



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Contributo para a caracterização molecular do vírus da hepatite B
(HBV) em circulação em duas províncias de Angola

MARIA RAQUEL MONTEIRO MARQUES

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE TROPICAL

Dezembro, 2023



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Contributo para a caracterização molecular do vírus da hepatite B (HBV)
em circulação em duas províncias de Angola

Autor: MARIA RAQUEL MONTEIRO MARQUES

Orientador: Prof. Doutor João Piedade

Coorientadora: Prof.^a Doutora Filomena M. Pereira

Coorientadora: Prof.^a Doutora Liliana Rodrigues

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Saúde Tropical.

Apoio financeiro das Forças Armadas Angolanas

DEDICATÓRIA

*Em memória aos meus entes queridos que sempre me incentivaram, meu estimado
companheiro de vida José Manuel Lima, Coronel, Médico das Forças Armadas Angolanas e
à minha preciosa mãe Maria Madalena A. M. Marques.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e graça recebida nesta jornada, que foi acompanhada de muitos desafios, porém orientados por excelentes pessoas, cheias de sabedoria e profissionalismo.

Meu eterno agradecimento às Forças Armadas Angolanas em particular ao Exmo. Sr. General Sachipengo Nunda, ao General Lúcio do Amaral, ao Doutor Aires Africano, ao Doutor Alberto Almeida, ao Doutor José M. Cunha, ao Dr. Vasco Sabino, ao Dr. Rui Pinto, ao Dr. Lúcio Lara, ao Dr. Antero Fernandes, ao Dr. Torquato, ao Dr. Jorge Mayer Faria e em especial ao Dr. Minji Sebastião, que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha estabilidade familiar e profissional.

Agradeço de coração aos meus irmãos Paulo e Constança, e aos familiares que estiveram sempre presentes bem como os amigos que a vida me deu Teresa Correia, Lourenço, Joaquim e Francisca Fortes. Ao Doutor Orlando da Mata e Victor Marques, pelo apoio e conforto. À Prof. Doutora Maria Madalena Chimpolo e aos colegas de Projetos da LABGENE - FMUAN.

À excelente equipa que me acompanhou, em particular, os Ex.^{mos} Orientadores, Prof. Doutor João Piedade e a Professora Doutora Filomena M. Pereira, de quem recebi desde o primeiro momento o seu apoio, e a quem agradeço a seleção do tema da dissertação e a oportunidade de realizar uma investigação clínica, ligada à área de Virologia Médica. À Prof.^a Doutora Liliana Rodrigues, pela amizade, acompanhamento e orientação técnica fundamental na Unidade de Microbiologia Médica do IHMT-NOVA.

À Doutora Dinamene Oliveira e à Dr.^a Lesya Yefimenko que, graças aos seus primeiros passos, disponibilidade incondicional e não só, foram fundamentais para concretizar esta ideia, sem esquecer o cuidadoso apoio da Prof.^a Doutora Rita Castro.

À equipa do Mestrado em Saúde Tropical, em especial à Prof.^a Doutora Rosa Teodósio, e à equipa do Mestrado de Parasitologia Médica, agradeço pelos ensinamentos transmitidos, visão a ter no campo clínico e laboratorial, em contexto de doenças tropicais, sem me esquecer dos estimados colegas dos mestrados desta experiência internacional.

O meu muito obrigada!

RESUMO

Introdução: Angola é um país da África subsaariana onde circula o vírus da hepatite B (HBV), um vírus de DNA hepatotrópico, carcinogénico e endémico na população, tendo esta uma situação vacinal anti-HBV desconhecida. **Objetivo:** Caracterizar o perfil molecular de um segmento da região de sobreposição dos genes S/P do HBV presente em amostras de plasma provenientes de utentes atendidos em duas Unidades de Saúde das cidades do Lubango e de Benguela. **Material e Métodos:** Seleccionaram-se 512 amostras de plasma com teste rápido (HBsAg+ e HBsAg-), previamente criopreservadas, das quais se tinha informação de natureza sociodemográfica e laboratorial disponível em bases de dados, sendo 456 provenientes de parturientes (Grupo 1) e 56 de doentes hospitalares (Grupo 2), de acordo com os locais de origem mencionados. Procedeu-se à extração de DNA viral com um *kit* comercial, seguindo-se a amplificação do DNA do HBV por *nested*-PCR para obtenção de um amplicão com 340 pb, aproximadamente. Após sequenciação direta unidirecional de Sanger validaram-se 103 cromatogramas que foram editados. As respetivas sequências foram alinhadas no programa informático BioEdit V.7.2.5. e a sua identidade confirmada através do programa <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. A tradução proteica das regiões codificantes da transcriptase reversa e do HBsAg foi realizada com o programa <https://hbv.geno2pheno.org/index.php> para análise das mutações. **Resultados:** No Grupo 1 obteve-se 12,3% (56/456) de casos de infeção pelo HBV, sendo 8,3% (38/456) identificados previamente com HBsAg+ e 4,3% (18/418) detetados com infeção oculta (HBsAg-/DNA-HBV+). A taxa global de amplificação de DNA do HBV foi de 11,2% (51/456), com 100% (51/51) das parturientes infetada pelo genótipo E, com subtipo *ayw4* (97,0%) e *ayw1* (3,0%). Cerca de 92,2% dos vírus (47/51) continha mutações pontuais (32/33 HBsAg+ vs 15/18 HBsAg-/DNA+). No Grupo 2, obtiveram-se 52/56 sequências HBV, 98,1% (51/52) de genótipo E e 1,9% (1/52) de genótipo A, subgenótipo 2, subtipo *adw2*. Entre os portadores do genótipo E, 100% (23/23) dos doentes com HBsAg+ tinham vírus do subtipo *ayw4*. Entre os casos de infeção oculta (28/28), 57,1% eram *ayw1*, 39,3% *ayw4* e 3,6% de subtipo indeterminado. Mutações pontuais ocorreram em 100% das sequências do Grupo 2. Mutações de provável resistência ao tratamento com análogos nucleosídeos/nucleotídeos foram detetadas no Grupo 1 em três portadoras HBsAg+ com variantes de resistência putativa à Lamivudina (rtT128N; rtN139D e rtV207L). Nas portadoras HBsAg-/DNA+, detetou-se um caso com dupla resistência (primária_rtA194T/Tenofovir + putativa_rtV207L/Lamivudina). No Grupo 2 ocorreram quatro casos, um no genótipo A, resistente a Lamivudina + Adefovir (putativa_W153R), e três casos entre os doentes com HBsAg-/DNA+, um resistente ao Entecavir ou Adefovir (primária_rtI169L) e dois resistentes a Lamivudina (putativa_rtT128N). Variantes de escape (imunitário, diagnóstico e vacinal) surgiram no Grupo 1 (sP120T; sQ129H, sD144E) e no Grupo 2 (sP120T, sT126I; sQ129R; sG130R; sD144A; sD144E e sG145K). **Conclusão:** Esta pesquisa, realizada em zona de elevada endemicidade, reforça que o genótipo E predomina em Angola com dois subtipos virais (*ayw4* e *ayw1*). Variantes de resistência ao tratamento com antivirais e mutantes de escape também foram identificados nesta população que é virgem de tratamento, com situação vacinal anti-HBV pouco esclarecida.

Palavras-chave: vírus da hepatite B; Angola; DNA-HBV; genótipo E; mutações de resistência aos antivirais.

ABSTRACT

Introduction: Angola is a country in the sub-Saharan of Africa where the hepatitis B virus (HBV), a hepatotropic, carcinogenic and endemic DNA virus circulates in the population, with an unknown anti-HBV vaccination status. **Objective:** To characterize the molecular profile of a segment of the HBV S/P gene overlapping this region present in plasma samples from users treated in two Health Units in the cities of Lubango and Benguela. **Material and Methods:** 512 plasma samples were selected (HBsAg⁺ and HBsAg⁻), previously cryopreserved, sociodemographic and laboratory information was available in the databases, 456 coming from parturient women (Group 1) and 56 samples from patients hospitals (Group 2), according to the mentioned places of origin. Viral DNA was extracted using a commercial kit, followed by amplification of HBV DNA by nested-PCR to obtain an amplicon measuring approximately 340 bp. After direct unidirectional Sanger sequencing, 103 chromatograms were validated and edited. The respective sequences were aligned using the BioEdit V.7.2.5 software program. and your identity confirmed through the program <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Protein translation of the coding regions for reverse transcriptase and HBsAg was performed using the program <https://hbv.geno2pheno.org/index.php> for mutation analysis. **Results:** In Group 1, 12.3% (56/456) of cases the HBV infection were found, as present with 8.3% (38/456) previously identified with HBsAg⁺ and 4.3% (18/418) detected with occult infection (HBsAg⁻/DNA-HBV⁺). The overall rate of HBV DNA amplification was 11.2% (51/456), with 100% (51/51) of parturients infected by genotype E, with subtype *ayw4* (97.0%) and *ayw1* (3, 0%). About 92.2% of viruses (47/51) contained point mutations (32/33 HBsAg⁺ vs 15/18 HBsAg⁻/DNA⁺). In Group 2, 52/56 HBV sequences was present 98.1% (51/52) of genotype E and 1.9% (1/52) of genotype A, subgenotype 2, subtype *adw2*. Among genotype E carriers, 100% (23/23) of patients with HBsAg⁺ had viruses of the *ayw4* subtype. Among cases of occult infection (28/28), 57.1% were *ayw1*, 39.3% *ayw4* and 3.6% of undetermined subtype. Point mutations occurred in 100% of the sequences in Group 2. Mutations of probable resistance to treatment with nucleoside/nucleotide analogues were detected in Group 1 in three HBsAg⁺ carriers with putative resistance variants to Lamivudine (rtT128N; rtN139D and rtV207L). In HBsAg⁻/DNA⁺ carriers, one case with double resistance was detected (primary_rtA194T/Tenofovir + putative_rtV207L/Lamivudine). In Group 2 there were four cases, one in genotype A, resistant to Lamivudine + Adefovir (putative_W153R), and three cases among patients with HBsAg⁻/DNA⁺, one resistant to Entecavir or Adefovir (primary_rtI169L) and two resistant to Lamivudine (putative_rtT128N). Escape variants (immune, diagnostic and vaccine) emerged in Group 1 (sP120T; sQ129H, sD144E) and in Group 2 (sP120T, sT126I; sQ129R; sG130R; sD144A; sD144E and sG145K). **Conclusion:** This research, carried out in a high endemicity area, reinforces that genotype E predominates in these regions of Angola, with two viral subtypes (*ayw4* and *ayw1*). Variants resistant to treatment with antivirals and escape mutants were also identified in this untreated population, with an unclear anti-HBV vaccination status.

Keywords: hepatitis B virus; Angola; HBV-DNA; genotype E; antiviral resistance mutations.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HISTÓRIA.....	1
1.2. CARATERIZAÇÃO GERAL E TAXONOMIA	2
1.2.1. ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL	3
1.2.2. GENOMA E GRELHAS DE LEITURA ABERTA	4
1.2.2.1. <i>GENE S</i>	5
1.2.2.2. <i>GENE P</i>	8
1.2.2.3. <i>GENE C</i>	9
1.2.2.4. <i>GENE X</i>	9
1.2.3. TROPISMO CELULAR	10
1.2.3.1. <i>CICLO INFECCIOSO E REPLICAÇÃO VIRAL</i>	10
1.2.4. INFEÇÃO E PATOGÊNESE.....	12
1.2.5. ASPETOS CLÍNICOS E MARCADORES SEROLÓGICOS.....	12
1.2.5.1. <i>INFEÇÃO AGUDA</i>	12
1.2.5.2. <i>INFEÇÃO CRÔNICA</i>	13
1.2.5.3. <i>INFEÇÃO OCULTA</i>	16
1.2.5.4. <i>CARCINOMA HEPATOCELULAR</i>	17
1.2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	18
1.2.6.1. <i>DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO</i>	18
1.2.6.2. <i>DIAGNÓSTICO MOLECULAR</i>	19
1.2.7. TRATAMENTO.....	20
1.2.8. EPIDEMIOLOGIA GERAL	21
1.2.8.1. <i>PREVALÊNCIA GLOBAL E TRANSMISSÃO</i>	23
1.2.8.2. <i>REGIÃO AFRICANA</i>	25
1.2.8.3. <i>INFEÇÃO OCULTA</i>	26
1.2.8.4. <i>CARCINOMA HEPATOCELULAR</i>	27
1.2.9. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	28
1.2.9.1. <i>SERÓTIPOS E SUBTIPOS</i>	28
1.2.9.2. <i>GENÓTIPOS</i>	28

1.2.9.2.1. DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL	29
1.3. IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS VARIANTES E DOS GENÓTIPOS	32
1.3.1. MUTAÇÕES	34
1.3.1.1. GENE S	34
1.3.1.2. GENE P	36
1.3.1.3. GENE C	38
1.3.1.4. GENE X	38
1.4. OBJETIVOS	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. TIPO DE ESTUDO, LOCAL E POPULAÇÃO EM ESTUDO	40
2.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	40
2.1.2. CARATERIZAÇÃO SOCIAL E DEMOGRÁFICA	41
2.1.3. CARATERIZAÇÃO DO PERFIL LABORATORIAL	41
2.1.4. CARATERIZAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR	41
2.1.4.1. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	41
2.1.4.2. NESTED-PCR	42
2.1.4.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	44
2.1.4.4. SEQUENCIAÇÃO NUCLEOTÍDICA	45
2.2. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA.....	45
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
2.4. CRITÉRIOS ÉTICOS.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	47
3.2. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR NESTED-PCR.....	47
3.3. CARATERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA E LABORATORIAL	50
3.4. CARATERIZAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR.....	56
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura 1. Modelo demonstrativo com os constituintes do vírus da hepatite B. A partícula de Dane (HBV) e as partículas subvirais. Fonte: Tsukuda & Watashi, 2020.	4
Figura 2. Modelo do genoma do vírus da hepatite B. Ao centro, as setas coloridas representam os quatro genes (S, P, C e X) do HBV com as coordenadas de início e término da região nucleotídica e o local de restrição EcoR1. DR1 e DR2, são locas de repetições diretas que funcionam como iniciadores ou <i>primers</i> . M, 5M e 3E representam os componentes reguladores, importantes para manter a cadeia parcialmente fechada. Fonte: Magnius et al., 2020.....	5
Figura 3. Eletroforese em gel com os dupletos proteicos do HBsAg e micrografias eletrônicas de contraste negativo com partículas do HBV. Ao centro os viriões, à direita as partículas subvirais. Fonte: Magnius et al., 2020.	6
Figura 4. Modelo de representação do genoma do HBV, RNAs e proteínas sintetizadas por cada ORF codificante (C, P, S e X). Ao centro os RNAs sintetizados pela transcrição do cccDNA e respectivas proteínas transcritas. Fonte: Tsukuda & Watashi, 2020.	7
Figura 5. Modelos da proteína do invólucro HBsAg. (A) A proteína L-HBs contém os domínios Pré-S1, Pré-S2 e S. Na porção Pré-S1 ocorre o processo de miristoilação. A proteína M-HBs contém domínios Pré-S2 e S, e a proteína S-HBs contém apenas o domínio S. (B) Demonstração da projeção das porções proteicas do HBsAg pela bicamada lipídica, onde se localizam os quatro domínios transmembranares (I-IV) presentes na proteína S-HBs. O determinante “a” local onde atuam os anticorpos neutralizantes. Fonte: Inoue et al., 2021.	7
Figura 6. Modelo da região hidrofílica principal do HBsAg. Alças ou locais onde atuam os anticorpos neutralizantes (determinante “a”) na variante selvagem do HBV. Pontos 1 e 2 contém as alças estabelecidas por pontes de dissulfeto entre os resíduos de aminoácidos 24 a 137 e 139 a 147. Fonte: Pondé, 2019.	9
Figura 7. Modelo do ciclo replicativo do HBV. Processo de entrada no hepatócito onde ocorre a formação de todos os componentes virais necessários para a formação de partículas completas e subvirais. Fonte: Tsukuda & Watashi, 2020.	11
Figura 8. Evolução natural da infecção pelo HBV e suas principais complicações. Fonte: https://www.drakeillafreitas.com.br/wp-content/uploads/2017/10/hepatite-B-1.jpg	12
Figura 9. Relação entre o tempo (dias) e o aparecimento dos principais marcadores (moleculares, serológicos e sintomáticos) observados em doentes com infecção aguda pelo HBV. Fonte: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5708a1.htm	13
Figura 10. Relação clínica entre a detecção dos principais marcadores moleculares e serológicos distribuídos pelo tempo, inicialmente em semanas de infecção crônica e posteriormente ao longo dos anos. Fonte: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5708a1.htm	14
Figura 11. Relação entre os marcadores serológicos, a carga viral e as cinco fases da doença crônica. Fonte: https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/hepatitis-b-portuguese-2015.pdf	15

Figura 12. Representação esquemática para identificar o grupo de portadores de IOB, pela presença ou ausência de anticorpos (anti-HBs e anti-HBc) ao longo do tempo. Fonte: Raimondo et al., 2019.....	16
Figura 13. Interpretação dos resultados serológicos durante a infecção pelo HBV. Pesquisa de antígenos (HBsAg e HBeAg) e anticorpos (anti-HBc, anti-HBe e anti-HBs). Fonte: https://www.biomedicinapadiao.com.br/2013/11/marcadores-serologicos-da-hepatite-b.html...	18
Figura 14. Relatório Global do Progresso de Avaliação da Situação Mundial do HIV Hepatites Vírais e ISTs (2016 – 2021). Fonte: https://reliefweb.int/report/world/global-progress-report-hiv-viral-hepatitis-and-sexually-transmitted-infections-2021	23
Figura 15. Algoritmo de dedução dos serótipos e subtipos a partir dos códons (122 e 160) presentes na estrutura primária da proteína S-HBs da região hidrofílica principal. Fonte: Yano, 2015.	28
Figura 16. Distribuição global e regional dos genótipos do HBV. Fonte: Kocher et al, 2021.....	30
Figura 17. Estruturas de sobreposição do gene S/P do HBV. Em cima correspondência entre as estruturas do HBsAg e em baixo o domínio da polimerase e subdomínios da transcriptase reversa. Fonte: Yano, 2015.....	35
Figura 18. Mapa de localização das duas unidades de saúde de Angola. Fonte: site www.google.pt/maps/	Erro! Marcador não definido.
Figura 19. Visualização dos resultados da <i>nested</i> -PCR. À esquerda, imagem de gel de agarose captada em aparelho foto documentador UV. À direita, marcador molecular - Ladder V, que separa as bandas a cada 100 <i>pb</i> . Legenda - M (marcador molecular), CN (controlo negativo), amostras LGO positivas $\cong$ 340 <i>pb</i> (123 e 338) amostras negativas (410 , 448 e 60).....	48
Figura 20. Distribuição do nível de escolaridade das mulheres em trabalho de parto infetadas com variantes do HBV, atendidas na MIN, Lubango.	52
Figura 21. Distribuição do nível de escolaridade dos doentes infetados com variantes do HBV, atendidos no HGB, Benguela.....	55
Figura 22. Subtipos virais identificados entre as sequências com genótipo E do HBV circulante em mulheres em trabalho de parto, atendidas na MIN, Lubango. Erro! Marcador não definido.	
Figura 23. Genótipos identificados entre as sequências do HBV circulantes nos doentes atendidos no HGB, Benguela.	58
Figura 24. Subtipos identificados entre as sequências com genótipo E do HBV circulantes nos doentes atendidos no HGB, Benguela.	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos <i>primers</i> utilizados em cada etapa da <i>nested</i> -PCR.....	43
Tabela 2. Etapa de preparação de soluções para a eletroforese	44
Tabela 3. Distribuição do perfil de amplificação das amostras de plasma dos dois grupos em estudo pela técnica de <i>nester</i> -PCR.	48
Tabela 4. Distribuição do perfil de subtipos das sequências com genótipo E (n=102), estratificadas de acordo com o tipo de infecção (HBsAg+ vs. HBsAg-/DNA+) e origem geográfica.....	62
Tabela 5. Frequências das variantes do HBV detetadas entre os subgrupos de infecção com genótipo E	68
Tabela 6. Frequência de mutações detetadas, por subgrupo e por tipo de infecção, para as sequências com genótipo E.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

Anti-HBc - Anticorpo para o antígeno do “core” do vírus da hepatite B

Anti-HBe - Anticorpo para o antígeno “e” do vírus da hepatite B

Anti-HBs - Anticorpo para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B

BLA - Sequências nucleotídicas com origem em estirpes do HBV circulantes em Benguela

CHC - Carcinoma hepatocelular

GSHV - Vírus da hepatite do esquilo terrestre

HBC - Hepatite B crónica

HBcAg - Antígeno do “core” do vírus da hepatite B

HBeAg - Antígeno “e” do vírus da hepatite B

HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBV - Vírus da hepatite B

HCV - Vírus da hepatite C

HDV - Vírus da hepatite D (ou delta)

HGB - Hospital Geral de Benguela

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IHMT-NOVA - Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade NOVA de Lisboa

IOB - Infecção oculta pelo vírus da hepatite B

LGO - Sequências nucleotídicas com origem em estirpes do HBV circulantes no Lubango

MIN - Maternidade Irene Neto

MINSA - Ministério da Saúde de Angola

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF – Região ou grelha de leitura aberta

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pb - Par de bases

TDR - Teste de diagnóstico rápido

WHV - Vírus da hepatite da marmota

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRIA

Desde a Antiguidade que há relatos de doença semelhante à que é provocada pela infecção do vírus da hepatite B (HBV). Esta doença foi reportada por Hipócrates (300 a 400 a. C.) como uma doença em que pode ocorrer um surto prolongado de icterícia e inflamação do fígado. Esta observação foi igualmente descrita há mais de 5000 anos na China e há mais de 2500 anos na Babilónia. A mesma observação ocorreu em campanhas militares na América do Norte durante a Guerra Civil Americana (1861 e 1865), onde mais de 40 mil casos foram registados. Outros relatos foram descritos após vacinação, como o que ocorreu na campanha de vacinação contra a varíola em trabalhadores de um estaleiro em Bremen (1885, Alemanha) e na campanha de vacinação contra a febre-amarela que ocorreu em militares durante a II Guerra Mundial (1942). Porém, só durante o século XX é que se caracterizou os agentes etiológicos das hepatites virais (A, B, C, D, E e G) (Fonseca, 2010).

Baruch Blumberg, geneticista e Prémio Nobel da Medicina (1976), contribuiu de uma forma muito especial para a história do HBV, sendo que em 1965 observou que o soro de um aborígene australiano continha um antigénio reativo, semelhante ao antigénio que estava presente em soros de alguns indivíduos leucémicos e hemofílicos, submetidos a múltiplas transfusões de sangue, denominando-o por antigénio Austrália (AuAg) devido a sua origem geográfica (Blumberg & Alter, 1965; Hadziyannis, 2011). Mais tarde, observou que uma colaboradora do laboratório de pesquisa se infetara durante a manipulação de soro com AuAg, por ter desenvolvido sintomatologia sugestiva de doença hepática, altura em que se relacionou o AuAg à hepatite (Alter, 2003).

Com o progresso da ciência em 1968, Prince e colaboradores por meio de um ensaio de imunodifusão relacionaram o AuAg, a um marcador qualitativo de diagnóstico serológico (Prince, 1968). Posteriormente, em 1970, Dane e colaboradores observaram por microscopia eletrónica as partículas presentes nos soros reativos ao AuAg, descrevendo-as como partículas múltiplas de tamanho e formato distinto, revestidas por um invólucro lipídico semelhante ao encontrado em vírus (Dane; Cameron & Briggs, 1970; Alter, 2003).

Samuel Krugman et al. (1971) descreveram a prevenção da transmissão vertical do AuAg, desenvolvendo uma imunoglobulina sérica anti-HBV, que foi administrada no pós-

parto imediato a crianças nascidas de mães AuAg positivas, evidenciando que esta intervenção preveniu a transmissão da infecção a 70% das crianças (Krugman et al., 1971).

Le Bouvier (1971) e Brancoft (1972) e seus colaboradores por outro lado, contribuíram para a descrição de parte da variabilidade do AuAg. Identificaram dois pares de alelos determinantes presentes na região exclusiva do antígeno de superfície que é comum aos demais serótipos, designando-a por determinante “a”. Inicialmente, foi conhecido o par *d* e *y*, seguindo-se o par *w* e *r*, através de testes de imunodifusão (Norder; Couroucé & Magnus 1992; Bremer et al., 2009). Mais tarde, Kaplan et al. (1973) foram os responsáveis por descrever a atividade enzimática da DNA polimerase presente em partículas completas conhecidas por partículas de Dane (Kaplan et al., 1973).

O primeiro modelo de teste de diagnóstico rápido (TDR) para a detecção do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) surgiu em 1970. Porém, entre 1971 e 1977, continuaram a observar-se casos de hepatite entre recetores de unidades de sangue testadas como negativas para HBsAg, sendo estes casos reportados na época como casos associados a infecção oculta (Tabor et al., 1979; Said, 2011).

Com a melhoria dos métodos de investigação em 1979 foi possível sequenciar o genoma completo do HBV (Galibert et al., 1979). Krugman e colaboradores desenvolveram a primeira vacina anti-HBV preparada com vírus inativado (Krugman, 1982) sendo que em 1986, uma nova vacina anti-HBV foi desenvolvida a partir de cultura de leveduras e técnica de DNA-recombinante (Stevens et al., 1987).

Até 1990 continuaram a ocorrer casos de hepatite após transfusão de sangue infetado pelo HBV. Isto ocorria devido ao período de janela imunológica, que é o tempo necessário (5 a 56 dias) para a produção e a detecção no sangue de todos os antígenos secretados pelo HBV e respetivos anticorpos (Niederhauser et al., 2008; Said, 2011). Finalmente, só com testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos virais (DNA e RNA/HBV+) se diminui o risco de transmissão do HBV por esta via.

1.2. CARACTERIZAÇÃO GERAL E TAXONOMIA

A família *Hepadnaviridae* inclui vírus esféricos (ocasionalmente, pleomórficos), de simetria icosaédrica, com invólucro de pequena dimensão (42-50 nm) que apresentam um genoma de DNA, circular, de dupla cadeia nucleotídica, parcial, com tamanho aproximado

entre 3000 e 3400 pb, compreendendo três genes principais, C, P e S. A sua replicação envolve a participação de enzimas celulares e de uma DNA polimerase viral, com características de transcriptase reversa. A maioria dos vírus desta família têm particular afinidade para o tecido hepático (Nassal & Schaller, 1996).

Em termos taxonômicos existem cinco gêneros de vírus na família *Hepadnaviridae*: *Parahepadnavirus* e *Metahepadnavirus* para vírus que infetam peixes; *Herpetohepadnavirus* para os vírus que infetam répteis e anfíbios; *Avihepadnavirus*, que são vírus que infetam aves e *Orthohepadnavirus* aqueles que infetam alguns mamíferos (Magnus et al., 2020). Este último gênero inclui 12 espécies virais distintas onde se posiciona o HBV, responsável por infetar humanos (Nassal & Schaller, 1996; Schaefer, 2007; Wang et al., 2020). Estes gêneros divergem entre si, apresentam homologia parcial na sequência nucleotídica e organização genômica (Schaefer, 2007; Said, 2011). Filogeneticamente, os vírus mais próximos do HBV são os vírus que infetam marmotas (WHV) e esquilos terrestres (GSHV). Estes não representam risco para os humanos contrariamente, o HBV é que tem a capacidade de infetar alguns símios (Seeger & Mason, 2000).

O HBV é um vírus estável no ambiente, pode ser inativado pelo calor a 98 °C por 1 minuto ou a 68 °C durante 10 h. Transmite-se a partir de plasma humano seco conservado, se mantido em temperatura ambiente (25 °C), sendo que a probabilidade de contágio por meio do manuseio de fômites ou a utilização de equipamentos mal higienizados ou não desinfetados é altíssima. Nestas condições este vírus permanece estável por 7 a 14 dias (Favero et al., 1974; Bond et al., 1981).

1.2.1. ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL

Por microscopia eletrônica após purificação a partir do soro, podem observar-se 3 tipos de partículas virais. A partícula completa infecciosa é designada “partícula de Dane” e tem 42 nm de diâmetro. É uma estrutura esférica, complexa e compacta, constituída por um invólucro externo glicoproteico e uma nucleocápside (“core”) que envolve o genoma viral (Dane et al., 1970; Bruss et al., 1996). Observam-se também partículas incompletas “não-infecciosas” ou “subvirais”, morfologicamente distintas (esféricas vs filamentosas), com aproximadamente 22 a 30 nm de diâmetro. Estas partículas desprovidas de material genético apresentam-se em maior quantidade no soro (Dane et al., 1970; Bruss et al., 1996).

O invólucro é constituído por uma membrana fosfolipídica de origem celular (Figura 1), na qual se destacam três glicoproteínas que estão ligadas entre si, com diferentes tamanhos, designadas no seu conjunto HBsAg (Bruss et al., 1996; Blanchet & Sureau, 2006).

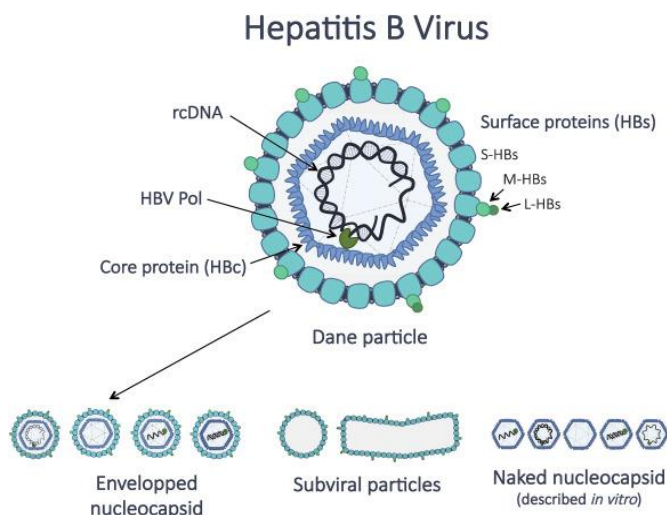


Figura 1. Modelo demonstrativo com os constituintes do vírus da hepatite B. A partícula de Dane (HBV) e as partículas subviraes. Fonte: Tsukuda & Watashi, 2020.

A nucleocápside tem simetria icosaédrica, mede 36 nm de diâmetro, apresenta-se constituída por proteínas do “core” designadas por antígeno central (HBcAg), que em conjunto encerra o genoma de DNA e cópias da DNA polimerase (Beck & Nassal, 2007).

1.2.2. GENOMA E GRELHAS DE LEITURA ABERTA

O genoma do HBV é composto por uma molécula de DNA de cadeia dupla parcial, circular, com cerca de 3200 pares de bases. A DNA polimerase viral encontra-se ligada covalentemente à extremidade 5' da cadeia negativa do genoma. Este genoma apresenta uma diversidade genética muito elevada entre as diversas estirpes do HBV, que se materializa na classificação em 10 genótipos (A – J), vários subgenótipos, alguns serótipos e subtipos (Lago et al., 2014; Arikan et al., 2019; Toyé et al., 2021).

O genoma integra quatro regiões de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORFs), correspondentes a quatro genes codificantes parcialmente sobrepostos: o gene do antígeno de superfície (ORF S), o gene da polimerase viral (ORF P), o gene da nucleocápside ou “core” viral (ORF C), que codifica também o HBeAg, e o gene X (ORF X), fundamentais para a expressão de sete proteínas virais antigénicas (Lago et al., 2014; Oluyinka et al., 2015; Arikan et al., 2019).

O genoma de DNA de cadeia dupla (Figura 2) apresenta uma cadeia mais curta, de polaridade positiva, com um tamanho compreendido entre 1700 e 2800 nucleótidos, e uma cadeia maior, de polaridade negativa, complementar ao RNA pré-genómico (RNAp_g), com cerca de 3020 a 3320 nucleótidos (Burda et al., 2001).

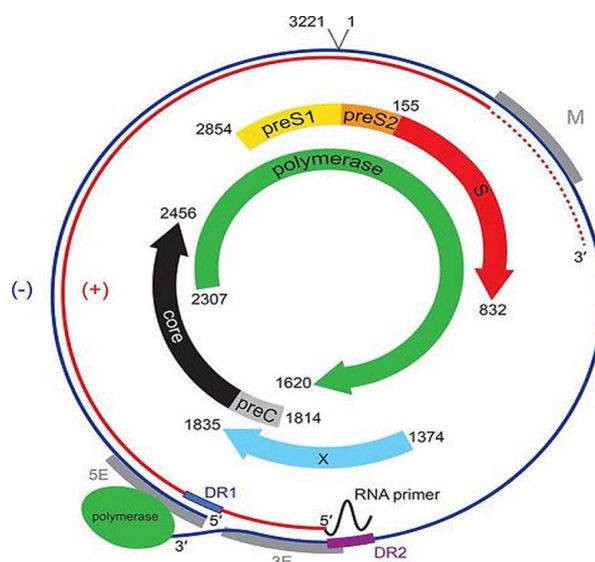


Figura 2. Modelo do genoma do vírus da hepatite B. Ao centro, as setas coloridas representam os quatro genes (S, P, C e X) do HBV com as coordenadas de início e término da região nucleotídica e o local de restrição EcoR1. DR1 e DR2, são locais de repetições diretas que funcionam como iniciadores ou *primers*. M, 5M e 3E representam os componentes reguladores, importantes para manter a cadeia parcialmente fechada. Fonte: Magnius, et al., 2020.

A cadeia menor pode apresentar até 2/3 do comprimento da cadeia maior. Ambas as cadeias apresentam do lado da extremidade 5' duas sequências repetidas de 11 nucleotídeos, que funcionam como iniciadores ou *primers*, denominados *Direct Repeats* (DR1 e DR2), que são fundamentais para o início da replicação viral (Burda et al., 2001; Magnius et al., 2020). O emparelhamento entre as bases nitrogenadas é responsável pela coesão da estrutura do genoma (Nassal & Schaller, 1996; Burda et al., 2001; Magnius et al., 2020). O genoma contém quatro promotores que regulam a síntese proteica através de vários intermediários de mRNA, genômicos e subgenômicos, transcritos pela RNA polimerase II celular (Magnius et al., 2020).

1.2.2.1. GENE S

O gene S codifica três proteínas (Figura 3) presentes no invólucro glicoproteico externo sendo, L-HBs, M-HBs e S-HBs, que estão interligadas entre si, compostas por

sequências aminoacídicas parcialmente sobreponíveis. Estas três formas glicoproteicas compõem o HBsAg, estão presentes em todas as partículas vírais e subvirais. As glicoproteínas, são integradas no invólucro lipídico a partir da membrana do retículo endoplasmático da célula hospedeira (Gutiérrez et al., 2004).

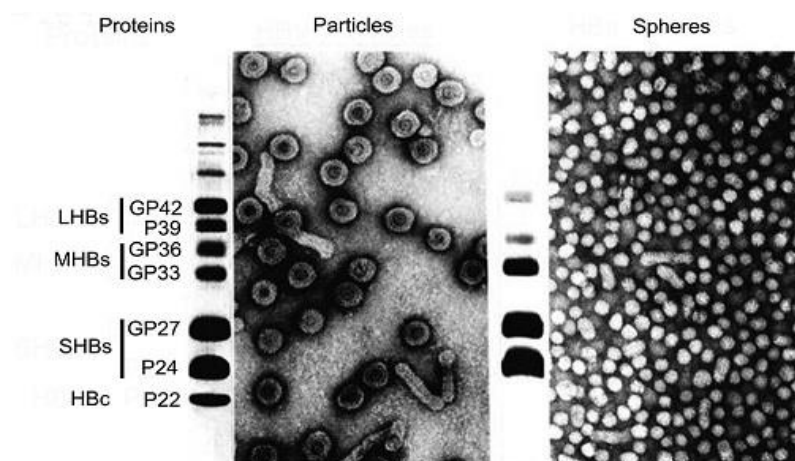


Figura 3. Eletroforese em gel com os dupletos proteicos do HBsAg e micrografias eletrônicas de contraste negativo com partículas do HBV. Ao centro os viriões, à direita as partículas subvirais. Fonte: Magnius, et al., 2020.

O HBsAg contém 400 aminoácidos (Figura 4) para a maioria dos genótipos e 389 aminoácidos para o genótipo D. A proteína L-HBs contém 3 domínios (Pré-S1, Pré-S2 e S), a proteína M-HBs possui 2 domínios (Pré-S2 e S) e a proteína menor ou mais pequena, mas mais abundante no invólucro (S-HBs) contém apenas o domínio S (Heermann et al., 1984; Inoue et al., 2021).

A proteína L-HBs apresenta no domínio Pré-S1 (N-terminal) duas conformações. Uma conformação encontra-se projetada para o exterior (lúmen), é responsável pelo tropismo e adesão aos recetores do hepatócito e a outra conformação, mais interna projetada para o lado citoplasmático é responsável por ativar processos intracelulares relacionados à morfogénese das partículas virais (Bruss et al., 1996; Gutiérrez et al., 2004). Esta proteína L-HBs, presente em todas as partículas do HBV, é produzida em maior quantidade para as partículas infecciosas, sendo que a mesma apresenta-se em menor quantidade entre as partículas subvirais (Inoue et al., 2021).

A proteína M-HBs resulta da tradução das regiões Pré-S2 e S e compreende 281 aminoácidos (Blanchet & Sureau, 2006; Tsukuda & Watashi, 2020).

A proteína S (S-HBs) resulta da tradução do gene S, que codifica 226 aminoácidos. É uma proteína sintetizada em grandes quantidades nos hepatócitos, a mais abundante no invólucro viral (Blanchet & Sureau, 2006; Inoue et al., 2021). Integra a região hidrofílica principal do HBsAg que contém a porção mais imunogénica (Tsukuda & Watashi, 2020; Inoue et al., 2021) deste antígeno, demonstrada na figura 5 e 6.

