U.PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Genótipos do vírus da hepatite B, variáveis associadas, características e distribuição no Norte de Portugal

Ana Paula Guimarães da Mota

Tese de Doutoramento em Ciências Biomédicas

2010

Ana Paula Guimarães da Mota

Genótipos do vírus da hepatite B, variáveis associadas, características e distribuição no Norte de Portugal

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor Jorge Alberto Afonso Pereira Areias

Categoria – Professor Catedrático Convidado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientadora – Doutora Maria Margarida da Fonseca e Castro Cardoso

Categoria – Professora Auxiliar

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientadora – Doutora Amujaci Fátima Alves de Moraes Guedes

Categoria – Professora Auxiliar

Afiliação – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

Esta tese resulta da "compilação, devidamente enquadrada, de um conjunto coerente e relevante de trabalhos de investigação, já objecto de publicação em revistas com comités de selecção de reconhecido mérito internacional" em conformidade com o Decreto-Lei nº 230/2009 de 14 de Setembro, Diário da República - 1ª série, Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior.

Artigos originais em revistas internacionais

Mota A, Areias J, Cardoso MF **A expressão genotípica do vírus da hepatite B em Portugal e no mundo.** Acta Med Port (aguarda publicação)

Mota A, Areias J, Cardoso MF. **Chronic liver disease and cirrhosis among patients with hepatitis B virus infection in northern Portugal with reference to viral genotypes**. J Med Virol. 2011 Jan; 83(1): 71-7.

Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. **Alcohol consumption among patients with hepatitis B infection in northern Portugal considering gender and hepatitis B vírus genotype differences.** Alcohol. 2010 Mar; 44(2): 149-56.

Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. **Epidemiological and genotypic profile of hepatitis B virus in Northern Portugal.** Revista de Saúde Pública. 2010 44 (6) 1087-93.

Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. **Epidemiological study of genotypes of hepatitis B vírus in northern Portugal**. J Med Virol. 2009 Jul; 81(7): 1170-6.

Dedicatória

Ao *Afonso*

Agradecimentos

Gostaria, em primeiro lugar, de agradecer ao orientador desta tese Professor Jorge Areias, que a acompanhou desde o início. Uma palavra de agradecimento à Professora Fátima Guedes. Um agradecimento muito especial à Professora Margarida Cardoso pelo empenho, espírito crítico e de acutilante acompanhamento em todas as etapas deste processo.

Endereço outra palavra de agradecimento, ao Serviço de Hematologia Clínica, na pessoa do seu director, Dr. Manuel Campos, primeiro por ter apoiado e permitido a realização da parte laboratorial deste trabalho no serviço pelo qual é responsável; à Dr.ª Luciana Pinho pelas sugestões, apoio e discussão de ideias que valorizaram muito este trabalho. Na área laboratorial, agradeço o desempenho da Dr.ª Cristina Bacelar e dos colegas das àreas de genética molecular e marcadores víricos, pelo apoio nos momentos mais difíceis de conjugar a rotina laboratorial e este trabalho suplementar.

Agradeço ainda à Mãe, ao Afonso, ao Samuel e à Titas, pelo apoio constante em todo este longo processo que roubou muitas horas ao convívio familiar.

Não quero esquecer os amigos de perto e de longe como a Manuela Jorge e a Luísa Oliveira que foram uma ajuda imprescindível, particularmente, no arranque do primeiro artigo. À Isabel pelo auxílio na leitura dos textos iniciais. À Ana Azevedo, pela correcção e tradução do resumo em francês. À Maria Albina pelo apoio na logística da impressão.

A todos os que acreditaram neste projecto, que é também uma postura de vida, o meu inteiro reconhecimento.

ÍNDICE

ÍNDICE I

ABREVIATURAS III

RESUMO V

SUMMARY VII

RÉSUMÉ IX

ENQUADRAMENTO XI

CAPÍTULO 1 – Revisão bibliográfica 1

CAPÍTULO 2 - Objectivos 11

2.1 - Bibliografia 12

CAPÍTULO 3 - Material e Métodos 15

3.1 - Levantamento de dados 15

3.2 - Avaliação de parâmetros biológicos 16

3.3 - A estrutura vírica do VHB e os genótipos 17

3.4 - Bibliografia 19

CAPÍTULO 4 – Estudo epidemiológico sobre os genótipos do vírus da hepatite B no norte de Portugal 21

CAPÍTULO 5 – Perfil epidemiológico e genotípico da infecção pelo vírus da hepatite B no norte de Portugal 31

CAPÍTULO 6 – Consumos de álcool entre indivíduos com infecção crónica pelo vírus da hepatite B no norte de Portugal tendo em conta as diferenças a nível de género e dos genótipos 41

CAPÍTULO 7 – Doença hepática e cirrose nos doentes com infecção crónica pelo vírus da hepatite B no norte de Portugal considerando os genótipos 51

CAPÍTULO 8 – Discussão, conclusões e perspectivas futuras 61

8.1 - Perspectivas Futuras 67

8.2 - Bibliografia 69

ABREVIATURAS

(mais usadas neste trabalho)

AgHBs – Antigénio *s* do vírus da hepatite B

AgHBe – Antigénio *e* do vírus da Hepatite B

AgHBc – Antigénio para o core do vírus da Hepatite B

Anti-HBc – Anticorpo para o *core* do vírus da hepatite B

Anti-HBs – Anticorpo para o Antigénio do vírus da hepatite B

Anti-HBe – Anticorpo para o antigénio *e* da hepatite B

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADNccc – Ligações covalentes de ADN

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

GGT - Gamaglutamil transpeptidase

FA – Fosfatase Alcalina

VHB – Vírus da hepatite B

CPB – Mutações do core promotor basal

OMS – Organização Mundial de Saúde

PNV – Programa Nacional de Vacinação

HSA – Hospital de Santo António

HJU – Hospital Joaquim Urbano

RESUMO

A seropositividade para o vírus da hepatite B (VHB) afecta, cerca de 30% da população mundial, em que cerca de 350 a 400 milhões de pessoas estão infectadas de forma crónica. Em Portugal, a prevalência da infecção pelo VHB parece variar entre 0,36 a 1%, as hepatites víricas, são a segunda maior causa de doença hepática. Desde o ano de 2000 o Programa Nacional de Vacinação prevê a imunização de todos os recém-nascidos para esta infecção.

O objectivo principal deste trabalho, consistiu em conhecer o perfil epidemiológico da infecção pelo VHB no Norte de Portugal e, em particular, a distribuição genotípica do mesmo. Foi ainda feita a avaliação das eventuais relações entre a prevalência de determinados genótipos e variáveis como: a idade, as eventuais vias de transmissão da infecção, o género, estilos de vida, e hábitos de ingestão alcoólica. De forma análoga, foi feito o doseamento dos marcadores víricos, do valor da carga viral e de outros parâmetros bioquímicos para avaliação da função hepática, tendo em vista o estabelecimento de eventuais relações, com os genótipos encontrados.

O procedimento utilizado para obter a amostra estudada, pretendeu obter uma boa aproximação da situação no Norte de Portugal, no que diz respeito à infecção pelo vírus da Hepatite B. Os Hospitais considerados: o Hospital de Santo António e o Hospital Joaquim Urbano, correspondem, respectivamente, a um hospital central e de referência na região norte na área da Gastrenterologia, e um hospital vocacionado para o tratamento das doenças infecciosas. A amostra foi constituída por todos os indivíduos que recorreram às consultas de especialidade destas instituições, nos anos 2008 e 2009.

