

INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES COM TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL, BRASIL CENTRAL

Ludimila Ríspoli Moura^a, Carmen Luci Rodrigues Lopes^b, Regina Maria B. Martins^c

^a*Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74605-080, Brasil*

^b*Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74605-080, Brasil*

^c*Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 74605050, Brasil*

E-mail: clopes232@gmail.com e ludimila_rispoli@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Hepatite B, tuberculose (TB), infecção oculta.

1. INTRODUÇÃO

A hepatite B configura-se como um problema mundial de saúde pública, tendo em vista à alta morbidade e mortalidade. Cerca de um terço da população mundial, apresentam evidências sorológicas da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Essa infecção pode ocasionar doença hepática aguda e crônica, incluindo cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (HCC) (WHO, 2005).

Esse vírus apresenta oito grupos genômicos ou genótipos, definidos com base numa divergência intergrupo de 8% ou mais, sendo designados de A a H. Os genótipos do HBV apresentam uma distribuição geográfica característica (ARAUZ-RUIZ *et al.*, 2002; ALLAIN, 2006; JAZAYERI *et al.*, 2010). No Brasil, os genótipos A, B, C, D e F têm sido encontrados, sendo A, D e F os mais prevalentes (TELES *et al.*, 2002; MELLO *et al.*, 2007).

No diagnóstico e em estudos epidemiológicos da infecção pelo HBV, os ensaios sorológicos para detecção do antígeno HBs e dos anticorpos anti-HBc e anti-HBs são

comumente utilizados. O marcador HBsAg indica infecção presente pelo HBV; já o anti-HBs, recuperação e imunidade. O anti-HBc surge na fase aguda da infecção, persistindo mesmo após a eliminação do vírus. Sua presença pode ser observada isoladamente (anti-HBc isolado), ou em conjunto com anti-HBs, que normalmente indica recuperação da infecção, ou ainda pode ser detectado juntamente com o HBsAg, indicando infecção presente (GROB *et al.*, 2000).

O HBV DNA tem sido detectado na ausência do marcador HBsAg, perfil denominado de infecção oculta (RAIMONDO *et al.*, 2010). Esse tipo de infecção oculta tem impacto em vários contextos clínicos, como a transmissão da infecção por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos e sua reativação aguda em casos de imunossupressão. Evidências sugerem que a mesma favoreça a progressão da fibrose hepática e o desenvolvimento de HCC (RAIMONDO *et al.*, 2007).

A tuberculose (TB) é também uma doença infecciosa com distribuição mundial, mantendo-se como uma importante causa de morbimortalidade. Estima-se que aproximadamente dois bilhões de indivíduos (30% da população mundial) estão infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. Desses, anualmente, oito milhões desenvolverão a forma ativa de TB e dois milhões irão a óbito. Cerca de 80% dos casos de TB concentram-se na Ásia, África e América do Sul (WHO, 2004). Aproximadamente um terço da população brasileira tem sido infectada pelo *M. tuberculosis*, estimando-se em 116.000 o número de casos novos por ano, mas somente 90.000 são reportados. O Brasil é o 14º em número de casos de tuberculose e o 22º em incidência (JARDIM & NASCIMENTO, 2007).

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é considerada hoje um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da TB ativa, devido ao comprometimento da resposta imunológica do paciente. Altos índices de associação entre TB e HIV têm sido observados nos últimos anos. No Brasil, taxas elevadas têm sido verificadas nas Regiões Sul e Sudeste (MUNIZ *et al.*, 2006; GAZETTA *et al.*, 2007). Observa-se, assim, que a incidência dos casos de TB ainda é alta para os dias de hoje, e que esse fato é agravado pelo aumento nos índices verificados ao longo dos últimos anos, devido, principalmente, à ocorrência de co-infecção entre TB e HIV, o

que fez com que a TB voltasse a ocupar posição de destaque como problema de saúde pública.