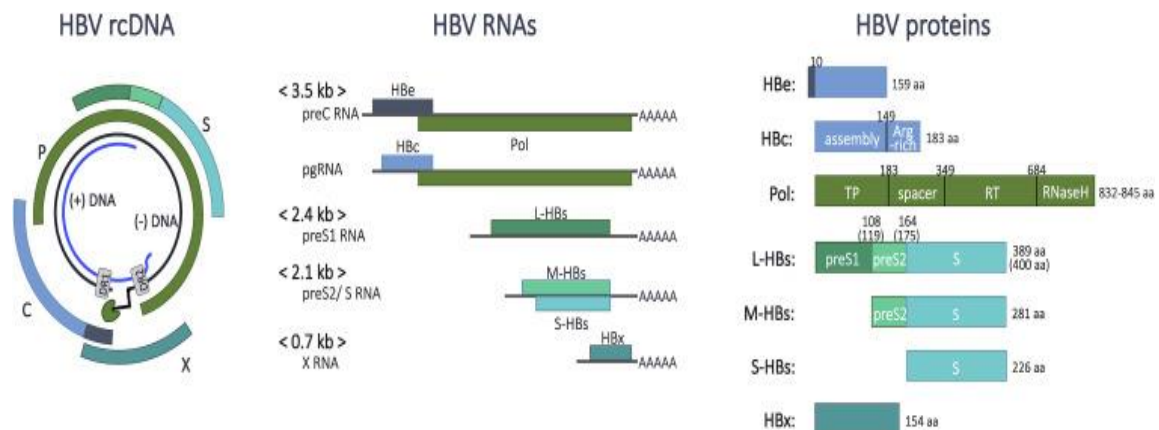


Figura 4. Modelo de representação do genoma do HBV, RNAs e proteínas sintetizadas por cada ORF codificante (C, P, S e X). Ao centro, os RNAs sintetizados pela transcrição do cccDNA e respectivas proteínas transcritas. Fonte: Tsukuda & Watashi, 2020.

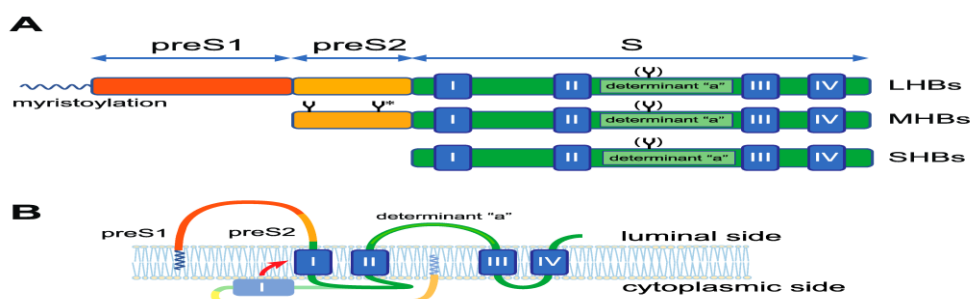


Figura 5. Modelos da proteína do invólucro HBsAg. (A) A proteína L-HBs contém os domínios Pré-S1, Pré-S2 e S. Na porção Pré-S1 ocorre o processo de miristoilação. A proteína M-HBs contém domínios Pré-S2 e S, e a proteína S-HBs contém apenas o domínio S. (B) Demonstração da projeção das porções proteicas do HBsAg pela bicamada lipídica, onde se localizam os quatro domínios transmembranares (I-IV) presentes na proteína S-HBs. O determinante "a" onde atuam os anticorpos neutralizantes. Fonte: Inoue et al., 2021.

O segmento N-terminal (Figura 6) é considerado fundamental para garantir a infeção/entrada do HBV no hepatócito. O ácido mirístico (Figura 5) encontra-se na porção hidrofóbica da bicamada lipídica do invólucro do HBV. Este, ativa-se em presença da enzima N-miristoiltransferase (NMT) durante a adsorção. Este processo de miristoilação envolve os

segmentos PreS1 e PréS2 alterando a sua conformação. Quando ativado, a porção PréS1 interage com a proteína L-HBs exposta para facilitar a entrada nos hepatócitos ligando-se assim, aos recetores de co transportador de sódio-taurocolato (NTCP) (Inoue et al., 2021).

A região hidrofílica principal delimita-se desde o codão 100 até 160. A zona imunodominante “a” (determinante “a”), está entre os codões 124 e 147, o local específico de atuação dos anticorpos neutralizantes anti-HBs (Moradi et al., 2012; Gencay et al., 2018; Pondé, 2019).

1.2.2.2. GENE P

O gene P apresenta a maior extensão nucleotídica, sobrepondo-se ainda que parcialmente, a todos os outros genes (Figura 2). Codifica a maior proteína estrutural (832 a 845 aminoácidos), tem atividade de uma DNA polimerase multifuncional com capacidade de utilização de matrizes de DNA ou RNA que se ativa durante a replicação do HBV (Nassal & Schaller, 1996; Tsukuda & Watashi, 2020).

A DNA polimerase (Figura 17) divide-se em quatro domínios um dos quais é inativo, ou tem função desconhecida, designado por região espaçadora (“spacer”). Os restantes domínios funcionais designam-se por domínio N-terminal ou da proteína terminal (TP)/primase, domínio da transcriptase reversa (rt-HBV) e domínio C-terminal ou da RNase H (Radziwill et al., 1990; Ngui et al., 1999; Stuyver et al., 2003).

O domínio N-terminal atua no início da síntese da cadeia de DNA de polaridade negativa (região de ligação à extremidade 5’ da cadeia de DNA), é responsável pelo início da replicação a partir do RNA pré-genómico viral (Ngui et al., 1999; Burda et al., 2001).

O domínio da transcriptase reversa (rt-HBV) é fundamental para a síntese de DNA genómico a partir da matriz de RNA pré-genómico encapsidado. Este domínio é constituído por sete subdomínios denominados de A a G. É uma região propensa ao desenvolvimento de mutações de resistência aos fármacos inibidores da função de transcriptase reversa (Radziwill et al., 1990; Yano, 2015).

O domínio C-terminal apresenta função de uma RNase H, intervém na degradação da matriz de RNA pré-genómico viral, à medida que a cadeia de DNA (-) é sintetizada, abrindo espaço para a síntese posterior da cadeia parcial de DNA complementar de polaridade

positiva. É também uma região fundamental para a encapsidação do complexo RNA pré-genômico/polimerase na nucleocápside (Chen et al., 1994; Ngui et al., 1999).

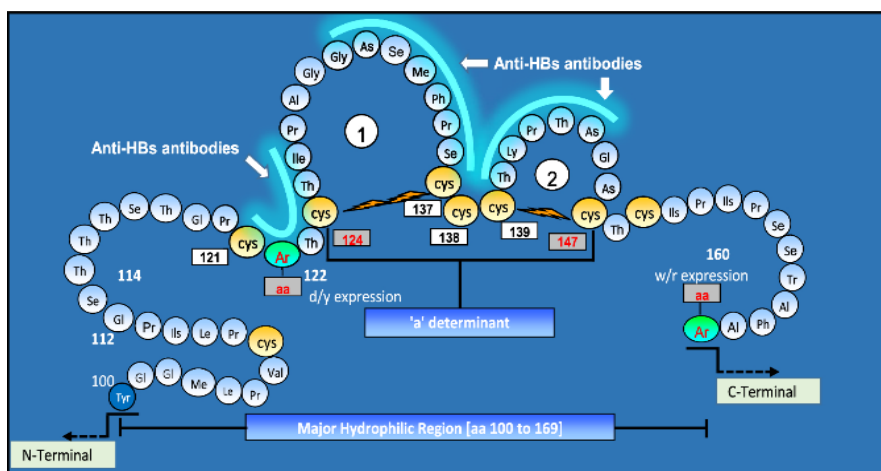


Figura 6. Modelo da região hidrofílica principal do HBsAg. Locais onde atuam os anticorpos neutralizantes (determinante “a”) na variante selvagem do HBV. Pontos 1 e 2 contêm as alças estabelecidas por pontes de dissulfeto entre os resíduos de aminoácidos 124 a 137 e 139 a 147. Fonte: Pondé, 2019.

1.2.2.3. GENE C

O gene C é responsável por codificar a proteína da nucleocápside ou “core” (o antígeno HBcAg) e o antígeno HBe (HBeAg) (Burda et al., 2001). As duas proteínas compartilham parte da respectiva sequência nucleotídica, mas exercem atividades distintas. O HBeAg é um antígeno não estrutural que é traduzido a partir do domínio Pré-C, está composto por 159 aminoácidos. Este antígeno pode ser detectado na circulação sanguínea acoplado a outras proteínas, sendo conhecido como um marcador de atividade replicativa e infecciosa (Ngui et al., 1999; Beck & Nassal, 2007). O HBcAg é um antígeno estrutural com 183 aminoácidos, que é responsável por organizar a nucleocápside espontaneamente na forma icosaédrica, encontrado no citoplasma dos hepatócitos, conhecido também como um indutor imunológico para a produção de anticorpos anti-HBc presentes no soro de pacientes infectados pelo HBV (Beck & Nassal, 2007).

1.2.2.4. GENE X

O gene X é o menor dos genes, composto por 456 nucleótidos responsáveis por codificar a proteína X (HBx) que apresenta 154 aminoácidos. Esta proteína multifuncional é responsável por estabilizar e induzir várias alterações no metabolismo da célula hospedeira por meio de interação com o DNA atuando em vários processos intracelulares. Possui dois

domínios, o C-terminal com função regulatória negativa e o N-terminal com função de reativação (Salarnia et al., 2017). Por ser considerada como uma proteína reguladora, participa em processos associados à transcrição viral, atua em vias de sinalização celular, degradação de proteínas e resposta celular ao stress (Nassal & Schaller, 1996; Seeger & Mason, 2000; Salarnia et al., 2017), além dos processos associados à inflamação que têm efeitos sobre a imunomodulação pela ativação conjunta de genes virais e genes do hospedeiro. Finalmente, a mesma participa na carcinogénese hepática bloqueando a reparação do DNA através da proteína p53 que está presente no citoplasma do hepatócito (Seeger & Mason, 2000).

1.2.3. TROPISMO CELULAR

O HBV infeta principalmente os hepatócitos que são as células responsáveis pela unidade estrutural e funcional do fígado, que representam 70% da estrutura hepática. Este vírus tem sido detetado em células das vias biliares, do pâncreas e do sistema linfático (Seeger & Mason, 2000; Pinho, 2005).

1.2.3.1. CICLO INFECIOSO E REPLICAÇÃO VIRAL

No hepatócito (Figura7) ocorre o processo replicativo onde este vírus produz em média 10^{11} cópias/dia (Schulze et al., 2007; Mokaya et al., 2021). O vírião expressa no seu invólucro, a proteína L-HBs com componentes codificados na região PréS1. Estes componentes servirão para a ligação ao recetor específico dos hepatócitos, denominado NTCP - polipéptido de cotransporte do taurocolato de sódio (Schulze et al., 2007; Inoue et al., 2021), que após uma interação inespecífica inicial com moléculas de proteoglicanos de sulfato de heparano por meio do qual ocorrerá a entrada do HBV no hepatócito, por meio do processo de endocitose e mediado por clatrina ou caveolina-1.

Finda a adsorção, os víriões penetram no hepatócito no interior de vesículas de endocitose e após fusão de membranas, dá-se a libertação no citoplasma da nucleocápside contendo o genoma viral. Este será transportado para o núcleo da célula e convertido em uma molécula de DNA circular covalentemente fechada (cccDNA), que servirá de matriz para a transcrição posterior de quatro mRNAs virais. Este mecanismo, ocorre devido à ação da DNA polimerase do hepatócito, o que permite indiretamente a persistência do HBV no hospedeiro (Seeger & Mason, 2000; Tsukuda & Watashi, 2020).

As estruturas terminais da cadeia de polaridade negativa e da cadeia de polaridade positiva são removidas do genoma viral para que o cccDNA se mantenha ligado e coeso. Posteriormente, por ação da enzima RNA polimerase II do hepatócito, o cccDNA é transcrito em vários mRNAs genômicos e pré-genômico (RNAppg). O mRNA de maior tamanho será usado como matriz para a síntese de novas cópias do genoma, depois de encapsidado, mas também para a tradução das proteínas da nucleocápside e da DNA polimerase, processo que começa por ocorrer primeiro. Os restantes mRNAs sofrem processamento adicional e assim, serão matrizes para a tradução das restantes proteínas virais (Bartenschlager & Schaller, 1992; Seeger & Mason, 2000).

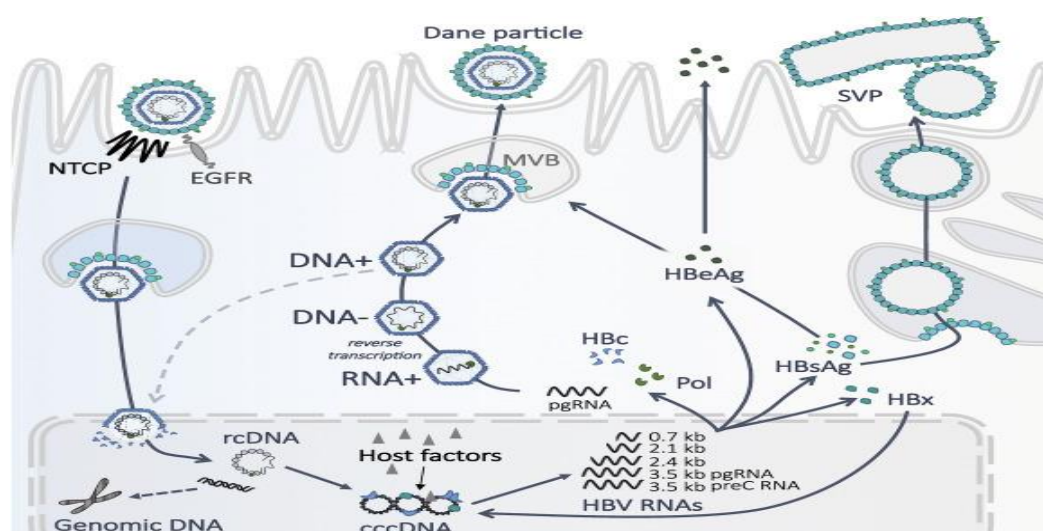


Figura 7. Modelo do ciclo replicativo do HBV. Processo de entrada no hepatócito onde ocorre a formação de todos os componentes necessários para a formação de partículas completas e subviraes. Fonte: Tsukuda & Watashi, 2020.

A síntese da cadeia dupla de DNA do genoma do HBV, inicia-se pela síntese da cadeia de polaridade negativa por meio da atividade de transcriptase reversa da DNA polimerase, a partir de um RNAppg encapsidado, que servirá como matriz. Simultaneamente, dá-se a degradação da matriz de RNA por ação do domínio de RNase H presente na polimerase viral, que ao terminar a polimerização da primeira cadeia dá início à síntese da cadeia de polaridade positiva. Quando completa a síntese da cadeia dupla parcial de DNA, inicia-se a morfogénese das novas partículas virais no retículo endoplasmático, em cuja membrana estão expostas as três glicoproteínas do futuro invólucro viral. As partículas formadas seguirão pelo complexo de Golgi até à periferia do hepatócito, local onde serão libertados os viriões recém produzidos (Bartenschlager & Schaller, 1992; Beck & Nassal, 2007; Tsukuda & Watashi, 2020).

1.2.4. INFEÇÃO E PATOGÊNESE

As variantes do HBV são responsáveis por desencadear no hospedeiro infectado respostas imunológicas lentas e persistentes ou exuberantes e assim, deste modo resultarão os principais desfechos clínicos (Figura 8) sendo conhecida a doença hepática aguda, crônica ou fulminante onde a inflamação e a necrose hepáticas, são os principais eventos responsáveis pelos desfechos clínicos: a cirrose, o CHC e a morte.

1.2.5. ASPETOS CLÍNICOS E MARCADORES SEROLÓGICOS

1.2.5.1. INFEÇÃO AGUDA

A infecção pelo HBV é distinta entre indivíduos com doença aguda, autolimitada ou fulminante, depende da interação entre a estirpe viral e o estado imunológico do portador, sendo estes responsáveis pelas principais manifestações clínicas (WHO, 2015). Durante a infecção aguda, o período de incubação pode variar (45 a 160 dias), geralmente 120 dias (Tran & Martin, 2004). A infecção aguda pode ser descrita em três fases:

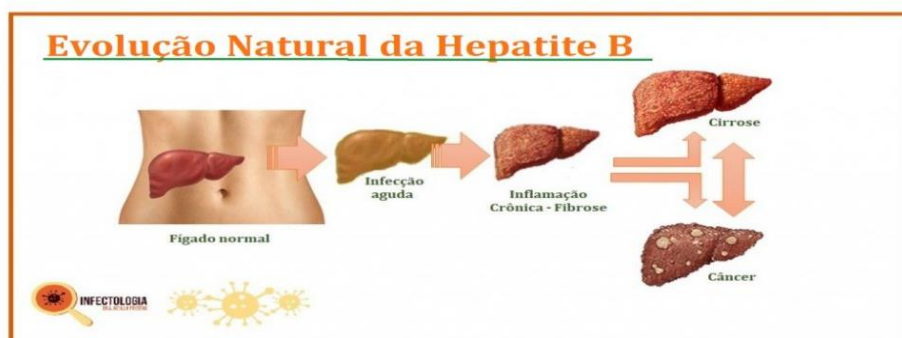


Figura 8. Evolução natural da infecção pelo HBV e suas principais complicações.

Fonte: <https://www.drakeillafreitas.com.br/wp-content/uploads/2017/10/hepatite-B-1.jpg>

I – Fase pré-ictérica ou prodrômica - Dura aproximadamente 3 a 10 dias, onde se pode observar astenia, fadiga, febre, anorexia, náuseas, vômitos, colúria, acolia fecal, dor abdominal, artralgia, exantema cutâneo e sintomas semelhantes a uma síndrome gripal.

II – Fase ictérica - Ocorre em 30% dos casos. Estes doentes podem ter durante 2 ou 3 dias colúria e acolia fecal, podendo prolongar-se até 10 dias. Segue-se posteriormente um período com melhoria relativa dos sintomas gastrointestinais. A hepatomegalia e a esplenomegalia podem estar presentes em 10 a 20% dos casos. A colestase hepática é resultante da obstrução da via biliar.

III – Fase de convalescença - É variável, pode prolonga-se por 2 a 12 semanas e depois evoluir para forma de doença crónica. Os sinais de evolução para gravidade são a febre prolongada, persistência de vômitos, sangramento, sonolência e/ou agitação psicomotora devido à encefalopatia hepática e assim o doente evoluir com torpor e coma, se não tratado adequadamente. Esta infecção pode resolver-se espontaneamente em pessoas saudáveis (Said, 2011). A idade em que ocorre a transmissão viral é um dos principais fatores relacionados a morbimortalidade (Tran & Martin, 2004) e a letalidade pode ocorrer em 1% dos infetados (WHO, 2015). Na fase aguda (Figura 9) o HBsAg é o primeiro marcador serológico a detetar-se na circulação e o DNA do HBV, o marcador molecular precoce.

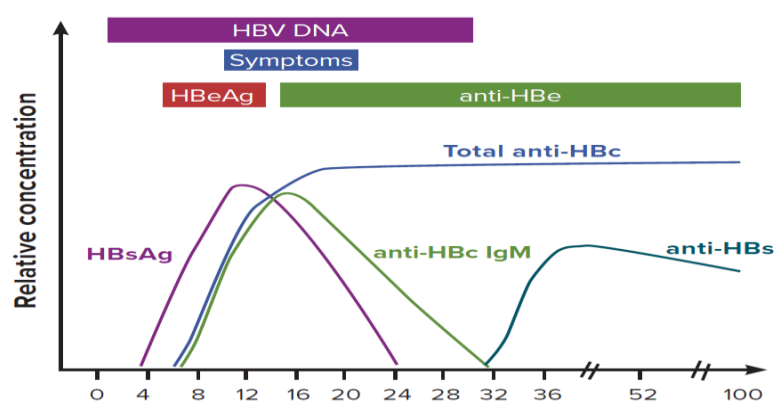


Figura 9. Relação entre o tempo (dias) o aparecimento dos principais marcadores (moleculares, serológicos e sintomáticos) observados nos doentes com infecção aguda pelo HBV. Fonte: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5708a1.htm>.

O sistema imunitário quando sensibilizado produz inicialmente anticorpos da classe IgM e depois anticorpos da classe IgG contra o antígeno da nucleocápside. Posteriormente, produz anticorpos anti-HBe e anti-HBs. Estes anticorpos são secretados no período de 3 meses sendo que indivíduos infetados ou que tiveram contato com o HBV e resolveram esta infecção permanecem com anticorpos anti-HBc e anti-HBs para toda a vida (Galbraith et al., 1975; Penna et al., 1996).

1.2.5.2. INFEÇÃO CRÓNICA

A infecção crónica caracteriza-se pela persistência do HBsAg por mais de 6 meses (Figura 10) após um episódio clínico de doença aguda que tenha sido evidente ou não. Ao longo da história natural da doença crónica podem ocorrer períodos sem deteção de carga viral do HBV (WHO, 2015).

A fibrose é responsável pelo desarranjo estrutural do fígado, principal manifestação clínica responsável pela lesão nodular e obstrução do sistema porta-hepático, a icterícia e outras complicações como varizes gástricas, hemorragia digestiva alta, alterações cutâneas, ascite, encefalopatia hepática, e peritonite bacteriana espontânea. A fibrose progressiva pode evoluir para a cirrose hepática no período de 5 anos. A cirrose, pode ocorrer em 8 a 20% dos doentes sem tratamento. Nestes doentes com cirrose e sem tratamento, 15 a 40% podem evoluir para descompensação hepática mais grave se coinfetados com outros vírus (HIV, HCV ou HDV) (WHO, 2015).

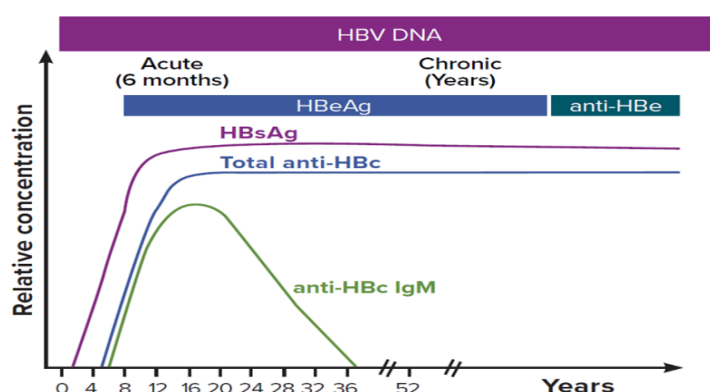


Figura 10. Relação clínica entre a detecção dos principais marcadores moleculares e serológicos distribuídos pelo tempo, inicialmente em semanas de infecção crônica e posteriormente ao longo dos anos. Fonte: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5708a1.htm>.

A infecção crônica resulta ainda da falta ou da fraca resposta imunológica das células T de defesa, que atuam contra os antígenos estruturais do HBV (Penna et al., 1996). Alguns portadores crônicos do HBV podem apresentar-se assintomáticos, podem apresentar alterações no padrão das enzimas hepáticas e até carga viral baixa ou mesmo indetetável (Ocana, 2011). Durante o percurso da infecção crônica podem observar-se cinco fases descritas na Figura 11. A OMS (WHO, 2015) fornece orientações para identificar as fases clínicas da HBC:

I - Fase imuno-tolerante - Apresenta alta taxa de replicação viral, pode ser observada em crianças durante a primeira infância e em adultos jovens, pode durar por 10 a 30 anos. Esta fase é característica do perfil de indivíduos HBeAg positivos com carga viral detetável >2000 UI/mL. A ALT pode estar persistentemente normal.

II - Fase imuno-reativa - Deteta-se o HBeAg associado a uma carga viral elevada com alteração das enzimas hepáticas. Os níveis de ALT e carga viral podem apresentar-se

flutuantes durante semanas ou anos. Estes doentes podem estar sintomáticos devido a lesão hepática que é decorrente da inflamação e da fibrose.

III - Fase inativa ou de controlo imunológico - Surge quando ocorre a conversão do HBeAg, acompanha-se de baixa carga viral <2000 UI/mL e as enzimas hepáticas (ALT) podem apresentar-se ligeiramente alteradas. Se a conversão do HBeAg⁺ para HBeAg⁻ ocorrer antes da lesão hepática estar instalada pode pensar-se em bom prognóstico quanto a evolução para a cirrose ou o carcinoma hépato celular CHC. Esta fase pode estar presente em indivíduos HBeAg negativos, com anticorpos anti-HBe positivos.

IV – Fase de escape imunológico - Está presente em indivíduos HBeAg negativos, que apresentam anticorpos anti-HBe positivos e a quantificação da carga viral nestes casos, é dependente da extensão lesão hepática.

V – Fase de reativação – Durante o ciclo infeccioso pode surgir a conversão espontânea dos anticorpos anti-HBs contra o HBsAg. Nesta fase pode haver reversão do HBeAg negativo para HBeAg positivo devido a reativação viral, por esta reativação ser decorrente de fatores mediados pelas células de defesa ou ocorrer por resistência medicamentosa.

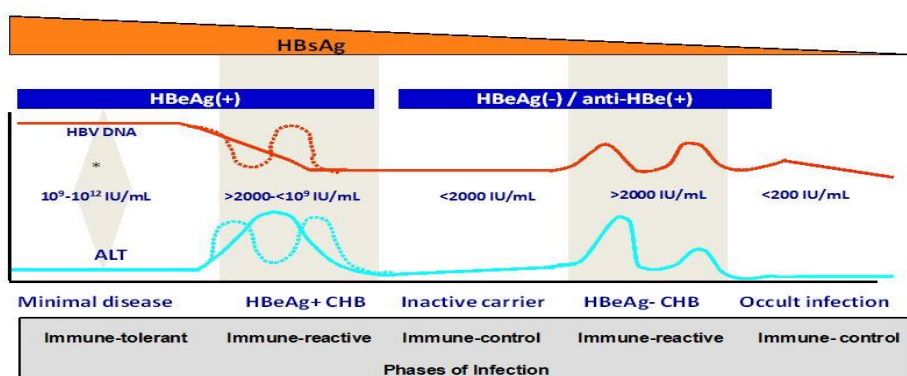


Figura 11. Relação entre os marcadores serológicos, a carga viral e as cinco fases da doença crónica. Fonte: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/hepatitis-b-portuguese-2015.pdf>

A fase com baixa replicação caracteriza o perfil de doentes HBeAg negativos com presença de anticorpos anti-HBe (Chu et al., 1985). Este perfil de doentes com hepatite B crónica, vem sendo detetado em todo mundo devido ao aumento da esperança de vida (WHO, 2015).

1.2.5.3. INFEÇÃO OCULTA

A hepatite B oculta foi alternativamente descrita como hepatite críptica (Pinho, 2005) ou ainda hepatite silenciosa (Makvandi, 2016) em grupo de doentes em risco com doença crónica. A infeção oculta B (IOB ou HBsAg-/DNA+) descrita há mais de 30 anos (Egboh & Davwar, 2023) caracteriza-se pela deteção de DNA viral em tecido hepático (cccDNA), que é a forma infecciosa, persistente integrada no núcleo dos hepatócitos, responsável por ativar a replicação e transcrição de genes do HBV, presente em indivíduos com um TDR HBsAg negativo. Pode ainda designar-se IOB, a deteção de ácidos nucleicos de HBV no sangue de indivíduos com TDR HBsAg negativo (Said, 2011; Oluyinka et al., 2015; Raimondo et al., 2019; Pollicino, 2022), ou ainda quando há evidência positiva ou negativa de produção de anticorpos contra ou anti-HBc (Makvandi, 2016; Egboh & Davwar, 2023). Em assintomáticos a virémia é geralmente baixa, <1000 cópias/mL ou 200 UI/mL (Said, 2011; Raimondo et al., 2019; Pollicino, 2022; Egboh & Davwar, 2023).

Devido a presença de mutações que se transmitem a região do HBsAg, as variantes S-HBs contribuem para a alteração da conformação proteica da estrutura proteína S-HBs, que contém os locais específicos de atuação dos anticorpos neutralizantes anti-HBs responsáveis pela resposta imunológica (Morales-Romero et al., 2014; Raimondo et al., 2014; Oluyinka et al., 2015). Estas alterações conformacionais podem reduzir também a afinidade dos anticorpos induzidos pela vacina anti-HBV, porque estas mutações alteram a hidrofiliidade, a carga elétrica, a acidez da alça hidrofílica e a estrutura da DNA polimerase (Di Stefano, et al., 2023).

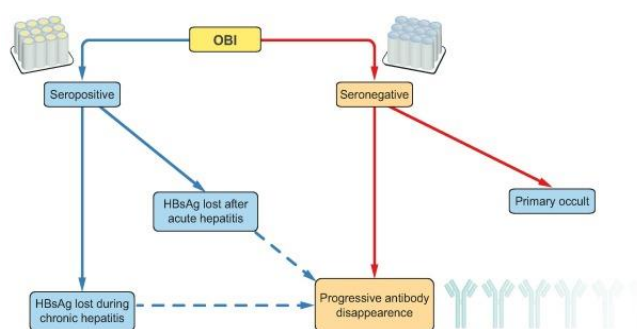


Figura 12. Representação esquemática para identificar o grupo de portadores de IOB, pela presença ou ausência de anticorpos (anti-HBs e anti-HBc) ao longo do tempo. Fonte: Raimondo et al., 2019.

Dois perfis de infeção oculta (Figura 12) podem caracterizar serologicamente os indivíduos seropositivos e os indivíduos seronegativos para o HBsAg (Ocana, 2011;

Raimondo et al., 2019; Egboh & Davwar, 2023). O grupo de indivíduos seropositivo apresenta um anticorpo ou o conjunto de anticorpos contra o HBV (anti-HBc e anti-HBs) que são produzidos após um quadro de hepatite aguda ou que permanecem após conversão do HBsAg positivo para HBsAg negativo. Quando o perfil do grupo é seropositivo para os dois anticorpos (anti-HBs e anti-HBc) a carga viral é geralmente instável. Apenas o grupo sem anticorpos anti-HBc e anti-HBs (seronegativo) apresenta frequentemente maior carga viral (Ocana, 2011; Rizzo, et al., 2023).

Em indivíduos imuno-comprometidos a IOB pode passar a forma crônica. Assim, estima-se que em crianças a taxa de IOB seja muito superior à taxa de IOB observada em adultos. A mesma variante oculta pode ser transmitida aos recetores biológicos de medula óssea, transplante hepático, rins ou outros tecidos infetados com DNA-HBV (Penna et al., 1996; Said, 2011), sendo que em doentes com imunossupressão a IOB pode desencadear modelos diferentes de reativação viral e agravar a doença hepática com uma fase de doença aguda que pode evoluir para insuficiência hepática (Raimondo et al., 2014).

1.2.5.4. CARCINOMA HEPATOCELULAR

A relação entre a infecção pelo HBV e o CHC foi estabelecida por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos onde sequências de DNA e mRNA virais, estavam presentes em indivíduos com IOB (Paterlini et al., 1990; Egboh & Davwar, 2023).

A hepatocarcinogénese ocorre devido a alterações no mecanismos de reparação do dano celular causadas pela inflamação e pelos mecanismos de stress oxidativo, devido à persistência do microcromossomo cccDNA nos hepatócitos (Tarocchi, 2014; Egboh & Davwar, 2023) descrito anteriormente. A proteína HBx e a proteína L-HBs (presente no invólucro das partículas virais e subvirais), também estão implicadas no desenvolvimento do CHC (Inoue et al., 2021; Tarocchi, 2014). A proteína HBx é conhecida como uma oncoproteína que funciona como um fator pró-oncogénico ativo (Liu et al., 2016; Inoue et al., 2021).

Os mecanismos para o desenvolvimento de CHC ligados à HBx vão desde a ativação, a inibição de algumas vias de sinalização celular, a fatores ligados à diminuição e à inibição da reparação do DNA do hospedeiro ou a mecanismos que induzem o surgimento de stress oxidativo celular e pode levar a indução da apoptose celular, a ativação de mecanismos de escape imunitário e outros mecanismos epigenéticos (Liu et al., 2016; Chen et al., 2017).

1.2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A pesquisa de marcadores bioquímicos relaciona-se com a análise da função hepática, os marcadores serológicos relacionam-se com a pesquisa de antígenos e anticorpos e os marcadores moleculares com a presença de DNA-HBV.

A OMS (WHO, 2015) recomenda a pesquisa da transaminase hepática ALT (para avaliação da lesão hepática), a carga viral (para estimar os níveis de partículas virais circulantes no sangue) e a pesquisa de alfa-fetoproteína em indivíduos com fibrose ou antecedentes familiares de CHC. Porém, o CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) recomenda para os Estados Unidos da América, a triagem tripla, ou seja, o HBsAg, anticorpos anti-HBs e anticorpos anti-HBc, a indivíduos com fatores de risco bem identificados (Connors et al, 2023).

1.2.6.1. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

O HBsAg e o HBeAg são antígenos que indicam infeciosidade. Estes marcadores antigénicos são fundamentais para os resultados serológicos (Figura 13) pois podem relacionar-se diretamente com as fases da infeção, a atividade replicativa (HBeAg+/-) e a secreção dos respetivos anticorpos (anti-HBs e anti-HBe).

Hepatite B: Interpretação dos resultados sorológicos						
Interpretação	HBsAg	HBeAg	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	Anti-HBe	Anti-HBs
Incubação	+	-	-	-	-	-
Fase aguda	+	+	+	+	-	-
Fase aguda final ou hepatite crónica	+	+	-	+	+	-
	+	-	-	+	+	-
	+	-	-	+	-	-
Início da fase convalescente	-	-	+	+	-	-
Imunidade, infecção passada recente	-	-	-	+	+	+
Imunidade, infecção passada	-	-	-	+	-	+ ou -
Imunidade, resposta vacinal	-	-	-	-	-	+

Figura 13. Interpretação dos resultados serológicos durante a infeção pelo HBV. Pesquisa de antígenos (HBsAg e HBeAg) e anticorpos (anti-HBc, anti-HBe e anti-HBs).
 Fonte: <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2013/11/marcadores-serologicos-da-hepatite-b.html>

O anticorpo anti-HBe é utilizado para monitorar a progressão da infeção crónica e com isto pode-se relacionar o efeito do tratamento antiviral. A presença de anticorpos anti-HBc, um marcador indicativo de contato com material do core viral (HBcAg), permanece positiva ao longo da vida. Em presença de anticorpo anti-HBc total com a imunoglobulina “M”

positiva (IgM+) representa doença aguda. Esta imunoglobulina desaparece quando ocorre a passagem para a infecção crónica, passando a detetar-se o anticorpo anti-HBc total associado a imunoglobulina “G” (IgG+). O resultado de deteção no soro de um único anticorpo positivo para o antígeno de superfície, o anti-HBs indica que o paciente adquiriu proteção contra o HBV por meio de vacinação anti-HBV (Connors et al, 2023).

1.2.6.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Realiza-se por meio de testes de amplificação de ácidos nucleicos como a PCR ou a *nested*-PCR, que são padrão ouro para deteção da IOB (Oluyinka et al., 2015; Raimondo et al., 2019). A PCR quantitativa ou em tempo real (qPCR) é utilizada para medir a carga viral (Ocana, 2011; Egboh & Davwar, 2023) e a monitorização da resistência a fármacos (Santantonio & Fasano, 2013). A qPCR apresenta um limite menor de deteção de ácidos nucleicos, quantifica a concentração de partículas virais contidas no soro, os resultados são obtidos em pouco tempo comparativamente à *nested*-PCR, que tem um limite de deteção de partículas virais < 5 UI/mL de DNA-HBV (Ocana, 2011) ou 2,5 cópias por reação de amplificação (Oluyinka et al., 2015).

Estes testes moleculares necessitam de pares de *primers* ou iniciadores para a síntese da cadeia de amplificação de ácidos nucleicos das regiões de interesse do genoma do HBV (S, P, C ou X). Na impossibilidade de pesquisar a totalidade dos genes recomendam no mínimo pesquisar dois genes. Os genes X e P são analisados para os casos de IOB e CHC (Ocana, 2011) e os demais genes (ex. S, P e C) são dependentes da função e objetivos da pesquisa. Assim, pode identificar-se mutações associadas à reativação (gene S), mutações relacionadas à resistência a fármacos anti-HBV (gene P) e mutações associadas a cirrose e ao CHC que são alterações observadas na região Pré-C/C (Patel et al., 2020).

De uma forma mais ampla as alterações presentes em variantes virais associadas à IOB, dependem de uma variedade de análises. Podem estar presentes em regiões regulatórias do HBV (ENH1, ENH2, Pré-S1, Pré-S2, Pré-C, Px, DR1 e DR2), resultarem da tradução das proteínas expressas no “core”, proteína X, proteína do gene da polimerase e transcriptase bem como estar presente entre as proteínas do HBsAg (Pré-S1 e Pré-S2, a proteína S) (Wang et al., 2022).

Com o diagnóstico molecular pode-se avaliar a relação custo-benefício da terapia antiviral, antes ou durante a seleção medicamentosa a administrar a um doente. Com isto,

pode-se concluir qual será a via mais adequada para cada doente, para prevenir por exemplo da falência terapêutica ou o desenvolvimento de resistência genotípica ao tratamento (Santantonio & Fasano, 2013; Bissinger et al., 2015).

1.2.7. TRATAMENTO

Existem várias abordagens clínicas para tratamento de doentes assintomáticos e sintomáticos. Este, deve obedecer a múltiplos critérios de seleção estabelecidos para países ou regiões com poucos ou mais recursos. Estas abordagens diferem parcialmente entre as Diretrizes recomendadas para Estados membros da OMS (OMS, 2016) ou das Diretrizes clínicas da Associação Europeia para o Estudo do fígado Lampertico et al., (2017). Atualmente, apenas 1% dos infetados com HBV recebe tratamento com antivirais. A OMS espera que até 2030 mais de 80% dos doentes crónicos estejam identificados para receber tratamento porque os tratamentos com os principais antivirais inibidores da transcriptase reversa suprimem a replicação viral ao longo do tempo (Burdette et al., 2023). Os análogos de nucleotídeos (Adefovir e Tenofovir) e o interferão alfa peguilado, são os fármacos mais indicados para o tratamento da doença crónica e em casos de terapia de resgate (Arikan et al., 2019; Roediger; Smyth & Dieterich, 2022; Burdette et al., 2023).

O tratamento com interferão apresenta limitações em populações com poucos recursos, por ser dispendioso. Além de ser um fármaco injetável, requer controlo durante o tratamento. Está contra-indicado a grávidas e crianças <1 ano de idade e pode promover efeitos colaterais (WHO, 2017).