Os resultados deste estudo, indicam que, no norte de Portugal, predominam os genótipos D (cerca de 60%) e A (aproximadamente 30%), semelhante ao encontrado em outros países europeus. Em percentagens menores, verifica-se o aparecimento de genótipos oriundos de outras zonas do globo, genótipos C, E e F.

Nesta amostra, observou-se ainda uma grande percentagem de indivíduos (cerca de 70 a 75%) com ausência do AgHBe. Este tipo de hepatite crónica B, provocada pelos vírus mutantes do pré-core, é muito expressiva na Europa Mediterrânea, onde se inclui Portugal.

No que se refere à forma de transmissão da infecção, verificou-se que, no género feminino, a transmissão intrafamiliar foi a via de transmissão mais registada (cerca de 40%), enquanto no género masculino, as formas de transmissão variavam de igual modo no que se refere a outras vias como a perinatal, sexual e intrafamiliar. Esta diferença relativa às vias de transmissão entre homens e mulheres reflecte diferentes

susceptibilidades de infecção, que poderá ser consequência de diferenças nos comportamentos de risco associadas ao género.

Na amostra estudada mais de metade dos indivíduos eram homens, e nos pacientes com consumo excessivo de álcool predominavam também os indivíduos do género masculino. Nas mulheres, verificou-se uma forte associação entre ingestão excessiva de álcool e dano hepático (OR=9,379, IC 95%: 0,859 a 468,422, P=0,037), embora os casos mais severos fossem encontrados em mulheres com mais de 45 anos de idade. Nos indivíduos com infecção pelo VHB, o álcool está associado a um maior dano hepático. Não se verificou associação com os genótipos do VHB. Além de se ter observado que o consumo excessivo de álcool estava associado positivamente com maior dano hepático, observou-se ainda um agravamento acentuado desta associação com a idade do doente, nos dois géneros.

Cerca de 25% dos indivíduos apresentavam cirrose. Na classificiação dos diferentes estadios de cirrose, utilizou-se a classificação de Child-Pugh. Três apresentavam nível C segundo a classificação de Child-Pugh, a situação mais severa, enquanto 28,8% (n=17) apresentavam o estadio B e 66,2% (n=39) o A.

Após a comparação das características entre os indivíduos classificados como nível B, e nível A, verificou-se que os primeiros eram mais velhos, bebiam mais, apresentavam níveis elevados de Aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina, quando comparados com os indivíduos classificados como A.

Este estudo, forneceu informação importante sobre o perfil epidemiológico e genotípico da infecção pelo VHB no Norte de Portugal. Só a implementação de um estudo prospectivo, poderá em definitivo, permitir uma avaliação exacta de como todos estes factores se relacionam e como poderão influenciar a evolução da doença hepática, com especial relevo para o impacto dos genótipos, particularmente os genótipos A e D que são predominantes no Norte de Portugal. Considera-se pertinente avaliar esta realidade a nível nacional, nomeadamente, na área de Lisboa, cuja taxa de imigração é consideravelmente diferente das outras regiões de Portugal, assim como nos territórios autónomos dos Açores e da Madeira. Sendo a infecção pelo VHB uma doença de declaração obrigatória, mas que apresenta subnotificação, será importante consciencializar os clínicos de forma a se poder ter uma actualização constante da prevalência desta doença a nível regional e nacional.

SUMMARY

The seropositivity of hepatitis B virus (HBV) affects approximately 30% of the world population, where about 350 to 400 million people are chronically infected. In Portugal, the prevalence of HBV infection appears to vary between 0.36 to 1% and viral hepatitis is the second leading cause of liver disease. Since 2000, the National Vaccination Program provides the immunization of all newborns for this infection.

This study aimed to survey HBV genotypes in the northern Portugal and to examine the possible associations between genotypes and gender, viral transmission routes, viral markers, viral load, and biochemical tests of liver function. The procedure used to obtain the sample, seems to be a good approximation of the situation in Northern Portugal with regard to infection by the hepatitis B virus. The Hospitals considered: the Santo António Hospital and the Hospital Joaquim Urbano, correspond respectively to a central reference hospital in the northern area of Gastroenterology, and a hospital specialized in the treatment of infectious diseases. The sample consisted of all individuals who have turned to speciality consultations in these institutions, in the years 2008 and 2009.

The results of this study indicate that in northern Portugal predominate genotype D (60%) and A (approximately 30%), similar to that found in other European countries. At lower percentages, we observed the emergence of genotypes from other parts of the globe, like genotypes C, E and F.

In this sample there were a large percentage of individuals (about 70 to 75%) with absence of HBeAg. This type of chronic hepatitis B virus mutants caused by the *pre-core* is very expressive in Mediterranean Europe, including Portugal.

Intrafamilial transmission was predominant in female patients, while males were infected in equal proportions by perinatal, sexual, and intrafamilial transmission. This difference on the transmission paths between men and women reflect different susceptibilities to infection, which may be due to differences in risk behaviours associated with gender. In this sample more than half of the subjects were men, and in patients with excessive alcohol consumption also dominated individuals of the male gender. Logistic regression showed a positive association between liver damage and alcohol intake increasing with age. In female patients, a strong positive association between alcohol intake and liver damage was also found (odds ratio: 9.379; 95% confidence interval: 0.859 to 468.422; P = 0.037); however, the most severe cases were only observed in women older than 45 years. In patients with HBV infection, alcohol was associated with a more severe liver disease.

About 25% of subjects had cirrhosis. The Child-Pugh classification was used to assess the prognosis of cirrhosis. Three individuals were classified as Child Pugh grade C, the

most severe situation, while 28.8% (n = 17) as grade B and 66.2% (n = 39) as grade A. Patients classified as grade B were older, drank more, and showed higher levels of AST and alkaline phosphatase when compared with individuals classified as grade A.

This study has provided important information on the epidemiologic and genotypic HBV infection in northern Portugal. Future studies would benefit from the analysis of the impact of genotypes on liver disease, particularly genotypes A and D, the most predominant genotypes in northern Portugal.

It would be important to assess this situation at the national level, particularly in the area of Lisbon, where the rate of immigration is considerably different from other regions of Portugal, as well as in the autonomous territories of the Azores and Madeira. HBV infection is a notifiable disease, but presents underreporting. It is important to raise awareness among clinicians in order to constantly update the prevalence of the disease at regional and national levels.

RÉSUMÉ

La séropositivité pour le virus de l'hépatite B (VHB) affècte environ 30% de la population mondiale, où environ 350 à 400 millions de personnes sont infectées d'une façon chronique. Au Portugal, la prévalence de l'infection par le VHB semble varier entre 0,36 à 1%; l' hépatite virale est la seconde grande cause de la maladie hépatique. Depuis l'année de 2000, le Programe National de Vaccination prévoit la vaccination de tous les nouveau-nés pour cette infection.

