, na área de Mavalane, Cidade de Maputo, Moçambique.***" Sobre o mesmo chegou a seguinte conclusão:

O CNBS não vê nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo pelo que, dá a sua devida aprovação.

Contudo recomenda que os investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo.

Faz notar que a aprovação ética não substitui a autorização administrativa.

Sem mais de momento as nossas cordiais saudações.



Dr. João Manuel de Carvalho Fumane

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

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

Anexo 6: Autorização da Direcção de Saúde da Cidade de Maputo



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
GOVERNO DA CIDADE DE MAPUTO
DIRECÇÃO DE SAÚDE DA CIDADE DE MAPUTO
GABINETE DO DIRECTOR

Exma Senhora
Dra. Awa Abdul Carimo

MAPUTO

N/Ref. 6914 VAES- /DSCM-GD/11

DATA: 17.11.2011

ASSUNTO: - Pedido de realização de estudo.

A Direcção de Saúde da Cidade de Maputo, endereça os seus melhores cumprimentos e, aproveita a ocasião para acusar a recepção da v/nota nº 10100.023.22/ INS de 16.11.2011, na qual solicitam autorização para realização de um estudo com o título "Prevalência de Hepatite B oculta em Doentes Infectados pelos Vírus da Imonodeficiência Humana Tipo 1/2" a ser realizado pela Dra. Awa AbdulCarimo, na área de Saúde de Mavalane.

Sobre a matéria, comunica-se que a Direcção de Saúde da Cidade de Maputo, é favorável a realização do estudo, devendo para tal submeter o pedido de autorização Administrativa à S.Excia o Ministro da Saúde e autorização ética ao Comité Nacional de Bioética para a Saúde.

Sem mais de momento, queira V.Excia aceitar as nossas calorosas saudações.


Dra. Páscua Zúlo Wate
(Médica Generalista Assistente, MIH)

PZW/fnm