O Adefovir dipivoxil é um pró-fármaco do Adefovir, um análogo da adenosina monofosfato recomendado para doentes com HBV, HIV e herpes vírus. Recomendado quando se observe resistência ao tratamento com Lamivudina, porque reduz eficazmente a carga viral e a inflamação hepática (Roediger; Smyth & Dieterich, 2022).

O Tenofovir, um fármaco análogo de adenosina monofosfato, principal medicamento recomendado pela OMS para tratamento de doentes com HBV e em coinfeção com HIV. Desde 2015, recomendam o início precoce do tratamento para diminuir a morbilidade entre os afetados (WHO, 2017). É recomendado igualmente pela Agência Europeia de Medicamentos (www.ema.europa.eu) sendo o Tenofovir disoproxil prescrito em casos de monoinfeção a doentes acima dos 12 anos de idade quando se observar resistência a Lamivudina, em tratamentos prolongados, desde que estes tenham doença hepática compensada, inflamação e

fibrose mínimas e aumento das transaminases. O Tenofovir alafenamida está recomendado a doentes sem cirrose. Deve ser prescrito durante 6 a 12 meses ou até altura em que ocorrer a conversão dos anticorpos (anti-HBe e anti-HBs) e reavaliados em até 2 anos após início do tratamento.

Os análogos de nucleosídeos (Lamivudina, Entecavir) são fármacos bem tolerados, administrados por via oral. Necessitam de cuidados de acompanhamento durante o tratamento devido ao aparecimento de estirpes resistentes altura em que torna-se necessário a terapia de resgate (Ghany & Doo, 2009) porque os análogos de nucleosídeos/nucleotídeos não atuam diretamente no cccDNA (Burdette et al., 2023). Estes fármacos inibidores competitivos da DNA polimerase podem perder a eficácia durante no tratamento prolongado o que predispõem ao surgimento de mutações compensatórias (Menéndez-Arias et al., 2014; Arikan et al., 2019) .

A Lamivudina, um fármaco análogo de citidina, potente inibidor da polimerase viral, está indicado para tratamento de doentes com infeção crónica por HBV/HIV. A sua administração apresenta benefícios na redução da atividade inflamatória, diminuição da carga viral, e dos níveis da ALT. Em monoterapia ou na forma combinada com outros antivirais, pode retardar o dano hepático e prevenir precocemente a resistência ao tratamento (Tchuem et al., 2020). As taxas de resistência a fármacos antivirais descrevem que em 5 anos de tratamento com Lamivudina (em monoterapia) a taxa de resistência a este fármaco calcula-se em 76%, e para o Adefovir calcula-se em 30% (Ghany & Doo, 2009).

A taxa de resistência ao Tenofovir ou Entecavir parece ser <1% num período de 2 anos (Ghany & Doo, 2009; Menéndez-Arias et al., 2014). Devido à existência de estirpes de HBV resistentes ao tratamento com os antivirais disponíveis faz-se necessário pesquisar novos alvos terapêuticos que inibam a replicação viral (Lindh et al., 2018; Pierra Rouviere; Dousson & Tavis, 2020; Tsukuda & Watashi, 2020; Burdette et al., 2023). Porém, a perda do HBsAg e a redução da carga viral a níveis indetetáveis não representa cura clínica devido a persistência do microcromossoma “cccDNA” nos hepatócitos (Lindh et al., 2018; Tsukuda & Watashi, 2020).

1.2.8. EPIDEMIOLOGIA GERAL

A Organização Mundial da Saúde propôs desde 2016, Diretrizes Globais de Saúde para a eliminação das hepatites virais, infeção pelo HIV e outras infeções sexualmente

transmissíveis (ISTs) até 2030, definindo estratégias (2016 – 2021) para melhorar a cobertura de saúde universal, revendo abordagens integradas para dar resposta a estas infeções por estas apresentarem fatores de risco e transmissão semelhantes e por colaborarem para o risco de múltiplas coinfeções (WHO 2021; Fofana et al., 2023).

Dados do Relatório Global do Progresso de Avaliação da Situação Mundial do HIV Hepatites Virais e ISTs para o período 2016 – 2021 (WHO, 2021), indicavam que muitas fragilidades e debilidades foram expostas devido à pandemia da COVID-19, o que interferiu diretamente na avaliação de todos os indicadores dos serviços de saúde. Assim, com a implementação das estratégias pretendem reduzir a incidência desta infeção a 90% de casos até 2030, sendo que estas estratégias globais foram atualizadas para o período 2022-2030 mantendo-se a visão e as metas comuns de controlar e eliminar o HBV e as outras epidemias até 2030.

O Relatório Global (WHO, 2021; Abbasfard et al., 2023; Mathew et al, 2023; Fofana et al., 2023) indicava que em 2019 (Figura 14) mais de dois mil milhões de pessoas no mundo permaneciam em contacto permanente com o HBV, 296 milhões eram portadores crónicos do vírus, que a cada ano uma média de 1,5 milhões de pessoas se infetava e que 820 mil pessoas morreram devido às suas principais complicações, a cirrose e o CHC.

Quanto à mortalidade, a meta estabelecida era de reduzir o número de mortes em 10% até 2020 e em 65% até 2030, por existirem meios seguros para a contenção desta infeção (a vacina, os antivirais e profilaxia preventiva), sendo que a profilaxia com a vacina anti-HBV garante uma proteção de 95% (Fofana et al., 2023).

À escala global em 2020, a região africana apresenta o maior número de casos de infeção pelo HBV (990 mil novas infeções e 80 mil mortes), seguindo-se a região do sudeste asiático (260 mil novas infeções e 180 mil mortes), a região oeste do Pacífico (140 mil novas infeções e 440 mil mortes) e depois a região oriental do Mediterrâneo (100 mil casos de novas infeções e 33 mil mortes). As regiões menos afetadas encontram-se na Europa (19 mil novas infeções, com 43 mil mortes, em 2020) e nas Américas (10 mil novas infeções, com uma mortalidade estimada em 15 mil casos) (WHO, 2021).

Este Relatório Global (WHO, 2021) informa que até 2019 a cobertura vacinal contra o HBV (administração de 3 doses de vacina anti-HBV) atingiu 85% da cobertura em relação

aos 90% pretendidos. A cobertura vacinal nos recém-nascidos atingiu apenas 43%, em vez dos 50% previstos anteriormente para o mesmo período.

Quanto ao conhecimento do diagnóstico de infecção crônica pelo HBV, apenas 30,4 milhões de pessoas o receberam e destas apenas 6,6 milhões recebeu tratamento adequado. A meta até 2030 é que 80% dos infetados estejam elegíveis para tratamento e que medidas de suporte, como atribuição de dispositivos seguros (agulhas e seringas) para usuários de drogas injetáveis e doações de sangue sejam fornecidos em 100% dos casos (WHO, 2021).

Dos 38 milhões de infetados com HIV em 2019, 2,7 milhões estavam coinfetados com HBV e cerca de 1,7 milhões de pessoas contraíram HIV. Em coinfetados (HIV/HBV) existe risco de desenvolver mais rapidamente as principais complicações (cirrose e CHC), que levam a piores resultados clínicos devido a ausência de tratamento (Phinius et al., Fofana et al., 2023).

A coinfeção, quando ocorre durante a gravidez duplica o risco de transmissão vertical de mãe para filho. Porém, pensava-se que a taxa de infecção pelo HIV estava a decair nos últimos 10 anos (WHO, 2021; Fofana et al., 2023). Segundo a UNAIDS (2023) dos cerca de 39 milhões de infetados com HIV, apenas 29,8 milhões recebem tratamento adequado.

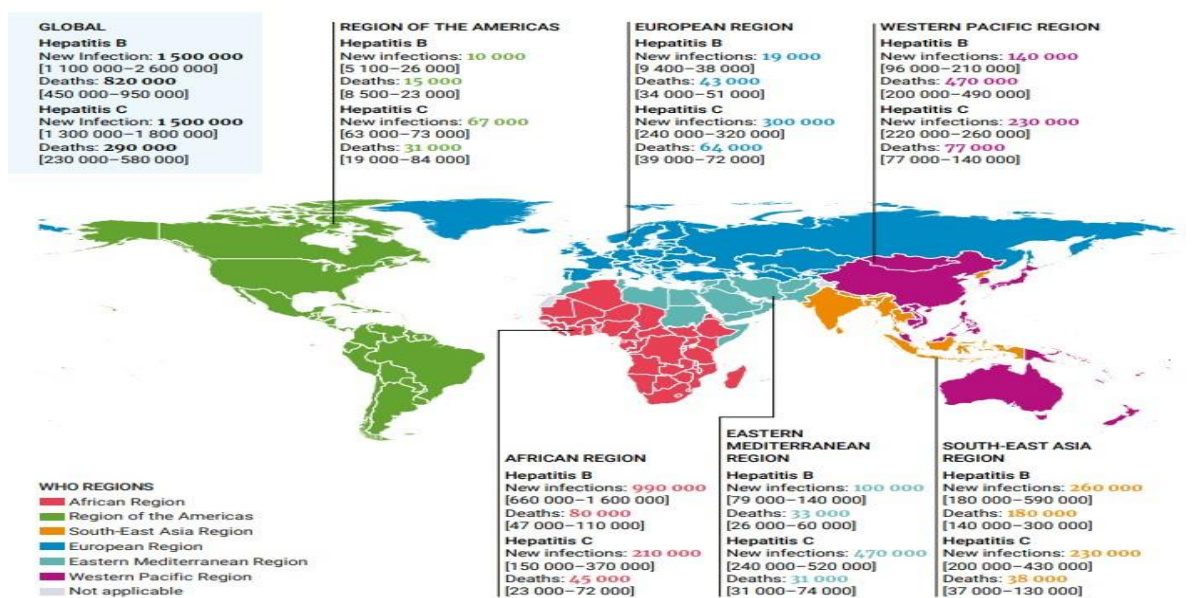


Figura 14. Relatório Global do Progresso de Avaliação da Situação Mundial do HIV Hepatites Vírais e ISTs (2016 – 2021). Fonte: <https://reliefweb.int/report/world/global-progress-report-hiv-viral-hepatitis-and-sexually-transmitted-infections-2021>

1.2.8.1. PREVALÊNCIA GLOBAL E TRANSMISSÃO

A prevalência de infecção é variável entre regiões geográficas e dentro de uma mesma região. Considera-se alta quando a taxa de detecção do HBsAg é no mínimo 8%, intermédia entre 2 e 7% e baixa quando inferior a 2%. A prevalência global do HBsAg varia (2% e <20%), sendo considerada baixa, em parte da América do Norte e da Europa Ocidental, onde a transmissão do HBV ocorre fundamentalmente na fase juvenil e início da vida adulta, por contato sexual e cutâneo. A prevalência foi considerada intermédia na região do Mediterrâneo e Europa Oriental (Nguyen et al., 2020).

A região africana apresenta a taxa de prevalência mais alta (8,8%), seguindo-se as regiões do sul do Pacífico (5,26%) (Nguyen et al., 2020; Schweitzer et al., 2015), onde a transmissão do HBV ocorre predominantemente ao nascer, por contato perinatal com o sangue e secreções maternas contaminadas. Nas etapas seguintes ao nascimento a transmissão ocorre de forma horizontal por contato intrafamiliar (Nguyen et al., 2020; Fofana et al., 2023).

Uma das principais metas do desenvolvimento sustentável do milénio inclui a redução da incidência global do HBV. Pretende-se reduzir para < 1% a prevalência do HBsAg em crianças menores de 5 anos por existir atualmente uma vacina eficaz que deve ser administrada preferencialmente ao nascer (WHO 2020; Guingané et al., 2022).

A transmissão deste vírus na população ocorre por contacto direto através de fluidos corporais infetados. Ocorre principalmente pelo sangue, secreção vaginal e menstrual, saliva e sémen. Pode ser transmitido por via sexual entre parceiros íntimos e durante o parto (transmissão vertical de mãe HBsAg positiva para o filho (Fofana et al., 2023). A transmissão vertical e horizontal é elevada no leste e sudeste da Ásia, onde há maior número de mães HBeAg positivas, sendo a altura onde 100% dos neonatos correm o risco de se infetar e 90% destes terão a probabilidade de desenvolver doença crónica, na ausência de cuidados profiláticos como a administração da vacina anti-HBV e da imunoglobulina humana anti-HBV nas primeiras 24 horas de vida. Este risco de transmissão pode decair para < 25% nos neonatos nascidos de mães HBeAg negativas, que apresentem anticorpos anti-HBc sendo que neste grupo de descendentes 10 a 15% pode evoluir para doença crónica. Quando a transmissão do HBV de mãe para filho ocorre nos primeiros 6 meses de vida, 90% destas crianças evoluem também para doença hepática crónica e se a transmissão do HBV ocorrer entre os 6 meses e os 5 anos de vida, o risco estima-se entre 20 e 60% (WHO, 2015).

Uma vez que a transmissão do HBV pode ocorrer por múltiplas formas como por transfusões de sangue e seus derivados, transplante de tecidos orgânicos contaminados, contato com utensílios perfurantes, agulhas e outros materiais de uso clínico ou pessoal não esterilizados corretamente. Porém, o risco de transmissão do HBV é conhecido por ser muito elevado entre profissionais de saúde, usuários de drogas injetáveis e em pessoas não vacinadas contra o HBV (WHO, 2015; Fofana et al., 2023).

1.2.8.2. REGIÃO AFRICANA

A África subsaariana representa a região do globo com a maior taxa de pessoas reativas ao HBsAg calculada entre 0,4 a 22,2% (Phinius et al., 2023) sendo que, em países desenvolvidos prevalência do HBsAg tem vindo a reduzir devido a campanhas regulares de vacinação e de prevenção na população (Kramvis et al., 2005b; Carimo et al., 2018). Em África, o risco de transmissão vertical do HBV de mãe para filho é igualmente elevado sendo que a transmissão horizontal é outra via de transmissão relacionada na primeira infância devido ao contacto próximo com outros portadores infetados por ser uma zona endémica (Fofana et al., 2023).

Atualmente, a prevalência de HBV na população da África subsaariana estima-se em 8% e a carga desta infeção na região da África ocidental estima-se em 5% em crianças dos 0 aos 16 anos. A prevalência calcula-se acima de 10% no Benim, 7% na Nigéria, 5% na Costa do Marfim e 1% no Togo para este grupo. Em crianças vacinadas a taxa de infeção estima-se em 2%, em crianças não vacinadas calcula-se em 6% o que reflete a necessidade continua de vacinar o maior número de crianças (Fofana et al., 2023).

A prevalência global de coinfeção HIV/HBV na África subsaariana entre 2011 e 2019 estimou-se em 3,2% e para a região da África Ocidental estimou-se em 5,1%. Observou-se que a mesma taxa decaiu comparativamente ao período de 2004 a 2010 que se situava em 6,3% (Kafeero et al., 2020). Mais recentemente observou-se que a prevalência de coinfeção com HIV calculou-se entre 3 e 9% entre crianças e jovens (Fofana et al., 2023).

Angola encontra-se na região da África subsaariana onde a prevalência do HBsAg pensa-se ser superior a 12,4%. Em países vizinhos a prevalência do HBsAg estima-se em 10,9% para a República do Congo, 5,9% para a República Democrática do Congo, em 8,6% para a Namíbia, em 6,1% para a Zâmbia e em 14,3% para o Zimbabué (Schweitzer et al., 2015). Alguns países africanos têm adotado a Estratégia de testar e tratar todos os casos

positivos identificados em zonas endêmicas para melhor controlar e prevenir a incidência e a transmissão do HBV (Egboh & Davwar, 2023; Fofana et al., 2023).

A vacinação contra o HBV é recomendada pela OMS desde 1992 (Fofana et al., 2023) porém introduzida em Angola em 2006. Tem sido administrada a grupos de risco e está disponível para crianças ao nascer, altura em devem receber a primeira dose. As demais doses devem ser administradas até aos 6 meses de idade. Porém, múltiplos fatores influenciam a cobertura vacinal que tem vindo a decaír desde 2011, tendo sido estimada uma cobertura vacinal de 64% em 2015 (Breakwell et al., 2017) e de 53% em 2019 (WHO, 2021).

Na província do Bié a prevalência de infeção em doadores de sangue estimou-se em 11%, em gestantes estimou-se em 9% entre 2005 e 2007 (Baião, 2008; Peliganga et al., 2021). O estudo PLACE (2017) foi realizado em profissionais do sexo de cinco províncias (Luanda, Benguela, Bié, Cabinda e Cunene). Este estudo concluiu que a carga de infeção pelo HBV era superior à taxa de infeção por HIV sendo que em mulheres trabalhadoras do sexo a taxa de infeção variou de 2 a 14%, em homens que fazem sexo com homens variou 10 a 23% e em indivíduos transgéneros calculou-se em 7%.

1.2.8.3. INFEÇÃO OCULTA

A infeção oculta pelo HBV (IOB) foi abordada em Taormina (Itália) em 2008 por um Colégio de Especialistas. Foi definida como infeção oculta a presença de DNA-HBV em amostras biológicas (sangue ou biopsia hepática) de indivíduos HBsAg negativo. A mesma, apresenta taxas de prevalência significativas em todo o mundo e está relacionada diretamente à endemicidade regional (Raimondo et al., 2014; Oluyinka et al., 2015; Egboh & Davwar, 2023). Taxas mais altas de IOB são observadas em zonas hiperendêmicas onde o risco de transmissão vertical e horizontal é elevado, agravado principalmente pelo contato permanente com portadores crónicos do HBV (Oluyinka et al., 2015). Nestes locais estima-se que 70 a 90% dos residentes já esteve em contacto com o HBV. Porém, em zonas de transmissão intermédia ou baixa, a taxa de IOB é inferior à observada em países ocidentais onde <5% da população está exposta ao HBV (Said, 2011).

Em África, a prevalência de IOB foi calculada em 17% (72/429) em doadores de sangue nigerianos, sendo esta taxa variável entre as regiões (9,0 e 39%) porque a prevalência de anticorpos anti-HBc na população está calculada acima dos 50% (Oluyinka et al., 2015). Recentemente estimaram-se prevalências de IOB de 14,8%, onde 7,4% dos casos eram

seronegativos e 20,0% seropositivos. Entre casos de IOB relacionados ao CHC cerca de 41,9% eram seropositivos e 33,1% seronegativos (Egboh & Davwar, 2023).

A prevalência de IOB pode ainda ser estimada entre 19% a 31% em produtos como sangue ou em biopsias de tecido hepático de doentes com HBC. A prevalência quando proveniente de tumores hepáticos primários pode ser calculada entre 30% a 60% dos casos relacionados ao HBV (Patel et al., 2020), porque esta infecção silenciosa resulta de estirpes virais que apresentam provavelmente mutações de escape, que são responsáveis por impedir a detecção do HBsAg pelos TDR e o reconhecimento dos anticorpos neutralizantes (anti-HBs) (Raimondo et al., 2014; Gencay et al., 2017).

A relação da IOB e as principais coinfeções virais indicam que em aproximadamente 15 a 30% dos indivíduos coinfectados com HCV, pode-se detetar DNA do HBV, bem como em 10 a 45% dos coinfectados com HIV, em 45% dos usuários de droga injetável, em 27% de pacientes em hemodialise, em 32% de doentes com cirrose criptogénica e, em 64% dos indivíduos que receberam transplantes segundo Raimondo et al. (2019).

1.2.8.4. CARCINOMA HEPATOCELULAR

Dentre os infetados com o HBV, 1 a 5% dos doentes crónicos pode evoluir para CHC, uma doença devastadora e letal, onde apenas 2% dos indivíduos com este diagnóstico consegue sobreviver até 5 anos (Golla et al., 2004; WHO, 2015). O CHC representa 70 a 90% da carga global de neoplasias primárias do fígado. Os principais agentes etiológicos para o seu desenvolvimento em todo mundo são o HBV e o HCV em 50 a 100% dos casos (Henry et al., 2002), sendo que na sua maioria (54,5%) são atribuídos à infecção pelo HBV (Liu et al., 2016) onde na região africana é o principal agente promotor do CHC (Lemoine & Thursz, 2017).

No leste asiático e África subsaariana a incidência de CHC é maior devido à maior prevalência da infecção pelo HBV e pelo elevado risco de transmissão que ocorre logo após o nascimento ou ao longo da vida (Morales-Romero et al., 2014; Lemoine & Thursz, 2017; Fofana et al., 2023). Na China, 95% dos casos de CHC devem-se igualmente ao HBV (Chen et al., 2017).

Alguns fatores potenciadores de carcinogénese ocorrem em zonas hiperendémicas para o HBV. Estão relacionados com as aflatoxinas que se fazem presentes na alimentação humana. Estas aflatoxinas são micotoxinas ambientais altamente mutagénicas. A sua

associação funciona favoravelmente para o desenvolvimento de CHC (Henry et al., 2002; Lawrence et al., 2023) apresentando 21% de risco associado (Lemoine & Thursz, 2017).

1.2.9. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

1.2.9.1. SERÓTIPOS E SUBTIPOS

A distribuição geográfica dos subtipos virais publicada por Couroucé-Pauty e colaboradores (1983), identifica o serótipo *ayw* circulante no Vietname, no Mediterrâneo, na África Ocidental e Central e na parte mais a norte da América do Sul e Antilhas. O serótipo *adw* foi identificado em países do norte e centro da Europa, África Central e do Sul, Índia, Pol n sia e Argentina. O serótipo *adrq-* circunscreve-se   Oceânia e o serótipo *adrq+* ao Sudeste Asiático. O serótipo *ayr* foi identificado na China, Japão, Vietname, Tailândia e Indonésia (Farshadpour; Taherkhani & Saberi, 2022) e na Oceânia (Manuylov et al., 2022).

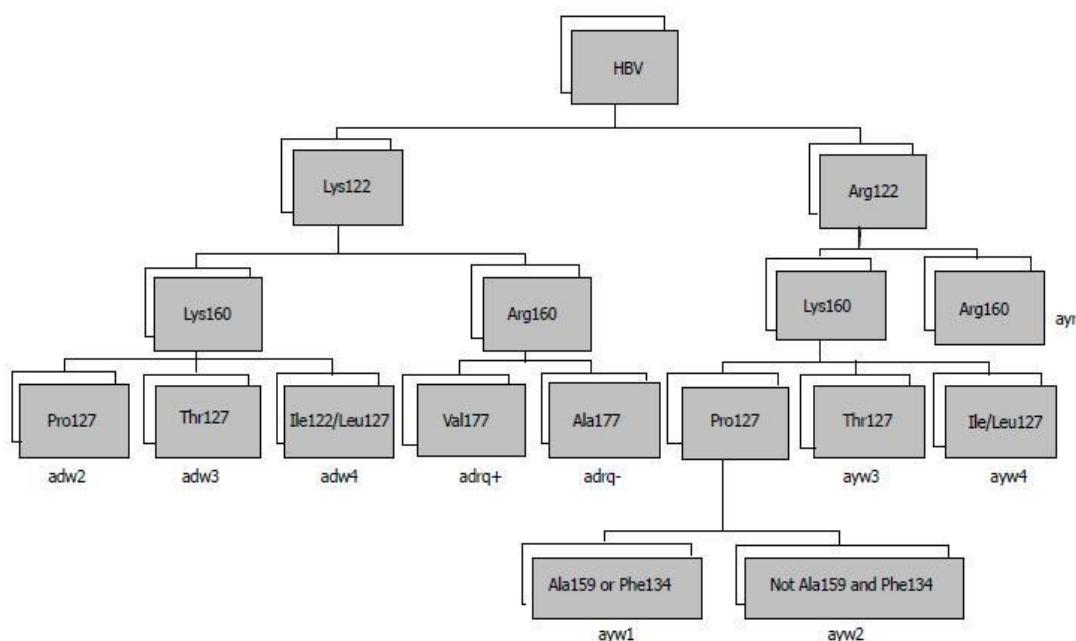


Figura 15. Algoritmo de dedução dos serótipos e subtipos. A dedução ocorre a partir dos codões (122 e 160) presentes na estrutura primária da proteína S-HBs da região hidrofílica principal. Fonte: Yano, 2015.

1.2.9.2. GENÓTIPOS

As variações g nicas observam-se a partir do grau de divergência presente nas sequências nucleotídicas do gene S. Quando calculada acima de 8% reconhecem-se os genótipos, até 4% de divergência identificam-se os subgenótipos e abaixo disto (1 a 3%) os clados. Atualmente, 10 genótipos estão designados de A a J (Kramvis et al., 2005a; Kramvis,

2014; Farshadpour; Taherkhani & Saberi, 2022; Toyé et al., 2023). A diferença entre genótipos pode chegar aos 14% (Sumer & Sayan, 2019). O número de subgenótipos reconhecidos aproxima-se a 40 (Toyé et al., 2021) sendo estes identificados entre os genótipos A-D, F e I (Kramvis, 2014). O genótipo E e G não apresentam subgenótipos, sendo que o genótipo E apresenta baixa diversidade genética, calculada entre 1,2% a 1,9% (Ingasia; Kinge & Kramvis, 2021).

Okamoto e colaboradores (1988) identificaram os genótipos A, B, C e D (Okamoto et al., 1988). Norder e colaboradores identificaram o genótipo E e F (Norder et al., 1994) e Struyver e colaboradores (2000) o genótipo G. Arauz-Ruiz e colaboradores (2002) identificaram o genótipo H. O genótipo I, foi identificado por Tran e colaboradores (2008) e o genótipo J foi inicialmente descrito no Japão em um doente com CHC, sendo que este genótipo apresentava-se mais divergente entre outros genótipos circulantes em humanos (Tatematsu et al., 2009).

Conheciam-se inicialmente quatro subgenótipos para o genótipo A (Kramvis, 2014) sendo que foram identificados oito subgenótipos, o A1, A2 e A6 são os melhor caracterizados. Os restantes A3, A4, A5, A7 e A8 parecem ter uma classificação ambígua, por não obedecerem a todos os critérios definidos anteriormente sendo estes identificados em África (Toyé et al., 2021). O genótipo B confere 5 subgenótipos (B1-B5), o genótipo C apresenta maior número de subgenótipos (C1-C16), é descrito como o mais antigo dentre os genótipos estudados (Kramvis, 2014). O genótipo D conta com oito subgenótipos (D1-D8), o genótipo F com catorze subgenótipos (F1-F4) o genótipo I conta com doze (I1-I2) subgenótipos (Dawood, 2022). Os genótipos de E a J, são considerados genótipos negligenciados por serem os menos estudados, sendo que o genótipo E apresenta baixa ou fraca diversidade intragenotípica apesar de serem conhecidas linhagens distintas, devido a sua distribuição geográfica (Toyé et al., 2023).

1.2.9.2.1. *DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL*

Os genótipos do HBV apresentam-se globalmente dispersos (Kramvis & Kew, 2007; Gencay et al., 2018; Toyé et al., 2021) (Figura 16) devido a intensificação das migrações. Podem ser detetados em migrantes e em contatos mais próximos, genótipos característicos das regiões de origem ou de seus ascendentes (Lago et al., 2014; Sumer & Sayan, 2019). A sua distribuição e heterogeneidade espelha a evolução filogenética o que os torna potenciais marcadores populacionais (Kramvis et al., 2005a; Gencay et al., 2018).

Em termos gerais o genótipo A é prevalente na Europa, os genótipos B e C no leste e sudeste asiático, o genótipo D tem distribuição mundial e o genótipo E é o mais prevalente na África subsaariana (Sunbul, 2014; Bissinger et al., 2015; Kocher et al, 2021; Toyé et al., 2021). O genótipo F é frequente nas Américas tal como o genótipo G (México e EUA) e o genótipo H. Quanto ao genótipo I este é encontrado no sudeste asiático, Índia e China. O genótipo J corresponde a uma estirpe viral encontrada no Japão (Kramvis, 2014). O genótipo A estende-se igualmente pela África subsaariana, norte da Europa e Índia (Nguyen et al., 2020). Os genótipos A e D apresentam-se como os mais dispersos pelo mundo sendo os genótipos mais prevalentes na Índia (Rahman et al., 2016).

Em África, circulam os genótipos A, D e E (Kramvis & Kew, 2007). Os subgenótipos A mais detetados em África são o A1, A3 e A4. O subgenótipo A2 ocorre fundamentalmente entre a Europa e América do Norte (Kramvis et al., 2005a; Kramvis, 2014). Na África subsaariana, predominam os genótipos E e A (Velkov et al., 2020; Toyé et al., 2023). O subgenótipo A1 distribui-se pela África do Sul, Zimbabué e Malaui (Bissinger et al., 2015), os subgenótipos A1, A2 e A3 circulam em Angola (Valente et al., 2010) e os subgenótipos A3 e A4 nos Camarões, Mali e Nigéria (Olinger et al., 2006). O subgenótipo A4 tem sido detetado entre populares da Gâmbia e do Senegal (Toyé et al., 2021).

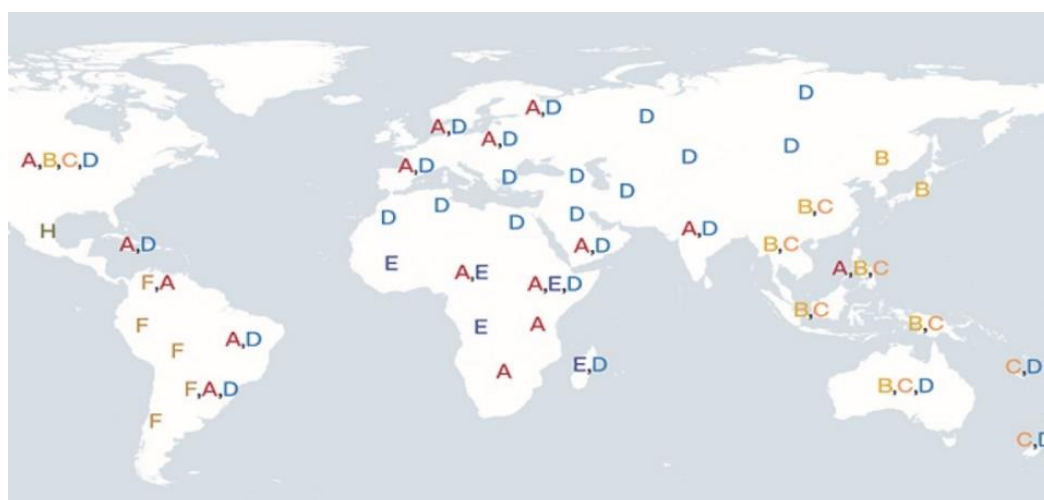


Figura 16. Distribuição global dos genótipos do HBV. Fonte: Kocher et al, 2021.

Os genótipos B e C são encontrados em populações da Ásia a leste e a sudeste (Sunbul, 2014; Rahman et al., 2016). O genótipo B prevalece no Japão, China, na Ásia Oriental, em Taiwan, Indonésia, Vietname, Camboja e Filipinas, mas também no Alasca, a norte do Canadá e na Gronelândia e entre os esquimós e população Inuit (Nguyen et al., 2020). As estirpes B foram reagrupadas em cinco subgenótipos (B1-B5), sendo que B1

restringe-se ao Japão e B5 a comunidades Inuit do Canadá. Acredita-se que o subgenótipo B1, no Japão se tenha originado de migrantes da Sibéria, Gronelândia e regiões a norte da América (Kramvis, 2014).

O genótipo C existe há mais de 40 mil anos (Paraskevis et al., 2013; Kramvis, 2014) é identificado pelo continente asiático (Ásia Ocidental ao Sudoeste asiático) compreendendo Taiwan, Coreia do Sul, China, Vietname, Tailândia, Filipinas, Indonésia até à Austrália e ilhas do Pacífico (Nguyen et al., 2020). Os subgenótipos identificados vão de C1 a C16, O subgenótipo C4 predomina em aborígenes australianos e os restantes subgenótipos predominam na Indonésia (Kramvis, 2014).

O genótipo D distribui-se por todo mundo com mais frequência na Europa, Norte de África, em países do Mediterrâneo, Médio Oriente e Austrália, sendo que a circulação conjunta com outros genótipos endêmicos, estirpes recombinantes ocorrem entre os genótipos como A/D e D/E (Kramvis & Kew, 2007; Kramvis, 2014). O genótipo D é subdividido em seis subgenótipos, D1-D6. Os subgenótipos D1, D3 e D6 foram identificados em África, sendo D1 em amostras egípcias, D3 em amostras sul-africanas e D6 na Tunísia e na Nigéria. O subgenótipo D1 também foi detetado no Médio Oriente e Ásia Central e o D3 na Alemanha, França, Itália e EUA (Kramvis & Kew, 2007). Estudos mais recentes, indicam que D1 também está presente na Austrália e Indonésia, enquanto D2 foi registado na Albânia, Reino Unido, Líbano, Rússia, Japão e Malásia. O subgenótipo D3 foi identificado no Brasil, em comunidades descendentes de italianos (Sumer & Sayan, 2019) e D5 em uma tribo na Índia (Kramvis, 2014).

O genótipo E predomina na África subsaariana difunde-se pela costa ocidental, local onde se observa a maior frequência (Lago et al., 2014; Oluyinka et al., 2015; Toyé et al., 2023). Este genótipo prevalece em tribos de Pigmeus e Khoi San (Kramvis, 2014; Ingasia; Kinge & Kramvis, 2021) e tem sido detetado na Arábia Saudita (Nguyen et al., 2020).

O genótipo F ocorre do Alasca à Argentina e por boa parte da América latina (Sumer & Sayan, 2019). Apresenta 4 subgenótipos (F1 a F4) e em conjunto com o genótipo H, ocorre em populações indígenas da América Central e do Sul. Na Nicarágua e no México tem maior prevalência (Panduro et al., 2013; Kramvis, 2014) e a distribuição do genótipo H estende-se até aos EUA, tendo sido detetado também no Japão (Rahman et al., 2016).

O genótipo G tem sido isolado em países europeus e EUA. Tem sido encontrado em recombinação com o genótipo A (Rahman et al., 2016) e é prevalente no México. Porém, acredita-se que tenha surgido nesta região antes da colonização espanhola (Panduro et al., 2013).

O genótipo I é um dos genótipos mais recentemente descrito, pouco frequente no mundo. A primeira sequência conhecida ocorreu por recombinação entre determinados genótipos (A/C/G) e outro genótipo indeterminado. Recentemente, ocorreu uma divergência acima de 7,5% quando comparado ao genótipo C. As mesmas sequências eram de descendentes do Vietname, provenientes de pacientes residentes no Canadá, do Laos, da China e de uma tribo indiana, onde dois subgenótipos I1 e I2 foram identificados (Kramvis, 2014).

Finalmente, um genótipo putativo designado como genótipo J, foi detetado em um indivíduo japonês portador de CHC, sendo conhecido que o seu portador tinha vivido em Bornéu durante um período longo da sua vida (Tatematsu et al., 2009).

1.3. IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS VARIANTES E DOS GENÓTIPOS

As variantes genéticas do HBV podem ser classificadas em variantes Pré-C e Pré-S, variantes C, variantes do promotor principal do gene C, variantes do antígeno de superfície, variantes do gene P e variantes que desencadeiam hepatite B fulminante (Burda et al., 2001; Croagh et al., 2015). Existe interesse clínico em identificar estas variantes devido a necessidade de criar estratégias de seguimento, de tratamento a aplicar e prognóstico necessários aos doentes com hepatite B crónica (Sunbul, 2014) por haver uma relação distinta a observar entre a história natural da infeção e o risco de desenvolver CHC, cirrose, titulação dos níveis de HBsAg, carga viral e resposta à terapia antiviral (Lin & Kao, 2015; Ingasia; Kinge & Kramvis, 2021; Toyé et al., 2023).

É importante reconhecer a associação entre o tipo de genótipo e o desfecho clínico principalmente entre os genótipos mais negligenciados (Lawrence et al., 2023; Toyé et al., 2023). A progressão ou evolução para a doença crónica parece ser maior entre os portadores dos genótipos A e C, seguindo-se os portadores dos genótipos B e D, não se conhecendo resultados robustos para os portadores do genótipo E. Em biópsias hepáticas, a inflamação e a fibrose parecem ser mais evidentes em infetados com os genótipos C e D, comparativamente aos infetados com o genótipo A e B. A doença hepática mais grave ocorre geralmente entre

infetados com o genótipo C por estes apresentarem pior prognóstico e gravidade da doença crónica. Esta gravidade parece ser semelhante entre os infetados com genótipos B e D (Croagh et al., 2015).

Quanto à resposta ao tratamento com interferão, é melhor entre os infetados com os genótipos A e F, do que entre os infetados com o genótipo B. A associação ao CHC é semelhante entre infetados com genótipos C e D e subgenótipo F2, comparativamente aos infetados com o genótipo B e subgenótipo A1. Quanto à conversão do HBeAg de positivo para negativo observa-se que ocorre mais precocemente entre os portadores dos genótipos B, D e F, quando comparados aos infetados com o genótipo C. A remissão sustentada do HBeAg após a conversão deste antigénio para HBeAg negativo, é significativamente maior entre os infetados com genótipos A e B. Quanto ao HBsAg a perda ou passagem para serologia negativa após o tratamento é maior em infetados com genótipo A, igual entre os infetados com genótipo B e D e fraca nos infetados com genótipo C.

Para o genótipo E, conhecem-se alguns resultados dentre os poucos estudos clínicos divulgados quando comparados aos estudos apresentados para os genótipos A e C (Croagh et al., 2015). Entre as características clínicas que estão associadas a pesquisas em portadores do genótipo E, parece ser um genótipo negligenciado quanto ao seguimento e tratamento destes doentes crónicos (Ingasia; Kinge & Kramvis, 2021; Toyé et al., 2023). Foi observado que muitos dos portadores apresentam elevada carga viral, alta taxa de positividade para o HBeAg, maior probabilidade de desenvolver doença crónica e consequentemente maior probabilidade de transmissão vertical entre mães HBeAg positivas para seus descendentes. Porém, foi descrito numa revisão da literatura de 2014 que o genótipo E, é um genótipo difícil de tratar, necessita de tempo prolongado de medicação antiviral relativamente a outros grupos em estudo, os seus portadores podem apresentar níveis médios a baixos de titulação do HBsAg no final do tratamento, podem ainda apresentar um elevado número de mutações de resistência entre os tratados e parece ser maior a incidência de CHC (Toyé et al., 2023). Pode ainda detetar-se esta infeção em recombinação com outros genótipos regionais (A e D) sendo que os subgenótipos A1 e D3 estão entre mais caracterizados e o subgenótipo A1 parece apresentar maior potencial carcinogénico (Ingasia; Kinge & Kramvis, 2021). Para a África Austral as pesquisas referem que entre os genótipos circulantes (A, D e E), os infetados com subgenótipo A1 representam o grupo onde existe maior incidência de CHC, com um risco acrescido 4,5 vezes superior comparativamente a outros genótipos (Kew et al., 2005).