Ainda são poucas as investigações sobre a infecção pelo HBV em pacientes com tuberculose e para o nosso conhecimento, não existem estudos moleculares sobre a hepatite B em pacientes com TB.

2. OBJETIVOS

- Detectar o HBV DNA e identificar os genótipos do HBV circulantes em pacientes com TB co-infectados pelo HIV ou não em Mato Grosso do Sul;
- Determinar o índice de infecção oculta pelo HBV;
- Verificar o índice de cobertura vacinal contra hepatite B nestes pacientes.

3. METODOLOGIA

Delineamento do estudo e população alvo - Estudo observacional, analítico, de corte transversal. A população foi constituída de pacientes com tuberculose atendidos em Mato Grosso do Sul (Ambulatórios de Pneumologia e de Doenças Infecto-Parasitárias do Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), durante o primeiro ano deste estudo. Os pacientes com TB (estimativa: N = 150) foram entrevistados e a seguir, foram coletados 10 mL de sangue. Os soros foram separados e estocados -70°C.

Testes sorológicos - As amostras foram testadas para a detecção dos marcadores HBsAg, anti-HBc IgM e total e anti-HBs utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA) (Hepanostika Uni-form Organon Técnica B.V., Boxtel, Holanda).

Detecção e genotipagem do HBV DNA – Foi realizada a extração do DNA do HBV nas amostras HBsAg reagentes conforme Niel *et al.* (1994), bem como naquelas anti-HBc reagentes, visando a pesquisa de infecção oculta pelo HBV. Após a extração do DNA,

2 µL foram submetidos a PCR utilizando-se os seguintes *primers*: PS1 e S2/S22 (1ª reação) e PS1 e SR (2ª reação) (Motta-Castro et al., 2005). As amostras positivas foram genotipadas pelo método de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), utilizando-se as enzimas de restrição *Bam* HI, *Eco* RI e *Stu* I. Em caso de dúvida, o DNA foi purificado e seqüenciado utilizando-se o Kit *BigDye Terminator* versão 3.1 (Applied Biosystems) e *primers* correspondentes a região Pré-S/S do HBV (ARAÚJO et al., 2004) em seqüenciador automatizado (ABI 3730, Applied Biosystems).

Processamento e análise dos dados - Os dados das entrevistas e os resultados dos testes sorológicos e moleculares foram digitados em microcomputador e analisados no programa Epiinfo versão 2000, desenvolvido pelo *Centers for Disease and Control*, Estados Unidos da América.

4. RESULTADOS

3.1 Características sorológicas e moleculares das amostras HBsAg reagentes

As características sorológicas e moleculares das amostras HBsAg reagentes estão apresentadas na Tabela 1. Das quatro amostras HBsAg positivas, o HBV DNA pode ser detectado em duas (50%), e destas, uma era do genótipo A e a outra do genótipo D.

Tabela 1 - Características sorológicas e moleculares das amostras HBsAg positivas

Amostra	Anti-HBc	HBV DNA	Genótipo
TB 06	-	-	-
TB 40	+	+	A
TB 55	-	-	-
TB 73	+	+	D

TB: tuberculose

3.2 Infecção oculta pelo vírus da hepatite B

As 28 amostras anti-HBc reagentes foram submetidas à pesquisa do HBV DNA para investigar a presença de infecção oculta pelo HBV nesta população. Destas, quatro foram HBV DNA positivas, resultando em um índice de infecção oculta pelo HBV em pacientes com TB de 14,3% (4/28).

A tabela 2 mostra as principais características dos pacientes com infecção oculta pelo HBV. A idade variou de 32 a 65 anos, e houve predomínio do sexo masculino. A maioria foi anti-HBc e anti-HBs positiva, e apenas um paciente apresentou o perfil anti-HBc isolado.