Le but principal de ce travail a consisté à connaître le profil épidémiologique de l'ínfection par le VHB au Nord du Portugal et, particulièrement, la distribution génotypique du même. On a fait, en plus, l'évaluation des éventuels rapports entre la prévalence de certains génotypes et des variables telles que: l'âge, les eventuelles vies de transmition de l'infection chronique, le genre, les styles de vie et les habitudes d'ingestion alcoolique. De la même façon on a fait le dosage des marqueurs virales, de la valeur de la charge virale et d'autres paramètres biochimiques pour l'évaluation de la fonction hépatique, en vue de l'établissement d'éventuels rapports avec les génotypes trouvés. Le procédé utilisé pour obtenir l' échantillon étudié a voulu obtenir une bonne approche de la situation au Nord du Portugal en ce qui concerne à l'ínfection par le virus de l'hépatite B. Les hôpitaux considérés - L'Hôpital Santo António et L'Hôpital Joaquim Urbano correspondent, respectivement, à un hôpital central et de référence dans la région nord dans l'aire de la Gastrenterologie et à un hôpital vocationé au traitement des maladies infectieuses. L'échantillon a été constitué par tous les individus qui ont recouri aux consultations de spécialité de ces institutions, pendant les années de 2008 et 2009. Les résultats de cet étude indiquent que, au Nord du Portugal prédominent les génotypes D (environ 60%) et A (environ 30%), semblable à ce qu' on a été trouvé dans d'autres pays européens. En des pourcentages plus petits on trouve les génotypes venus d'autres zones du globe, des génotypes C, E et F.

Dans cet échantillon on a encore observé un pourcentage élevé d'individus (environ 70% à 75%) à l'absence du AgHBe. Ce type d'hépatite chronique B, provoquée par des vyrus mutants du pré-core, est très expressif dans l'Europe Méditeranée où Portugal est inclus.

En ce qui concerne à la façon de transmission de l'infection, on a vérifié que, dans le genre féminin, la transmission intrafamiliale a été la vie la plus régistrée (environ 40%), tandis que,dans le genre masculin, les façons de transmission variaient également par rapport à d'autres vies comme la péritonale, sexuel ou intrafamiliale.Cette différence concernant les vies de transmission entre les homens et les femmes réfléchit des différents susceptibilités d'infection, qui pourra être la conséquence de différences dans les conduites de risque associées au genre.

Dans l'échantillon étudié, plus de la moitié des individus étaient des hommes et, parmis les patients avec une ingestion excessive de l' alcool, c'étaient aussi les individus du genre masculin qui prédominaient. Parmis les femmes on a vérifié une grande association entre l'ingestion escessive de l'alcool et le dommage hépatique (OR=9.379,95%IC:0,859 to 468,422, P=0,037), quoique les cas les plus sévères étaient trouvés parmis des femmes agées de plus de 45 ans. Parmis les individus avec infection par VHB l' alcool était associe à un plus grand dommage hépatique. On n'a pas vérifié une association avec les genotypes du VHB. Outre avoir observe que la consomation excessive de l'alcool était associé positivement à un plus grand dommage hépatique, on a observé encore une aggravation accentuée de cette association avec l'âge du malade, dans les deux genres.

Environ 25% des individus présentaient une cirrhose. Dans le classement des différents stades de cirrhose, on a utilisé le classement de Child-Pugh. Trois individus présentaient le niveau C, selon le classement de Child-Pugh, la situation la plus grave, tandis que 28,8% (n=17), présentaient le stade B et 66,2% le stage A.

Après la comparaison des caractéristiques entre les indivudus classés dans le niveau B et le niveau A, on a vérifié que les premiers étaient les plus âgés, buvaient d'avantage, présentaient des niveaux élevés de AST et de Fosfatase Alcaline en comparaison avec les individus classes comme A.

On peut conclure que cet étude a fourni des renseignements importants sur le profil épédimiologique et génotypique de l'infection par le VHB, au Nord du Portugal.

Seulement une implementation d'un étude prospectif pourra, définitivement, permettre une évaluation rigoureuse de comme tous ces facteurs se rapportent et comme ils pourront influencier l'évolution de la maladie hépatique, notamment l'impact des genotypes, en partuculier les genotypes A et D qui prédominent au Nord du Portugal.

On considère pertinent évaluer cette réalité au niveau national, nommément dans la région de Lisbonne où la taxe d'immigration est considérablement différente des autres regions du Portugal, aussi bien que dans les regions autonomes de Açores et Madeira.

En étant l'infection par le VHB une maladie de déclaration obligatoire mais qui présente une sousnotification, il faut rendre conscient les médecins pour qu'on puisse avoir une actualisation soutenue de la prépondérence de cette maladie au niveau régional et national.

ENQUADRAMENTO

A contextualização e introdução ao tema, assim como a revisão da literatura científica e o estado da arte sobre a temática da tese, encontra-se no artigo: **Mota A, Areias J, Cardoso MF. A expressão genotípica do vírus da hepatite B em Portugal e no mundo**, **Acta Med.** (aguarda publicação).

Numa fase seguinte, descreveu-se em pormenor o perfil epidemiológico e genotípico da infecção pelo vírus da hepatite B em Portugal com a publicação do artigo: **Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. Epidemiological study of genotypes of hepatitis B vírus in northern Portugal. J Med Virol. 2009 Jul; 81(7): 1170-6**.

Conhecido em termos gerais o perfil epidemiológico e genotípico da infecção crónica pelo VHB no norte de Portugal, foi importante aprofundá-lo, separadamente, para os homens e para as mulheres. É do conhecimento geral que associado ao género, existem comportamentos e susceptibilidades que os tornam de certa forma distintos. Tornou-se por isso importante considerar separadamente os homens e mulheres, para um melhor conhecimento do referido perfil genotípico: **Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. Epidemiological and genotypic profile of hepatitis B virus in Northern Portugal Revista de Saúde Pública. 2010 44 (6) 1087-93.**

Tendo em conta as características específicas da população portuguesa no que concerne aos hábitos de ingestão alcoólica, estudou-se o impacto desse mesmo consumo, na infecção crónica crónica pelo VHB: **Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. Alcohol consumption among patients with hepatitis B infection in northern Portugal considering gender and hepatitis B vírus genotype differences. Alcohol. 2010 Mar; 44(2): 149-56.**

Por fim, analisou-se a doença hepática, dando particular atenção à cirrose, nos pacientes com infecção crónica pelo vírus da hepatite B, e a sua possível associação com o perfil epidemiológico e genótipico da infecção pelo VHB: **Mota A, Areias J, Cardoso MF. Chronic liver disease and cirrhosis among patients with hepatitis B virus infection in northern Portugal with reference to viral genotypes. J Med Virol. 2011 Jan; 83(1): 71-7.**

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A EXPRESSÃO GENOTÍPICA DO VÍRUS DA HEPATITE B EM PORTUGAL E NO MUNDO