Os estudos relacionados aos genótipos B e C em áreas de elevada endemicidade referem pior o prognóstico, sendo o risco de transmissão vertical do HBV, de mãe para filho, muito elevado (Sunbul, 2014). O CHC tem sido detetado na maior parte dos infetados com genótipo C e F comparativamente aos infetados com o genótipo B ou D (WHO, 2015).

O genótipo G tem sido detetado em homens que fazem sexo com homens. A infeção crónica ocorre em presença de recombinação com outro genótipo (Kramvis, 2014). Porém, entre infetados com genótipo H é elevado número de casos de IOB (Panduro et al., 2013).

1.3.1. MUTAÇÕES

As mutações ocorrem de forma espontânea ou iatrogénica (Arikan et al., 2019), podem corresponder a alterações pontuais na sequência nucleotídica ou à fixação de pequenas inserções ou deleções. A incidência global de mutações espontâneas ou naturais é de aproximadamente 5,3% na população com hepatite B crónica (Zhang et al., 2015). Esta incidência altera-se consoante a distribuição dos genótipos, critérios de pesquisa, o tamanho do gene a pesquisar, fatores endógenos como os exercidos pelo sistema imunológico do hospedeiro e fatores exógenos como os desencadeados por terapias antivirais (Araujo; Teles & Spitz, 2020).

As variantes naturais do HBV ocorrem em qualquer um dos períodos de infeção (Ngui et al., 1999). Podem surgir de forma espontânea ou por causas iatrogénicas, sendo esta última relacionada com a falência do tratamento com imunossuppressores, interferão ou antivirais. Outra fonte de seleção de mutações de caráter iatrogénico é relacionada à pressão vacinal anti-HBV (Ngui et al., 1999; Araujo; Teles & Spitz, 2020; Ingasia; Kinge & Kramvis, 2021).

1.3.1.1. GENE S

A região codificante S do genoma do HBV inclui três domínios distintos (Pré-S1, Pré-S2 e S) relacionados às três formas de antigénio de superfície presentes no invólucro viral (L, M e S-HBs) os quais se diferenciam pelo seu tamanho/massa molecular e têm sequências aminoacídicas parcialmente sobreponíveis (Figura 17).

O domínio Pré-S1 correlaciona-se com a porção única da proteína L-HBs e o domínio Pré-S2 com a proteína M-HBs, locais importantes para a ligação ao hepatócito por integrarem vários epitopos de reconhecimento dos linfócitos T e B. O domínio S, comum às três formas

de antígeno de superfície corresponde à região hidrofílica principal (S-HBs) responsável pela principal zona imunogênica do HBV (Heermann et al., 1984).

Qualquer das regiões do gene S pode abrigar mutações que são identificadas quando comparadas a uma sequência nucleotídica pertencente a uma estirpe selvagem do HBV. Assim, identificam-se as variantes Pré-S1, Pré-S2 e variantes da região S (S-HBs) aquela que contém especificamente as variantes do determinante “a” e da região hidrofílica principal (Moradi et al., 2012; Yano, 2015; Gencay et al., 2018). As mutações observadas na região S-HBs alteram a conformação do HBsAg, porque esta região contém a região determinante “a”, que é composta por um conjunto de aminoácidos que são comuns todos os genótipos. Alterações nesta região promovem variantes ou mutantes de escape, conhecidas como variantes de escape de diagnóstico, escape imunitário, escape vacinal e de escape ao tratamento (Ngui et al., 1999; Pawlotsky, 2005; Yano, 2015; Araujo; Teles & Spitz, 2020; Di Stefano et al, 2023). Assim, entre vacinados contra o HBV várias variantes circulam pelo mundo. Estas variantes de escape imunitário e vacinal são detetadas nos codões 116; 120; 126; 129; 130; 133; 134, 141; 142; 143; 144 e 145 da região hidrofílica principal do HBsAg (Gencay et al., 2018; Mathew et al., 2023; Araujo; Teles & Spitz, 2020).

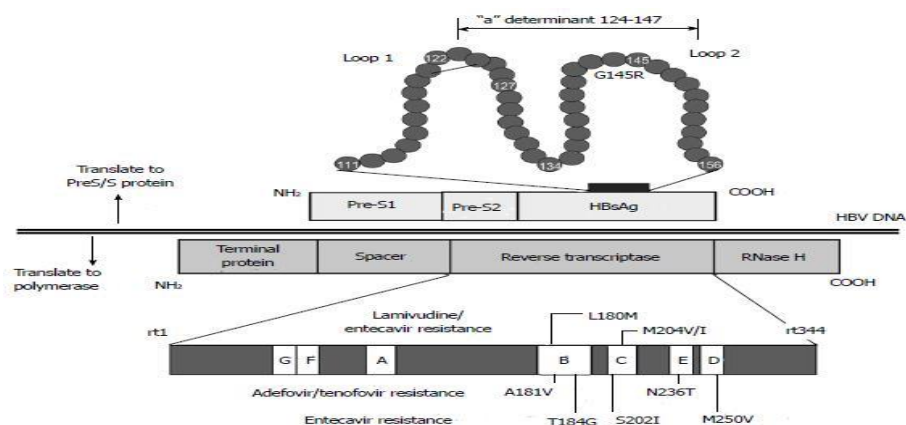


Figura 17. Estruturas de sobreposição do gene S/P do HBV. Em cima correspondência entre as estruturas do HBsAg e em baixo o domínio da polimerase e subdomínios da transcriptase reversa. Fonte: Yano, 2015.

A principal mutação de escape vacinal é a sG145R, que está associada também ao escape à terapia com HBIG (Cooreman et al., 2001; Fujii et al., 1992; Araujo; Teles & Spitz, 2020; Ingasia; Kinge & Kramvis, 2021) sendo esta conhecida também como uma mutação estável na população pois permanece em circulação (Carman et al., 1989; Gencay et al., 2018).

Os mutantes de escape imunitário podem surgir em consequência de tratamento com antivirais inibidores da transcriptase reversa. As mesmas, caracterizando-se como alterações duplas que ocorrem entre a região S-HBs e o domínio rt-HBV (Caligiuri, 2016; Choi; Lee & Kim 2018).

Uma pesquisa que envolveu 8 genótipos (A-F) distribuídos por seis mil sequências completas do HBV refere que foram detetados 10,7% de mutantes de escape (imunitário e vacinal) sendo estes identificadas na sua maioria no codão 129 (sI129H, sT129H - 1,8%), no codão 133 (sM133T - 1,2%); no codão 145 (sG145R - 1,2%) e codão 129 (sQ129R - 1,0%), respectivamente (Araujo; Teles & Spitz, 2020).

As mutações de escape imunitário pré-existentes quando se acompanham de outras mutações no domínio rt-HBV (subdomínio A e B), um dos domínios que se sobrepõe ao HBsAg, podem reduzir a eficácia dos antivirais anti-HBV, alterar os epítomos conformacionais do HBsAg, alterar a capacidade de replicação e a virulência do HBV (Choi; Lee & Kim 2018; Araujo; Teles & Spitz, 2020; Ingasia; Kinge & Kramvis, 2021).

Dependendo do método empregue na detecção de mutações, 5 a 20% das alterações podem não ser detetadas sendo o método de sequenciação de Sanger, o método menos abrangente mas mais acessível em todo mundo (Yano, 2015).

1.3.1.2. GENE P

Este gene possui quatro domínios (Figura 17), sendo o domínio da transcriptase reversa (rt-HBV) específico para a detecção de mutações de resistência associadas a falência ao tratamento com antivirais inibidores da transcriptase reversa (Lago et al., 2014; Oluyinka et al., 2015; Arikan et al., 2019). As mutações de resistência têm relevância clínica no resgate do tratamento (Arikan et al., 2019; Bartholomeusz & Locarnini, 2006; Yano, 2015). Estas, podem surgir em locais clássicos ou não do domínio funcional. A sua presença pode eventualmente desencadear resistência cruzada, inibir a ação de vários fármacos, predispor ao surgimento de mutantes de escape (imunitário e vacinal), além de que estas variantes podem ser transmitidas à população em risco e por sua vez, responsáveis por agravar o estado de saúde dos portadores (Santantonio & Fasano, 2013; Yano, 2015).

Podem designar-se mutações de resistência primária, aquelas diretamente associadas à falência terapêutica, pois têm capacidade de diminuir a replicação viral. As mutações de

resistência secundária ou compensatória são mutações que restauram a capacidade replicativa do vírus (Zhang et al., 2015). As mutações putativas são mutações que ocorrem entre os portadores que não respondem à terapia antiviral, sugerindo que as mesmas sejam responsáveis por baixar a barreira de resistência aos antivirais. As mutações pré-tratamento são mutações em que o efeito ainda não está esclarecido ou comprovado (Panigrahi et al., 2013; Zhang et al., 2019).

Sete posições/codões estão relacionadas à resistência primária aos antivirais sendo o codão 180, 181, 184, 202, 204, 236 e 250 (Araujo; Teles & Spitz, 2020) ou incluindo ainda o codão 169 (181, 184, 202, 204, 236, 250). As mutações compensatórias ou secundárias podem incluir o codão 80 (Zhang et al., 2015) o codão 173 e 180 (Panigrahi et al., 2013). As mutações putativas podem ocorrer nos codões 53, 54, 82, 84, 85, 91, 126, 128, 139, 153, 156 e 166 de acordo com Panigrahi; et al., (2013) bem como as que ocorrem nos codões 191, 200, 207, 213, 214, 218, 221, 229, 237, 238 e 245 de acordo com Zhang et al., 2019. Mutações pré-tratamento podem ser detetadas nos codões 38, 124, 134, 139, 224 e 242 de acordo com Panigrahi et al., (2013) e nos codões 122 e 242 de acordo com Zhang et al. (2019).

Em doentes com hepatite B virgens de tratamento, é possível detetar vírus com mutações que conferem algum grau de resistência ao tratamento com análogos de nucleosídeos/nucleotídeos. Os locais onde se observam as principais substituições de resíduos aminoacídicos são: rtI169T, rtA181T/V, rtT184S/C/G/A, rtA194T, rtS202G/C/I, rtM204V/I, rtN236T e rtM250V. Para as que conferem resistência secundária ou compensatória descrevem a posição rtL80I, rtV173L e rtL180M (Zhang et al., 2015).

Em doentes com tratamento prévio, mutações típicas de escape imunitário e de resistência aos inibidores da transcriptase reversa podem ser identificadas (Arikan et al., 2019). As mutações relacionadas à monoterapia com Entecavir e à terapia combinada com Lamivudina + Tenofovir, surgem de acordo com o tempo de tratamento (Bartholomeusz & Locarnini, 2006; Yano, 2015). Valores globais de resistência identificados para a Lamivudina calcularam-se em 7,3%, para o Adefovir calcularam-se em 0,5%, para Entecavir em 0,2% e Tenofovir em 0,05% (Araujo et al., 2020).

A resistência medicamentosa (Figura 17) quando associada à monoterapia prolongada com Lamivudina é observada no domínio C da rt-HBV, onde se encontra a sequência de aminoácidos YMDD, na variante selvagem do HBV. Em presença de variante de resistência

esta sequência apresenta-se como YV/IDD (Tchuem et al., 2020). Conferem resistência à Lamivudina e ao Entecavir as mutações rtI169T, rtV173L, rtL180M, rtT184G, rtS202G, rtM204V/I e rtM250V. Confere resistência ao tratamento com o Tenofovir, a mutação rtN236T (Yano, 2015).

1.3.1.3. GENE C

O gene C codifica dois antígenos, HBcAg e HBeAg. O HBeAg é a principal proteína não estrutural detetada na circulação sanguínea indicadora de replicação. Porém, existem mutações relacionadas aos níveis de síntese do HBeAg vs carga viral vs CHC. Estas mutações, ocorrem na região Pré-C e C (Fang et al., 2009; Farshadpour; Taherkhani & Saberi 2022). Nomeadamente, a mutação G1896A, ocorre no códon 1896 resulta da substituição de um resíduo de triptofano por um códon de terminação, é uma das mutações mais significativas por inibir a produção do HBeAg (Omata et al., 1991; Ingasia; Kinge & Kramvis, 2021). Outro par de dupla mutação (A1762T + G1764A) frequentemente detetada entre portadores HBeAg negativos que apresentam carga viral mais baixa comparativamente a portadores HBeAg+ (Moriyama et al., 1996; Funk et al., 2002; Ayed et al., 2007; Fang et al., 2009). Indivíduos com triplas mutações (T1753V + A1762T + 1761A apresentam cargas virais menos significativas (Fang et al., 2009).

1.3.1.4. GENE X

A progressão da doença hepática para cirrose e o CHC depende igualmente do polimorfismo relacionado ao gene X e ao genótipo. Alterações no padrão da sequência de nucleótidos detetada neste gene responsável pela tradução da proteína x (HBx), demonstra que é possível detetarem-se mutações pontuais isoladas ou associadas em conjuntos (duplas mutações ou triplas mutações), em maior frequência nos doentes crónicos com complicações instaladas (Salarnia et al., 2017; Ave; Putra & Miro 2022).

Os pares de duplas ou triplas mutações mais frequentes detetadas entre portadores do genótipo B e C ocorrem em frequências distintas, sendo superior em portadores do genótipo C (72,2%) vs genótipo B (27,8%), identificadas nas posições 130 e 131 (HBx130 +HBx131) associada a uma terceira posição HBx5 ou a HBx127 (HBX5+HBx130+HBx131 e HBx127+HBx130+HBx131) de acordo com a pesquisa de Ave; Putra & Miro (2022). Porém, em doentes com cirrose quando comparados a doentes com hepatite B crónica, as alterações génicas produzem uma proteína truncada, responsável pelos rearranjos estruturais. Estes

rearranjos estão caracterizados por deleções e inserções na região C-terminal da proteína x (1762-1768; 1763-1770; 1769-1773 e T1771/A1775) responsáveis por alterar o quadro de função deste gene observada entre portadores HBeAg negativos do genótipo D (Salarnia et al., 2017).

1.4. OBJETIVOS

GERAL:

Caraterizar o perfil molecular de parte da região de sobreposição dos genes S/P no genoma do HBV presente em amostras de plasma de indivíduos com resultado de teste de diagnóstico rápido para o HBsAg, atendidos em duas unidades de saúde de Angola.

ESPECÍFICOS:

1. Estimar a taxa de infecção pelo HBV com recurso a técnicas moleculares.
2. Descrever o perfil social e demográfico dos indivíduos com infecção HBsAg⁺ e HBsAg⁻/DNA⁺.
3. Recolher o perfil laboratorial da atividade replicativa (HBeAg) e coinfeções (ISTs).
4. Identificar os genótipos, serótipos e os subtipos do HBV.
5. Identificar as mutações presentes no domínio rt-HBV do gene P associadas a resistência ao tratamento.
6. Identificar as mutações presentes no gene S-HBs associadas ao escape imunitário e vacinal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. TIPO DE ESTUDO, LOCAL E POPULAÇÃO EM ESTUDO

Esta dissertação apresenta um estudo transversal desenvolvido na Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, entre 2021 e 2022.

As amostras de plasma estudadas, selecionadas por conveniência estavam criopreservadas a -20°C. Eram resultantes de dois estudos de investigação independentes efetuados em duas capitais de província de Angola, para as quais parte dos resultados sociodemográficos e serológicos se encontravam disponíveis.

O Grupo 1 era constituído de amostras de plasma provenientes de mulheres em trabalho de parto, que foram atendidas na Maternidade Irene Neto (MIN). As mesmas foram colhidas entre 2016 e 2017, na cidade do Lubango, província da Huíla, que contam com dados parcialmente publicados por Oliveira et al. (2020a; 2020b; 2021).

O Grupo 2 de amostras de plasma era proveniente de doentes atendidos em consulta externa, no banco de urgência ou durante o internamento no Hospital Geral de Benguela (HGB), que se encontra situado na cidade de Benguela, província de Benguela. Estas amostras de plasma foram colhidas entre 2016 e 2017 e pertencem a um lote de amostras com resultados parciais publicados por Yefimenko et al. (2023).

2.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Nesta pesquisa, incluíram-se 512 amostras de plasma com resultado de TDR conhecido para o HBsAg, divididas em dois grupos. O primeiro grupo contou com 456 amostras que foram separadas em dois lotes (subgrupos). Um lote com 38 amostras com TDR HBsAg positivas (HBsAg+) e outro com 418 amostras com TDR HBsAg negativas (HBsAg-). Do lote de amostras negativas, incluíram-se as que tiveram um fragmento de amplificação de DNA específico com aproximadamente 340 pb, tratando-se posteriormente como amostras com IOB (HBsAg-/DNA-HBV+).

Do segundo grupo, selecionaram-se apenas 56 amostras de plasma que foram repartidas em dois lotes (subgrupos), um lote com 28 amostras com TDR HBsAg+ e outro com 28 amostras com IOB. Na descrição dos dados moleculares excluíram-se todas as amostras com TDR HBsAg positivas sem amplificação específica de ácidos nucleicos.

2.1.2. CARATERIZAÇÃO SOCIAL E DEMOGRÁFICA

Os dois grupos de amostras eram distintos entre si, um com origem em mulheres em trabalho de parto vs indivíduos doentes atendidos em consulta médica. O género feminino ficou subentendido no Grupo 1 (mulheres em trabalho de parto). Para o Grupo 2 (doentes em consulta), estratificou-se em género masculino e feminino. As restantes variáveis sociodemográficas, consistiram na idade, escolaridade e estado civil. A idade foi medida em anos. A escolaridade estratificou-se em níveis de frequência de ensino (primário, secundário, superior e analfabetismo). O estado civil estratificou-se entre ser casado(a), divorciado(a) ou solteiro(a), sendo que os indivíduos que vivessem em união de facto foram incluídos na primeira categoria. Pesquisou-se ainda o local onde residiam os participantes infetados, se área urbanizada ou em área rural.

2.1.3. CARATERIZAÇÃO DO PERFIL LABORATORIAL

Os dados serológicos estavam previamente disponíveis para o HBsAg, HBeAg, sífilis e HIV. Estes estavam disponíveis através das fontes primárias que resultaram da aplicação de TDRs recomendados pelo MINSA (Ministério da Saúde de Angola), aplicados anteriormente nos rastreios em consultas médicas no local de origem (Angola) e repetidos no IHMT-NOVA.

2.1.4. CARATERIZAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR

2.1.4.1. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

As amostras de plasma encontravam-se armazenadas em tubos de 1,5 mL selados e identificados. Foram separadas em amostras com TDR HBsAg⁺ e TDR HBsAg⁻, sendo que se manteve o número de identificação original.

Após o descongelamento das amostras de plasma em temperatura ambiente por 30 min., seguiu-se a agitação em vórtex (REAX 2000 Vortex Mixer, Heidolph, Alemanha) por 10 a 15 segundos e posterior centrifugação a 12000 rpm, por 2 min. (PicoTM 21 Microcentrifuge, Thermo ScientificTM, EUA), de forma a obter-se uma amostra plasmática menos viscosa e sedimentada.

O DNA total foi extraído com o kit comercial Quick-DNATM Miniprep Plus (ZYMO RESEARCH, EUA), seguindo-se as orientações do fabricante para a extração de ácidos nucleicos a partir de fluidos orgânicos, para obtenção de 50 µL de produto final de extração ultrapuro (> 50 kb), livre de RNA. Antes de iniciar o processo de extração de DNA viral,

preparou-se uma solução de proteinase K com uma concentração final de 20 mg/mL. Esta preparação foi conservada a -20°C.

A uma alíquota de 200 µL de amostra de plasma, adicionou-se 200 µL de *BioFluid & Cell Buffer* e 20 µL da solução de proteinase K a 20 mg/mL. Levou-se a agitar em vórtex por 10 a 15 segundos e de seguida, incubou-se a 55°C em termobloco digital (AccuBlock™, Labnet, EUA), durante 10 min. Após a incubação, à preparação com 420 µL de produto digerido acrescentou-se um volume (420 µL) de *Genomic Binding Buffer*, o tampão de ligação genómica e voltou a agitar-se em vórtex por 10 a 15 segundos. Seguidamente, aplicou-se a mistura numa coluna *Zymo-Spin™ IIC-XLR* apoiada em tubo coletor e centrifugou-se a 12000 rpm, por 1 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e a coluna transferida para novo tubo coletor.

Adicionou-se 400 µL de *DNA Pre-Wash Buffer* e centrifugou-se a 12000 rpm durante 1 min. Descartou-se o sobrenadante do tubo coletor e recolocou-se na coluna à qual se adicionou 700 µL de tampão de lavagem *g-DNA (g-DNA Wash Buffer)*. Centrifugou-se novamente utilizando as condições anteriores. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de *g-DNA Wash Buffer*. Voltou a centrifugar-se de igual modo, descartando-se o sobrenadante e o tubo coletor. Transferiu-se a coluna para um novo tubo de 1,5 mL, previamente identificado com o número original da amostra.

Na última etapa, adicionou-se 50 µL de *DNA Elution Buffer* à coluna e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min. Centrifugou-se novamente a 12000 rpm durante 1 min., de modo a obter um volume final de aproximadamente 50 µL de DNA. Este DNA viral foi armazenado a -20°C até à realização da *nested-PCR*.

2.1.4.2. NESTED-PCR

Nesta etapa utilizou-se o método descrito por Oluyinka et al. (2015) para amplificação de ácidos nucleicos do HBV. Foram necessárias duas etapas sucessivas de PCR, recorrendo-se aos iniciadores da sequência alvo (*primers*).

Para amplificar o gene S/P-HBV foram utilizados dois pares de *primers* que delimitaram uma pequena parte do gene S responsável pela tradução das proteínas S-HBs do HBsAg e parte do domínio da transcriptase reversa (rt-HBV) que se encontra sobreposta. Estes *primers* encontram-se descritos na Tabela 1. Os *primers* externos HBPr134 (*sense*) e

HBPr135 (*antisense*) contêm 20 oligonucleótidos cada um. O segundo par de *primers* internos HBPr75 (*sense*) tem 24 oligonucleótidos e HBPr94 (*antisense*) 20 nucleótidos, que amplificaram em conjunto um fragmento com 340 pb.

Os *primers* liofilizados foram reconstituídos em água ultrapura Milli Q (Reagents Grade Ultrapure Systems, Millipore, EUA) para constituir uma solução *stock*, a uma concentração de 100 µM, que foi conservada a -20°C entre cada etapa de preparação. Para cada *primer*, preparou-se uma solução de trabalho a 10 µM, a partir da solução *stock* (diluição de 1:10 em água ultrapura) que foi armazenada em alíquotas de 100 µL e refrigerada a -20°C entre cada processo.

<i>Nested-PCR</i>	<i>Primer</i>		Sequência nucleotídica (5' - 3')	Sentido
1º PCR	Externo (<i>outer</i>)	HBPr134	TGC TGC TAT GCC TCA TCT TC	<i>Sense</i>
		HBPr135	CAG AGA CAA AAG AAA ATT GG	<i>Anti-sense</i>
2º PCR	Interno (<i>inner</i>)	HBPr75	CAA GGT TAT GTT GCC CGT TTG TCC	<i>Sense</i>
		HBPr94	GGT ATA AAG GGA CTC ACG ATG	<i>Anti-sense</i>

Tabela 1. Descrição dos *primers* utilizados em cada etapa da *nested-PCR*.

A *nested-PCR* é uma das técnicas de biologia molecular que aumenta a sensibilidade e a especificidade de uma reação de amplificação de ácidos nucleicos executada em duas etapas sucessivas de PCR. Esta, teve recurso a um *kit* comercial, *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYTech, Portugal) que contém uma DNA polimerase de nova geração proveniente de uma *Taq* otimizada a 2x. A *NZYTaq II 2x Green Master Mix* apresenta-se como uma solução de cor verde com tampão de reação e aditivos em concentrações ótimas. Contém 0,2 U/µL de DNA polimerase, 10 nmol de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e MgCl₂ a uma concentração final de 2,5 mM, um importante catalisador de reação enzimática. A *Master Mix* foi refrigerada a -20°C entre as preparações. Para cada etapa de PCR, incluíram-se dois controlos negativos (CN) sendo recomendado excluir-se o controlo positivo (CP) para diminuir o risco de contaminações cruzadas.

Na preparação da mistura da primeira de reação de PCR, incluiu-se por cada reação: 5,5 µL de água ultrapura estéril, 12,5 µL de *Green Master Mix*, 1 µL do *primer* HBPr134 e 1 µL do *primer* HBPr135. Posteriormente, distribuiu-se 20 µL desta preparação por cada tubo de PCR de 0,2 mL e adicionou-se 5 µL de suspensão de DNA extraído de cada amostra em

análise, para um volume final de 25 μL . Nos CN, foram incluídos 5 μL de água ultrapura estéril em substituição do DNA da amostra.

As reações de PCR ocorreram em termociclador Biometra T-Personal Thermo Cycler (Biometra, Alemanha), selecionando-se um programa de amplificação com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 min., seguido de outros 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, um emparelhamento a 52°C por 30 segundos e uma extensão a 72°C por 45 segundos, e uma etapa de extensão final a 72°C durante 5 min.

A preparação da segunda mistura de PCR incluiu para cada reação: 9,5 μL de água ultrapura estéril, 12,5 μL de *Green Master Mix*, 1 μL do *primer* HBPr75 e 1 μL do *primer* HBPr94. Cada tubo de reação continha 24 μL de mistura de PCR ao qual foi acrescentado 1 μL do produto de amplificação obtido na primeira PCR. Acrescentou-se 1 μL de água ultrapura estéril na mistura de cada CN. Esta etapa de PCR foi semelhante à programação de amplificação anterior, alterando-se o número de ciclos de amplificação de 35 para 40 ciclos.

2.1.4.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para executar a eletroforese em gel de agarose prepararam-se previamente as soluções tampão (Tabela 2).

Solução - Tampão TBE 10x/1L	
Tris base (CALBIOCHEM®)	108 g
Ácido Bórico (SIGMA®)	55 g
EDTA 0,5 M	40 mL
Esterilizou-se a 121°C durante 15 min.	
Autoclavagem	
Preparação - Tampão TBE 1x (1:10)	
Solução de tampão TBE 10x	100 mL
Água bidestilada	900 mL
Preparação - Gel de Agarose (100 mL)	
SeaKem® LE Agarose (1,8% p/v)	1,80g
Tampão TBE 1x	100 mL
Grenn safe premium (NZYtech)	2 μL

Tabela 2. Etapa de preparação de soluções para a eletroforese

Os produtos da *nested*-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) a 1,8% (p/v), contendo 1 μL do corante de ácidos nucleicos *GreenSafe Premium* (NZYTech, Portugal), em tampão TBE 1x. Depositou-se nos poços do gel de agarose, 3 μL de marcador molecular NZYDNA Ladder V (NZYTech, Portugal),

seguido de 5 µL de CN, 5 µL de volume de cada produto amplificado. Os CN serviram para avaliar o risco de uma eventual contaminação dos produtos amplificados. O marcador molecular Ladder V fragmentou-se pelo gel a cada 100 pb. A eletroforese decorreu em aparelho horizontal SUB-CELL GT CELL (Bio-Rad, EUA) por 1 h e 10 min., a 100 V.

2.1.4.4. SEQUENCIAÇÃO NUCLEOTÍDICA

Os produtos de amplificação validados, i.e., com tamanho aproximado de 340 pb, foram analisados em empresa externa (STAB VIDA, Lda. Caparica, Portugal). A sequenciação nucleotídica foi realizada pelo método de sequenciação de Sanger, utilizando-se o *primer* interno HBPr75 como iniciador. Os resultados da sequenciação direta foram fornecidos em formato de cromatograma.

2.2. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

Os resultados da sequenciação nucleotídica direta foram analisados nas plataformas Chromas (versão 2.6.6) e BioEdit Sequence Alignment Editor (v.7.2.5) para a edição e alinhamento múltiplo das sequências. As sequências editadas foram comparadas (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com outras sequências pertencentes ao HBV depositadas nas bases de dados internacionais (*GeneBank*) para comprovar a sua identidade.

As sequências nucleotídicas positivas foram submetidas à ferramenta bioinformática Geno2pheno [hbv] 2.0 (<https://hbv.geno2pheno.org/index.php>) onde após identificação, confirmou-se os de genótipos e os polimorfismos genéticos. Para identificar a variabilidade do HBsAg relacionada ao serótipo e ao subtipo do HBV seguiu-se o método dedutivo de Echevarria; Avellón, A., & Magnius (2005) e posteriormente confirmou-se pelo método dedutivo de Yano (2015). Os resíduos aminoacídicos foram traduzidos com recurso ao código genético em <https://www.todamateria.com.br/codigo-genetico/>.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados em programa informático Excel (365 MICROSOFT) e SPSS (IBM SPSS STATISTICS – Versão 26). Aplicaram-se testes estatísticos no cálculo da média, desvio padrão, e proporções entre os grupos. Para as amostras independentes, aplicou-se o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Os resultados apresentam-se em tabelas de dupla contingência onde se analisou a frequência e alguma probabilidade de associações entre variáveis. Todo o valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.4. CRITÉRIOS ÉTICOS

O estudo transversal no qual se insere este trabalho obteve parecer favorável para a sua realização da Comissão Científica e de Ética do Hospital Geral de Benguela (N/ref. 26/014). As amostras do Lubango eram incluídas num estudo observacional, transversal e analítico que obteve aprovação do Comité de Ética de Angola (n.º 35/2017). Todos os participantes ou os seus representantes assinaram um consentimento informado e esclarecido. Os dados de identificação de cada doador de amostra permanecem em confidencialidade, protegidos e em anonimato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. POPULAÇÃO EM ESTUDO

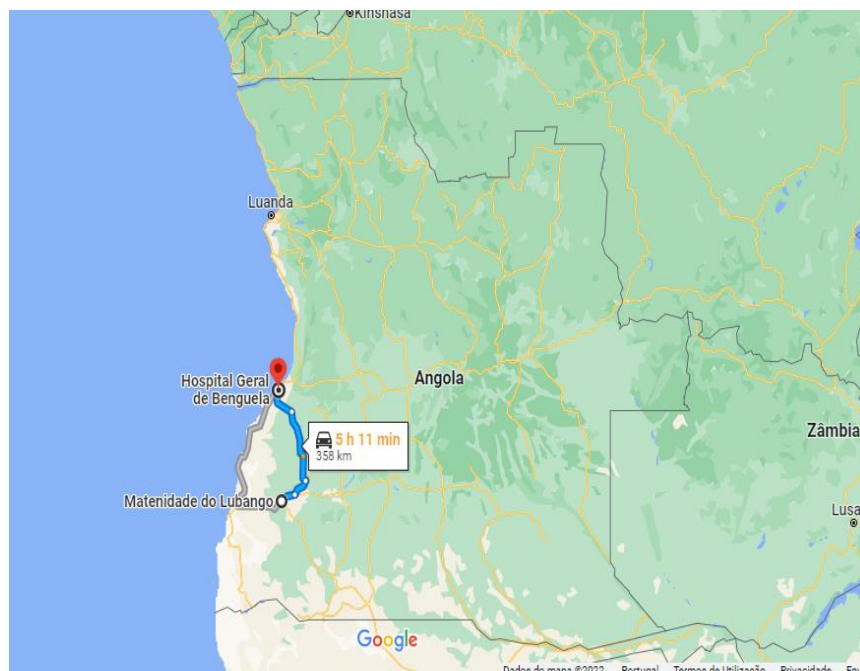


Figura 18 – Mapa de localização das duas Unidades de Saúde de Angola. Fonte: [site www.google.pt/maps/](http://www.google.pt/maps/)

Angola é um país da África subsaariana localizado a Oeste da África Austral, conta com 1 246 700 milhões de km². É delimitado a Norte pela República do Congo (província de Cabinda) e República Democrática do Congo (RDC), a Este pela Zâmbia, a Sul está delimitado pela Namíbia e a Oeste pelo Oceano Atlântico. Em 2017 contava com cerca de 28,4 milhões de habitantes distribuídos por 18 províncias.

Angola possui 35 Unidades de Saúde de referência para tratamento e seguimento de infetados por este vírus (3 em Benguela e 2 na Huíla), segundo o portal de notícias Angop.ao de 28 de julho de 2023 referindo que de 2014 a 2023 houve mais de 6 mil casos hospitalares. As amostras derivaram de duas Unidades de Saúde do país (Figura 18). Uma localizada na cidade do Lubango (LGO) - província da Huíla, a segunda região mais populosa do país (cerca de 3,1 milhões de habitantes). A segunda encontra-se localizada em Benguela (BLA), na capital da província que na época era a terceira região mais populosa, com cerca de 2,7 milhões de habitantes, segundo dados do Instituto Nacional de Estatística de Angola.

3.2. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR NESTED-PCR

Nesta etapa obtiveram-se 105/512 (20,5%) produtos próximos a 340 pb (Figura 19) nos dois grupos em estudo. Das 456 amostras de plasma do Grupo 1 (Anexo 1; Tabela 3), 8,3% (38/456) destas correspondiam a casos de infecção com TDR HBsAg+ onde em 86,8% (33/38) destas houve amplificação de DNA do HBV. Cerca 13,2% (5/38) dos produtos virais foram excluídos das demais análises por não se obter amplificação de ácidos nucleicos (HBsAg+/DNA-), mantendo-se negativos após repetição.

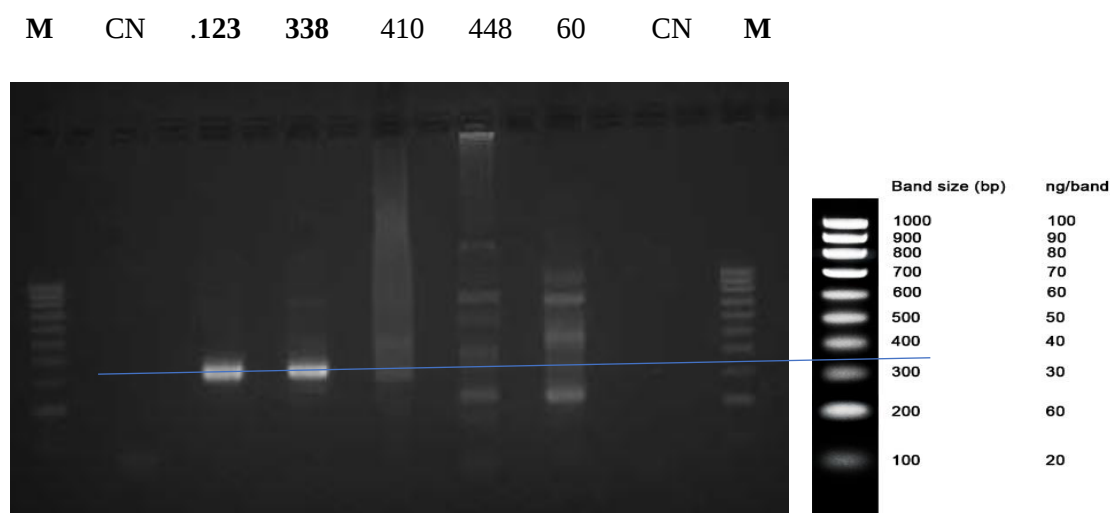


Figura 19 Visualização dos resultados da *nested*-PCR. À esquerda, imagem de gel de agarose captada em aparelho foto documentador UV. À direita, marcador molecular - Ladder V, separado as bandas a cada 100 pb. Legenda - **M** (marcador molecular), **CN** (controle negativo), amostras LGO positivas $\cong$ 340 pb (**123** e **338**) amostras negativas (**410**, **448** e **60**).

<i>Nested</i> -PCR		HBsAg +		HBsAg-		Total	
		n.	%	n.	%	n.	%
Grupo 1 (LGO)	C/ amplificação	33	86,8	20	4,8	53	11,6
	S/ amplificação	5	13,2	398	95,2	403	88,4
	Total	38	100	418	100	456	100
Grupo 2 (BLA)	C/ amplificação	24	85,7	28	100,0	52	92,9
	S/ amplificação	4	14,3	0	0,0	4	7,1
	Total	28	100	28	100	56	100

Tabela 3. Distribuição do perfil de amplificação das amostras de plasma dos dois grupos pela técnica de *nested*-PCR

A pesquisa de IOB em produtos com TDR HBsAg- com DNA-HBV+ realizou-se em 418 amostras de plasma, foi estimada em 4,3% (18/418) no Grupo 1, após a edição dos cromatogramas e análise de identidade das sequências vírais, sendo que duas sequências nucleotídicas (2/20 - TDR HBsAg-) foram excluídas. Uma (LGO277) por representar

contaminação com DNA humano e outra (LGO242) por conter um cromatograma sem qualidade. Assim, a taxa de detecção de ácidos nucleicos entre amostras com TDR HBsAg+ calculou-se em 11,2% (51/456). A taxa global de infeção pelo HBV no grupo das mulheres em trabalho de parto calculou-se em 12,3% (56/456) sendo que 38 HBsAg+ e 18 relacionados a casos de IOB.

A distribuição do perfil de amplificação do Grupo 2 que contou com 56 amostras de plasma previamente identificadas de um grupo de doentes atendidos no Hospital Geral de Benguela. Assim, em 28/56 amostras com TDR HBsAg+ houve 85,7% (24/28) detecção de DNA do HBV, e a totalidade (100% - 28/28) das amostras com IOB, todas eram pertencentes ao HBV. Obteve-se 14,3% (4/28) de amostras com TDR HBsAg+ sem amplificação de DNA resultando assim 52 amplicons do HBV entre o grupo de doentes.

Em amostras de plasma humano testadas com TDR HBsAg+ nem sempre se obtém 100% de amplificação de DNA do HBV, por múltiplos fatores. Alguns fatores estão associados ao perfil clínico que é dependente do estado imunológico, da fase de infeção, das comorbilidades e coinfeções. Outros fatores podem estar relacionados ao vírus como a quantificação da carga viral sem nos esquecermos de fatores relacionados à execução da técnica de amplificação.