Tabela 2 - Características dos pacientes com infecção oculta pelo HBV

Amostra	idade	Sexo	Perfil sorológico
TB 10	52	M	Anti-HBc+/anti-HBs+
TB 45	65	F	Anti-HBc+/anti-HBs+
TB 63	32	M	Anti-HBc+/anti-HBs-
TB 125	48	M	Anti-HBc+/anti-HBs+

TB: tuberculose, M: masculino, F: feminino.

3.3 Índice de cobertura vacinal

3.3.1 Marcadores Sorológicos para o HBV em Pacientes com Tuberculose em Mato Grosso do Sul

Do total de pacientes entrevistados, 32 possuíam algum marcador de infecção, resultando em uma prevalência global de 21,3 %. O marcador HBsAg não foi detectado isoladamente na população estudada. O anti-HBc isolado foi observado em quatorze dos indivíduos, e este mesmo marcador quando associado ao HBsAg esteve presente em quatro pacientes. Quatorze indivíduos foram positivos para o anti-HBc e anti-HBs. Dos 150 pacientes entrevistados, 23 (15,3%) mostraram positividade apenas para o marcador anti-HBs, indicando vacinação prévia contra hepatite B (Tabela 3).

Tabela 3 - Prevalência dos marcadores sorológicos para hepatite B em pacientes com tuberculose em Mato Grosso do Sul, Brasil Central.

Marcadores	n	%
HBsAg	00	0,0
Anti-HBc isolado	14	9,3
Anti-HBc/HBsAg	04	2,7
Anti-HBc/anti-HBs	14	9,3
Algum marcador de infecção	32	21,3
Anti-HBs isolado	23	15,3
Ausência de marcador	95	63,4

5. DISCUSSÃO

Com o presente estudo investigamos a infecção pelo HBV em pacientes com tuberculose. São poucas as investigações sobre essa infecção nesses pacientes. (PATEL *et al.*, 2002; KUNIHOLM *et al.*, 2008; PANDO *et al.*, 2008).

O HBsAg é o primeiro marcador sorológico que surge durante o curso da infecção pelo HBV, podendo estar presente antes mesmo do início dos sintomas (HATZAKIS *et al.*, 2006). Neste estudo, não foi detectado a presença desse marcador isoladamente. Entretanto, Blal *et al.* (2005), encontraram prevalência de 2,8% em população semelhante, no Rio de Janeiro. Já em investigações realizadas fora do Brasil, índices de 13,8% (PATEL *et al.*, 2002), 4,3% (KUNIHOLM *et al.*, 2008) e 9% (SIRINAK *et al.*, 2008) foram encontrados.

O índice global para o marcador anti-HBc foi de 21,3%, sendo que em quatro indivíduos (2,7%), este esteve associado ao HBsAg, indicando infecção presente para o HBV. A presença do marcador anti-HBc associado ao anti-HBs foi verificada em 9,3% dos pacientes. Este achado indica infecção passada e imunidade para o HBV, embora o grau de proteção seja dependente da taxa de anti-HBs. Em 9,3% dos indivíduos

estudados, o anti-HBc foi detectado isoladamente, o que pode indicar “janela imunológica”, quando há o desaparecimento do HBsAg e a não detecção do anti-HBs.

Em duas das quatro amostras HBsAg reagentes o HBV DNA foi detectado e as mesmas puderam ser genotipadas, sendo uma do genótipo A e a outra do genótipo D. Esses dados corroboram os encontrados em outros estudos realizados no Brasil e confirmam que os genótipos D e A, bem como o F são os que mais circulam no País, bem como na Região Centro-Oeste (TELES *et al.*, 2002; MELLO *et al.*, 2007; Motta-Castro *et al.*, 2005).

Neste estudo, das 28 amostras anti-HBc reagentes o índice de infecção oculta foi de 14,3%. Sendo que 10,7% foram anti-HBc e anti-HBs positivas, e 3,6 % apresentaram o perfil anti-HBc isolado. Este é um dado preocupante pelo fato de que a infecção oculta pode ter impacto na transmissão da infecção por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos, bem como na sua reativação aguda em casos de imunossupressão. Além disso, evidências sugerem que a mesma favoreça a progressão da fibrose hepática e o desenvolvimento de HCC (RAIMONDO *et al.*, 2007).