RESUMO

Introdução: A infecção pelo vírus da Hepatite B (VHB) é um problema de saúde pública a nível mundial. Em Portugal, os dados publicados e disponíveis indicam que cerca de 1% da população estará infectada. Determinados genótipos apenas são predominantes em certas partes do mundo, no entanto a migração de indivíduos não vacinados entre os vários locais do planeta poderá levar à disseminação dos diferentes genótipos. A heterogeneidade dos genótipos da hepatite B parece estar relacionada com diferenças na evolução clínica da infecção e na resposta ao tratamento antiviral. Objectivos: Conhecer a distribuição dos oito genótipos do VHB a nível mundial, dando relevo à sua possível implicação na forma como se apresenta na população portuguesa. Material e Métodos: Utilização de revistas indexadas, assim como consulta de resumos de congressos das áreas da Virologia e da Hepatologia realizados em Portugal. Resultados: Verifica-se, na Ásia o predomínio dos genótipos B e C; no Norte de África, o predomínio do genótipo D, na costa Ocidental o genótipo E; no Continente Americano os genótipos predominantes são A, D, F, G e H. Na América do Sul, na Venezuela e Argentina predomina o genótipo F, no Brasil predomina o A. Finalmente na Europa, particularmente no Norte de Portugal, predominam os genótipos A e D. Em Portugal foram também identificados indivíduos com genótipo C, E e F, em indivíduos Portugueses e em imigrantes. Discussão: A mobilidade das populações introduz genótipos, cuja expressão em termos de patogenecidade se pode revelar de forma distinta face à população de origem. A distribuição genotípica encontrada parece estar associada não só ao facto de Portugal ser um país europeu, mas também ao facto de ter imigração oriunda de África, Brasil, do leste Europeu, e também de países asiáticos como a China. Considera-se pertinente avaliar esta realidade a nível nacional, nomeadamente na área de Lisboa, cuja taxa de imigração é consideravelmente diferente das outras regiões de Portugal, assim como dos territórios autónomos dos Açores e da Madeira. Desconhece-se, ainda, a relação dos genótipos do vírus da Hepatite B com a gravidade da infecção crónica causada pelos mesmos. No entanto, todas as investigações desenvolvidas até ao momento, evidenciam a sua grande importância, quer em termos clínicos, quer de saúde pública. É imprescindível promover, uma cada vez maior, investigação para se conhecer de que forma é que

estes genótipos afectam a severidade da doença hepática, visando uma melhor resposta no tratamento da infecção pelo VHB.

Mota A, Areias J, Cardoso MF. **A expressão genotípica do vírus da hepatite B em Portugal e no mundo. Acta Med Port** (aguarda publicação).

ARTIGO DE REVISÃO

Acta Med Port 2010; 23: ???-???

A EXPRESSÃO GENOTÍPICA DO VÍRUS DA HEPATITE B
Em Portugal e no Mundo

Ana MOTA, Jorge AREIAS, Margarida Fonseca CARDOSO

RESUMO

Introdução: A infecção pelo vírus da Hepatite B (VHB) é um problema de saúde pública a nível mundial. Em Portugal, os dados publicados e disponíveis indicam que cerca de 1% da população estará infectada. Determinados genótipos apenas são predominantes em certas partes do mundo, no entanto a migração de indivíduos não vacinados entre os vários locais do planeta poderá levar à disseminação dos diferentes genótipos. A heterogeneidade dos genótipos da hepatite B parece estar relacionada com diferenças na evolução clínica da infecção e na resposta ao tratamento antiviral.

Objectivos: Conhecer a distribuição dos oito genótipos do VHB a nível mundial, dando relevo à sua possível implicação na forma como se apresenta na população portuguesa.

Material e Métodos: Utilização de revistas indexadas, assim como consulta de resumos de congressos das áreas da Virologia e da Hepatologia realizados em Portugal.

Resultados: Verifica-se, na Ásia o predomínio dos genótipos B e C; no Norte de África, o predomínio do genótipo D, na costa Ocidental o genótipo E; no Continente Americano os genótipos predominantes são A, D, F, G e H. Na América do Sul, na Venezuela e Argentina predomina o genótipo F, no Brasil predomina o A. Finalmente na Europa, particularmente no Norte de Portugal, predominam os genótipos A e D. Em Portugal foram também identificados indivíduos com genótipo C, E e F, em indivíduos Portugueses e em imigrantes.

Discussão: A mobilidade das populações introduz genótipos, cuja expressão em termos de patogenecidade se pode revelar de forma distinta face à população de origem. A distribuição genotípica encontrada parece estar associada não só ao facto de Portugal ser um país europeu, mas também ao facto de ter imigração oriunda de África, Brasil, do leste Europeu, e também de países asiáticos como a China. Considera-se pertinente avaliar esta realidade a nível nacional, nomeadamente na área de Lisboa, cuja taxa de imigração é consideravelmente diferente das outras regiões de Portugal, assim como dos territórios autónomos dos Açores e da Madeira. Desconhece-se, ainda, a relação dos genótipos do vírus da Hepatite B com a gravidade da infecção crónica causada pelos mesmos. No entanto, todas as investigações desenvolvidas até ao momento, evidenciam a sua grande importância, quer em termos clínicos, quer de saúde pública. É imprescindível promover, uma cada vez maior, investigação para se conhecer de que forma é que estes genótipos afectam a severidade da doença hepática, visando uma melhor resposta no tratamento da infecção pelo VHB.

A.M., J.A., M.F.C.: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto. Porto

A.M., J.A.: Serviços de Hematologia Clínica e de Gastrenterologia. Hospital de Santo António (CHP). Porto

M.F.C.: Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental. Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto. Porto

© 2010 CELOM

SUMMARY

HEPATITIS B GENOTYPE DISTRIBUTION
In Portugal and Worldwide

Introduction: Infection with Hepatitis B is a public health problem worldwide. In Portugal, around 1% of the population is chronically infected. Some genotypes are only predominant

Recebido em: XX de Mes de 2009
Aceite em: XX de Mes de 2009

in some geographical regions; however migration around the world can lead to the dissemination of the different genotypes. The heterogeneity of hepatitis B genotypes seems to be related to differences in clinical evolution of the infection and response to antiviral treatment.
Aim: The present study was designed to review the worldwide geographical distribution of Hepatitis B genotypes, and to analyze the possible relationships with the distribution of genotypes in Portugal.
Methods: Studies of interest were identified by search on indexed journals. Search of Portuguese information was extended to conference proceedings in the areas of Virology and Hepatology.
Results: In Asia genotypes B and C were prevalent; in the North of Africa the genotype D was prevalent, and in the East Coast genotype E was predominant. In the American continent the most predominant genotypes were A, D, F, G and H. In South America, Venezuela and Argentina showed a high prevalence of genotype F, in Brazil genotype A was prevalent. In Europe, including Portugal, genotypes A and D were predominant. In Portugal genotypes C, E and F were observed in Portuguese patients and in immigrant patients.
Discussion: The pattern of global migration affects the pattern of genotype distribution, introducing genotypes in regions where the clinical outcome can differ from the population of origin. The genotypic distribution found in Portugal seems to be associated not just with being a European country, but also with immigration from Africa, Brazil, Eastern Europe, and Asian countries like China. The study of the hepatitis B genotypic distribution should be extended to all regions in Portugal, namely Lisbon where the immigration levels are higher, as well as to the autonomous regions of Portugal, the Azores and Madeira islands. The relationship between hepatitis B genotypes and pathogenicity remains largely unknown, however evidence suggests the clinical and public health relevance of these genotypes. Further research is needed, not only to know how genotypes affect the severity of liver disease, but also to understand if and how the response to treatments is influenced by hepatitis B virus genotype.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da Hepatite B (VHB) é um dos maiores problemas de saúde a nível mundial. Existem cerca de 350 a 400 milhões de portadores desta doença em todo o mundo[1]. Em Portugal, não há, actualmente, informação concreta acerca da prevalência da infecção pela Hepatite B. Os dados publicados e disponíveis indicam um valor aproximadamente de 1%[2,3]. O inquérito serológico nacional, *Portugal Continental 2001-2002* publicado pelo Ministério da Saúde, aponta para uma prevalência de 0,36% de indivíduos com presença do antigénio de superfície do VHB (Ag HBs)[4].