A taxa de detecção de DNA viral encontrada nos dois grupos (86,8% LGO vs. 85,7% BLA) foi semelhante. A pesquisa de Valente et al. (2010) realizada a partir de plasma colhido numa Unidade Sanitária de Luanda (proveniente de utentes, visitantes e funcionários) refere que obtiveram 100% de amplificação de ácidos nucleicos virais em amostras com TDR HBsAg+ e HBeAg+.

No nosso estudo 13,2% (5/38) das amostras HBsAg+ do Grupo 1 permaneceu sem amplificação de DNA após uma segunda extração de ácidos nucleicos. Estas amostras eram todas HBeAg negativas indicando indiretamente que a atividade replicativa provavelmente estaria abaixo do limite mínimo de detecção de DNA, que por *nested*-PCR tem sido calculada < 5UI/mL segundo descreve Ocana et al. 2011 ou 2,5 cópias por reação segundo Oluyinka et al., 2015, respetivamente.

No Grupo 2, 14,3% (4/28) das amostras com TDR HBsAg+ manteve-se sem amplificação sendo que todas as amostras eram HBsAg+ e HBeAg+, o que difere do Grupo 1. Os marcadores serológicos (HBsAg e HBeAg) podem ser detetados na corrente sanguínea em

menos de 30 dias após o início da infecção pelo HBV. Estes marcadores virais surgem durante a fase aguda da infecção ou reaparecem durante a fase de reativação viral podendo permanecer detetáveis por um período longo da infecção (Trepo et al., 2014).

A ausência de amplificação de DNA-HBV em amostras com TDR HBsAg+, foi descrita por Candotti e colaboradores (2007) durante uma pesquisa sobre transmissão materno-fetal do HBV no Gana, África Ocidental. Estes pesquisadores submeteram as amostras HBsAg+/DNA- a uma segunda extração de DNA, alterando o volume de soro proposto inicialmente de 200 µL para 500 µL o que aumentou em parte o volume de amostras com resultados de amplificação positivos.

Observamos que a maioria das amostras HBsAg+ são HBeAg-, porque parte das amostras do Grupo 1 não teve critérios de seleção de pesquisa deste marcador no estudo anterior. Assim, identificou-se dados para apenas 28/38 amostras com TDR HBsAg+ onde 26/28 (92,9%) eram HBeAg- e apenas 2/26 (7,7%) eram HBeAg+. No Grupo 2, a maioria (54,2% - 13/24) dos infectados eram HBeAg negativos e apenas 11/24 dos infectados eram HBeAg+.

A morfogénese das partículas do HBV indica que a quantidade de partículas subvirais presentes no soro é geralmente, muito superior à quantidade de partículas completas (100000 vezes ou 10^{14} /mL) circulantes na corrente sanguínea (Hu & Liu, 2017). Os mesmos estudos referem que as partículas subvirais secretadas na corrente sanguínea durante a fase aguda da infecção ou durante a fase mais replicativa, as partículas subvirais expressam-se apenas com proteínas de superfície (HBsAg) ou com proteínas associadas ao HBeAg.

A coinfeção ou superinfecção com o HDV, um “vírus satélite” do HBV, que é dependente da membrana e das glicoproteínas do invólucro do mesmo para infectar os hepatócitos e replicar-se. Este vírus satélite do HBV pode suprimir a atividade replicativa do HBV e do HCV em casos de tripla infecção (Jardi et al., 2001). Porém, desconhece-se o perfil clínico destes portadores para a infecção pelo HDV o que limitou a nossa abordagem.

3.3. CARATERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA E LABORATORIAL

3.3.1. Grupo 1

As sequências virais (n=51) eram oriundas de parturientes infectadas com HBV que tinham entre 13 e 43 anos de idade (média 25,4 anos; mediana 24,4 anos; DP=7,18). Cerca de

62,7% (32/51) destes vírus eram provenientes de mulheres casadas e 37,3% (19/51) de mulheres solteiras. A maior parte (94,1% - 48/51) representada na Figura 20, foi obtida de parturientes que possuíam algum grau de instrução onde a maioria (76,5% - 39/51) frequentou o nível secundário e apenas 5,9% (3/51) destas eram iletradas. A maioria (82,4% - 42/51) das portadoras residia em zona urbana (cidade do Lubango) e apenas 17,6% (9/51) residia na zona rural.

Os resultados colhidos dos testes laboratoriais caracterizaram-se por testes imunocromatográficos de fluxo lateral, que associam anticorpos monoclonais ou policlonais. Estes, têm a função de detecção do HBsAg circulante no soro, plasma ou sangue total. Foi utilizado o mesmo TDR para detecção do HBsAg nos dois grupos de amostras (Laboquick HBsAg Test, Koroglu Medical Devices, Turquia). No Grupo 1, apenas os casos com TDR HBsAg + com descendentes nados-vivo foram selecionados para a detecção de HBeAg, sendo o teste utilizado o HBeAg&Ab (DIA.PRO, Itália).

Igualmente, a recolha de resultados do HIV, a partir das fontes primárias selecionaram um algoritmo com três TDRs para o diagnóstico materno da infeção pelo HIV-1. O teste de primeira linha selecionado foi um teste de quarta geração (Determine HIV-1/2 Ag/Ab Combo, Alere LTD., Reino Unido) e os outros dois testes selecionados foram de terceira geração (Hexagon HIV, Human, Alemanha e Info Anti-HIV 1/2 Version 2, Bio-Rad, França).

Os anticorpos contra *Treponema pallidum* foram identificados primariamente com um teste rápido específico, o teste treponémico Laboquick Anti-Syphilis Test (Koroglu Medical Divices, Turquia), sendo que as amostras reativas foram confirmadas com outro teste não treponémico, o teste rápido da reagina plasmática RPR (Syphilis RPR Test, Human, Alemanha) ou o teste de floculação RPR (testes Macro -Vue RPR Card, EUA).

Após identificação do perfil serológico agrupou-se pelo perfil de infeção pelo HBV em amostras com perfil replicativo HBeAg+ (positivas) e HBeAg- (negativas), coinfeções (HBV/HIV-1 ou HIV-2 e HBV/Sífilis), e referências de tratamento com antiviral inibidor da transcriptase reversa. O perfil replicativo destas infetadas encontrava-se disponível apenas para 84,8% (28/33) dos casos em estudo. Assim, apenas 7,1% (2/28) dos casos continha atividade replicativa (HBeAg+) e 92,9% (26/28) eram de portadoras de um perfil HBeAg-. Em cinco casos este resultado encontrava-se indisponível por critérios de exclusão do estudo anterior, ou seja, estas parturientes tiveram descendentes nados-mortos, por isso não foram selecionadas para esta avaliação serológica. A maioria dos casos (92,2% - 47/51) apresentava-

se em monoinfeção pelo HBV e apenas em quatro casos (7,8%) havia coinfeção com HIV. Destes casos com HIV, três tinham dupla infecção (HBV/HIV) e um tinha uma tripla infecção (HBV/HIV/Sífilis). Dois dos casos em coinfeção eram HBsAg+/ HIV e um era portador de IOB/HIV.

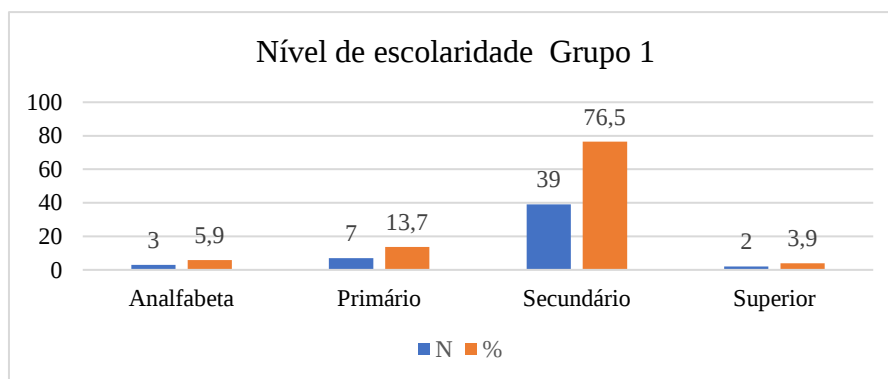


Figura 20 - Distribuição do nível de escolaridade das mulheres em trabalho de parto infetadas com variantes do HBV, atendidas na MIN, Lubango. Fonte: Base dados informáticos SPSS

Observámos que nenhum dos incluídos neste grupo havia feito tratamento para a hepatite B. Apenas o caso de IOB (TDR HBsAg-/HIV+) apresentava registo de seguimento médico em Unidade de Saúde. Este caso, estava medicado com Aluvia (combinação antiviral que integra dois inibidores da protease do HIV sendo Ritonavir e Lopinavir).

O perfil de vacinação contra o HBV das parturientes e seus recém-nascidos não estava completo, apresentava apenas dados dos recém-nascidos com critério vacinal. Desconhece-se se todas as parturientes estavam previamente vacinadas para a hepatite B. Porém, observou-se que a disponibilidade de vacinação contra o HBV aos recém-nascidos ocorreu para apenas 78,9% (360/456) dos descendentes das infetadas. Constatou-se que 16,2% (74/456) dos recém-nascidos neste grupo de infetadas não recebeu vacina ao nascer, onde 22 casos corresponderam a 14 nados-mortos e 8 dos recém-nascidos estavam sem critérios para vacinar ao nascer (< 2000 g) de acordo com os dados publicados por Oliveira et al. (2020a).

Os dados sociodemográficos e laboratoriais indicam que a frequência de infecção pelo HBV era 8,3% (38/456 TDR HBsAg+) inicialmente, porém detetou-se IOB em 4,3% (18/418 – TDR HBsAg-/DNA+) do grupo. Este resultado aumenta a frequência de infecção pelo HBV no grupo 1 para 12,3% (56/456), respetivamente. Este resultado aproxima-se do encontrado por Candotti et al. (2007), que foi obtido entre 1368 mulheres (gestantes e parturientes) do Gana, infetadas com HBV, e tinham idades compreendidas entre os 15 e 48 anos. Detetaram 12,6% de amostras TDR HBsAg+ (173/1368) e 1,5% de amostras com IOB. As frequências

de infecção aqui reportadas estão ainda mais próximas dos resultados encontrados por Peliganga et al. (2021) na província do Bié (Angola), de 2005 a 2020, onde 57979 amostras de soro provenientes de doadores de sangue, com idades compreendidas entre 18 e 50 anos, de indivíduos atendidos no Hospital Geral do Bié, detetaram 8,5% de portadores com TDR HBsAg+, 2,1% de casos com HIV, sendo que a pesquisa de IOB ocorreu num lote de amostras de soro preservadas desde 2007, onde obtiveram 5,9% de positividade (10/170) sendo que o país aguarda a divulgação dos resultados serológicos do HBV (2023/2024) Indicadores Múltiplos de Saúde do Instituto Nacional de Estatística.

Os resultados reportados no nosso trabalho para a frequência de IOB, aproximam-se aos encontrados por Konopleva et al. (2021), que obteve 5,1% de detecção de DNA-HBV entre 59 amostras de soro TDR HBsAg-, de indivíduos com diagnosticados com doença hematológica maligna.

Os dados sociodemográficos dos indivíduos incluídos no Grupo 1, indicam que as sequências genómicas virais foram identificadas em parturientes que tinham entre os 13 e 43 anos (média de idade 25,4 anos), e estas parturientes na sua maioria residia em área urbana, tinha algum grau de instrução, eram casadas ou viviam maritalmente o que se assemelha à população de um estudo realizado num Hospital terciário de Muanza, na Tanzânia, onde Geffert et al. (2020) avaliaram um grupo com 743 mulheres (parturientes e gestantes), que tinham entre 18 e 40 anos, média de 26 anos, no qual detetaram uma taxa de infecção de 3,0% (22/743 – TDR HBsAg+), que é uma taxa inferior à detetada no Grupo 1 (8,3% - TDR HBsAg+). A Tanzânia, é também considerado um país endémico para o HBV, apresenta uma prevalência intermédia de infecção de 7,7%. Porém, no grupo de mulheres tanzanianas apenas 9,1% (2/22 - HBeAg+) destas apresentava atividade replicativa positiva. Este resultado, assemelha-se ao encontrado no Grupo 1 (7,1% - 2/28 TDR HBsAg+/HBeAg+). A literatura descreve que a conversão do estado de portador HBeAg+ para portador HBeAg- pode ocorrer geralmente antes dos 15 ou 16 anos de idade para a maioria das mulheres africanas infetadas pelo HBV, durante a infância (Candotti et al., 2006b). Entre os nossos casos com perfil HBeAg-, observamos que estes eram provenientes de parturientes com idades entre os 16 e 23 anos, pelo que desconhecemos o contexto em que ocorreu a transmissão desta infecção neste grupo.

Entre as mulheres infetadas pelo HBV e seguidas em Muanza (Tanzânia), um dos descendentes de mãe portadora HBeAg+ resultou que após três anos de seguimento, o

descendente apresentava uma sequência viral idêntica a da respetiva mãe. Este caso de infeção crónica ocorreu por transmissão vertical do HBV, ficou comprovado que apesar de que os recém-nascidos terem sido vacinados ao nascer nesta localidade, houve transmissão do HBV. Ainda sobre a vacinação contra o HBV, o estudo de Geffert et al. (2020) citado acima, refere que 2,0% (14/701) das mulheres recebeu pelo menos uma dose de vacina antes do início da sua pesquisa. Porém, não se comprovou qual seria o perfil vacinal do grupo de mulheres em trabalho de parto atendidas na MIN da cidade do Lubango sendo que, Oliveira et al. (2020b) descreve que das 8,6% com TDR HBsAg positivas de seu estudo, 6,6% (33/500) destas não possuía cartão de grávida, apenas 9,1% (42/462) iniciou as consultas no primeiro trimestre de gestação e 62,7% (293/467) destas realizou apenas 4 consultas durante a gestação (valor mínimo de consultas de obstetrícia recomendado pela OMS e pelo MINSA). Quanto ao rastreio de ISTs, a mesma autora refere que 66,5% (309/465), havia sido rastreada para o HIV, 60,2% (281/467) rastreada para a sífilis e apenas 44,6% (208/466) rastreada para o HBV durante as consultas de seguimento pré-natal. Entre as coinfectadas com HIV, uma estava em tratamento antirretroviral e todas as infetadas com o HBV estavam sem tratamento.

Em Luanda, a prevalência de infeção pelo HBV e pelo HIV e os casos de coinfeção em mulheres grávidas mostra-se preocupante pelo impacto na transmissão do HBV. A pesquisa de Vueba et al. (2021) envolveu a distribuição geoespacial, determinantes sociodemográficos, clínicos e obstétricos de 878 grávidas atendidas na Maternidade Lucrecia Paim (2016 e 2017), que tinham idades compreendidas entre os 15 e os 47 anos (média 29,0). Este estudo realizado na capital do país, demonstrava que 25,7% (226/878) das gestantes apresentava o HBsAg+ e a infeção pelo HBV variou entre 15,6% e 25,8% entre os municípios de Luanda. Para o HIV, a infeção variou entre 10,0% e 14,9% entre os municípios, sendo que 6,3% dos casos estavam em coinfeção (HBV/HIV) e 34,5% das gestantes apresentava um perfil HBeAg+, espelhando o risco de transmissão vertical e a manutenção deste vírus na população.

3.3.2. Grupo 2

Os resultados (Anexo 2) indicam que o HBV infetou indivíduos com menos de um ano até aos 70 anos. A média para a idade calculou-se em 34,2 anos (DP=2,46). O coeficiente de variância situou-se acima dos 50% ($CV = DP/Média \times 100 = 51,9\%$) calculando-se assim a mediana em 33,5 anos (I.C 95% de 29,30 $\pm$ 39,20, amplitude interquartil de 22). Cerca de 17,3% (9/52) do grupo com esta infeção, era proveniente de indivíduos com menos de 16 anos

de idade. Quanto ao género dos portadores de HBV, 67,3% (35/52) era do sexo feminino e 32,7% (17/52) do sexo masculino. O estado civil indica que a maioria (51,9% - 27/52) dos portadores era casado ou vivia em união de facto e quanto ao perfil académico (Figura 22), a maioria (61,5% - 32/52) frequentou o nível primário e 13,5% (7/52) o nível secundário. Dentre os infetados, 5,8% (3/52) frequentou o nível superior e igual percentagem foi observada para os iletrados. Estes resultados estavam indisponíveis para os <6 anos de idade (7,7% - 4/52) e para três (3) casos sem registo (5,8% - 3/52).

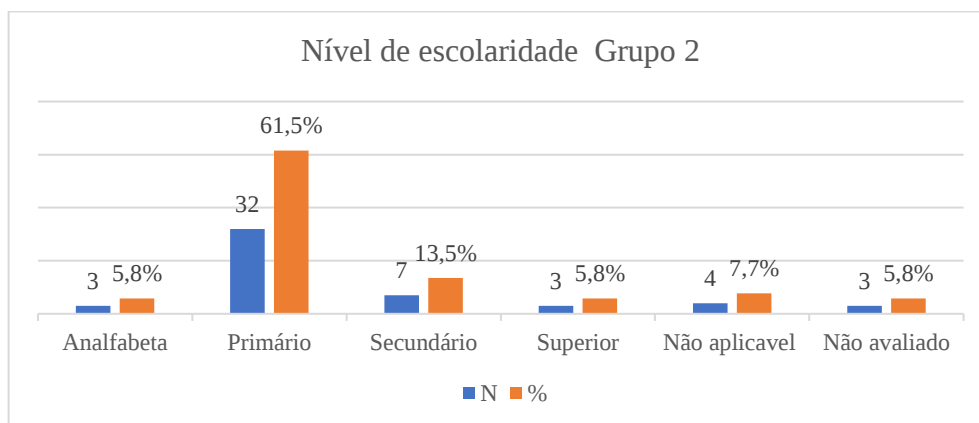


Figura 21 - Distribuição do nível de escolaridade dos doentes infetados com variantes do HBV, atendidos no HGB, Benguela Fonte: Base dados informáticos SPSS

Cerca de 65,4% (34/52) dos doentes deste grupo residia na zona urbana e 34,6% (18/52) era proveniente da zona rural. Cerca de 46,2% (24/52) dos doentes era portador de TDR HBsAg+ e 53,8% (28/52) eram portadores identificados com IOB. Constatamos que o perfil replicativo (HBeAg) estava disponível para o total de amostras TDR HBsAg+, sendo 45,8% (11/24) HBeAg+ e 54,2% (13/24) HBeAg-, respetivamente.

Os resultados laboratoriais das amostras de Benguela para o HIV compreenderam a pesquisa os anticorpos anti-HIV com dois testes imunocromatográficos rápidos. O primeiro teste o HIV1/2 (Healgen Scientific, EUA), um teste de terceira geração não específico para o tipo viral que permite identificar anticorpos anti-HIV-1 e -2 no soro, plasma ou sangue total. O segundo teste aplicado no local foi o anti-HIV 1/2 Test (Türklab, Turquia), que não distingue os anticorpos anti-HIV-1 e -2, que é mais abrangente e inclui o HIV-1 do grupo O. O terceiro teste (terceira geração), usado no IHMT-NOVA, serviu para discriminar e validar o subtipo (HIV-1 e/ou HIV-2) (Hexagon HIV-1/2, Human Diagnostics, Alemanha).

Relativamente à presença de coinfeções 20/52 (38,5%) eram HBV/HIV sendo que, 18/20 TDR HBsAg+ infetado com HIV-1 e dois (2/20) eram TDR HBsAg-/DNA+ infetado com HIV-2. No Grupo 2, 61,5% (32/52) do grupo estava monoinfeção HBV, todos eram

virgens de tratamento para a hepatite B e quanto à situação vacinal contra a Hepatite B, observámos que 82,7% (43/52) dos doentes incluídos no estudo não estava vacinado e 17,3% (9/52) destes não tinha certeza de estar imunizados contra HBV.

Assim, dos selecionados para este estudo (56/546) derivados de dados colhidos e publicados parcialmente por Yefimenko et al. (2023), conhecem-se alguns fatores de risco associados à ISTs entre estes doentes. Na amostra inicial obtiveram 30,0% (164/546) de casos de IOB e 67,7% (111/164) destes estavam coinfectados com HIV. Cerca de 14,7% (80/546) do grupo de doentes tinha TDR HBsAg+ e 41,2% (225/546) estavam infectados com HIV. Dentre os 52/56 incluídos, eram provenientes de indivíduos com idade até 70 anos, sendo que 17,3% (9/52) tinham menos de 16 anos. A maioria (67,3% - 35/52) dos infectados era proveniente de indivíduos do sexo feminino e 32,7% (17/52) eram do sexo masculino.

Os resultados primários (546 doentes atendidos no HGB com 14,7% TDR HBsAg+ vs. 30,0% IOB), aproximam-se aos encontrados em soros de doentes internados num hospital em Kampala, em 2006, no Uganda, por Apica et al., (2016). Demonstraram que 15,9% dos doentes internados na época era portador ativo (TDR HBsAg+) e 29,9% era portador de IOB. Estes resultados da associação de pesquisas em ambiente de internamento hospitalar, demonstra que a frequência de IOB pode ser muito superior à frequência de portadores de infeção ativa, ou seja com TDR HBsAg positivo, além de que a maioria dos portadores ser do sexo feminino. Esta observação assemelha-se ao encontrado entre os doentes do Grupo 2 (67,3%). Na pesquisa de Apica et al. (2016), os coinfectados com HIV, a maior parte foi detetada em doentes com IOB (57% IOB/HIV vs. 39% HBsAg+/HIV). Porém, nosso estudo avaliou uma pequena parte das amostras representando 46,4% (13/28 -IOB/HIV) e 29,2% (7/24 -HBsAg+/HIV), respetivamente.

A maioria (82,7%) das amostras do Grupo 2 provinha de indivíduos não imunizados contra o HBV, sendo observado que 17,3% destes não tinham certeza de estar protegidos contra HBV. Pesquisas recentes realizadas em território nacional por Peliganga et al. (2020) e Vueba et al. (2021) relacionadas a prevalência da infeção pelo HBV, referem que esta infeção negligenciada constitui um problema permanente na Saúde publica e nas estratégias de eliminação global do HBV.

3.4. CARATERIZAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR

As mutações identificadas pelo algoritmo Geno2pheno (Anexo 5; 6; 7 e 8), existentes na região de sobreposição (de 340 pb) dos genes S e P, localizam-se no domínio catalítico da

rt-HBV entre o codão 123 e o codão 215. As mutações contidas na pequena porção S-HBs ocorreram entre as posições 118 e 206 da região hidrofílica principal do HBsAg. Mutações de interesse clínico, de resistência aos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos e mutações de escape (imunológico, escape vacinal, escape ao tratamento e escape de diagnóstico) foram identificadas entre os codões 124 a 147.

3.4.1. GENÓTIPOS, SERÓTIPOS E SUBTIPOS

As 103 sequências virais (Anexo 3 e 4) pertenciam na sua maioria (99,0% - 102/103) ao genótipo E, serótipo *ayw* e o restante (1,0% - 1/103) ao genótipo A, serótipo *adw*, respectivamente.

3.4.1.1. Grupo 1

A totalidade das sequências virais deste grupo (100% - 51/51) eram do genótipo E (Figura 22). O subtipo *ayw1* foi identificado em 2/51 sequências. Este subtipo esteve presente em 5,6% (1/18) das sequências virais obtidas de amostras com TDR HBsAg-/DNA+ e em 3,0% (1/33) das amostras com TDR HBsAg+, respectivamente.

O subtipo *ayw4* foi encontrado na maioria (96,1% - 49/51) dos resultados estando presente em 97,0% (32/33) das sequências virais que infetavam as portadoras com TDR HBsAg+ e 94,4% (17/18) das portadoras com TDR HBsAg-/DNA+.

A respetiva alteração detetada entre os dois subtipos resultou da presença no codão 127 (sL127) de um resíduo aminoacídico de leucina.

3.4.1.2. Grupo 2

Em 98,1% (51/52) das sequências virais deste grupo identificou-se o genótipo E e em 1,9% (1/52) destas identificou-se o genótipo A (Figura 23). No genótipo A, identificou-se o subgenótipo A2, e o subtipo *adw2* por conter um resíduo de prolina no codão 127, fenilalanina no codão 134, treonina no codão 140, alanina no codão 159 e prolina no codão 178, respectivamente.

O genótipo E infetou 45,1% (23/51) doentes com TDR HBsAg+ e 54,9% (28/51) dos doentes com IOB. O subtipo *ayw1* foi identificado em 57,1% (16/28) das sequências com TDR HBsAg-/DNA+. O subtipo *ayw4* foi identificado em 100,0% (23/23) com TDR HBsAg+ e em 32,1% (9/28) dos casos de IOB. Porém, em 3 sequências não foi possível determinar o

subtipo pelo método proposto nesta pesquisa devido a alterações nos codões 127 (BLA88 – sL127T), 140 (BLA86 – sS140L) e 149 (BLA532 – sG149A).

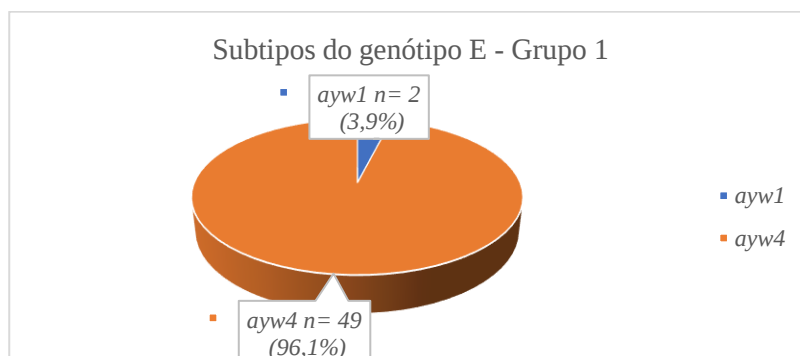


Figura 22 - Subtipos virais identificados entre as sequências com genótipo E do HBV circulante em mulheres em trabalho de parto, atendidas na MIN, Lubango Fonte: Base dados informáticos

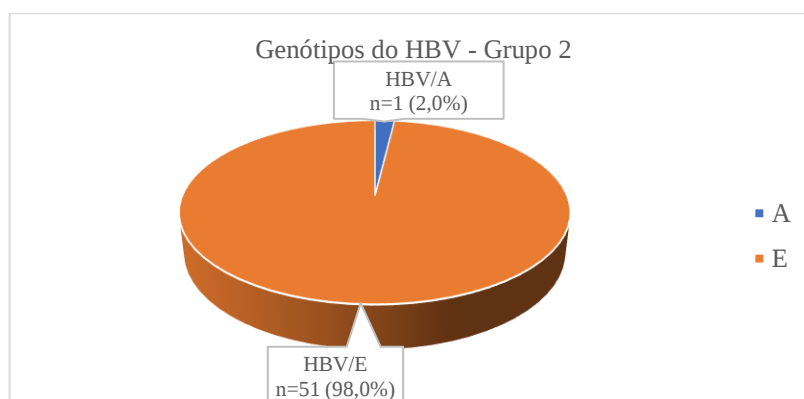


Figura 23 - Genótipos identificados entre as sequências do HBV circulante nos doentes atendidos no HGB, Benguela. Fonte: Base dados informáticos.

De uma maneira geral podemos referir que da totalidade das sequências do Grupo 2, com genótipo E, encontrou-se o subtipo *ayw1* em 31,4% das sequências, o subtipo *ayw4* em 62,7% das sequências e 5,9% (3/21) destas sequências polimórficas ficou por determinar.

Assim, comprova-se que o genótipo E é hiperendêmico entre populações africanas residentes na África Ocidental (Wongjarupong et al., 2007), na África Central (Kurbanov et al., 2010), na África Austral (Norder & Magnus, 1993; Makiala-Mandanda et al., 2017) e este genótipo difunde-se até à Namíbia (Kramvis et al., 2005; Kramvis, 2018).

Em 99,0% (101/102) das sequências analisadas nas duas localidades de Angola (Lubango vs Benguela) comprovamos esta evidência, além da frequência do genótipo A (1,0%, 1/102) pouco significativa. De igual modo, no Gana, um país da África Ocidental, Candotti e colaboradores (2007) pesquisaram a transmissão vertical do HBV entre mulheres

gestantes e parturientes não vacinadas e sem tratamento para HBV onde detetaram o genótipo E em 99,0% das amostras o que vai de encontro aos nossos resultados.

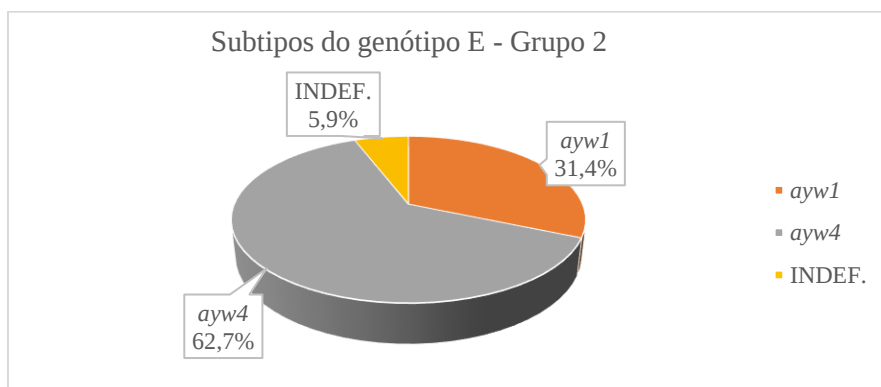


Figura 24 - Subtipos identificados entre as sequências com genótipo E do HBV circulante nos doentes atendidos no HGB, Benguela. Fonte: Base dados informáticos

Observou-se que no grupo de mulheres em trabalho de parto 100% (51/51) destas estava infetada com o genótipo E, sendo 96% dos casos relacionados ao subtipo *ayw4* e 3,9% ao subtipo *ayw1*. Quanto ao grupo de Benguela (Figura 24) infetado pelo genótipo E (98,1%) diferiu na frequência dos subtipos, sendo que o subtipo *ayw4* manteve-se em frequência elevada (62,7% - 32/51). Comparativamente ao subtipo *ayw1* (31,4% - 16/51) foi mais expressivo que no grupo 1. Neste Grupo 2, o subgenótipo A2 subtipo *adw2*, foi pouco expressivo. Na literatura descreve que o subtipo *ayw4* é predominante entre os infetados pelo genótipo E na África Ocidental (Kramvis et al., 2005).

Durante o tratamento dos resultados observámos que pelo método de classificação do serótipo e subtipo do HBV proposto por Echevarría et al. (2005) incluía a análise de cinco (5) codões (122, 127, 134, 140 e 159), o que difere da proposta de Kramvis e colaboradores que apresentam resultados com base em três codões principais (arginina-122, lisina-160 e leucina-127) sendo o método idêntico ao ilustrado no texto (Figura 15) por Yano et al. (2015) específico para o subtipo quatro. Alternativamente, observamos que Sitnik et al. (2007) fez a sua análise baseando-se em quatro codões (os anteriores e outro que inclui a serina no codão 140) para classificar o subtipo presente no caso clínico que apresentou de viajante angolano infetado com genótipo E subtipo *ayw4* (Sitnik et al., 2007).

Para estes resultados seria interessante realizar-se posteriormente a sequenciação completa do gene S dos 102 casos infetados com o genótipo E, comparar-se a outras sequências vírais do sudoeste africano conforme descrito por Lago et al (2014), que parecem ser pertencentes a um conjunto de vírus detetados em Angola, Namíbia e República

Democrática do Congo, que se apresentam divergentes dos demais estudados em países africanos. Isto, deve-se provavelmente à vasta distância geográfica existente entre as regiões por onde o genótipo E se difunde.

Assim, com base na distância regional existente entre as localidades do nosso estudo, observamos diferenças na frequência dos subtipos (*ayw4* e *ayw1*) visto que não se conhecem outros resultados para Angola. Constatou-se igualmente que nenhuma das 103 sequências identificadas apresentava elevada identidade com sequências virais de estudos anteriores (Valente et al., 2010; Lago et al 2014), o que poderia contribuir para melhor divulgação das características da região S/P do genótipo E presente em Angola, tendo em conta as observações feitas nos estudos de Ingasia et al., 2020.

O genótipo A detetado entre o grupo de doentes de Benguela foi detetado anteriormente na capital do país, por Valente et al. (2010). Este ocorreu entre utentes de uma Unidade Sanitária (10,0% - 4/40 genótipo A) em conjunto com o genótipo E (87,5% - 35/40) e D (2,5% - 1/40) sendo que o subgenótipo A2 detetou-se apenas em uma das suas sequências.

Mais tarde, Lago et al. (2014) com o mesmo grupo de amostras deste local identificaram 15,2% (77/508) de portadores com TDR HBsAg+. Seleccionaram uma pequena parte para análise molecular onde obtiveram 29/30 sequências com genótipo E a maioria era do subtipo *ayw4* (96,7%) e apenas uma (3,3% - 1/30) era compatível com um dos subtipos *ayw1/ayw2* devido à presença de prolina no codão 127 (sL127P). Estes resultados diferem dos encontrados entre as parturientes do Lubango relativamente à taxa de infeção pelo HBV (15,2% vs. 8,3%) que era mais elevada na capital do país.

O genótipo A foi identificado em 100% das sequências do Uganda (subgenótipos A1, A2 e A3), em 33% das sequências dos Camarões e em 13% das sequências da Costa do Marfim, sendo que 68% das sequências do genótipo A continham o subtipo *adw2*. O subgenótipo A2 tem apresentado baixa frequência na zona da África Ocidental (Forbi et al. 2013). Este subgenótipo e o genótipo E, foram detetados por Forbi et al. (2013) entre vários países da África subsaariana, onde 9,6% (143/1492) das amostras continham DNA do HBV. Destas, 67,1% (96/143) eram do genótipo E e 32,9% (47/143) do genótipo A. Em termos gerais, 100% das amostras provenientes do Gana, 87% das amostras da Costa do Marfim e 67% das amostras dos Camarões pertenciam ao genótipo E, e o subtipo *ayw4* foi detetado em

92,7% (89/96) destas sequências. O subgenótipo A2 predomina na Europa e na América do Norte, é geralmente detetado entre migrantes e/ou descendentes de populações que, tiveram contacto com indivíduos oriundos destas regiões (Schaefer, 2007; Kurbanov et al., 2010; Rodriguez Lay et al., 2015) porém, Benguela é uma cidade cosmopolita e Angola deixou de ser colónia de um país europeu há quase 50 anos.

Os dados descritos aproximam-se aos resultados obtidos neste trabalho para o Grupo 1 (100% genótipo E; 96,1% subtipo *ayw4* e 3,9% subtipo *ayw1*) e para o Grupo 2 (98,1% genótipo E e 1,9% genótipo A2) sendo que foram encontrados para o genótipo E diferentes taxas para os subtipos presentes entre os doentes com IOB (57,1% subtipo *ayw4*, 31,4% subtipo *ayw1* e 3,6% sem determinação). Isto, demonstra que existe diversidade genética entre as estirpes do HBV circulantes entre as duas localidades estudadas (Lubango e Benguela), podendo esta evidência aumentar em função da população em estudo, da quantidade de amostras e do local de onde provêm.

No entanto, a República Democrática do Congo (RDC) se encontra a norte de Angola, e alguns dos nossos resultados diferem igualmente dos encontrados por Makiala-Mandanda et al. (2017) em amostras de soro que eram provenientes de 11 províncias deste país. A sua pesquisa envolvia a deteção de vírus relacionados às hepatites virais e vírus da febre-amarela, que são vírus responsáveis por promover dano hepático. Estes vírus, foram detetados em 43,8% (218/498) das amostras sendo o HBV o mais prevalente (48,2% - 105/218). Os autores selecionaram apenas 45,7% (48/105) de amostras com TDR HBsAg+ para tipagem molecular, sendo 64,6% (31/48) destas eram relacionadas ao genótipo E, 27,1% (13/48) ao genótipo A (nenhuma do subgenótipo A2) e 8,3% (4/48) ao genótipo D, respetivamente.

Norder & Magnius (1993) descreveram a relação genética existente entre as estirpes do HBV e a variação natural da estrutura do HBsAg e sua origem geográfica. Estes pesquisadores referem a ocorrência de alterações/substituições na cadeia de aminoácidos entre os codões 127 e 140 da região codificante da proteína S-HBs, à semelhança do que ocorreu entre as sequências BLA88 (sL127T) e BLA86 (sS140L) (vide Anexo 4). Estas substituições e a mutação sG159A, na sequência BLA532 impossibilitaram na primeira abordagem a discriminação dos subtipos virais (*ayw*) pelo método dedutivo proposto na nossa metodologia de pesquisa. Assim, conclui-se e concorda-se com Norder & Magnius (1993) e Rodriguez Lay et al. (2015) ser necessário avaliar outros codões. Observando o método descrito aqui por Yano et al. (2015) as sequências BLA86 e BLA532 são compatíveis com o subtipo *ayw4* por

apresentarem arginina (R) na posição 122, lisina (K - Lys) na posição 160 e leucina (L) na posição 127. Porém, o método dedutivo não foi válido para a BLA88 por apresentar arginina (R) em 122, serina (S) na posição 160 e treonina (T) na posição 127 motivo pelo qual, ficou uma sequência por definir. Esta sequência sem subtipo viral apresenta múltiplas mutações cerca de cinco no domínio da transcriptase reversa e doze mutações na proteína de superfície concluindo-se que em presença de múltiplas mutações, estes métodos de dedução podem não ser específicos para todas as variantes.

Subtipo HBV-E					
Origem	Tipo de infecção	n (%)	ayw1	ayw4	Indefinido
LGO	HBsAg+	33/51 (64,7%)	1/33 (3,0%)	32/33 (97,0%)	-
	IOB	18/51 (35,3%)	1/18 (5,6%)	17/18 (94,4%)	-
BLA	HBsAg+	23/51 (45,1%)	-	23/23(100%)	-
	IOB	28/51 (54,9%)	16/28 (57,1%)	11/28 (39,3%)	1/28 (3,6%)

Tabela 4. Distribuição do perfil de subtipos das sequências com genótipo E (n=102), estratificadas de acordo com o tipo de infecção (HBsAg+ vs. HBsAg-/DNA+) e origem geográfica.