Apesar de ser a vacina contra o vírus da hepatite B a medida de prevenção mais efetiva (LAVANCHY, 2004, 2005; VAN HERCK *et al.*, 2008), ainda encontra um déficit de cobertura vacinal em populações de risco no Brasil. Neste estudo, apenas 15,3% dos 150 pacientes entrevistados apresentaram positividade isolada para o marcador anti-HBs, indicando uma baixa cobertura vacinal contra hepatite B. Blal *et al.* (2005), também verificaram baixo índice de cobertura vacinal em pacientes com TB.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados deste estudo mostraram a presença da infecção pelo HBV, mesmo na ausência do marcador HBsAg (infecção oculta) e uma baixa cobertura vacinal contra a hepatite B. Assim sendo, os pacientes com TB constituem uma população vulnerável à infecção pelo HBV, o que torna necessário a elaboração e implementação de estratégias que visem a prevenção da infecção pelo HBV nesta população, devendo estas incluir a vacina contra hepatite B.

7. REFERÊNCIAS

1. ALLAIN, J.P. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. *J Clin Virol* 36: S12-17, 2006.
2. ARAUJO, N.M.; MELLO, F.C.; YOSHIDA, C.F.; NIEL, C.; GOMES, S.A. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of hepatitis B virus. *Arch Virol* 149: 1383-95, 2004.
3. ARAUZ-RUIZ, P.; NORDER, H.; ROBERTSON, B.H.; MAGNIUS, L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 83: 2059-73, 2002.
4. BLAL, C.A.; PASSOS, S.R.L.; HORN, C.; GEORG, I.; BONECINI-ALMEIDA, M.G.; ROLLA, V.C.; DE CASTRO, L. High prevalence of hepatitis B virus infection among tuberculosis patients with and without HIV in Rio de Janeiro, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24: 41-3, 2005.
5. GAZETTA, C.E.; VENDRAMINI, S.H.; RUFFINO-NETTO, A.; OLIVEIRA, M.R.; VILLA T.C. Descriptive study of the implementation and impact of the directly observed treatment, short-course strategy in the Sao Jose do Rio Preto municipal tuberculosis control program (1998-2003). *J Bras Pneumol* 33 (2): 192-98, 2007.
6. GROB, P.; JILG, W.; BORNHAK, H.; GERKEN, G.; GERLICH, W.; GUNTHER, S.; HESS, G.; HUDIG, H.; KITCHEN, A.; MARGOLIS, H.; MICHEL, G.; TREPO, C.; WILL, H.; ZANETTI, A.; MUSHAHWAR, I. Serological Pattern "Anti-HBc alone": Report on a Workshop. *J Med Viral* 62: 450-55, 2000.
7. HATZAKIS, A.; MAGIORKINIS, E.; HAIDA, C. HBV virological assessment. *J Hepatol* 44: S71-6, 2006.
8. JARDIM, J.R.; NASCIMENTO, O. Respiratory health in Brazil. *Chron Respir Dis* 4 (1): 45-9, 2007.