O VHB é um membro da família *Hepadnaviridae*, cuja principal característica é o seu hepatotropismo. O vírus contém um revestimento externo denominado antigénio de superfície (AgHBs) e um invólucro interno. Durante a infecção, a produção do AgHBs ocorre em grandes quantidades nos hepatócitos e é libertado sobre a forma de pequenas partículas e filamentos (partículas Dane). O invólucro interno é constituído pela proteína do core (AgHBc), que contém ADN vírico. Para além do ADN vírico, no *core* do vírus encontra-se ainda a enzima responsável pela multiplicação do ADN vírico nas células já infectadas, que se designa como polimerase do ADN. O antigénio *e* (AgHBe) é outra das proteínas do invólucro interno do vírus, apesar de algumas estirpes, mutantes, conseguirem reproduzir-se sem dar origem ao AgHBe.

Numa primeira fase, o VHB, adere a um receptor de superfície do hepatócito, enquanto o invólucro interno é transportado pelo citoplasma celular até ao núcleo. Aí, o ADN vírico é convertido numa forma fundamental para a estratégia replicativa do VHB, o ADNccc (*covalently closed circular DNA*). Posteriormente, a síntese e agregação organizada ocorre no citoplasma originando novas estruturas víricas que são libertadas para a circulação, possibilitando a infecção de novos hepatócitos. O ADNccc vai persistir no núcleo das células infectadas e torna-se uma reserva permanente de infecção. Nas mutações da zona promotora do core e/ou pré-core, a produção do AgHBe pode ser

reduzida ou mesmo eliminada. Este tipo de hepatite crónica B, provocada pelos vírus mutantes do pré-core, tem grande expressão na Europa Mediterrânea, onde se inclui Portugal. É responsável por cerca de 80% dos casos de hepatite crónica, com uma taxa muito baixa de resolução espontânea da infecção.

O antigénio de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) apresenta uma grande heterogeneidade serológica. As diferenças antigénicas do próprio AgHBs estabeleceram quatro subtipos principais: *adw*, *ayw*, *adr*, e *ayr*[5], o que permitiu, em definitivo avanços nos métodos de diagnóstico, através da, substituição da subtipagem pela genotipagem. O isolamento do VHB, permitiu classificá-lo em nove subtipos diferentes, de acordo com os determinantes antigénicos do AgHBs. Nas nove versões geneticamente distintas de VHB, designados de A a H, há já a hipótese da existência de um genótipo do tipo I[5].

Nalguns estudos epidemiológicos constata-se que determinados genótipos apenas são predominantes em certas partes do mundo. Assim, os genótipos D e A prevalecem nos países do sul da Europa, os genótipos B e C na Ásia e os genótipos F e H na América do Sul[6-8].

Estudos recentes vieram demonstrar que os vários genótipos do VHB podem influenciar na gravidade da doença hepática, tal como a cirrose e o carcinoma hepatocelular, dificultando a resposta nos respectivos tratamentos[8]. O genótipo B associa-se a taxas mais elevadas de seroconversão do AgHBe para o anti-HBe relativamente ao genótipo C. A mutação pré-core, associada ao anti-HBe positivo é significativa nos indivíduos que apresentam o genótipo B, a variante pré-core abunda em indivíduos com genótipo D, e é menos frequente nos indivíduos com o genótipo A. No entanto, a consistência da informação obtida não é expressiva, particularmente na população europeia. Quando comparada com outras zonas geográficas, a Europa apresenta uma baixa prevalência de infecção pelo VHB. Por contraste na Ásia, com taxas de prevalência da infecção muito elevadas tem sido possível estudar em grande escala, o comportamento da carga viral, das enzimas hepáticas, dos genótipos e a maior ou menor severidade da doença hepática associada[9].

É num contexto actual de grande mobilidade de indivíduos não vacinados[10], entre os mais variados locais do planeta, que ocorre a infecção pelo VHB. Esta infecção poderá levar também à disseminação dos diferentes genótipos, por populações que até agora não estariam infectadas por determinados genótipos. A exposição de populações a genótipos para os quais estarão mais vulneráveis, pode promover a evolução para uma maior severidade da doença hepática já que os hospedeiros são diferentes. Mas se a importância dos genótipos na progressão da doença e na resposta terapêutica não é ainda completamente conhecida, há zonas no globo, particularmente na Ásia, que indicam que as formas mais severas da doença hepática, assim como o desenvolvimento de cirrose estão mais associadas com o genótipo C (face ao B). Na Europa até ao momento existem poucos estudos que façam a comparação entre os genótipos e a eficácia terapêutica. Este facto será o fim último da genotipagem, quando permite em definitivo conhecer qual a terapêutica a utilizar no tratamento de determinado genótipo face a outro.

De momento, e segundo da tutela do Ministério da Administração Interna, 4% da população Portuguesa compõe-se de imigrantes oriundos de África, Brasil e do leste Europeu, no entanto a Norte de Portugal essa percentagem é menor. Neste sentido, o presente estudo pretende fazer uma revisão bibliográfica sobre a distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite B a nível mundial, dando relevo à sua possível implicação na forma como se apresenta na população portuguesa.

MATERIAL E MÉTODOS

Efectuou-se o levantamento da produção científica existente, particularmente nos textos disponíveis *on-line*. Considerou-se os dados publicados desde 1984 a 2010 (até Março de 2010). A indexação das revistas e os índices de impacto associados, são garante da qualidade científica veiculada.

A pesquisa a nível mundial incluiu revistas indexadas internacionalmente disponíveis nas bases científicas da *Pubmed,* da *ISI Web of Knowledge* e da *Scopus*. Os critérios da selecção dos artigos estudados para esta publicação foram baseados na actualidade e na qualidade dos mesmos. As palavras-chave da pesquisa incluíram: *Hepatitis B* ou *HBV*, *genotypes* ou *genotypic*, *distribution*, e *Portugal*. Foram ainda consultadas revistas de língua portuguesa, de Portugal e do Brasil, como as revistas da *Scielo.* A *Scielo* (*Scientific Electronic Library Online*) é uma biblioteca virtual que abrange uma colecção seleccionada de periódicos científicos.

No que diz respeito a Portugal, e dada a escassez de artigos que abordam esta temática, a pesquisa incluiu também os livros de resumos de congressos nacionais na área da Infecciologia e da Virologia, nomeadamente os livros de resumos dos Congressos Nacionais de Virologia e Encontros Nacionais de Actualização em Infecciologia. Foram ainda consultados os dados estatísticos referentes à patologia em estudo, oriundos da tutela da Direcção Geral de Saúde e da Organização Mundial de Saúde.

RESULTADOS

Na Ásia, em estudos recentemente publicados verificou-se a prevalência do genótipo C na Coreia[7], na Tailândia[11] o genótipo B foi o predominante, no Japão[12] verificou-se uma predominância dos genótipos B e C, embora o genótipo D se apresentasse prevalente numa área do ocidente do Japão. Numa perspectiva de proximidade geográfica, na China[8], o primeiro grande estudo realizado em 2005, permitiu concluir que os genótipos mais comuns eram do tipo B e C, o genótipo C predominava no norte do país, e o genótipo B nas províncias do sul. Em Taiwan[7], o genótipo predominante é do tipo B. Na Índia[13] o genótipo predominante é do tipo D. Na Turquia[14] 85,9% dos indivíduos estudados apresentavam o genótipo D, o que eventualmente poderá estar associado à proximidade deste país com a Europa.