A presença de serina no codão 140 parece ser característica em sequências com genótipos E e F (Norder & Magnius, 1993) comprovámos que em 99,0% (102/103) das sequências continha serina no codão 140, exceto a sequência BLA86, que continha leucina na posição 140. Esta observação foi referida por Kramvis et al. (2005) ocorreu também entre genomas completos de HBV de sequências provenientes de Angola, da Namíbia e de Madagáscar.

Conclui-se na Tabela 4 os resultados para ambos os grupos (Lubango vs Benguela) onde em 97,0% (32/33) das parturientes portadoras TDR HBsAg+ eram do subtipo ayw4 e 3,0% (1/33) destas continham o subtipo ayw1. Para o Grupo 2, 100% (23/23) das sequências com TDR HBsAg+ eram do subtipo ayw4 e entre as sequências derivadas de TDR HBsAg-/DNA+ cerca de 57,1% (16/28) era do subtipo ayw1 e através da reavaliação dos subtipos indefinidos inicialmente (BLA86 e BLA532 - 32,1% - 9/28) passou para 39,1% (11/28) de sequências com subtipo ayw4 sendo que 3,6% (1/28 – BLA88) ficou por definir.

3.4.2. MUTAÇÕES

Um conjunto de estirpes geneticamente complexas e altamente heterogêneas (incluindo, *quasispecies*), foi identificado entre os dois grupos e seus subgrupos. Para o

genótipo E descreve-se a distribuição do número de mutações por sequência e por subgrupo na Tabela (5). Seguidamente, identifica-se o tipo de mutações e frequência em cada subgrupo na Tabela (6).

3.4.2.1. Grupo 1

Aqui, excluíram-se 4/51 (7,8%) sequências consideradas do tipo selvagem, sendo uma (1) do subgrupo com TDR HBsAg+ e três (3) do subgrupo com IOB. Assim, cerca de 92,2% (47/51) das sequências virais continha mutações. Estas mutações foram identificadas em 68,1% (32/47) das sequências provenientes de parturientes com TDR HBsAg+ e 31,9% (15/47) com IOB, respetivamente.

3.4.2.1.1. PARTURIENTES COM INFEÇÃO ATIVA

A maioria (97,0% - 32/33) das sequências provenientes de parturientes com TDR HBsAg+ continham mutações (Anexo 5). Estes resultados são apresentados e discutidos pelo domínio da transcriptase reversa (I) e pelo antígeno de superfície (II). Neste subgrupo 43,8% (14/32 TDR HBsAg+) dos casos era portadora de genomas com mutações nos dois domínios (rt-HBV + S-HBs).

I – DOMÍNIO DA TRANSCRIPTASE REVERSA

Na Tabela 5, identifica-se que ocorreu uma (1) única mutação em 62,5% (20/32) das sequências e, dupla mutação identificou-se em 37,5% (12/32) das sequências. Na Tabela 6, observa-se que no codão 123 registou-se a substituição de um resíduo de asparagina por histidina em 100% (32/32) das sequências. No codão 126, observou-se a substituição de uma tirosina por um resíduo de histidina em 6,3% (2/32) das sequências. Todas as outras substituições apresentam-se em caso único (3,1% - 1/32). De realçar, a manifestação de presença de uma *quasispecies* viral associada ao codão 176 (S176N/S) onde ocorreu a substituição de serina por um resíduo de asparagina.

Os polimorfismos genéticos encontrados nos codões 126 e 134 (rtY126H e rtD134G) têm sido associados a resistência a fármacos. A sua deteção deverá impulsionar mais pesquisas (Park et al., 2019; Mokaya et al., 2020) porque se desconhece o impacto destas alterações entre portadores do genótipo E (Olusola et al., 2021; Toyé et al., 2023) que venham a receber tratamento antiviral.

Xu et al., em 2015 na China encontraram 25,6% (43/168) de sequências virais com alterações pré-existentes no domínio da transcriptase reversa, em pacientes com hepatite B crônica (HBC) que eram virgens de tratamento e apresentavam-se sem mutações de resistência primária ou secundária conhecida para os principais inibidores virais de tratamento da HBC (Lamivudina, Adefovir, Entecavir e Tenofovir). Estes resultados não vão de encontro aos por nós reportados, sendo que, 81,4% (35/43) das sequências chinesas continham pelo menos uma mutação e 16,3% (7/43) das sequências continham duas mutações pré-existentes neste domínio. No nosso grupo 100,0% das sequências oriundas de portadoras com TDR HBsAg+ possuía mutações pré-existentes no domínio da transcriptase reversa. Neste domínio 62,5% (20/32) das sequências continha uma mutação e 37,5% (12/32) das sequências possuíam duas mutações pré-existentes. Apesar da comparação de nossos resultados ocorrer com resultados de genótipos diferentes (B e C vs. E) podemos dizer que não foram identificadas mutações primárias ou secundárias o que também vai de acordo com o encontrado por Xu et al. (2015) e Araujo et al. (2020) em população virgem de tratamento.

Dentre as mutações que ocorreram em caso único (3,1% - 1/32) assinalamos uma mutação que ocorreu na posição 164 (M164L) do domínio rt-HBV, onde ocorreu a substituição de um resíduo de leucina por metionina. Esta mutação presente na região espaçadora do gene da polimerase assinalada com metionina na posição 164, é uma característica deste genótipo, de acordo com o estudo de Ingasia et al., 2020. Assim, observamos que 99,0% (101/102) das sequências cumpriu este critério.

Observa-se que as mutações que ocorreram nos codões 128, 139, 207, 212 (rtT128N; rtN139D; rtV207L; rtK212R) foram identificadas em outros estudos relacionadas à resistência à Lamivudina. Sendo a mutação rtT128N e rtN139D identificadas entre conjuntos de mutações emergentes no domínio da transcriptase reversa, foi classificada como mutação putativa (Panigrahi et al., 2013; Zhang et al., 2019). A mesma, foi relacionada ao tratamento com Lamivudina (Rose et. Al., 2018). A mutação rtV207L é referida por Mantovani et al., 2013, como uma mutação pontual resistente ao mesmo fármaco, detetada ocasionalmente entre pacientes virgens de tratamento. A mutação rtK212R foi descrita por Xu et al (2015) em pacientes chineses virgens de tratamento e Akanbi et al. (2019), refere que a mesma ocorreu entre doentes coinfectados com HIV em tratamento com antivirais no sudeste da Nigéria, onde referem ser elevada a frequência de mutações genicas entre portadores coinfectados.

Esta observação, poderá conferir 12,5% (4/32) de variantes virais que apresentam resistência putativa a este antiviral, neste subgrupo de parturientes. Estas mutações podem surgir em pacientes que receberam Lamivudina em monoterapia ou em combinação com outro antiviral. Observou-se que as mesmas sequências aminoacídicas possuíam mutações nos dois genes estudados. A presença da mutação rtK212R está associada à alteração da conformação estrutural da proteína de superfície por torná-la mais alongada ou truncada (Xu et al., 2015) sendo que observamos que a sequência (LGO323) acompanha-se de tripla mutação na S-HBs, respetivamente. Observamos igualmente a presença da mutação rtT128N, uma mutação putativa descrita em conjunto com a mutação que ocorre no codão 120 do HBsAg, a sP120T (Torresi et al., 2002). As mesmas mutações ocorreram no nosso estudo, entre os portadores de variantes com TDR HBsAg⁺ (LGO123) e IOB (BLA68), respetivamente.

A elevada diversidade genética encontrada pode estar relacionada à elevada taxa de replicação do HBV, aliada à propensão da DNA polimerase viral de gerar erros durante a retrotranscrição, potenciada pela sobreposição parcial dos quadros de leitura aberta, que pode proporcionar a seleção contínua de variantes e *quasispecies* competentes, ou não, para se transmitirem na população exposta ao HBV. O mecanismo replicativo será então parcialmente responsável pela virulência variável das diferentes estirpes virais ou pela promoção da resistência ao tratamento medicamentoso com análogos de nucleosídeos/nucleotídeos (Torresi, 2002; Bartholomeusz & Locarnini, 2006; Xu et al., 2015).

II – ANTIGÉNIO DE SUPERFÍCIE

Aqui, identificaram-se 34,4% (11/32) vírus com uma única mutação, 3,1% com dupla mutação e 6,3% (2/32) com múltiplas mutações. Todas as substituições de resíduos aminoacídicos encontram-se discriminados na Tabela 6, apresentando-se em caso único 3,1% (1/32) cada mutação, respetivamente.

Cerca de 19 mutações ocorreram em 14/32 sequências que apresentavam mutações nos dois genes. Dentre estas, havia a presença duas *quasispecies*, uma associada ao codão 168 (A168A/T) onde ocorreu a substituição de alanina por treonina e, outra no codão 193 (S193L/S) onde ocorreu a substituição de serina por leucina. No codão 126 ocorreu a substituição de treonina/alanina e no codão 127 a substituição de leucina/prolina.

As variantes de escape vacinal contra o HBV, descritas na literatura têm sido detetadas entre os codões sT116s; sP120, sT126, sQ129, sM133, sF134, sK141, sP142, sD144 ou sG145 (Raheel et al., 2020; Mathew et al, 2023). Na região imunodominante “a” ocorreram três variantes de escape vacinal (codões 120, 126 e 144) representando 9,4% (3/32) respetivamente.

Adesina et al. (2021) detetaram em sequências aminoacídicas do genótipo E, variantes (sP120L/S, sQ129H/R, sM133I, sD144E e sG145I) de escape imunitário e vacinal que diferem em parte dos resultados encontrados neste subgrupo sP120T; sT126A e sD144E. Por sua vez, nossos resultados diferem igualmente dos encontrados entre 6 sequências com genótipo E, de doadores de sangue com TDR HBsAg+, da Tanzânia, referidos por Forbi et al. (2017).

A mutação sP120T, ocorreu igualmente entre sequências com IOB (BLA16 e 68 – 7,1% - 2/28). A mesma foi identificada em um portador do HBV, com genótipo recombinante A/E, entre soros colhidos entre 2013 e 2014, no Hospital Nacional de Niamey, no Níger, segundo Brah et al. (2016).

Entre 2017 e 2019, Koyaweda et al. (2020) do Instituto Pasteur de Bangui, na República Centro-Africana, pesquisaram numa população semelhante à nossa, em amostras de indivíduos que tinham entre 17 e 64 anos e que estavam sem tratamento antiviral e sem vacinação contra o HBV. Detetaram 51 sequências de doentes com TDR HBsAg+, sendo 96% destas sequências do genótipo E (ayw4). Porém, seus resultados diferem dos encontradas em nosso estudo tanto para as mutações detetadas no HBsAg e região imunodominante. Os mesmos autores descrevem que não foram detetadas mutações de resistência primária ou secundária neste grupo, assemelhando-se aos nossos resultados não nos esquecendo que três (3) mutações eram putativas.

A mutação sT126A e a sD144E ocorreram em 3,1% (1/32) das sequências deste subgrupo, respetivamente. A mutação sD144E ocorreu entre sequências com TDR HBsAg+ (BLA404) e com IOB (LGO184, BLA267). Estas variantes foram detetadas em cerca de 10,1% (7/69) de sequências com genótipo E, sendo que, a mutação sT126A foi detetada no Botsuana e a mutação sD144E foi detetada no Gana (Mokaya et al., 2018).

Karataş et al. (2018), na Turquia detetaram estas mutações (sP120T e sD144E) em sequências com genótipo D, referindo que as mesmas mutações de escape imunitário e de

diagnóstico foram obtidas de doentes com infeção crónica, de doentes em fase de reconversão e de doentes transplantados.

Diversos autores (Bartholomeusz & Locarnini, 2006; Zoulim et al., 2007; Rose et al., 2019) concordam que a exposição prolongada ao tratamento com antivirais é responsável por reduzir a eficácia da barreira de alguns antivirais, motivo pelo qual são selecionadas estirpes resistentes ao longo do tempo de tratamento com inibidores da transcriptase reversa. Estas mutações podem ser detetadas entre doentes com HBC, e podem ser responsáveis por agravar o estado de saúde do portador e promover o insucesso terapêutico (Zoulim, 2011; Akanbi et al., 2019) daí o dever de recomendar e controlar os doentes propostos ao tratamento porque as mesmas variantes poderão estar aptas para a replicação e assim, transmitir-se à população, causar doença em indivíduos imunizados ou que venham a receber a vacina anti-HBV (Sheldon et al., 2006).

3.4.2.1.2. PARTURIENTES COM INFEÇÃO OCULTA

Aqui, as variantes virais encontravam-se em 15 parturientes que tinham uma idade média de 25,4 anos, onde a portadora mais nova contava com 17 anos e a mais velha com 43 anos (D.P 7,48). Em todas (100% -15/15) circulavam estirpes com mutações no rt-HBV e 60,0% destas sequências (9/15 – S-HBs) continham alterações nos dois genes, respetivamente.

I – DOMÍNIO DA TRANSCRIPTASE REVERSA

Na Tabela 5, observa-se que ocorreu uma única mutação em 60% (9/15) das sequências aminoacídicas e 20% (3/15) das sequências continham dupla mutação e múltiplas mutações, cada, respetivamente.

Na tabela 6, observa-se que no codão 123 registou-se igualmente a substituição de um resíduo de asparagina por histidina em 80,0% (12/32) dos casos. No codão 126, observou-se igualmente a substituição de uma tirosina por um resíduo de histidina em 1,3% (2/15) das sequências. Todas as outras substituições neste subgrupo apresentam-se em caso único (6,7% - 1/15). De realçar, a manifestação de presença de uma *quasispecies* viral associada ao codão 126 (Y126H/Y) e codão 188 (C188C/G).

Sequências	Tipo de infecção	Genes	n° Sequências c/mutações (%)	Quantidade de mutações/Sequência (%)		
				Única	Dupla	Múltiplas
LGO (n=47)	HBsAg+ 32/47	rt-HBV	32/32 (100%)	20/32 (62,5%)	12/32 (37,5%)	
		S-HBs	14/32 (43,8%)	11/32 (34,4%)	1/32 (3,1%)	2/32 (6,3%)
	IOB 15/47	rt-HBV	15/15 (100%)	9/15 (60,0%)	3/15 (20,0%)	3/15 (20,0%)
		S-HBs	9/15 (60,0%)	7/15 (46,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)
BLA (n=51)	HBsAg+ 23/51	rt-HBV	22/23 (95,7%)	7/23 (30,4%)	14/23 (60,9%)	1/23 (4,5%)
		S-HBs	4/23 (17,4%)	1/23 (4,3%)	1/23 (60,9%)	2/23 (8,7%)
	IOB 28/51	rt-HBV	19/28 (67,9%)	16/28 (57,1%)	2/28 (7,1%)	1/28 (3,6%)
		S-HBs	28/28 (100%)	16/28 (57,1%)	7/28 (25,0%)	5/28 (17,9%)

Tabela 5. Frequências das variantes do HBV detetadas entre os subgrupos de infecção com genótipo E

Sequências n (%)	Região	Mutações circulantes entre os grupos com infecção ativa (HBsAg+/DNA+)								
LGO 32/32 (100%)	rt-HBV	N123H	Y126H	T128N	D134G	N139D	K149Q	F151L	I162V	M164L
		32/32 (100%)	2/32 (6,2%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)
		S176N/S	V207L	K212R						
		1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)						
BLA 23/24 (95,7%)	rt-HBV	N123H	Y126H	Q125*	F148Y					
		20/23 (86,7%)	16/23 (69,6%)	1/23 (4,3%)	1/23 (4,3%)					
LGO 14/32 (43,8%)	S-HBs	T118M	P120T	T126A	L127P	D144E	A168A/T	L175S	A184V	T189I
		1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)
		S193L	S193L/S	I195T	M198I	P203R	P203Q	S204N	S204G	
		1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	1/32 (3,1%)	
BLA 4/23 (17,4%)	S-HBs	T123A	L127P	T131I	S140T	S140L/S	S140L	D144E	G145K	A168A/V
		1/23 (4,3%)	2/23 (8,9%)	1/23 (4,3%)	1/23 (4,3%)	1/23 (4,3%)	1/23 (4,3%)	1/23 (4,3%)	1/23 (4,3%)	1/23 (4,3%)
		L175S	W182*	T189I/T						
		1/23 (4,3%)	1/23 (4,3%)	1/23 (4,3%)						
Sequências n (%)	Região	Mutações circulantes entre os grupos com IOB (HBsAg-/DNA+)								
LGO 15/15 (100%)	rt-HBV	N123H	Y126H	Y126H/Y	L140H	F148Y	T187L	C188C/G	V190M	A194T
		12/15 (80%)	2/15 (13,3%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)
		C188R	V207M	V214I						
		1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)						
BLA 20/28 (71,4%)	rt-HBV	N123H	Y126H/Y	T128N	S135Y	R138K	F148Y	S159P/S	I162T	I169L
		15/28 (53,6%)	1/28 (3,6%)	2/28 (7,1%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)
LGO 9/15 (60,0%)	S-HBs	L127P	Q129H	S132T	S140T	D144E	A168V	A184A/V	T189I	T189I/T
		1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	2/15 (13,3%)	1/15 (6,7%)
		M198I	S204N							
		1/15 (6,7%)	2/15 (13,3%)							
BLA 28/28 (100%)	S-HBs	P120T	T126I	L127P	L127T	Q129R	G130R	S132Y	S140L	S140T
		2/28 (7,1%)	1/28 (3,6%)	15/28 (53,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)
		P142H/P	D144A	D144E	S154P	G159A	K160N/S	S167L	A168V	L173P
		2/28 (7,1%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	2/28 (7,1%)	2/28 (7,1%)	2/28 (7,1%)	2/28 (7,1%)
		S174N	L175S	L176P	V177A	P178L	P178Q	T189I	I195I/T	M198T
		5/28 (17,9%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	4/28 (14,3%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)
		P203L/P	S204N	S204N/S						
		1/28 (3,6%)	4/28 (14,3%)	3/28 (10,7%)						

Tabela 6. Frequência de mutações detetadas por subgrupo e por tipo de infecção para as sequências do genótipo E.

Mutações pré-existentes e com interesse clínico foram detetadas representando 6,7% (1/15) cada, respetivamente. A mutação que ocorreu no codão 194 e 207 (rtA194T+rtV207M - onde ocorreu a troca de alanina por treonina no codão 194 e a troca de valina/metionina no codão 207 - LGO143), e a mutação rtI187L (onde ocorreu a substituição de isoleucina/leucina - LGO287), indicam a presença de uma mutação de resistência primária (rtA194T) associada a uma mutação putativa no codão 207 (rtV207M) de acordo com Zhang et al (2015).

Os resultados deste grupo de parturientes com IOB com idade média de 25,4 anos, onde a idade mínima era 17 anos e a máxima 41 anos, assemelham-se aos resultados encontrados no grupo com TDR HBsAg+ onde a média foi de 25,2 anos, a idade mínima era de 13 anos e máxima 41 anos. Comprovamos igualmente que 100% das sequências virais apresentavam mutações pré-existentes no domínio da transcriptase reversa.

O polimorfismo rtN123H esteve presente, mas em menor frequência entre as sequências obtidas de parturientes com IOB, comparativamente ao observado entre as sequências obtidas das parturientes com TDR HBsAg+ (73,3% vs. 100%). Igualmente observamos maior frequência do polimorfismo rtY126H (20% IOB vs. 6,2 % 9,3% TDR HBsAg+) entre os dois perfis clínicos. As restantes mutações rtL140H; rtF148Y; rtI187L; rtC188C/G; rtV190M; rtA194T; rtC198R e rtV214I, revelaram-se distintas das detetadas entre as parturientes com TDR HBsAg+ (rtT128N; rtD134G; rtN139D; rtK149Q; rtF151L; rtM162V; rtS176N/S; e K212R), excetuando-se rtN123H; rtY126H e rtV207L referidas anteriormente.

Observa-se que este subgrupo obteve em maior percentagem (60% vs. 43,8%) de mutações nos dois genes comparativamente aos resultados das sequências obtidas das parturientes com TDR HBsAg+. Com esta observação, concordamos com Gencay et al. (2018) que há necessidade de se desenvolver testes de diagnóstico serológico mais específicos, que tenham em conta as variantes de diferentes regiões geográficas porque, pode não existir afinidade de ligação entre os anticorpos anti-HBs sensibilizados e os antígenos de ligação presentes nos testes de rastreio amplamente para diagnóstico clínico em contexto, onde há falta de recursos para outros diagnósticos mais específicos. Assim, poder-se-ia evitar resultados falso negativo para o HBV, conforme se comprova entre os subgrupos com IOB.

As mutações que ocorreram nos codões 194 e 187 (rtA194T e rtI187L), foram identificadas nos estudos de Xu et al., em 2015, na China, circulavam em indivíduos com perfil HBeAg-. A mutação de resistência primária rtA194T, foi detetada igualmente entre indivíduos virgens de tratamento (Zhang et al., 2015). Esta mutação pode conferir resistência parcial ao tratamento com Tenofovir, um fármaco de primeira linha para tratamento de doentes com HIV e HBV (Sheldon et al., 2006; Amini-Bavil-Olyaei et al., 2009). Esta mutação pode ser detetada em portadores com TDR HBsAg+ ou com IOB. A sua presença, pode restaurar a atividade replicativa em portadores HBeAg-. Em indivíduos virgens de tratamento com esta mutação pré-existente (Herbers et al., 2013) recomendam iniciar o tratamento com Entecavir. Esta parturiente com IOB, tinha 17 anos e a variante apresentava mutações nos dois genes, sendo uma tripla mutação (V190M+A194T+V207M).

Segundo Mokaya et al. (2020) referem que a probabilidade de conferir resistência ao Tenofovir (TDF/TAF) é maior quando a mutação estiver associada à outra mutação em local conservado. Esta sequência apresenta comprometidos o codão 194 e codão 207, sítios ativos da enzima transcriptase reversa. Esta mutação primária (rtA194T), foi descrita como sendo uma mutação rara identificada anteriormente em portadores coinfectados com HIV-1 (Sheldon et al., 2005) que desenvolveram resistência ao Tenofovir entre a 63^a e 72^a semanas de tratamento. A mesma mutação, foi detetada em um portador com o genótipo E, num grupo de 23 amostras com TDR HBsAg+ provenientes de pacientes, virgens de tratamento, não imunizados contra o HBV, que foram atendidos no Hospital Nacional de Niamey, Níger, entre 2013 e 2014 (Brah et al., 2016). Foi igualmente detetada em Moçambique em portadores com subgenótipo A1 (Mokaya et al., 2020), respetivamente.

A resistência ao Tenofovir, passa a constituir atualmente uma preocupação para os países endémicos para HBV e HIV porque existem poucos estudos clínicos associados à resistência a este fármaco principalmente entre portadores africanos. O Tenofovir é amplamente recomendado como fármaco de primeira linha, por ser mais seguro, barato e eficaz na redução da carga viral e ter elevada barreira de resistência contra o HBV (Mokaya et al., 2020).

A mutação rtV207M é uma mutação putativa que tem sido associada ao desenvolvimento de resistência ao tratamento com Lamivudina que foi isolada em alta frequência, no Norte do Vietname, um país endémico para o HBV. Foi isolada em 46,5%

(66/94) de amostras provenientes de crianças com HBC, virgens de tratamento e provavelmente descendentes de mães portadoras de estirpes resistentes à Lamivudina e Adefovir segundo refere Phung et al. (2020) pelo que, desconhecemos a realidade dos incluídos em nossa pesquisa.

II – ANTIGÊNIO DE SUPERFÍCIE

Aqui, observamos (Tabela 5) que 46,7% (7/15) das sequências virais identificou-se uma (1) única mutação, e duas e múltiplas mutações identificaram-se 6,7% (1 em cada 15) sequências, respetivamente. Em 60,0% (9/15) das sequências havia mutações nos dois genes.

Na tabela 6, observa-se que treze mutações foram identificadas sendo que ocorreram no codão 189, com a substituição de um resíduo de treonina por isoleucina e no codão 204 observou-se a substituição de serina por asparagina em 13,3% (2/15) dos casos. As demais substituições aminoacídicas apresentam-se em caso único (6,7% - 1/15) sendo observado a presença de uma *quasispecies* viral associada ao codão 189 (T189I/T).

Apenas três (3) mutações (sL127P; sQ129H e sD144E) foram identificadas neste subgrupo como variantes de escape imunitário e escape vacinal e de falha de diagnóstico serológico. Assim, sL127P é uma variante de escape imunitário identificada entre portadores coinfectados com HIV, que eram resistentes ao tratamento com Lamivudina, entre 2017 e 2018 em Abidjan referidas por Olivier et al., (2020) onde detetaram dois mutantes de escape vacinal sQ129H, sD144E. A mutação sQ129H, foi detetada anteriormente em Luanda, em dois portadores com TDR HBsAg+ identificados no trabalho de Lago et al. (2014). Esta mutação de escape vacinal sQ129H (6,7% - 1/15 – LGO287) caracterizou-se pela substituição de glutamina por arginina no mesmo codão. A mesma, foi identificada igualmente na Tanzânia em um portador com subgenótipo A1 (Forbi et al., 2017), na África do Sul entre um doador de sangue com TDR HBsAg positivo portador do genótipo A (Gencay et al., 2018). A mesma mutação foi ainda detetada em alta frequência (18,2% - 8/44) entre portadores com genótipo E, aparentemente saudáveis, virgens de tratamento e sem resistência aos inibidores da transcriptase reversa nos Estados de Ekiti e Ondo, Sudeste da Nigéria (Adesina et al., 2021).

A outra mutação associada ao escape imunitário e vacinal a sD144E, ocorreu em um (1/32 - 3,1%) caso entre as sequências derivadas de TDR HBsAg positivas do subgrupo das parturientes e, igualmente em um caso (1/15 – 6,7%) proveniente de parturientes com IOB. A

mesma foi igualmente detetada na África do Sul, em um portador com TDR HBsAg positivo com genótipo A (Gencay et al., 2018) e parte dos resultados para a mesma mutação encontram-se descritos anteriormente.

3.4.2.2. GRUPO 2

3.4.2.2.1. DOENTES COM INFEÇÃO ATIVA

Aqui, os nossos resultados indicam que este subgrupo de doentes com TDR HBsAg+ tinha uma idade média de 35,3 anos (mediana de 33,5 anos de idade). A idade mínima, entre os portadores foi de 10 anos e máxima 70 anos (D.P 17,35). Observamos que a sequência com o genótipo A(A2) continha múltiplas mutações e sua análise será descrita em separado das sequências com genótipo E (Tabela 5 e 6) que serão descritas abaixo, pelo domínio da transcriptase reversa (I) e pelo antigénio de superfície (II).

Genótipo A

A sequência BLA72 (subgenótipo A2, *adw2*) continha mutações pré-existentes nos dois genes sendo, quatro (4) no domínio da transcriptase reversa (rtM145L+rtW153R+rtS159T +rtS213T) indicando que ocorreu a troca de metionina/lisina no codão 145, a troca de triptofano/arginina no codão 153, a troca de serina/treonina no codão 159 e 213, respetivamente. Na superfície viral (S-HBs) foi detetada a mutação rtS204R (onde ocorreu a troca de serina/arginina no codão 204).

Com base nestes resultados para o genótipo A, podemos referir que as mutações presentes no domínio rt-HBV não ocorreram entre as sequências do genótipo E, exceto a mutação rtS159T detetada como uma *quasispecies* (rtS159P/S) onde ocorreu a troca de serina/prolina/serina.

A mutação rtW153R foi detetada em portadores com subgenótipos A1, na investigação de Koyaweda et al. (2020) em indivíduos com TDR HBsAg+, virgens de tratamento e sem histórico de vacinação, atendidos em Bangui, República Centro-Africana onde em 96,1% (49/51) destes infetados portavam sequências virais do genótipo E e 9,8% (2/51) do subgenótipo A1. Esta mutação rtW153R localizada no codão 153, ocorre em local relacionado a resistência a fármacos entre o subdomínio rt105 – 169. Foi identificada anteriormente entre um grupo de doentes submetidos a terapia combinada de Lamivudina + Adefovir de acordo Mirandola et al., (2012) numa pesquisa italiana.

Konopleva et al. (2021), referem ter detetado mutantes da proteína S-HBs entre 59 soros de utentes com doença hematológica maligna onde a mutação a sS204R, que ocorreu entre os genótipos A, D e em um recombinante D/E igualmente. A mesma mutação foi identificada no banco de sangue na Beira, Moçambique, em soros infetados com genótipo A, entre os dois tipos de infeção (TDR HBsAg+ e IOB) de acordo com Mathew et al., (2023).

Genótipo E

Entre os resultados obtidos de 51 doentes portadores do genótipo E (Anexo 7 e Tabela 5 e 6) observa-se que 95,7% (22/23) dos relacionadas a TDR HBsAg+ continham mutações no domínio da rt-HBV, e 17,4% (4/23) apresentam mutações no S-HBs. Neste Grupo 2, 13,0% (3/23) dos doentes era portador de variantes virais com alterações nos dois genes.

I – DOMÍNIO DA TRANSCRIPTASE REVERSA

Na Tabela 5, observar-se que neste lote de sequência com genótipo E, com uma única mutação identificaram-se 7/23 sequências, com dupla mutação identificaram-se 14/23 sequências e com múltiplas mutações identificou-se 1/23 sequência, respetivamente.

No codão 123 registou-se igualmente a substituição de um resíduo de asparagina por histidina em 87,0% (20/23) dos casos. No codão 126, observou-se também a substituição de uma tirosina por um resíduo de histidina em 70,0% (16/23) das sequências. Todas as outras substituições (Tabela 6) apresentam-se em caso único (4,3% - 1/23). De realçar, a manifestação de presença de rtQ125*, um codão de terminação da tradução (*stop*).

Comparando as sequências oriundas de doentes com TDR HBsAg+ de Benguela e as sequências oriundas de parturientes com TDR HBsAg+ circulantes no Lubango (95,8% vs. 100%), observam-se que a mutação no domínio funcional é distinta. A mutação rtY126H ocorreu em 72,7% (16/22 – BLA) vs. 6,3% (2/32 LGO) das sequências. O codão 126 é um dos codões do subdomínio ativo da transcriptase reversa (Mokaya et al, 2020) relacionado ao estudo de resistência a fármacos inibidores da transcriptase reversa, identificado em parte das mutações putativas (Panigrahi et al.,2013) o que sugere ser necessário realizar pesquisas de sensibilidade ao tratamento na nossa população.

Na China, Fan et al. (2015) apresentam algumas evidências detetadas em pacientes com HBC, com genótipo B e C, analisaram mutações resistentes a análogos de nucleotídeos em genomas HBV. Referem que, em 51,7 % (155/300) das sequências existiam mutações

únicas ou múltiplas, e que as sequências com genótipo C apresentavam maior frequência de mutações no domínio da transcriptase reversa comparativamente às sequências com genótipo B. Observaram igualmente que, o nível de carga viral do HBV era mais elevado nas sequências sem mutações, comparativamente à carga viral detetada entre sequências com múltiplas mutações. Esta observação não foi comprovada em nossa investigação pelo que, iria contribuir para caracterizar positivamente este grupo de portadores com genótipo E.

De um modo geral, entre as sequências com genótipo E, derivadas de TDR HBsAg+ pertencentes a doentes virgens de tratamento não foram detetadas mutações de resistência clássica e este resultado vai de acordo ao encontrado por Archampong et al. (2017) no Gana, em 36/63 sequências virais de TDR HBsAg+ provenientes de doentes coinfectados com HIV, propostos para terapia antirretroviral.

II – ANTIGÉNIO DE SUPERFÍCIE

Na tabela 5, observa-se que ocorreu uma única mutação em uma (1/23) sequência, duas mutações em outra (1/23) sequência igualmente e, múltiplas mutações identificaram-se em 2/23 sequências, respetivamente. Observa-se que, apenas 17,4% (4/23) dos doentes continha alterações.

Na tabela 6, observa-se que no codão 189 registou-se a substituição de um resíduo de treonina por isoleucina e no codão 204 observou-se a substituição de serina por asparagina em 13,3% (2/15) dos casos. As demais substituições apresentam-se em caso único (6,7% - 1/15) sendo observado que dentre elas havia a presença da mutação de *stop* sW182* e uma *quasispecies* viral associada ao codão 189 (T189I/T).

Estes resultados (17,4% - 4/23) não vão de encontro aos observados entre o subgrupo de mulheres em trabalho de parto (43,8% - 14/32) continha alterações nos dois genes. Aqui foram identificadas duas variantes de escape imunitário (sG145K) e uma de escape imunitário e escape vacinal (sD144E e sG145K). A sG145K foi detetada anteriormente, em um experimento onde pretendiam avaliar a combinação de mutantes de escape imunológico e resistência a antivirais (Zhang et al., 2013) e, mais recentemente identificada como variante de escape imunitário e escape vacinal (Olivier, et al., 2020).

As duas mutações sD144E; sG145K foram detetadas entre as pesquisas de Ma & Wang (2012) na China, entre as pesquisas de Choga et al. (2019) na Beira, Moçambique e de Konopleva et al. (2021) na Rússia.

A mutação de ponto de paragem W182* foi identificada por Jiang; Chang; Yan & Wang (2021) entre um grupo de sequências virais detetadas em doentes com TDR HBsAg positivos que tinham anticorpos anti-HBs, descrito como caso paradoxal observado com mais frequência. Isto, pode depender de diversos fatores como os ligados ao hospedeiro e ao próprio HBV. Esta mutação de *stop* ocorre no domínio transmembranar, parece afetar a secreção e a estrutura do HBsAg e a ligação dos anticorpos neutralizantes. A mesma mutação é responsável por produzir uma proteína truncada ou alongada na porção L-HBs, que poderá estar relacionada a casos que apresentam alterações metabólicas promotoras de cirrose e CHC, desfecho clínico observado entre portadores do genótipo A, com TDR HBsAg+ descrito por Eschlimann, et al., (2017).

3.4.2.2.2. DOENTES COM INFEÇÃO OCULTA

Os doentes portadores de IOB tinham uma idade média de 33,3 anos (mediana de 33,5 anos). A idade mínima estava compreendida entre portadores com < 1 ano e até 67 anos de idade (D.P 18,37). Abaixo, descrevem-se os resultados para 28 sequências identificadas com IOB, identificadas no Anexo 8, com resultados descritos nas Tabela (5 e 6). Estes resultados estão identificados em separado pelo domínio da transcriptase reversa (I) e pelo antigénio de superfície (II).

I – DOMÍNIO DA TRANSCRIPTASE REVERSA

Na tabela 5 identifica-se que ocorreu uma única mutação em 16/28 sequências virais, a dupla mutação ocorreu em 2/28 sequências e com múltiplas mutações apenas 1/28 sequência. Neste grupo 67,9% (19/28) dos doentes era portador de variantes virais que apresentavam alterações nos dois genes.

As principais mutações foram detetadas em quatro posições (Anexo 8). A alteração observada no codão 126 mantém-se igualmente entre as sequências deste subgrupo, com uma *quasispecies* rtY126H/Y. Apenas no codão 128, ocorreu a mutação rtT128N que já foi descrita anteriormente como uma mutação putativa que ocorreu em 10,5% (2/19) das sequências.

Na mutação rtS135Y observa-se a substituição de serina/tirosina, na mutação rtR138K observa-se a troca de arginina/lisina; na mutação rtF148Y observa-se a substituição de fenilalanina por tirosina, na mutação rtS159P/S observa-se a troca de serina por prolina, na mutação rtI162T a substituição de isoleucina por treonina e a mutação rtI169L a substituição de isoleucina por leucina com 5,3% (1/19) cada codão respectivamente. A mutação rtI169L é uma mutação de resistência primária (Categoria 1) que tem sido associada à resistência ao Entecavir (rtI169L).

A mutação rtN123H foi detetada em 78,9% (15/19). Nos portadores com IOB observa-se que 100% (15/15) das sequências do Lubango vs. 67,9% (19/28) das sequências de Benguela, apresentam alterações neste domínio.

Não se observaram semelhanças entre as sequências LGO e BLA com IOB, apenas se registaram alterações nos mesmos codões 123 e 126. As mutações presentes neste subgrupo eram distintas entre si. Apenas uma mutação primária (rtI169L) foi encontrada. Esta sequência foi obtida de um portador com 31 anos de idade, HBeAg negativo que apresentava múltiplas alterações. Esta mutação ocorreu em 3,5% (1/28) das sequências, e foi relacionada com a provável resistência ao tratamento com Entecavir e Adefovir, sendo que, em África, a mesma foi identificada em Moçambique, na África do Sul, Gâmbia e Etiópia, de acordo a pesquisa de Mokaya et al. (2018).

Wandeler et al. (2016), detetaram a mutação rtI169L entre portadores moçambicanos. A mesma foi identificada em duas amostras colhidas entre 2007 e 2008, em indivíduos adultos, coinfectados com HIV, em tratamento antirretroviral, subgenótipo A1. Na Índia, Ismail et al. (2014), ao avaliarem a eficácia do tratamento com Adefovir, verificaram que esta mutação surgiu em 6,7% (2/30) das sequências de doentes com HBC a quem foi proposto tratamento. A resistência a este fármaco, surgiu em média 12 meses após o início da terapia.

Finalmente, observa-se que a taxa de resistência aos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos detetada entre os grupos repartida pelo tipo de infeção foi calculada em 9,4% (3/32 – TDR HBsAg+) vs 6,7% (1/15 - IOB) para o grupo das parturientes e 4,2% (1/24 – TDR HBsAg+) vs 10,7% (3/28 - IOB) entre os doentes internados. Para as parturientes portadoras de infeção ativa vs infeção oculta com genótipo E (47/51), não foi encontrada diferença estatística significativa ($p=0,2$). Entretanto, comparativamente entre o

subgrupo de doentes (51/51) portadores com TDR HBsAg+ vs IOB esta taxa foi significativa ($p=0.0$).

II – ANTIGÉNIO DE SUPERFÍCIE

Na Tabela 5, observa-se que ocorreu uma única mutação em 16/28 sequências, duas mutações identificaram-se 7/28 sequências e múltiplas mutações identificaram-se em 5/28 sequências, respetivamente.