9. JAZAYERI, S.M.; ALAVIAN, S.M. CARMAN, W.F. Hepatitis B virus: origin and evolution. *J Viral Hepatitis* 17: 229-35, 2010.
10. KUNIHOLM, M.H.; MARK, J.; ALADASHVILI, M.; SHUBLADZE, N.; KHECHINASHVILI, G.; TSERTSVADZE, T.; DEL RIO, C.; NELSON, K.E. Risk factors and algorithms to identify hepatitis C, hepatitis B, and HIV among Georgian tuberculosis patients. *Int J Infect Dis* 12 (1): 51-6, 2007.
11. LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepatitis* 11: 97-107, 2004.
12. LAVANCHY, D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and current and vaccine prevention. *J Clin Virol* 34: 1-3, 2005.
13. MELLO, F.C.A.; SOUTO, F.J.D.; NABUCO, L.C.; VILLELA-NOGUEIRA, C.A.; COELHO, H.S.M.; FRANZ H, C.F.; SARAIVA, J.C.P.; VIRGOLINO, H.A.; MOTTA-CASTRO, A.R.C.; MELO, M.M.M.; MARTINS, R.M.B.; GOMES, A.S. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 7: 103, 2007.
14. MOTTA-CASTRO, A.R.C.; MARTINS, R.M.B.; YOSHIDA, C.F.T.; TELES S.A.; PANIAGO, A.M.; LIMA, K.M.B.; GOMES, S.A. Hepatitis B virus infection in isolated Afro-Brazilian communities. *J Med Virol* 77: 188-93, 2005.
15. MUNIZ, J.N.; RUFFINO-NETTO, A.; VILLA, T.C.; YAMAMURA, M.; ARCENCIO, R.; CARDOZO-GONZALES, R.I. Epidemiological aspects of human immunodeficiency virus/tuberculosis co-infection in Ribeirão Preto, Brazil from 1998 to 2003. *J Bras Pneumol* 32 (6): 529-34, 2006.
16. NIEL ,C.; MORAES, M.T.B.; GASPAR A, M.C.; YOSHIDA, C.F.T.; GOMES, S.A. Genetic diversity of hepatitis B virus strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 44: 180-86, 1994.

17. PANDO, M.A.; DE SALVO C.; BAUTISTA, C.T.; EYZAGUIRRE, L.; CARRION, G.; FEOLA ,M.; LADO, I.; HOFFMAN, M.; BIGLIONE, M.M.; CARR, J.K.; MONTANO, S.M.; SANCHEZ, J.L.; WEISSENBACHER, M.; AVILA, M.M. Human immunodeficiency virus and tuberculosis in Argentina: prevalence, genotypes and risk factors. *J Microbiol* 57: 190-7, 2008.
18. PATEL, P.A.; VOIGT, M.D. Prevalence and interaction of hepatitis B and latent tuberculosis in Vietnamese immigrants to the United States. *Am J Gastroenterol* 97 (5): 1198-203, 2002.
19. RAIMONDO, G.; POLLICINO, T.; CACCIOLA, I.; SQUADRITO, G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 46: 160-70, 2007.
20. RAIMONDO, G.; POLLICINO, T.; ROMANO, L.; ZANETTI A.R. A 2010 update on occult hepatitis B infection. *Pathol Biol* 58 (4): 254-7, 2010.
21. SIRINAK, C.; KITTIKRAISAK, W.; PINJEESEKIKUL, D.; CHARUSUNTONSRI, P.; LUANLOED, P.; SRISUWANVILAI, L.; NATENIYOM, S.; AKKSILP, S.; LIKANONSAKUL, S.; SATTAYAWUTHIPONG, W.; BURAPAT, C.; VARMA, J.K. Viral hepatitis and HIV- associated tuberculosis: Risk factors and TB treatment outcomes in Thailand. *BMC Public Health* 18 (8): 245, 2008.
22. TELES, S.A; MARTINS, R.M.B.; GOMES, S.A.; GASPAR, A.M.C.; ARAUJO, N.M.; SOUZA, K.P.; CARNEIRO, M.A.S.; YOSHIDA, C.F.T. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. *J Med Virol* 68: 41-9, 2002.
23. VAN HERCK, K.; VORSTERS, A. VAN DAMME, P. Prevention of viral hepatitis (B and C) reassessed. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 22 (6): 1009-29, 2008.
24. WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Control – Surveillance, Planning, Financing, *Geneve* 226, 2004.

25. WHO - World Health Organization 2005. Hepatitis B vaccines. Available from: WHO web site: <http://www.who.int/vaccines/en/hepatitisb.shtml> (accessed on 22 March, 2010).