No continente africano, os genótipos predominantes são o A e o E. O genótipo E é mais comum na África Ocidental, e o A na África Central[5]. No norte de África existem países onde predomina o genótipo D[15,16]. Na Tunísia e no Egipto[16], os genótipos predominantes são do tipo D. No Benim, considera-se predominante o genótipo E, seguido pelo genótipo A. Nos Camarões, os genótipos predominantes são do tipo A e E. No Senegal[17], o genótipo predominante na cidade de Dakar é do tipo E, seguido pelo genótipo A. Na Tanzânia[18] o genótipo A é predominante.

No Continente americano, os genótipos predominantes são: o A, o D, o F, o G e H.

Na América do Norte, incluindo os Estados Unidos[19], um estudo de 2003, permitiu verificar que o genótipo do VHB que predomina é diferente nas várias regiões. As regiões Oriental e Central apresentam predominância dos genótipos A e C. No Sul, o genótipo predominante é o A. Na região Ocidental, os genótipos predominantes são o B e o C. A razão desta diferença, pode ser justificada pela variedade de etnias e dos locais de nascimento das mesmas. No Havai, predomina o genótipo C, seguido pelos genótipos A e B.

No México[20] parece predominar o genótipo H. Num estudo de 49 indivíduos, cerca de três quartos estavam infectados pelo genótipo H, seguidos pelo genótipo G, A e D.

Na América do Sul, na Venezuela o genótipo F é predominante. No Brasil, predomina o genótipo A, seguidos pelos genótipos D, C e F. Resultados obtidos em indivíduos oriundos da região oriental da Amazónia[21] confirmam o predomínio do tipo A. Na Argentina, nomeadamente na região norte, predomina o genótipo F, seguido pelos genótipos A, D e C.

Os escassos dados sobre esta área do globo indicam que na Austrália[22] o genótipo C é predominante. Nos 103 indivíduos estudados em 2005, 41% possuíam o genótipo C, 29% o genótipo B, 22% o genótipo D e 8% o genótipo A. Neste estudo foi ainda possível verificar que os indivíduos com o genótipo A eram predominantemente de origem caucasiana. Os indivíduos com os genótipos B e C eram asiáticos e os indivíduos com genótipo D eram oriundos dos países do Mediterrâneo.

A situação europeia é a que suscita maior interesse, dado o enquadramento do nosso país neste Continente. De acordo com Verschuere et al, na Europa os genótipos predominantes são do tipo A e D[23]. Num estudo realizado no distrito de Paris[24], verificou-se que 1/4 dos indivíduos apresentavam genótipo do tipo A, seguidos pelos tipo B, D e E. Na Bélgica verificou-se o predomínio dos genótipos A e D. Na Irlanda predomina o genótipo A. Num estudo realizado na Escócia verificou-se que cerca de metade dos indivíduos apresentava o genótipo A, seguido pelo B, C e o D. Na Albânia (país com elevada prevalência de infecção pelo VHB) e segundo um estudo realizado por investigadores italianos e publicado em 2005[25], verificou-se que nos indivíduos estudados predominava o genótipo D, o que está de acordo com a distribuição predominante na Europa, e permite confirmar que o nível de endemicidade da infecção não parece afectar a distribuição genótipica. Na Polónia, num estudo realizado em crianças com hepatite crónica pelo VHB, 86,5% estavam infectadas com o genótipo A, e as restantes com o tipo D. Na Islândia, num estudo de 1989, verificou-se que os genótipos mais frequentes eram do tipo A, C e D. Na República Checa, predomina o genótipo do tipo A, seguido pelo genótipo D. Em Espanha[26] encontrou-se uma alta prevalência dos genótipos tipo A e D. Em Portugal, conforme publicação do *Journal of Medical Virology* em 2009[27] sobre a distribuição e a origem dos genótipos num universo de 340 indivíduos, residentes na região Norte de Portugal, prevaleciam os genótipos D (62,6%) e A (32,1%) nos de naturalidade portuguesa, e numa proporção reduzida foram identificados indivíduos com genótipo E e F. Nos indivíduos de naturalidade estrangeira prevalecia o genótipo E, correspondendo a indivíduos oriundos das antigas colónias portuguesas em África, seguido do genótipo A e D com distribuição idêntica em cidadãos oriundos da Europa Central e Oriental. Numa terceira posição estavam indivíduos provenientes da China com genótipo C. Este artigo com publicação internacional, vem confirmar dados de vários núcleos de investigação oriundos de Lisboa e Coimbra que foram fruto de comunicações, particularmente em Congressos, e que indiciavam de forma muito objectiva esta tendência para a predominância dos genótipos D e A, na população portuguesa.

DISCUSSÃO

Se hoje em dia é frequentemente utilizada a expressão de *aldeia global da informação* esta expressão não será de todo errónea, quando aplicada à transmissão vírica, e em particular à infecção pelo vírus da Hepatite B e aos genótipos associados. Esta questão dos fenómenos migratórios, ganha consistência se se fizer o enquadramento deste fenómeno na Europa. As baixas prevalências da infecção nesta área do globo, seja por medidas preventivas precocemente implementadas seja pela aplicação de tratamentos eficazes, permitem uma expressão baixa desta infecção (1 a 2%) na população. Se a estes grupos populacionais com estas características se *adicionar* indivíduos oriundos de zonas endémicas ou com altas taxas de infecção, a presença destes, produzirá inevitáveis alterações quer na prevalência quer na expressão genotípica da infecção. A descrição pormenorizada da prevalência dos genótipos permite conhecer as tendências existentes nas populações. A presença de genótipos *vindos* de outras zonas do globo poderão alterar a configuração genotípica inicial.

A infecção pelo vírus da Hepatite B sendo um dos maiores problemas de saúde a nível mundial com cerca de 350 a 400 milhões de portadores em todo o mundo[1], poderá sofrer um sério retrocesso nas suas prevalências se as entidades de saúde de cada país instituírem programas de vacinação à nascença e uma forte atitude formativa, relativamente às vias de transmissão. Se o continente Asiático se caracteriza por uma marcada forma de transmissão perinatal, já no continente Europeu a via de transmissão sexual é uma das mais frequentes[1]. Os valores de prevalência de infecção apresentados na Europa são menores ou muito próximos de Portugal[2,3].

Presentemente, não está definitivamente comprovado se determinados genótipos do VHB estão associados, ou não, a um maior risco de desenvolvimento da doença hepática grave. Contudo, os dados disponíveis na Ásia referem que as doenças hepáticas severas e o desenvolvimento de cirrose estão mais associadas com o genótipo C (face ao B). Estudos realizados, em Taiwan e no Japão, confirmam estes dados[8]. Refira-se que a Ásia, pelas elevadas prevalências de infecção pelo VHB, é, um terreno fértil, neste tipo de estudos, particularmente no que concerne aos genótipos aí predominantes. A investigação aponta também para uma associação entre os genótipos e a sensibilidade e resposta do doente a diferentes terapêuticas. No que concerne à terapêutica a diferença de prognóstico na resposta ao tratamento devido ao genótipo infectante foi demonstrada aquando do uso de Interferão alfa, em que os portadores de VHB com genótipo B apresentaram melhor resposta do que doentes infectados com os genótipos C e D[28]. Um outro estudo com este mesmo medicamento, demonstrou que os portadores dos genótipos A e B apresentaram melhor resposta ao tratamento face aos restantes[29] No tratamento combinado com Interferão alfa e Lamivudina, parece ocorrer uma resposta melhor nos portadores do genótipo B em comparação com o genótipo C[30] No que concerne à utilização de outras terapêuticas como: Adefovir, Dipiroxil e Entecavir, até ao momento existem poucos estudos que façam a comparação entre os genótipos e a sua eficácia[31].