Na Tabela 6, observa-se que no codão 127 registou-se também a substituição de um resíduo de lisina por prolina em 53,6% (15/28) dos casos. As demais substituições apresentam-se no codão 174, onde ocorreu a substituição de serina por asparagina em 17,9% (5/28) dos casos, seguindo-se o codão 178, com a substituição de prolina por lisina e, no codão 204 ocorreu a substituição de serina por asparagina, representando 14,3% (4/28), cada, respetivamente. As demais substituições ocorreram no codão 120, onde ocorreu a substituição de prolina por treonina, no codão 168 onde ocorreu a substituição de um resíduo de alanina por valina, no codão 173 onde ocorreu a substituição de lisina por prolina em 7,2% (2/28) dos casos respetivamente. As demais mutações ocorreram em 3,6% (1/28) cada, respetivamente

Observou-se que dentre estas sequências havia a presença de três codões (10,7% - 3/28) que apresentaram *quasispecies* virais, sendo a mutação sP142H/P (onde ocorreu a substituição de prolina/histidina/prolina) a mutação sK160N/S (onde ocorreu a substituição de lisina/asparagina/serina) a mutação s I195I/T (onde ocorreu a substituição de uma isoleucina por uma treonina) e sS204N/S (onde ocorreu a substituição de serina por asparagina), respetivamente.

A totalidade das sequências provenientes de doentes com IOB continha alterações, em maior proporção que a encontrada entre as sequências das parturientes com IOB (100% vs 60%). Foram identificadas seis mutações com importância clínica sendo mutações associadas ao de escape imunitário sP120T; sT126I; sQ129R; sG130R; sD144A; sD144E. Mutações de escape vacinal, as mutações sP120T; sQ129R e sD144E e parte destas já descrita nos pontos anteriores. Estes resultados, indicam que nestes doentes atendidos no HGB, havia maior número de mutantes de escape imunológico comparativamente ao detetado no subgrupo das parturientes com IOB. Parte destas mutações de escape imunitário e vacinal, encontram-se descritas por Gencay et al., (2018) em portadores sul africanos e, entre a pesquisa de Choga et al. (2019) em portadores moçambicanos e, entre a pesquisa de Konopleva et al. (2021) em

portadores russos e entre a pesquisa de Anejo-Okopi et al., (2022) entre portadores nigerianos assintomáticos.

As mutações sQ129R e sG130R foram detetadas no Botsuana, entre soros de doadores de sangue com IOB, com genótipo A e a mutação sD144A foi detetada em indivíduos com genótipo D (Choga et al., 2019). Estes autores, referem ser elevada a prevalência de mutantes de escape imune circulante, entre doadores de sangue e indivíduos coinfectados com HIV que foi calculada e 14%.

Konopleva et al. (2021) descrevem que entre as sequências de HBV obtidas de 56 soros de doentes russos com doença hematológica maligna havia várias variantes para um mesmo codão e eram diferentes entre os genótipos. O mesmo foi observado entre os nossos resultados, em sequências com genótipo E, pelo que se desconhece a sua implicação clínica. Estas alterações ocorreram nos codões 140, 144, 178, 193, 203 e 204.

A mutação sP120T é identificada como uma variante de escape vacinal do HBV e as variantes do codão sD144E têm sido identificadas como variantes de escape vacinal e de diagnóstico. As mutações que ocorrem nos codões 144 e 145 do S-HBs são identificadas como dominantes entre as estirpes do HBV, e circulantes entre portadores com doença crónica.

Na Nigéria, Anejo-Okopi et al. (2022) referem que entre 101 amostras derivadas de TDR HBsAg+ com o genótipo E identificaram dois tipos de mutações responsáveis por alterar a conformação proteica do HBsAg, a mutação L127R e a sG145A. Estas alterações contribuem para o fraco desempenho de alguns dos testes convencionais de diagnóstico serológico, originando resultados falsos negativos. No nosso estudo, detetaram-se variantes do codão sL127L (sL127P e sL127T), sendo que a sP127T é uma variante de escape imunitário. A sua presença ocorreu tanto em casos ligados a infeção ativa como à infeção oculta, pelo que seria interessante estudar estas alterações nas proteínas do HBsAg e relacionar com o desempenho de TDR alternativos para o HBsAg, para portadores do genótipo E.

A mutação sS140T está associada à fraca ou baixa capacidade de deteção em testes de diagnóstico serológico, descrita anteriormente. Por outro lado, confirmou-se que a mutação sP120T, uma mutação de escape vacinal relacionou-se com a mutação que ocorreu no domínio funcional da rtT128N, conforme observado no estudo de Amini-Bavil-Olyaei et al. (2010). Anteriormente, Pollicino et al. (2009) confirmaram que mutações presentes entre o

domínio rt-HBV e S-HBs, ocorreram em doentes virgens de tratamento com antivirais portadores de genótipo A e D. Mais tarde, Torresi et al., (2022) descrevem que a mutação rtT128I/N, observada neste domínio funcional do gene da polimerase viral do HBV, teve a capacidade de restaurar a carga viral do HBV a níveis semelhantes aos encontrados em portadores de vírus do tipo selvagem. Descrevem que esta mutação secundária ou compensatória é observada em portadores com perfil de resistência primária ao tratamento com Lamivudina. Por outro lado, esta mutação mantém-se estável e transmite-se pela população.

As mutações sT126I e a Q129R são mutações associadas ao escape imunitário. A mutação sT126I parece relacionar-se com a resistência ao tratamento com HBIg e a mutação sG130R está implicada na resistência ao tratamento com Lamivudina e à resistência ao tratamento com HBIg, respetivamente. A mutação sS140T também está associada à resistência ao tratamento com HBIg, e a sD144E está associada ao escape vacinal e à resistência ao tratamento com HBIg, igualmente (Choga et al., 2019; Tarafdar et al., 2022).

Assim, podemos observar que outras mutações ocorreram entre os domínios funcionais da região hidrofílica principal do HBsAg. As mesmas mutações contêm algumas referências descritas como associadas à deficiente maturação das partículas virais, à infeciosidade e a fraca compatibilidade com testes de diagnóstico imunológico. Porém, a presença de mutações na região do *loop* luminal do HBsAg, a saber a sS167L e para a região C-terminal da membrana basal do HBsAg, encontraram-se referências descritivas para a sS174N, sS175S e sV177A (Svicher et al., 2012) sendo que as mutações que ocorreram nas posições sS167L sS174N sS175S V177A foram detetadas entre as sequências de portadores com IOB.

Quanto à concordância de mutações de escape imunológico detetadas entre as diferentes localidades e pelos tipos de infeção, constata-se igualmente que é diminuta. Esta evidência também foi feita após a identificação e caracterização de mutantes de escape imune do HBV circulantes no Quênia por King et al. (2022).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de biologia molecular “*nested-PCR*” associada à detecção de dois genes parciais do HBV demonstrou ser precisa quando associada as ferramentas bioinformáticas. Esta técnica laboratorial orientada para suporte clínico e para a investigação demonstrou que a detecção de ácidos nucleicos do HBV é dependente do número de partículas vírais existente na amostra pelo que, torna-se importante quantificar futuramente a carga viral.

Através da caracterização parcial dos mesmos genes identificou-se os genótipos, os subtipos e as resistências naturais presentes no domínio funcional da transcriptase reversa e da pequena porção da proteína S do HBsAg. Assim, variantes vírais distintas circulam nas localidades do Lubango e de Benguela em populares com TDR HBsAg⁺ e TDR HBsAg⁻/DNA⁺ sendo que, a dispersão destas variantes do HBV poderá contribuir para a propagação entre os suscetíveis e, por sua vez pode comprometer os esforços dos Serviços de Saúde relacionados as metas da OMS para a eliminação do HBV até 2030.

Os casos detetados com IOB indicam que um TDR HBsAg com resultado negativo não exclui esta infeção endémica sendo que, o teste rápido utilizado INFO Turk HBsAg test, é preparado com anticorpos monoclonais anti-HBs específicos. Não detetou parte das nossas variantes sendo uma hipótese futura desenvolver outros testes adequados as nossas variantes.

Mutantes de resistência ao tratamento com inibidores da transcriptase reversa foram detetados entre os portadores com genótipo E, de resistência primária e resistência putativa, além de que uma quantidade significativa de mutações caracterizou o codão 126 do domínio da transcriptase reversa. Visto que há registo literário de que portadores infetados com genótipo E provavelmente necessitem de maior tempo de tratamento, comparativamente ao observado em portadores de genótipos diferentes, propomos estudos de suscetibilidade e resistência fenotípica (*in vitro*) em monoterapia ou em terapias combinadas com Tenofovir, o mesmo para as variantes de escape. Assim, identificaram-se elementos que poderão integrar testes “alternativos” aos TDRs-HBsAg convencionais visto que os testes moleculares são dispendiosos para os nossos países além de carecerem de técnicos de diagnóstico molecular

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasfard, Z., Kasraian, L., Farhadi, A., Jowkar, Z., Nejabat, N., Kargar, M., ... & Behzad-Behbahani, A. (2023). Detection of Hepatitis B Virus Genome with Mutations Outside the Major Hydrophilic Region in the Surface Antigen Isolated from Patients with Coexisting HBsAg and Anti-HBs. *Hepatitis Monthly*, 23(1).
- Adesina, O. A., Akanbi, O. A., Opaleye, O. O., Japhet, M. O., Wang, B., Oluyeye, A. O., ... & Bock, C. T. (2021). Detection of Q129H Immune Escape Mutation in Apparently Healthy Hepatitis B Virus Carriers in Southwestern Nigeria. *Viruses*, 13(7), 1273.
- Alter, H.J., (2003). The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera [J Am Med Assoc 1965;191:541–546]. *J. Hepatol.* 39, 149–152. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00157-0)
- Akanbi, O. A., Harms, D., Wang, B., Osundare, F. A., Adesina, O., Oluremi, A. S., ... & Bock, C. T. (2019). High frequency of drug resistance mutations in the HBV genome in ART-experienced HIV-coinfected patients in southwestern Nigeria. *Antiviral Therapy*, 24(7), 521-528.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Vucur, M., Luedde, T., Trautwein, C., & Tacke, F. (2010). Differential impact of immune escape mutations G145R and P120T on the replication of lamivudine-resistant hepatitis B virus e antigen-positive and-negative strains. *Journal of Virology*, 84(2), 1026-1033.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Herbers, U., Sheldon, J., Luedde, T., Trautwein, C., & Tacke, F. (2009). The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatology*, 49(4), 1158-1165.
- Anejo-Okopi, J., Okeke, E., Davwar, P. M., Onwuamah, C., Onywera, H., Omaiye, P., ... & Hawkins, C. (2022). Molecular detection of hepatitis B virus genotype E with immune escape mutations in chronic hepatitis B patients on long-term antiviral therapy in Jos, Nigeria. *African Journal of Laboratory Medicine*, 11(1), 7.
- Araujo, N. M., Teles, S. A., & Spitz, N. (2020). Comprehensive analysis of clinically significant hepatitis B virus mutations in relation to genotype, subgenotype and geographic region. *Frontiers in Microbiology*, 11, 616023.
- Archampong, T. N., Boyce, C. L., Lartey, M., Sagoe, K. W., Obo-Akwa, A., Kenu, E., ... & Kwara, A. (2017). HBV genotypes and drug resistance mutations in antiretroviral treatment-naïve and treatment-experienced HBV–HIV-coinfected patients. *Antiviral therapy*, 22(1), 13-20.
- Arikan, A., Sayan, M., Sanlidag, T., Suer, K., Akcali, S., & Guvenir, M. (2019). Evaluation of the/S Gene Overlapping Mutations in Chronic Hepatitis B Patients in Northern Cyprus. *Polish Journal of Microbiology*, 68(3), 317-322.
- Ave, A. R., Putra, A. E., & Miro, S. (2022). Gene X Two Triple Mutations Predominance on Chronic Hepatitis B Virus in Padang, West Sumatra Indonesia. *The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy*, 23(2), 106-111.
- Aydemir, S., Yildirmak, M.T., Sayan, M., Atak, S., Kucuk, M., (2019). A chronic hepatitis B patient infected with HBsAg diagnostic-escape strain in the presence of anti-HBs positivity. *Rev. Romana Med. Lab.* 27, 421–426. <https://doi.org/10.2478/rrlm-2019-0038>
- Ayed, K., Gorgi, Y., Ayed-Jendoubi, S., Aouadi, H., Sfar, I., Najjar, T., Ben Abdallah, T., (2007). Hepatitis B virus genotypes and precore/core-promoter mutations in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Infect.* 54, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.05.013>

- Baião, P. L. (2008). Prevalência das hepatites B e C em doadores de sangue e da hepatite B em gestantes no Kuito, Biê, Angola (*Doctoral dissertation, Instituto Oswaldo Cruz*).
- Bartenschlager, R., Schaller, H., (1992). Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J.* 11, 3413–3420. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05420.x>
- Bartholomeusz, A., Locarnini, S.A., (2006). Antiviral Drug Resistance: Clinical Consequences and Molecular Aspects. *Semin. Liver Dis.* 26, 162–170. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939758>
- Bartholomeusz, A., & Locarnini, S. (2006). Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *Journal of medical virology*, 78(S1), S52-S55.
- Beck, J., Nassal, M., (2007). Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol. WJG* 13, 48–64. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.48>
- Bissinger, A.L., Fehrle, C., Werner, C.R., Lauer, U.M., Malek, N.P., Berg, C.P., (2015). Epidemiology and Genotyping of Patients with Chronic Hepatitis B: Genotype Shifting Observed in Patients from Central Europe. *Pol. J. Microbiol.* 64, 15–21. <https://doi.org/10.33073/pjm-2015-002>
- Blanchet, M., Sureau, C., (2006). Analysis of the Cytosolic Domains of the Hepatitis B Virus Envelope Proteins for Their Function in Viral Particle Assembly and Infectivity. *J. Virol.* 80, 11935–11945. <https://doi.org/10.1128/JVI.00621-06>
- Blumberg, B.S., Alter, H.J., (1965). A “New” Antigen in Leukemia Sera. *JAMA* 191, 541–546. <https://doi.org/10.1001/jama.1965.03080070025007>
- Bond, W., Favero, M., Petersen, N., Gravelle, C., Ebert, J., & Maynard, J. (1981). Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. *Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week.*, 1, 550-551.
- Brah, S., Moussa, S., Inoua, A., Alhousseini, D. M., Daou, M., Madougou, B., ... & Colson, P. (2016). Molecular characterization of hepatitis B virus from chronically-infected patients in Niamey, Niger. *International journal of infectious diseases*, 45, 18-23.
- Breakwell, L., Tevi-Benissan, C., Childs, L., Mihigo, R., Tohme, R., (2017). The status of hepatitis B control in the African region. *Pan Afr. Med. J.* 27. <https://doi.org/10.11604/pamj.suppl.2017.27.3.11981>
- Bremer, C.M., Saniewski, M., Wend, U.C., Torres, P., Lelie, N., Gerlich, W.H., Glebe, D., (2009). Transient occult hepatitis B virus infection in a blood donor with high viremia. *Transfusion (Paris)* 49, 1621–1629. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02188.x>
- Bruss, Volker, Gerhardt, E., Vieluf, K., Wunderlich, G., (1996). Functions of the Large Hepatitis B Virus Surface Protein in Viral Particle Morphogenesis. *Intervirology* 39, 23–31. <https://doi.org/10.1159/000150471>
- Bruss, Volker, Hagelstein, J., Gerhardt, E., Galle, P.R., (1996). Myristylation of the Large Surface Protein Is Required for Hepatitis B Virusin Vitro Infectivity. *Virology* 218, 396–399. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0209>
- Burda, M.R., Günther, S., Dandri, M., Will, H., Petersen, J., (2001). Structural and functional heterogeneity of naturally occurring hepatitis B virus variants. *Antiviral Res.* 52, 125–138. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(01\)00177-2](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00177-2)
- Burdette, D., Hyrina, A., Song, Z., Beran, R. K., Cheung, T., Gilmore, S., ... & Lazerwith, S. (2023). Characterization of a Novel Capsid Assembly Modulator for the Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(1), e01348-22.

- Caligiuri, P., (2016). Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. *World J. Gastroenterol.* 22, 145. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.145>
- Candotti, D., Danso, K., & Allain, J. P. (2007). Maternofetal transmission of hepatitis B virus genotype E in Ghana, west Africa. *Journal of General Virology*, 88(10), 2686-2695.
- Carimo, A.A., Gudo, E.S., Maueia, C., Mabunda, N., Chambal, L., Vubil, A., Flora, A., Antunes, F., Bhatt, N., (2018). First report of occult hepatitis B infection among ART naïve HIV seropositive individuals in Maputo, Mozambique. *PLOS ONE* 13, e0190775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190775>
- Carman, W. F., Hadziyannis, S., McGarvey, M. J., Jacyna, M. R., Karayiannis, P., Makris, A., & Thomas, H. C. (1989). Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *The Lancet*, 334(8663), 588-591.
- Carman, W. F., Karayiannis, P., Waters, J., Thomas, H. C., Zanetti, A. R., Manzillo, G., & Zuckerman, A. T. (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *The lancet*, 336(8711), 325-329
- Chemin, I., Trépo, C., (2005). Clinical impact of occult HBV infections. *J. Clin. Virol.* 34, S15–S21. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(05\)80005-8](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(05)80005-8)
- Chen, S., Chen, H., Gao, S., Qiu, S., Zhou, H., Yu, M., Tu, J., (2017). Differential expression of plasma microRNA-125b in hepatitis B virus-related liver diseases and diagnostic potential for hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: Plasma miR-125b as biomarker for HBV-HCC. *Hepatol. Res.* 47, 312–320. <https://doi.org/10.1111/hepr.12739>
- Chen, Y., Robinson, W.S., Marion, P.L., (1994). Selected mutations of the duck hepatitis B virus P gene RNase H domain affect both RNA packaging and priming of minus-strand DNA synthesis. *J. Virol.* 68, 5232–5238. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.8.5232-5238.1994>
- Choi, Y. M., Lee, S. Y., & Kim, B. J. (2018). Naturally occurring hepatitis B virus reverse transcriptase mutations related to potential antiviral drug resistance and liver disease progression. *World journal of gastroenterology*, 24(16), 1708.
- Choga, W. T., Anderson, M., Zumbika, E., Moyo, S., Mbangiwa, T., Phinius, B. B., ... & Gaseitsiwe, S. (2019). Molecular characterization of hepatitis B virus in blood donors in Botswana. *Virus Genes*, 55(1), 33-42
- Chu, C.-M., Karayiannis, P., Fowler, M.J.F., Monjardino, J., Liaw, Y.-F., Thomas, H.C., (1985). Natural history of chronic hepatitis B virus infection in taiwan: Studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 5, 431–434. <https://doi.org/10.1002/hep.1840050315>
- Connors, E. E., Panagiotakopoulos, L., Hofmeister, M. G., Spradling, P. R., Hagan, L. M., Harris, A. M., ... & Wang, S. H. (2023). Screening and testing for hepatitis B virus infection: CDC recommendations—United States, 2023. *MMWR Recommendations and Reports*, 72(1), 1.
- Cooreman, M.P., Leroux-Roels, G., Paulij, W.P., (2001). Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J. Biomed. Sci.* 8, 237–247. <https://doi.org/10.1007/BF02256597>
- Coser, T. B., Chesky, M., Paris, F. D., Barth, A. L., Schmitt, V. M., & Machado, A. B. M. P. (2008). Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de PCR “nested” para o vírus da Hepatite B (HBV). *Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 28*, n. 1 (2008), p. 5-9.
- Courouc  -Pauty, A. M., Plan  on, A., & Soulier, J. P. (1983). Distribution of HB (s) Ag Subtypes in the World. *Vox sanguinis*, 44(4), 197-211.

- Croagh, C.M., Desmond, P.V., Bell, S.J., (2015). Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World J. Hepatol.* 7, 289–303. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i3.289>
- Dane, D. S., Cameron, C. H., & Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *The lancet*, 295(7649), 695-698.
- Dawood, A. A. (2022). Hepatitis Virus, Genotypes and B Subtypes. *Hepatitis B*, 17.
- Di Stefano M., Faleo, G., Leitner, T., Zheng, W., Zhang, Y., Hassan, A., ... & Santantonio, T. A. (2023). Molecular and Genetic Characterization of Hepatitis B Virus (HBV) among Saudi Chronically HBV-Infected Individuals. *Viruses*, 15(2), 458.
- Downs, L. O., Campbell, C., Yonga, P., Githinji, G., Ansari, M. A., Matthews, P. C., & Etyang, A. O. (2023). A systematic review of Hepatitis B virus (HBV) prevalence and genotypes in Kenya: Data to inform clinical care and health policy. *PLOS Global Public Health*, 3(1), e0001165.
- Echevarría, J. M., Avellón, A., & Magnius, L. O. (2005). Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *Journal of medical virology*, 76(2), 176-184.
- Egboh, S. M. C., & Davwar, P. M. (2023). The burden of occult hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma in Nigeria. *Gastroenterology, Hepatology and Endoscopy Practice*, 3(2), 35
- Eschlimann, M., Malvé, B., Velay, A., Fenaux, H., Berger, S., Fripiat, J. P., ... & Schvoerer, E. (2017). The variability of hepatitis B envelope is associated with HBs antigen persistence in either chronic or acute HBV genotype A infection. *Journal of Clinical Virology*, 94, 115-122.
- Fan, J., Zhang, Y., Xiong, H., Wang, Y., & Guo, X. (2015). Nucleotide analogue-resistant mutations in hepatitis B viral genomes found in hepatitis B patients. *Journal of General Virology*, 96 (3), 663-670.
- Fang, Z. L., Sabin, C. A., Dong, B. Q., Wei, S. C., Chen, Q. Y., Fang, K. X., ... & Harrison, T. J. (2009). The association of HBV core promoter double mutations (A1762T and G1764A) with viral load differs between HBeAg positive and anti-HBe positive individuals: a longitudinal analysis. *Journal of hepatology*, 50(2), 273-280.
- Farshadpour, F., Taherkhani, R., & Saberi, F. (2022). Molecular evaluation of hepatitis B virus infection and predominant mutations of pre-core, basal core promoter and S regions in an Iranian population with type 2 diabetes mellitus: a case–control study. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 1-11.
- Favero, M.S., Bond, W.W., Petersen, N.J., Berquist, K.R., Maynard, J.E., (1974). Detection Methods for Study of the Stability of Hepatitis B Antigen on Surfaces. *J. Infect. Dis.* 129, 210–212. <https://doi.org/10.1093/infdis/129.2.210>
- Fofana, D. B., Somboro, A. M., Maiga, M., Kampo, M. I., Diakité, B., Cissoko, Y., ... & Holl, J. L. (2023). Hepatitis B Virus in West African Children: Systematic Review and Meta-Analysis of HIV and Other Factors Associated with Hepatitis B Infection. *International journal of environmental research and public health*, 20(5), 4142.
- Fonseca, J.C.F. da, (2010). Histórico das hepatites virais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43, 322–330. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000300022>
- Forbi, J. C., Ben-Ayed, Y., Xia, G. L., Vaughan, G., Drobeniuc, J., Switzer, W. M., & Khudyakov, Y. E. (2013). Disparate distribution of hepatitis B virus genotypes in four sub-Saharan African countries. *Journal of Clinical Virology*, 58(1), 59-66.

- Forbi, J. C., Dillon, M., Purdy, M. A., Drammeh, B. S., Tejada-Strop, A., McGovern, D., ... & Khudyakov, Y. E. (2017). Molecular epidemiology of hepatitis B virus infection in Tanzania. *Journal of General Virology*, 98(5), 1048-1057.
- Fujii, H., Moriyama, K., Sakamoto, N., Kondo, T., Yasuda, K., Hiraizumi, Y., Yamazaki, M., Sakaki, Y., Okochi, K., Nakajima, E., (1992). Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1152–1157. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80003-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80003-8)
- Funk, M.L., Rosenberg, D.M., Lok, A.S.F., (2002). World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J. Viral Hepat.* 9, 52–61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2002.00304.x>
- Jiang, X., Chang, L., Yan, Y., & Wang, L. (2021). Paradoxical HBsAg and anti-HBs coexistence among chronic HBV infections: causes and consequences. *International journal of biological sciences*, 17(4), 1125.
- Galbraith, R. M., Williams, R., Eddleston, A. L. W. F., Zuckerman, A. J., & Bagshawe, K. D. (1975). Fulminant hepatic failure in leukaemia and choriocarcinoma related to withdrawal of cytotoxic drug therapy. *The Lancet*, 306(7934), 528-530.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P., (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. *Nature* 281, 646–650. <https://doi.org/10.1038/281646a0>
- Geffert, K., Maponga, T. G., Henerico, S., Preiser, W., Mongella, S., Stich, A., ... & Kasang, C. (2020). Prevalence of chronic HBV infection in pregnant woman attending antenatal care in a tertiary hospital in Mwanza, Tanzania: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases*, 20(1), 1-10.
- Gencay, M., Hübner, K., Gohl, P., Seffner, A., Weizenegger, M., Neofytos, D., ... & Kaminski, W. E. (2017). Ultra-deep sequencing reveals high prevalence and broad structural diversity of hepatitis B surface antigen mutations in a global population. *PloS one*, 12(5), e0172101.
- Gencay, M., Vermeulen, M., Neofytos, D., Westergaard, G., Pabinger, S., Kriegner, A., ... & Kaminski, W. E. (2018). Substantial variation in the hepatitis B surface antigen (HBsAg) in hepatitis B virus (HBV)-positive patients from South Africa: reliable detection of HBV by the Elecsys HBsAg II assay. *Journal of Clinical Virology*, 101, 38-43.
- Ghany, M.G., Doo, E.C., (2009). Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology* 49, S174–S184. <https://doi.org/10.1002/hep.22900>
- Ghany, M., & Liang, T. J. (2007). Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 132(4), 1574-1585.
- Golla, K., Epstein, J.B., Cabay, R.J., (2004). Liver disease: Current perspectives on medical and dental management. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. *Endodontology* 98, 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.09.011>
- Guidotti, L. G., & Chisari, F. V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1, 23-61.
- Guingané, A.N., Kaboré, R., Shimakawa, Y., Somé, E.N., Kania, D., Pisoni, A., Nagot, N., King, R., Sombié, R., Meda, N., Van de Perre, P., Tuaillon, E., (2022). Screening for Hepatitis B in partners and children of women positive for surface antigen, Burkina Faso. *Bull. World Health Organ.* 100, 256–267. <https://doi.org/10.2471/BLT.21.287015>

- Gutiérrez, C., Devesa, M., Loureiro, C.L., León, G., Liprandi, F., Pujol, F.H., (2004). Molecular and serological evaluation of surface antigen negative hepatitis B virus infection in blood donors from Venezuela. *J. Med. Virol.* 73, 200–207. <https://doi.org/10.1002/jmv.20076>
- Hadziyannis, S.J., (2011). Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African Countries. *J. Hepatol.* 55, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.030>
- Hamers, RL, Zaaier, HL, Wallis, CL, Siwale, M., Ive, P., Botes, ME, ... & De Wit, TFR (2013). Co-infecção HIV-HBV na África Austral e o efeito da TARVc contendo lamivudina versus tenofovir nos desfechos de HBV. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 64 (2), 174-182.
- Herbers, U., Amini-Bavil-Olyae, S., Mueller, A., Luedde, T., Trautwein, C., & Tacke, F. (2013). Hepatitis B e antigen-suppressing mutations enhance the replication efficiency of adefovir-resistant hepatitis B virus strains. *Journal of Viral Hepatitis*, 20(2), 141-148.
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., Gerlich, W.H., (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J. Virol.* 52, 396–402. <https://doi.org/10.1128/jvi.52.2.396-402.1984>
- Henry, S.H., Bosch, F.X., Bowers, J.C., (2002). Aflatoxin, Hepatitis and Worldwide Liver Cancer Risks, in: DeVries, J.W., Trucksess, M.W., Jackson, L.S. (Eds.), *Mycotoxins and Food Safety, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US, Boston, MA*, pp. 229–233. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0629-4_24
- Inoue, J., Sato, K., Ninomiya, M., Masamune, A., (2021). Envelope Proteins of Hepatitis B Virus: Molecular Biology and Involvement in Carcinogenesis. *Viruses* 13, 1124. <https://doi.org/10.3390/v13061124>
- Ismail, A. M., Ramachandran, J., Kannangai, R., & Abraham, P. (2014). Antiviral efficacy of adefovir dipivoxil in the treatment of chronic hepatitis B subjects from Indian subcontinent. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 32(1), 60-63.
- Ingasia, L. A. O., Kinge, C. W., & Kramvis, A. (2021). Genotype E: The neglected genotype of hepatitis B virus. *World Journal of Hepatology*, 13(12), 1875.
- Ingasia, L. A. O., Kostaki, E. G., Paraskevis, D., & Kramvis, A. (2020). Global and regional dispersal patterns of hepatitis B virus genotype E from and in Africa: A full-genome molecular analysis. *PLoS One*, 15(10), e0240375.
- Kafeero, H.M., Ndagire, D., Ocama, P., Walusansa, A., Sendagire, H., 2020. Sero-prevalence of human immunodeficiency virus–hepatitis B virus (HIV–HBV) co-infection among pregnant women attending antenatal care (ANC) in sub-Saharan Africa (SSA) and the associated risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Virol. J.* 17, 170. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01443-6>
- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H., Robinson, W.S., (1973). DNA Polymerase Associated with Human Hepatitis B Antigen. *J. Virol.* 12, 995–1005. <https://doi.org/10.1128/jvi.12.5.995-1005.1973>
- Karataş, E., Erensoy, S., Akarca, U. S., & Sertöz, R. (2018). Analysis of hepatitis B virus (HBV) preS1, preS2 and S gene regions from patient groups infected with HBV genotype D. *Mikrobiyoloji bulteni*, 52(1), 23-34.
- Kew, M.C., Kramvis, A., Yu, M.C., Arakawa, K., Hodgkinson, J., (2005). Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-saharan Africans. *J. Med. Virol.* 75, 513–521. <https://doi.org/10.1002/jmv.20311>

- King, R. E., Kimotho, J., Macharia, R., Ndung'u, F. N., Nzou, S. M., & Irekwa, R. M. (2022). Identification and Characterization of Hepatitis B Virus Immune Escape Mutants in Kenya. *American Journal of Molecular Biology*, 13(1), 1-17.
- Knöll, A., Boehm, S., Hahn, J., Holler, E., Jilg, W., (2007). Long-term surveillance of haematopoietic stem cell recipients with resolved hepatitis B: high risk of viral reactivation even in a recipient with a vaccinated donor. *J. Viral Hepat.* 14, 478–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00830.x>
- Kramvis, A. (2018). Molecular characteristics and clinical relevance of African genotypes and subgenotypes of hepatitis B virus. *SAMJ: South African Medical Journal*, 108(8), 17-21.
- Kramvis, A., (2014). Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus. *Intervirology* 57, 141–150. <https://doi.org/10.1159/000360947>
- Kramvis, A., Kew, M.C., (2007). Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatol. Res.* 37, S9–S19. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00098.x>
- Kramvis, A., Kew, M., François, G., 2005a. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23, 2409–2423. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.045>
- Kramvis, A., Restorp, K., Norder, H., Botha, J.F., Magnus, L.O., Kew, M.C., (2005b). Full genome analysis of hepatitis B virus genotype E strains from South-Western Africa and madagascar reveals low genetic variability. *J. Med. Virol.* 77, 47–52. <https://doi.org/10.1002/jmv.20412>
- Krugman, S., (1982). The Newly Licensed Hepatitis B Vaccine: Characteristics and Indications for Use. *JAMA* 247, 2012–2015. <https://doi.org/10.1001/jama.1982.03320390074052>
- Krugman, S., Giles, J.P., Hammond, J., (1971). Viral Hepatitis, Type B (MS-2 Strain): Prevention With Specific Hepatitis B Immune Serum Globulin. *JAMA* 218, 1665–1670. <https://doi.org/10.1001/jama.1971.03190240019005>
- Kocher, A., Papac, L., Barquera, R., Key, F. M., Spyrou, M. A., Hübler, R., ... & Moiseyev, V. (2021). Ten millennia of hepatitis B virus evolution. *Science*, 374(6564), 182-188.
- Konopleva, M. V., Belenikin, M. S., Shanko, A. V., Bazhenov, A. I., Kiryanov, S. A., Tupoleva, T. A., ... & Suslov, A. P. (2021). Detection of s-hbsag mutations in patients with hematologic malignancies. *Diagnostics*, 11(6), 969.
- Koyaweda, G. W., Ongus, J. R., Machuka, E., Juma, J., Macharia, R., Komasa, N. P., & Pelle, R. (2020). Detection of circulating hepatitis B virus immune escape and polymerase mutants among HBV-positive patients attending Institut Pasteur de Bangui, Central African Republic. *International Journal of Infectious Diseases*, 90, 138-144.
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., & Mizokami, M. (2010). Diversidade geográfica e genética do vírus da hepatite B humana. *Hepatology Research*, 40 (1), 14-30.
- Lago, B.V., Mello, F.C., Ribas, F.S., Valente, F., Soares, C.C., Niel, C., Gomes, S.A., (2014). Analysis of Complete Nucleotide Sequences of Angolan Hepatitis B Virus Isolates Reveals the Existence of a Separate Lineage within Genotype E. *PLoS ONE* 9, e92223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092223>
- Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., Buti, M., Janssen, H. L., Papatheodoridis, G., ... & Tacke, F. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*, 67(2), 370-398.

- Lawrence, P., Chabane, M., Abrouk, L., Thiesson, A., Berthé, D., Diarra, A. B., ... & Gormally, E. (2023). First Molecular Characterization of Chronic Hepatitis B Carriers in Timbuktu, Mali. *Diagnostics*, 13(3), 375.
- Le Bouvier, G. L. (1971). The heterogeneity of Australia antigen. *Journal of Infectious Diseases*, 123(6), 671-675.
- Lemoine, M., Thursz, M.R., (2017). Battlefield against hepatitis B infection and HCC in Africa. *J. Hepatol.* 66, 645–654. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.013>
- Levrero, M., Pollicino, T., Petersen, J., Belloni, L., Raimondo, G., Dandri, M., (2009). Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 51, 581–592. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.022>
- Lindh, M., Rydell, G.E., Larsson, S.B., (2018). Impact of integrated viral DNA on the goal to clear hepatitis B surface antigen with different therapeutic strategies. *Curr. Opin. Virol., Antiviral strategies* 30, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.01.011>
- Liu, S., Koh, S., Lee, C., (2016). Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 940. <https://doi.org/10.3390/ijms17060940>
- Ma, Q., & Wang, Y. (2012). Comprehensive analysis of the prevalence of hepatitis B virus escape mutations in the major hydrophilic region of surface antigen. *Journal of medical virology*, 84(2), 198-206.
- Magnius, L., Mason, W.S., Taylor, J., Kann, M., Glebe, D., Dény, P., Sureau, C., Norder, H., ICTV Report ConsortiumYR (2020), n.d. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae. *J. Gen. Virol.* 101, 571–572. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001415>
- Makiala-Mandanda, S., Le Gal, F., Ngwaka-Matsung, N., Ahuka-Mundeke, S., Onanga, R., Bivigou-Mboumba, B., ... & Becquart, P. (2017). High prevalence and diversity of hepatitis viruses in suspected cases of yellow fever in the Democratic Republic of Congo. *Journal of clinical microbiology*, 55(5), 1299-1312.
- Makvandi, M., (2016). Update on occult hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 22, 8720. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i39.8720>
- Mantovani, N., Cicero, M., Santana, L. C., Silveira, C., do Carmo, E. P., Abrão, P. R. F., ... & Komninakis, S. V. (2013). Detection of lamivudine-resistant variants and mutations related to reduced antigenicity of HBsAg in individuals from the cities of Santos and São Paulo, Brazil. *Virology journal*, 10(1), 1-5.
- Mathew, A., Ismael, N., Meeds, H., Vubil, A., Zicai, A. F., Mabunda, N., & Blackard, J. T. (2023). Hepatitis B virus genotypes and drug resistance mutations circulating in blood donors in Beira, Mozambique. *PLoS One*, 18(2), e0281855.
- Mello, V. D. M. D., Nunes, J. P. D. S., Sousa, P. S. F. D., Portilho, M. M., Ginunino, C. F., Fernandes, C. A. D. S., ... & Peliganga, L. B. (2018). Detecção de casos de Hepatite B oculta em amostras de doadores de sangue previamente testados com testes rápidos.
- Menéndez-Arias, L., Álvarez, M., Pacheco, B., (2014). Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Curr. Opin. Virol.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.04.005>
- Mirandola, S., Sebastiani, G., Rossi, C., Velo, E., Erne, E. M., Vario, A., ... & Alberti, A. (2012). Genotype-specific mutations in the polymerase gene of hepatitis B virus potentially associated with resistance to oral antiviral therapy. *Antiviral research*, 96(3), 422-429.