Para além disso, alguns genótipos parecem promover aparecimento da infecção crónica pelos vírus mutante[8]. Esta infecção em indivíduos não vacinados está eventualmente relacionada com a mobilidade das populações até aqui não infectadas por determinados genótipos, cuja expressão em termos de patogenecidade se revela de forma distinta face ao esperado naquela população.

A circunstância portuguesa nesse aspecto é disso um exemplo: se predominam os genótipos D e A, à semelhança europeia, também estão presentes outros genótipos oriundos de locais onde os antigos fenómenos de colonização e actuais fenómenos de reconstrução assumem um papel relevante[32]. A presença de genótipos oriundos de África é disso um exemplo. Por outro lado, a imigração de indivíduos da Europa de Leste e da China introduzem novos genótipos, e podem eventualmente alterar as taxas de prevalência da infecção.

Quer a África ou a Ásia apresentam, altas taxas de endemicidade, que atingem 8 a 10% da população. Os estudos mais representativos nesta matéria são oriundos dos países asiáticos com estruturação económica e política, onde a investigação científica tem já um peso considerável, como o Japão, a China, a Coreia, a Tailândia e a Índia. Em África seja pelas convulsões internas que ocorrem há dezenas de anos, seja por interesses externos, a investigação na área da infecção pelo VHB, parece ser exígua. Para um conhecimento mais aprofundado da distribuição dos genótipos e respectivas prevalências seria necessário alargar o leque de países estudados, só assim se poderão definir estratégias sustentadas de contenção da infecção pelo VHB. Até ao momento, sabe-se que alguns países mais próximos do Mediterrâneo, partilham o genótipo D com o continente Europeu, enquanto que, a Costa Ocidental Africana, e nos poucos países com dados disponíveis, verifica-se uma notória predominância do genótipo E. Facto que indirectamente, um estudo português recente[27], veio confirmar, ao verificar que nos indivíduos com genótipo E parte tinham nascido em África e

os restantes apesar de terem nascido em Portugal, correspondiam à segunda geração de imigrantes Africanos. O já referido estudo português apresenta ainda indivíduos com o genótipo F nascidos em Portugal, no entanto é na América do Sul que este genótipo predomina. A este fenómeno não serão alheias as grandes comunidades Portuguesas existentes na Venezuela e no Brasil, assim como a residência e o nascimento de muitos indivíduos, em Portugal, oriundos desses países. De novo na América do Sul, se verifica, a ausência de dados de outros países, desde a cordilheira Andina à Patagónia, e cujo conhecimento quer da prevalência quer da genotipagem poderiam ajudar a implementar medidas de saúde pública eficazes no decréscimo da infecção pelo VHB, numa zona de elevada endemicidade, que abrange 8% a 10% do total da população[20,21]. Em Portugal salienta-se ainda a presença do genótipo C em indivíduos oriundos da China, país em que predominam os genótipos B e C[8].

Em contraste com estas elevadas prevalências observadas na América do Sul surge a maior parte do território da América do Norte, com prevalências de infecção abaixo de 2%[33], e com uma variada expressão genótipica entre o A, o D, o F, o G e H. A este fenómeno não serão alheios todos os movimentos migratórios de todos os continentes para o 'novo mundo', com grande proporção de Asiáticos, o que poderá ser uma explicação relativa ao passado, mas também ao presente, em termos de infecção pelo VHB nesta área do globo. Na América do Norte parece importante, ainda, salientar, a existência de duas zonas de elevada endemicidade, as áreas associadas aos *nativos americanos*, no Alasca e no norte do Canadá, onde as taxas de infecção variam de 5 a 15% da população[33]. Para além do importante problema de saúde pública, a genotipagem destas duas áreas localizadas em zonas longínquas e eventualmente, mais inacessíveis ao mundo exterior, poderiam em muito contribuir para um maior conhecimento sobre as implicações de determinados genótipos e da associação, ou não, a formas mais ou menos severas de doença hepática, fim último da genotipagem do VHB.

Esta situação é também extensível a Portugal, em que se torna necessário, tanto quanto possível, realizar estudos nacionais que permitam obter não só um conhecimento mais abrangente dos genótipos presentes, mas fundamentalmente permitam estudar as relações e a importância dos genótipos D e A, os genótipos mais prevalentes em Portugal, na evolução e severidade da doença hepática[27]. No Norte de Portugal onde se observou uma distribuição dos genótipos D de 60,3% e A de 31,5%, a positividade do HBeAg estava associada com o genótipo D, com valores elevados de carga viral, e das enzimas hepáticas particularmente a Alanina Aminotransferase (ALT) e o Aspartato Aminotransferase (AST).

Com a implementação da vacinação obrigatória de todos os recém-nascidos desde o ano de 2000, certamente Portugal apresentará, no futuro, níveis residuais de infecção pela hepatite B, no entanto, não se pode escamotear o facto de que esta doença afecta, ainda hoje, cerca de um milhão de Portugueses, com aproximadamente 100.000 indivíduos cronicamente infectados pelo VHB.

O estudo desenvolvido em 2009 em Portugal[27] permitiu conhecer a distribuição dos genótipos do VHB no Norte de Portugal, cujos dados se desconheciam até à data. A distribuição genotípica encontrada parece estar associada não só ao facto de Portugal ser um país europeu, mas também ao facto de ter imigração oriunda de África, Brasil, do leste Europeu, e também de países asiáticos como a China. Considera-se pertinente avaliar esta realidade a nível nacional, nomeadamente na área de Lisboa, cuja taxa de imigração é consideravelmente diferente das outras regiões de Portugal, assim como dos territórios autónomos dos Açores e da Madeira.

Conflito de interesses:
Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:
Patrocínio: Fórum Hematológico do Norte.