- Mokaya, J., McNaughton, A. L., Hadley, M. J., Beloukas, A., Geretti, A. M., Goedhals, D., & Matthews, P. C. (2018). A systematic review of hepatitis B virus (HBV) drug and vaccine escape mutations in Africa: A call for urgent action. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(8), e0006629.
- Mokaya, J., McNaughton, A. L., Bester, P. A., Goedhals, D., Barnes, E., Marsden, B. D., & Matthews, P. C. (2020). Hepatitis B virus resistance to tenofovir: fact or fiction? A systematic literature review and structural analysis of drug resistance mechanisms. *Wellcome open research*, 5.
- Mokaya, J., Maponga, T. G., McNaughton, A. L., Van Schalkwyk, M., Hugo, S., Singer, J. B., ... & Matthews, P. C. (2020). Evidence of tenofovir resistance in chronic hepatitis B virus (HBV) infection: An observational case series of South African adults. *Journal of Clinical Virology*, 129, 104548.
- Mokaya, J., Vasylyeva, T. I., Barnes, E., Ansari, M. A., Pybus, O. G., & Matthews, P. C. (2021). Global prevalence and phylogeny of hepatitis B virus (HBV) drug and vaccine resistance mutations. *Journal of Viral Hepatitis*, 28(8), 1110-1120.
- Moradi, A., Zhand, S., Ghaemi, A., Javid, N., Tabarraei, A., (2012). Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Golestan Province-Iran. *Virus Genes* 44, 382–387. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0715-z>.
- Morales-Romero, J., Vargas, G., García-Román, R., (2014). Occult HBV Infection: A Faceless Enemy in Liver Cancer Development. *Viruses* 6, 1590–1611. <https://doi.org/10.3390/v6041590>.
- Moriyama, K., Okamoto, H., Tsuda, F., Mayumi, M., (1996). Reduced Precore Transcription and Enhanced Core-Pregenome Transcription of Hepatitis B Virus DNA after Replacement of the Precore-Core Promoter with Sequences Associated with e Antigen-Seronegative Persistent Infections. *Virology* 226, 269–280. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0655>.
- Manuylov, V., Chulanov, V., Bezuglova, L., Chub, E., Karlsen, A., Kyuregyan, K., ... & Norder, H. (2022). Genetic diversity and possible origins of the hepatitis B virus in Siberian natives. *Viruses*, 14(11), 2465.
- Nassal, M., Schaller, H., (1996). Hepatitis B virus replication-an update. *J. Viral Hepat.* 3, 217–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.1996.tb00047.x>
- Ngui, S.L., Hallet, R., Teo, C.G., (1999). Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. *Rev. Med. Virol.* 9, 183–209. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1654\(199907/09\)9:3<183::AID-RMV248>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1654(199907/09)9:3<183::AID-RMV248>3.0.CO;2-P)
- Nguyen, M.H., Wong, G., Gane, E., Kao, J.-H., Dusheiko, G., (2020). Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 33, e00046-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-19>
- Niederhauser, C., Graziani, M., Stolz, M., Tinguely, C., Schneider, P., & Mansouri, T. (2008). Blood donor screening: how to decrease the risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus?. *Swiss medical weekly*, 138(0910), 134-141.
- Norder, H., Couroucé, A. M., & Magnius, L. O. (1992). Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *Journal of General Virology*, 73(12), 3141-3145.
- Norder, H., Hammas, B., Lee, S. D., Bile, K., Couroucé, A. M., Mushahwar, I. K., & Magnius, L. O. (1993). Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *Journal of General Virology*, 74(7), 1341-1348.

- Norder, H., Couroucé, A.-M., Magnius, L.O., (1994). Complete Genomes, Phylogenetic Relatedness, and Structural Proteins of Six Strains of the Hepatitis B Virus, Four of Which Represent Two New Genotypes. *Virology* 198, 489–503. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1060>
- Norder, H., Couroucé, A. M., Coursaget, P., Echevarria, J. M., Lee, S. D., Mushahwar, I. K., ... & Magnius, L. O. (2004). Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 47(6), 289-309.
- Ocana, S., Casas, M. L., Buhigas, I., & Lledo, J. L. (2011). Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(12), 1553. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1553>
- Olinger, C. M., Weber, B., Otegbayo, J. A., Ammerlaan, W., van der Taelem-Brulé, N., & Muller, C. P. (2007). Hepatitis B virus genotype E surface antigen detection with different immunoassays and diagnostic impact of mutations in the preS/S gene. *Medical microbiology and immunology*, 196(4), 247-252.
- Okamoto, H., Imai, M., Kametani, M., Nakamura, T., Mayumi, M., (1987). Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn. J. Exp. Med.* 57, 231–236.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R.I., Imai, M., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1988), n.d. Typing Hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes. *J. Gen. Virol.* 69, 2575–2583. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-10-2575>
- Olinger, C.M., Venard, V., Njayou, M., Oyefolu, A.O.B., Maïga, I., Kemp, A.J., Omilabu, S.A., le Faou, A., Muller, C.P., (2006). Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J. Gen. Virol.* 87, 1163–1173. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81614-0>
- Oliveira, D., Martins, M. do R., Castro, R., Cordeiro, L., Barroso, M.R., Nazaré, M.A., Pereira, F., (2020a). Seropositivity rate and sociodemographic factors associated to HIV, HBV, HCV and syphilis among parturients from Irene Neto Maternity of Lubango city, Angola. *Sex. Transm. Infect.* 96, 587–589. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2019-054249>
- Oliveira, D., Martins, M. do R., Castro, R., Cordeiro, L., Barroso, M.R., Nazaré, M.A., Pereira, F., (2020b). HIV, HBV and syphilis screening in antenatal care in Lubango, Angola. *Sex. Transm. Infect.* 96, 621–622. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2019-054407>
- Oliveira, D., Piedade, J., Castro, R., Lopes, Â., Martins, M. do R., Pereira, F., (2021). Evaluating vertical transmission of sexually transmitted infections to newborns. *J. Infect. Dev. Ctries.* 15, 1547–1550. <https://doi.org/10.3855/jidc.12731>
- Olivier, G. L., d'Aquin, T. T., Renaud, D. J. J., N'DIN, J. L. P., Emmanuel, B. R. O. U., Flore, F. I. E. N. I., & Roland, A. B. Y. (2020) Resistance of HBV to nucleoside reverse transcriptase inhibitors and its impact on surface antigen in HBV-HIV co-infected patients in Abidjan. *International Journal of Biochemistry, Bioinformatics and Biotechnology Studies* Vol.5, No.2, pp.23-40
- Olusola, B.A., Faneye, A.O., Oluwasemowo, O.O., Motayo, B.O., Adebayo, S., Oludiran-Ayoade, A.E., Aleru, B., George, U.E., Oragwa, A.O., (2021). Profiles of mutations in hepatitis B virus surface and polymerase genes isolated from treatment-naïve Nigerians infected with genotype E. *J. Med. Microbiol.* 70. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001338>
- Oluyinka, O.O., Tong, H.V., Bui Tien, S., Fagbami, A.H., Adekanle, O., Ojurongbe, O., Bock, C.-T., Kremsner, P.G., Velavan, T.P., (2015). Occult Hepatitis B Virus Infection in Nigerian Blood

- Donors and Hepatitis B Virus Transmission Risks. *PLOS ONE* 10, e0131912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131912>
- Panduro, A., Maldonado-Gonzalez, M., Fierro, N.A., Roman, S., (2013). Distribution of HBV genotypes F and H in Mexico and Central America. *Antivir. Ther.* 18, 475–484. <https://doi.org/10.3851/IMP2605>
- Panigrahi, R., Biswas, A., De, B. K., Chakrabarti, S., & Chakravarty, R. (2013). Characterization of antiviral resistance mutations among the Eastern Indian Hepatitis B virus infected population. *Virology journal*, 10(1), 1-5.
- Paraskevis, D., Magiorkinis, G., Magiorkinis, E., Ho, S.Y.W., Belshaw, R., Allain, J.-P., Hatzakis, A., (2013). Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology* 57, 908–916. <https://doi.org/10.1002/hep.26079>
- Park, E. S., Lee, A. R., Kim, D. H., Lee, J. H., Yoo, J. J., Ahn, S. H., ... & Kim, K. H. (2019). Identification of a quadruple mutation that confers tenofovir resistance in chronic hepatitis B patients. *Journal of Hepatology*, 70(6), 1093-1102.
- Patel, N.H., Meier-Stephenson, V., Genetu, M., Dantie, D., Abate, E., Alemu, S., Aleka, Y., Van Marle, G., Fonseca, K., Coffin, C.S., Deressa, T., (2020). Prevalence and genetic variability of occult hepatitis B virus in a human immunodeficiency virus positive patient cohort in Gondar, Ethiopia. *PLOS ONE* 15, e0242577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242577>
- Paterlini, P., Gerken, G., Nakajima, E., Terre, S., D'Errico, A., Grigioni, W., Nalpas, B., Franco, D., Wands, J., Kew, M., Pisi, E., Tiollais, P., Bréchet, C., (1990). Polymerase Chain Reaction to Detect Hepatitis B Virus DNA and RNA Sequences in Primary Liver Cancers from Patients Negative for Hepatitis B Surface Antigen. *N. Engl. J. Med.* 323, 80–85. <https://doi.org/10.1056/NEJM199007123230202>
- Pawlotsky, J.-M., (2005). The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J. Clin. Virol.* 34, S125–S129. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(05\)80021-6](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(05)80021-6)
- Penna, A., Artini, M., Cavalli, A., Levrero, M., Bertoletti, A., Pilli, M., Chisari, F.V., Rehermann, B., Del Prete, G., Fiaccadori, F., Ferrari, C., (1996). Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J. Clin. Invest.* 98, 1185–1194. <https://doi.org/10.1172/JCI118902>
- Pierra Rouviere, C., Dousson, C.B., Tavis, J.E., (2020). HBV replication inhibitors. *Antiviral Res.* 179, 104815. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104815>
- Pinho, J. R. R. (2005). Diagnóstico contemporâneo da hepatite B oculta ou críptica. *Einstein*, (1), 32-8.
- Phinius, B. B., Anderson, M., Gobe, I., Mokomane, M., Choga, W. T., Mutenga, S. R., ... & Gaseitsiwe, S. (2023). High Prevalence of Hepatitis B Virus Infection Among People Living with HIV in Rural and Peri-urban Communities in Botswana. In *Open Forum Infectious Diseases*.
- Pollicino, T., Isgrò, G., Di Stefano, R., Ferraro, D., Maimone, S., Brancatelli, S., ... & Raimondo, G. (2009). Variability of reverse transcriptase and overlapping S gene in hepatitis B virus isolates from untreated and lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *Antiviral therapy*, 14(5), 649-654.
- Pollicino, T. (2022). Global burden of occult hepatitis B virus infection: where we are and what to do. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 7(10), 899-900.
- Pondé, R. A. D. A. (2019). Expression and detection of anti-HBs antibodies after hepatitis B virus infection or vaccination in the context of protective immunity. *Archives of Virology*, 164(11), 2645-2658. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04369-9>

- Prince, A.M., (1968). An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 60, 814–821.
- Phung, T. T. B., Chu, S. V., Vu, S. T., Pham, H. T., Nguyen, H. M., Nguyen, H. D., ... & Nguyen, A. T. V. (2020). COLD-PCR method for early detection of antiviral drug-resistance mutations in treatment-naïve children with chronic hepatitis B. *Diagnostics*, 10(7), 491
- Raheel, M., Choga, W. T., & Blackard, J. T. (2020). The distribution of hepatitis B virus surface antigen polymorphisms at positions associated with vaccine escape. *Journal of Medical Virology*, 92(12), 3336-3343.
- Radziwill, G., Tucker, W., Schaller, H., 1990. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J. Virol.* 64, 613–620. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.2.613-620.1990>
- Rahman, Md.A., Hakim, F., Ahmed, M., Ahsan, C.R., Nessa, J., Yasmin, M., 2016. Prevalence of genotypes and subtypes of hepatitis B viruses in Bangladeshi population. *SpringerPlus* 5, 278. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1840-2>
- Raimondo, G., Pollicino, T., Cacciola, I., Squadrito, G., (2007). Occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 46, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.10.007>
- Raimondo, G., Filomia, R., Maimone, S., (2014). Therapy of Occult Hepatitis B Virus Infection and Prevention of Reactivation. *Intervirology* 57, 189–195. <https://doi.org/10.1159/000360943>
- Raimondo, G., Locarnini, S., Pollicino, T., Levrero, M., Zoulim, F., Lok, A.S., Allain, J.-P., Berg, T., Bertoletti, A., Brunetto, M.R., Bruno, R., Chen, D.-S., Coppola, N., Cornberg, M., Craxì, A., Dandri, M., Di Marco, V., Ferrari, C., Gaeta, G.B., Glebe, D., Guidotti, L.G., Kramvis, A., Lampertico, P., Li, C., Liang, J., Marzano, A., Michalak, T.I., Pawlotsky, J.-M., Prati, D., Puoti, M., Samuel, D., Soriano, V., Squadrito, G., Sureau, C., Trepo, C., Yuen, M.-F., (2019). Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 71, 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
- Raimondo, G., Locarnini, S., Pollicino, T., Levrero, M., Zoulim, F., & Lok, A. S. (2019). Taormina workshop on occult HBV infection faculty members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 71(2), 397-408.
- Raheel, M., Choga, W. T., & Blackard, J. T. (2020). The distribution of hepatitis B virus surface antigen polymorphisms at positions associated with vaccine escape. *Journal of Medical Virology*, 92(12), 3336-3343.
- Rhee, S. Y., Kassaye, S. G., Barrow, G., Sundaramurthi, J. C., Jordan, M. R., & Shafer, R. W. (2020). HIV-1 transmitted drug resistance surveillance: shifting trends in study design and prevalence estimates. *Journal of the International AIDS Society*, 23(9), e25611.
- Rizzo, G. E. M., Celsa, C., Enea, M., Di Maria, G., Vaccaro, M., Rancatore, G., ... & Cammà, C. (2023). Risk factors for viral reactivation in patients with overt or occult Hepatitis B Virus infection receiving immunosuppressive treatments: A systematic review and meta-analysis with decision curve analysis. *Digestive and Liver Disease*, 55, S16.
- Rodriguez Lay, L. A., Corredor, M. B., Villalba, M. C., Frometa, S. S., Wong, M. S., Valdes, L., ... & Muller, C. P. (2015). Genetic diversity of the hepatitis B virus strains in Cuba: absence of West-African genotypes despite the Transatlantic Slave Trade. *PloS one*, 10(5), e0125052.
- Roediger, R., Smyth, E. K., & Dieterich, D. (2022). Adefovir for lamivudine-resistant hepatitis B. *Antiviral Therapy*, 27(2), 13596535211067605.
- Rose, R. E., Hernandez, D., Falk, P. J., Ericson, K., Zhou, N., Thiry, A., & McPhee, F (2018). Discovery of the Novel Entecavir-Resistant Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase A181C

- Substitution From an Integrated Genotypic Analysis. *Hepatology Communications*, 2(9), 1123-1135.
- Said, Z.N.A., (2011). An overview of occult hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol. WJG* 17, 1927–1938. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i15.1927>
- Salarnia, F., Besharat, S., Zhand, S., Javid, N., Khodabakhshi, B., & Moradi, A. (2017). Mutations in hepatitis-B X-gene region: Chronic hepatitis-B versus cirrhosis. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(3), OC31
- Santantonio, T., Fasano, M., (2013). Current Concepts on Management of Chronic Hepatitis B, in: Serviddio, G. (Ed.), Practical Management of Chronic Viral Hepatitis. *InTech*. <https://doi.org/10.5772/54759>
- Schaefer, S., (2007). Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol. WJG* 13, 14–21. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.14>
- Schaefer, S., Glebe, D., Wend, U.C., Oyunbileg, J., Gerlich, W.H., (2003). Universal primers for real-time amplification of DNA from all known Orthohepadnavirus species. *J. Clin. Virol.* 27, 30–37. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(02\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(02)00108-7)
- Schaefer, S. (2007). Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatology Research*, 37, S20-S26.
- Schulze, A., Gripon, P., Urban, S., (2007). Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 46, 1759–1768. <https://doi.org/10.1002/hep.21896>
- Schweitzer, A., Horn, J., Mikolajczyk, R.T., Krause, G., Ott, J.J., (2015). Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *The Lancet* 386, 1546–1555. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X)
- Seeger, C., Mason, W.S., (2000). Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 51–68. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.51-68.2000>
- Sheldon, J., Camino, N., Rodés, B., Bartholomeusz, A., Kuiper, M., Tacke, F., ... & Soriano, V. (2005). Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antiviral therapy*, 10(6), 727-734.
- Sheldon, J., Rodes, B., Zoulim, F., Bartholomeusz, A., & Soriano, V. (2006). Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *Journal of viral hepatitis*, 13(7), 427-434
- Sitnik, R., Sette Jr, H., Santana, R.A.F., Menezes, L.C., Graça, C.H.N., Dastoli, G.T.F., Silbert, S., Pinho, J.R.R., (2007). Hepatitis B virus genotype E detected in Brazil in an African patient who is a frequent traveler. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 1689–1692. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000185>
- Stevens, C.E., Taylor, P.E., Tong, M.J., Toy, P.T., Vyas, G.N., Nair, P.V., Weissman, J.Y., Krugman, S., (1987). Yeast-Recombinant Hepatitis B Vaccine: Efficacy With Hepatitis B Immune Globulin in Prevention of Perinatal Hepatitis B Virus Transmission. *JAMA* 257, 2612–2616. <https://doi.org/10.1001/jama.1987.03390190090026>
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R.F., Rossau, R., (2000). A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Microbiology* 81, 67–74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-67>
- Stuyver, L.J., Locarnini, S.A., Lok, A., Richman, D.D., Carman, W.F., Dienstag, J.L., Schinazi, R.F., (2003) The Hep Dart International Committee,. Chapter 28 - Nomenclature for antiviral

- resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region, in: Schinazi, R.F., Sommadossi, J.-P., Rice, C.M. (Eds.), *Frontiers in Viral Hepatitis*. Elsevier, Amsterdam, pp. 335–351. <https://doi.org/10.1016/B978-044450986-4/50079-5>
- Su, M., Xiang, K., Li, Y., Li, Y., Deng, J., Xu, X., ... & Li, T. (2016). Higher detection rates of amino acid substitutions in HBV reverse transcriptase/surface protein overlapping sequence is correlated with lower serum HBV DNA and HBsAg levels in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with subgenotype B2. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 275-281.
- Sumer, U., Sayan, M., (2019). Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus in Turkish Cypriot. *Pol. J. Microbiol.* 68, 449–456. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-044>
- Sunbul, M., (2014). Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 5427–5434. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5427>
- Svicher, V., Cento, V., Bernassola, M., Neumann-Fraune, M., Van Hemert, F., Chen, M., ... & Perno, C. F. (2012). Novel HBsAg markers tightly correlate with occult HBV infection and strongly affect HBsAg detection. *Antiviral research*, 93(1), 86-93.
- Tabor, E., Hoofnagle, J.H., Smallwood, L.A., Drucker, J.A., Pineda-Tamondong, G.C., Ni, L.Y., Greenwalt, T.J., Barker, L.F., Gerety, R.J., (1979). Studies of Donors Who Transmit Posttransfusion Hepatitis. *Transfusion (Paris)* 19, 725–731. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1979.19680104098.x>
- Tarafdar, S., Virata, M. L., Yan, H., Zhong, L., Deng, L., Xu, Y., ... & Zhang, P. (2022). Multiple epitopes of hepatitis B virus surface antigen targeted by human plasma-derived immunoglobulins coincide with clinically observed escape mutations. *Journal of Medical Virology*, 94(2), 649-658.
- Tarocchi, M., (2014). Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 20, 11630. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11630>
- Tatematsu, K., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Sugauchi, F., Mano, S., Maeshiro, T., Nakayoshi, T., Wakuta, M., Miyakawa, Y., Mizokami, M., (2009). A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. *J. Virol.* 83, 10538–10547. <https://doi.org/10.1128/JVI.00462-09>
- Tchuem, C.R.T., Brandt, L., Nel, E.D. la R., Cotton, M.F., Matthews, P., Kaindjee-Tjituka, F., Preiser, W., Andersson, M.I., (2020). Hepatitis B virus drug resistance mutations in HIV/HBV co-infected children in Windhoek, Namibia. *PLOS ONE* 15, e0238839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238839>
- Torresi, J. (2002). The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *Journal of clinical virology*, 25(2), 97-106.
- Torresi, J., Earnest-Silveira, L., Civitico, G., Walters, T. E., Lewin, S. R., Fyfe, J., ... & Bock, T. C. (2002). Restoration of replication phenotype of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by compensatory changes in the “fingers” subdomain of the viral polymerase selected as a consequence of mutations in the overlapping S gene. *Virology*, 299(1), 88-99.
- Toyé, R. M., Loureiro, C. L., Jaspe, R. C., Zoulim, F., Pujol, F. H., & Chemin, I. (2023). The Hepatitis B Virus Genotypes E to J: The Overlooked Genotypes. *Microorganisms*, 11(8), 1908.
- Toyé, R. M., Cohen, D., Pujol, F. H., Sow-Sall, A., Lô, G., Hoshino, K., ... & Chemin, I. (2021). Hepatitis B virus genotype study in West Africa reveals an expanding clade of subgenotype A4. *Microorganisms*, 9(3), 623

- Tran, T.T., Martin, P., (2004). Hepatitis B: epidemiology and natural history. *Clin. Liver Dis., Hepatitis B* 8, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.02.008>.
- Tsukuda, S., Watashi, K., (2020). Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res.* 182, 104925. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104925>
- Valente, F., Lago, B.V. do, Castro, C.A.V. de, Almeida, A.J. de, Gomes, S.A., Soares, C.C., (2010). Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 970–977. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000800004>
- Velkov, S., Protzer, U., Michler, T., (2020). Global Occurrence of Clinically Relevant Hepatitis B Virus Variants as Found by Analysis of Publicly Available Sequencing Data. *Viruses* 12, 1344. <https://doi.org/10.3390/v12111344>
- Wandeler, G., Musukuma, K., Zürcher, S., Vinikoor, M. J., Llenas-García, J., Aly, M. M., ... & leDEA-Southern Africa. (2016). Hepatitis B infection, viral load and resistance in HIV-infected patients in Mozambique and Zambia. *PloS one*, 11(3), e0152043.
- Wang, M., Xu, R., Huang, J., Liao, Q., Tang, X., Shan, Z., ... & Fu, Y. (2022). Molecular characteristics of the full-length genome of occult hepatitis B virus from blood donors in China. *Scientific Reports*, 12(1), 1-11.
- Wang, Q., Qin, Y., Zhang, J., Jia, L., Fu, S., Wang, Y., Li, J., Tong, S., (2020). Tracing the evolutionary history of hepadnaviruses in terms of e antigen and middle envelope protein expression or processing. *Virus Res.* 276, 197825. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197825>
- Wongjarupong, N., Yonli, A. T., Nagalo, B. M., Djigma, F. W., Somda, S. K., Hassan, M. A., ... & Roberts, L. R. (2020). Characteristics of patients with chronic hepatitis B virus infection with genotype E predominance in Burkina Faso. *Hepatology communications*, 4(12), 1781-1792.
- Xu, J., Wu, B., Wang, J. H., Huang, L., Wang, D. Y., Zhao, L., ... & Wang, Y. (2015). Pre-existing mutations in reverse transcriptase of hepatitis B virus in treatment-naïve Chinese patients with chronic hepatitis B. *PLoS One*, 10(3), e0117429.
- Yano, Y., (2015). Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J. Hepatol.* 7, 583. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i3.583>
- Yefimenko, L., Gasparinho, C., Lopes, Â., Castro, R., & Pereira, F. (2023). Treponema pallidum infection rate in patients attending the general hospital of Benguela, Angola. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 17(01), 125-128.
- Zahn, A., Li, C., Danso, K., Candotti, D., Owusu-Ofori, S., Temple, J., Allain, J.-P., (2008). Molecular characterization of occult hepatitis B virus in genotype E-infected subjects. *J. Gen. Virol.* 89, 409–418. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83347-0>
- Zhang, M., Ge, G., Yang, Y., Cai, X., Fu, Q., Cai, J., & Huang, Z. (2013). Decreased antigenicity profiles of immune-escaped and drug-resistant hepatitis B surface antigen (HBsAg) double mutants. *Virology journal*, 10(1), 1-9.
- Zhang, Q., Liao, Y., Cai, B., Li, Y., Li, L., Zhang, J., An, Y., Wang, L., (2015). Incidence of natural resistance mutations in naïve chronic hepatitis B patients: A systematic review and meta-analysis: Hepatitis B virus natural mutation rate. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30, 252–261. <https://doi.org/10.1111/jgh.12831>
- Zhang, X., Chen, X., Wei, M., Zhang, C., Xu, T., Liu, L., & Xu, Z. (2019). Potential resistant mutations within HBV reverse transcriptase sequences in nucleos (t) ide analogues-experienced patients with hepatitis B virus infection. *Scientific reports*, 9(1), 8078.

Zou, W., Qian, F., Jin, F., Li, D., & Chen, J. (2021). Characterization of mutations in the reverse transcriptase region of hepatitis B virus in treated and untreated chronic hepatitis B patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 115(8), 870-877.

Zoulim, F., Buti, M., & Lok, A. S. (2007). Antiviral-resistant hepatitis B virus: can we prevent this monster from growing?. *Journal of Viral Hepatitis*, 14, 29-36.

Zoulim, F. (2011). Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going?. *Liver International*, 31, 111-116.

MANUAIS TÉCNICOS

Mapeamento Programático e Prevalência de VIH e outras ITS entre Populações Chave de Angola: Estudo PLACE 2017. Disponível em: <https://www.fhi360.org/sites/default/files/media/documents/resource-linkages-portuguese-angola-report-june%202018.pdf>

Relatório global de hepatite, (2017) [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565455> (accessed 4.12.22).

THE PATH THAT ENDS AIDS, GLOBAL REPORT 2023. Disponível em: <https://thepath.unaids.org/>

WGO, 2015 – WORLD GASTROENTEROLOGY PRATICE GUIDE. Disponível em:

<https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/hepatitis-b-portuguese-2015.pdf>

WHO, 2015 – Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/154590/9789241549059_eng.pdf

WHO, Global Hepatitis Report; Geneva, World Health Organization, 2017 (<https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>, consultado 23/03/2021).

WHO, 2020 - WHO-UNICEF estimates of HepB3 coverage https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tswucoveragehepb3.html

WHO, 2021 - Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021 Disponível em <https://reliefweb.int/report/world/global-progress-report-hiv-viral-hepatitis-and-sexually-transmitted-infections-2021>

World health statistics 2023: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals (WHS, 2023) <https://reliefweb.int/report/world/world-health-statistics-2023-monitoring-health-sdgs-sustainable-development-goals>

Global HIV, Hepatitis and STIs, Programmes, 2023 - Health sector strategies 2022-2030 <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/strategies/global-health-sector-strate>

ANEXOS

1 - Distribuição de dados sociodemográficos e laboratoriais do Grupo 1

Variáveis	N.	%
Total n (%)	456	100,0
HBsAg+	38	8,3
HBsAg-	418	91,7
Nested - PCR + Sequenciação	51	11,2
DNA+/HBsAg+	33	86,8
DNA+/HBsAg-	18	4,3
Dados sociodemográficos	51	100,0
Género		
Feminino	51	100,0
Idade	51	100,0
Idade (média=25,4; mediana= 24,4 DP=7,18)		
Idade (min.13 - máx.43 anos)		
Estado civil	51	100,0
Casada/União facto	32	62,7
Solteira	19	37,3
Nível de escolaridade	51	100,0
Analfabeta	3	5,9
Primário	7	13,7
Secundário	39	76,5
Superior	2	3,9
Área de residência	51	100,0
Urbana	42	82,4
Rural	9	17,6
Perfil serológico	28	100,0
HBsAg+ /HBeAg+	2	7,1
HBsAg+ /HBeAg-	26	92,9
Perfil de infeção (ISTs)	51	100,0
HBV/ Sífilis	1	2,0
HBV/ HIV	3	5,9
HBV	47	92,2
HBsAg+/DNA+	33	100,0
HBV*HIV	2	6,1
HBV	31	93,9
HBsAg-/DNA+	18	100,0
IOB*HIV	1	5,6
IOB	17	94,4
Vacinação anti-HBV	456	100,0
Recém-nascido (Sim)	360	78,9
Recém-nascido (Não)	74	16,2
Não aplicável	8	1,8
Nados-mortos	14	3,1
Gestantes (dado desconhecido)	456	100

Fonte: Ficheiro SPSS

2 - Distribuição de dados sociodemográficos e laboratoriais do Grupo 2

Variáveis	N.	%
Total n (%)	56	100,0
HBsAg+	28	50
HBsAg-/DNA+	28	50
Nested-PCR + Sequenciação	52	92,9
DNA+/ HBsAg+	24	85,7
DNA+/ HBsAg-/ HBsAg-	28	100,0
Dados sociodemográficos	52	100,0
Género		
Masculino	17	32,7
Feminino	35	67,3
Idade	52	100,0
Idade (média= 34,2; mediana=33,5; DP=2,46)		
Idade (min.1 - máx.70 anos)		
Estado civil	52	100,0
Casada(o)/União facto	27	51,9
Divorciada(o)	7	13,5
Solteira(o)	5	9,6
Viúva	4	7,7
Menor de idade (<16a)	9	17,3
Nível de escolaridade	52	100,0
Analfabeto	3	5,8
Primário	32	61,5
Secundário	7	13,5
Superior	3	5,8
Não aplicável	4	7,7
Não Avaliado (N.A)	3	5,8
Área de residência	52	100,0
Urbana	34	65,4
Rural	18	34,6
Perfil serológico	24	100,0
HBsAg+ /HBeAg+	11	45,8
HBsAg+ /HBeAg -	13	54,2
Perfil de infeção (ISTs)	52	100,0
HIV*	20	38,5
* HIV1	18	34,6
* HIV2	2	3,8
HBV	32	61,5
HBsAg+/DNA+	24	100,0
HBV/HIV	7	29,2
HBV	17	70,9
HBsAg-/DNA+	28	100,0
IOB/HIV	13	46,4
IOB	15	53,6
Vacinação anti-HBV	52	100,0
Não vacinados	43	82,7
Não sabe	9	17,3

Fonte: Ficheiro SPSS

3 - Dedução do subtipo viral presente no genótipo E do Grupo 1

Sequências LGO (N=51)	122	127	Codões				Subtipo	Serologia
			134	140	159	160		
56	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
80	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
123	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
144	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
154	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
159	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
177	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
182	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
189	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
195	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
202	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg+
203	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
240	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
261	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
272	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
298	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
304	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
323	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
332	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
338	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
371	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
373	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
395	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
425	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
439	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
448	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
455	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
457	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
477	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
485	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
487	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
375	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
410	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
45	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
53	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
61	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
62	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
71	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
73	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
101	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
105	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
143	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
184	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
287	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
336	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
342	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
346	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
388	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
407	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
460	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
473	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-

Aminoácidos: R (arginina); L (leucina); P (prolina); F (fenilalanina); S (serina); G (glicina); K (lisina)

4 - Dedução do subtipo viral presente no genótipo E do Grupo 2

Sequência BLA (N=51)	Codões						Subtipo	Serologia
	122	127	134	140	159	160		
50	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
65	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
76	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
99	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
117	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
141	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
142	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
171	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
174	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
186	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
198	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
200	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
77	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
108	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
237	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
277	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
289	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
301	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
328	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
336	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
378	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
404	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
492	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg+
15	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
16	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
22	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
63	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
68	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
74	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
79	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
86	R	L	F	L	G	K	ayw4	HBsAg-
88	R	T	F	S	G	K160N/S	*	HBsAg-
255	R	L	F	S	G		ayw4	HBsAg-
267	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
392	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
463	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
464	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
472	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
473	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
479	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
480	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
501	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
516	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
520	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
521	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
522	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
523	R	P	F	S	G	K	ayw1	HBsAg-
524	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
532	R	L	F	S	A	K	ayw4	HBsAg-
536	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-
539	R	L	F	S	G	K	ayw4	HBsAg-

Aminoácidos: R (arginina); L (leucina); P (prolina); F (fenilalanina); S (serina); G (glicina); A (alanina) K (lisina)

5 - Perfil molecular identificado no subgrupo de mulheres em trabalho de parto HBsAg+, estado replicativo e coinfeções (HIV))

Variantes identificadas em sequências HBsAg+				
LGO	rt-HBV (codões 123 a 215)	S-HBs (codões 115 a 206)	HBeAg	HIV
56	N123H	<i>D144E (Escape)</i>	Negativo	Negativo
80	N123H		Negativo	Positivo
123	N123H; <i>T128N (categoria 3)</i>	<i>P120T (Escape)</i>	Negativo	Negativo
144	N123H		Negativo	Negativo
154	N123H	S204N	N.M	Negativo
159	N123H		Negativo	Negativo
177	N123H		Negativo	Negativo
182	N123H	P203R	Negativo	Negativo
189	N123H	S193L	Negativo	Negativo
195	N123H; K149Q		Negativo	Negativo
202	N123H; D134G (categoria 3)	T126A, L127P	N.M	Positivo
203	N123H		Negativo	Negativo
240	N123H		Negativo	Negativo
261	N123H		Negativo	Negativo
272	N123H; N139D	S204N	N.M	Negativo
298	N123H; F151L		Negativo	Negativo
304	N123H		Negativo	Negativo
323	N123H; K212R	S193L/S; P203Q; S204G	N.M	Negativo
332	N123H; M164L		Negativo	Negativo
338	N123H; <i>V207L (categoria 3)</i>	M198I	N.M	Negativo
371	N123H		Negativo	Negativo
373	N123H		Negativo	Negativo
395	N123H		Negativo	Negativo
425	N123H; Y126 H	A184V; T189I; I195T	Negativo	Negativo
439	N123H	S204N	Negativo	Negativo
455	N123H; Y126H		Negativo	Negativo
457	N123H; I162V	L175S	Negativo	Negativo
477	N123H		Negativo	Negativo
485	N123H	T118M	Negativo	Negativo
487	N123H		Negativo	Negativo
375	N123H		Positivo	Negativo
410	N123H; S176N/S	A168A/T	Positivo	Negativo
			TOTAL	32

Em negrito (coinfeção HBV/HIV); N.M. (parturientes com nados mortos). Em Itálico tipo de mutação de provável resistência aos ITR (rt-HBV) e variantes de escape (S-HBs)

6 - Perfil molecular identificado no subgrupo de mulheres em trabalho de parto com HBsAg-/DNA+ e coinfeções (HIV)

Variantes identificadas em sequências HBsAg-/DNA-HBV+			
LGO	rt-HBV (codões 123 a 215)	S-HBs (codões 115 a 206)	HIV
45	N123H		Negativo.
53	N123H	T189I; S204N	Negativo
61	N123H		Negativo
62	C188C/G	A184A/V	Negativo
71	N123H		Negativo
143	V190 M; A194T ; V207M (<i>categoria 1 e 3</i>)	M198I	Negativo
184	F148 Y	L127P; S140T; D144E , A168V (<i>Escape</i>)	Negativo
287	N123H; Y126H; I187L	Q129H (<i>Escape</i>)	Negativo
336	N123H; V214I		Negativo
342	N123H; Y126H, L140H	S132T	Negativo
346	N123H; Y126H/Y	T189I/T	Negativo
388	N123H		Negativo
407	N123H		Negativo
460	N123H	S204N	Negativo
473	N123H; C198R	T189I	Negativo
TOTAL			15
Em negrito e em itálico tipo de mutação de provável resistência aos ITR (rt-HBV) e variantes de escape (S-HBs)			

7 - Perfil molecular identificado no subgrupo de doentes HBsAg+, estado replicativo (HBeAg) e coinfeções (HIV)

Variantes identificadas em sequências HBsAg+				
BLA	rt-HBV (codões 123 a 215)	S-HBs (codões 115 a 206)	HBeAg	HIV
50	N123H		Negativo	Negativo
65	N123H	S140L/S; T189I/T	Negativo	Negativo
*72	<i>M145L; W153R; S159T; S213T (categoria 3)</i>	<i>S204R</i>	<i>Negativo</i>	<i>Negativo</i>
76	N123H; Y126H		Negativo	Negativo
99	N123H; Y126H	S140L	Negativo	Negativo
117	N123H; Q125*E/K/Q; Y126H		Negativo	Negativo
141	N123H; Y126H		Negativo	Positivo
142	N123H; Y126H		Negativo	Negativo
171	N123H; Y126H		Negativo	Negativo
174	N123H; Y126H		Negativo	Negativo
186	N123H; Y126H		Negativo	Negativo
198	N123H		Negativo	Negativo
200	N123H; Y126H		Negativo	Negativo
77	N123H; Y126Y/H		Positivo	Negativo
108	Y126H		Positivo	Negativo
237	Y126H		Positivo	Positivo
277	N123H; Y126H		Positivo	Positivo
289	N123H; Y126H		Positivo	Positivo
301	N123H; Y126H/Y		Positivo	Negativo
328	N123H; Y126H		Positivo	Negativo
336	N123H		Positivo	Negativo
378		T123A; L127P; T131I; G145K; L175S; W182*W (Escape)	Positivo	Positivo
404	N123H; F148Y	L127P; S140T; D144E; A168A/V (Escape)	Positivo	Positivo
492	N123H		Positivo	Positivo
			TOTAL	24

Em itálico (*72 - genótipo A); Em negrito (coinfeção HBV/HIV); Em Itálico tipo de mutação de provável resistência aos ITR (rt-HBV) e variantes de escape (S-HBs)

8 - Perfil molecular identificado no subgrupo de doentes HBsAg-/DNA+, estado replicativo (HBeAg) e coinfeções (HIV)

Variantes identificadas em sequências HBsAg-/DNA+				
BLA	rt-HBV (codões 123 a 215)	S-HBs (codões 115 a 206)	HBeAg	HIV
15	N123H	L127P	Negativo	Negativo
16	N123H; T128N (categoria 3)	P120T ; L127P; P142H/P; I195I/T; P203L/P (Escape)	Negativo	Negativo
22	N123H	S204N	Negativo	Negativo
63	N123H	S204N/S	Negativo	Negativo
68	T128N (categoria 3)	P120T ; L127P; P142HP; P203L/P (Escape)	Negativo	Negativo
74		S204N	Negativo	Negativo
79	N123H	S204N	Negativo	Negativo
86	N123H	S132Y; S140L; A168V; L173P; M198T	Negativo	Negativo
	S135Y; R138K; I162T; I169L	T126I ; L127T; Q129R ; G130R ; S154P; K160N/S; S167L; S174T; L175S; L176P; V177A;	Negativo	Negativo
88	(Categoria 1)	P178Q (Escape)		
255	S159P/S	T189I; S204N	Negativo	Negativo
267	F148Y	L127P; S140T; D144E ; A168V, S204N/S (Escape)	Negativo	Negativo
392		L127P	Negativo	Negativo
463	N123H	L127P	Negativo	Positivo
464		L127P	Negativo	Negativo
472	N123H	L127P	Negativo	Negativo
473		L127P	Negativo	Positivo
479	N123H; Y126HY	L127P	Negativo	Negativo
480	N123H	L127P	Negativo	Negativo
501		L127P; S204N/S	Negativo	Negativo
516		L127P	Negativo	Negativo
520		L127P	Negativo	Negativo
521		L127P	Negativo	Negativo
522		S174N; P178L	Negativo	Negativo
523	N123H	L127P	Negativo	Positivo
524	N123H	S174N; P178L	Negativo	Positivo
532	N123H	D144A; G159A (Escape)	Negativo	Positivo
536	N123H	S174N; P178L	Negativo	Positivo
539	N123H	S174N; P178L	Negativo	Positivo
			TOTAL	28

As letras em negrito (coinfeção HBV/HIV); Em Itálico tipo de mutação de provável resistência aos ITR (rt-HBV) e variantes de escape (S-HBs)