BIBLIOGRAFIA

1. LOK AS, MCMAHON BJ: Chronic hepatitis B. Hepatology 2007;45(2):507-539
2. LECOUR H, RIBEIRO AT, AMARAL I, RODRIGUES MA: Prevalence of viral hepatitis markers in the population of Portugal. Bull World Health Organ 1984;62(5):743-7
3. SANTOS A, CARVALHO A, TOMAZ J et al: Prevalence of markers of hepatitis B infection in the adult population of the district of Coimbra. Acta Med Port 2000;13(4):167-171
4. Ministério da Saúde: Avaliação do programa nacional de vacinação e melhoria do seu custo-efectividade: 2º inquérito serológico nacional: Portugal Continental 2001-2002. Direcção-Geral da Saúde 2004
5. KURBANOV F, TANAKA Y, MIZOKAMI M: Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. Hepatol Res 2010;40(1):14-30
6. CHU CJ, LOK AS: Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. Hepatology 2002;35(5):1274-6
7. BAE SH, YOON SK, JANG JW et al: Hepatitis B virus genotype C prevails among chronic carriers of the virus in Korea. J Korean Med Sci 2005;20(5):816-820
8. ZHU L, TSE CH, WONG VW, CHIM AM, LEUNG KS, CHAN HL: A complete genomic analysis of hepatitis B virus genotypes and mutations in HBeAg-negative chronic hepatitis B in China. J Viral Hepat 2008;15(6):449-458

9. CARNEIRO DE MOURA M, MARINHO R: Natural history and clinical manifestations of chronic hepatitis B virus. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008;26(Suppl 7):11-8
10. ABREU C. Viral hepatitis in travellers. Acta Med Port 2007;20(6):557-566
11. TANGKIJVANICH P, MAHACHAI V, KOMOLMIT P, FONGSARUN J, THEAMBOONLERS A, POOVORAWAN Y: Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Thailand. World J Gastroenterol 2005;11(15):2238-43
12. MICHITAKA K, TANAKA Y, HORIIKE N et al: Tracing the history of hepatitis B virus genotype D in western Japan. J Med Virol 2006;78(1):44-52
13. CHATTOPADHYAY S, DAS BC, KAR P: Hepatitis B virus genotypes in chronic liver disease patients from New Delhi, India. World J Gastroenterol 2006;12(41):6702-6
14. SUNBUL M, LEBLEBICIOGLU H: Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. World J Gastroenterol 2005;11(13):1976-80
15. BAHRI O, CHEIKH I, HAJJI N et al: Hepatitis B genotypes, precore and core promoter mutants circulating in Tunisia. J Med Virol 2006;78(3):353-7
16. SAUDY N, SUGAUCHI F, TANAKA Y et al: Genotypes and phylogenetic characterization of hepatitis B and delta viruses in Egypt. J Med Virol 2003;70(4):529-536
17. VRAY M, DEBONNE JM, SIRE JM et al: Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Dakar, Senegal. J Med Virol 2006; 78(3):329-334
18. HASEGAWA I, TANAKA Y, KURBANOV F et al: Molecular epidemiology of hepatitis B virus in the United Republic of Tanzania. J Med Virol 2006;78(8):1035-42
19. CHU CJ, KEEFFE EB, HAN SH et al: Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. Gastroenterology 2003;125(2):444-451
20. ALVARADO-ESQUIVEL C, SABLON E, CONDE-GONZALEZ CJ, JUAREZ-FIGUEROA L, RUIZ-MAYA L, AGUILAR-BENAVIDES S: Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: predominant circulation of hepatitis B virus genotype H. World J Gastroenterol 2006;12(40):6540-5
21. CONDE SR, MOIA LDE J, BARBOSA MS et al: [Prevalence of hepatitis B virus genotypes and the occurrence of precore mutation A-1896 and to correlate them with the clinical presentation of chronic hepatitis, in a population group of the Eastern Amazon region]. Rev Soc Bras Med Trop 2004;37(Suppl 2):33-9
22. BELL SJ, LAU A, THOMPSON A et al: Chronic hepatitis B: recommendations for therapy based on the natural history of disease in Australian patients. J Clin Virol 2005;32(2):122-7
23. VERSCHUERE V, YAP PS, FEVERY J: Is HBV genotyping of clinical relevance? Acta Gastroenterol Belg 2005;68(2):233-6
24. GANNE-CARRIE N, WILLIAMS V, KADDOURI H et al: Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). J Med Virol 2006;78(3):335-340
25. KONDILI LA, BRUNETTO MR, MAINA AM et al. Clinical and molecular characterization of chronic hepatitis B in Albania: a country that is still highly endemic for HBV infection. J Med Virol 2005;75(1):20-6
26. SORIANO V, MOCROFT A, PETERS L et al: Predictors of hepatitis B virus genotype and viraemia in HIV-infected patients with chronic hepatitis B in Europe. J Antimicrob Chemother 2010 Jan 5;**[FALTA VOLUME E NÚMEROS DE PÁGINAS]**
27. MOTA A, GUEDES F, AREIAS J, PINHO L, CARDOSO MF: Epidemiological study of genotypes of hepatitis B virus in northern Portugal. J Med Virol 2009;81(7):1170-6
28. MA JC, WANG LW, LI XJ, LIAO YF, HU XY, GONG ZJ: Relationship between HBV genotypes and anti-viral therapeutic efficacy of interferon-alpha. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2007; 6(2):166-171
29. TILLMANN HL: Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol 2007;13(1):125-140
30. AKUTA N, KUMADA H: Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies. J Antimicrob Chemother 2005;55(2):139-142
31. LIU CJ, KAO JH, CHEN DS: Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. Liver Int 2005;25(6):1097-107
32. TAVORA-TAVIRA L, TEODOSIO R, SEIXAS J et al: Sexually transmitted infections in an African migrant population in Portugal: a base-line study. J Infect Dev Ctries 2007;1(3):326-8
33. CAREY WD: The prevalence and natural history of hepatitis B in the 21st century. Cleve Clin J Med 2009;76(Suppl 3):S2-5

CAPÍTULO 2 – OBJECTIVOS

Em Portugal, as hepatites víricas são a segunda maior causa de doença hepática (1). A doença hepática tem um peso significativo no conjunto das dez principais patologias, aparecendo em quinto lugar no que se refere aos potenciais anos de vida perdidos aos 70 anos (5). A mortalidade por cirrose hepática apresenta cerca de 2.500 casos por ano. As estatísticas dos centros hospitalares indicam que, 15-20% dos doentes com cirrose hepática estão infectados com o vírus da hepatite B (VHB) (2). Actualmente, não existe informação exacta sobre a prevalência desta infecção crónica na população portuguesa. De acordo com os estudos mais representativos nesta área, a percentagem de indivíduos cronicamente infectados pelo VHB representaria cerca de 1% da população portuguesa no final do século 20 (3-5). Estes estudos que surgiram nos anos 80 do século passado, foram contributos parciais para a avaliação da infecção crónica pelo VHB, mas um estudo de carácter oficial e com dados de prevalência, com carácter definitivo, nunca existiu. O segundo inquérito serológico nacional realizado em Portugal Continental, nos anos de 2001 a 2002 (6) e publicado pelo Ministério da Saúde, aponta para uma prevalência de 0,36% de indivíduos com presença do antigénio de superfície do VHB (Ag HBs).

Após a descoberta da estrutura vírica, o passo mais importante nos anos 70 e 80 do século passado foi o aparecimento da vacina para a infecção pelo VHB. Sendo, actualmente, a sua eficácia e segurança perfeitamente conhecidas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu estratégias de vacinação em função da endemicidade das zonas afectadas. Em países com endemicidade média a baixa, a estratégia foi vacinar exclusivamente os indivíduos considerados de alto risco (7), o que foi feito progressivamente, a partir de 1990. No entanto, esta estratégia de vacinação, acabou por ter pouco impacto já que não foi capaz, por si só, de reduzir a incidência da infecção pelo VHB. Muitas das pessoas que ficaram infectadas, não tinham sido vacinadas por não apresentarem factores de risco identificados ou por não terem tido acesso a programas de vacinação (5, 8). Assim, face ao fraco impacto desta estratégia, a OMS, na 45ª Assembleia Mundial de Saúde, recomendou que, os países com proporção de portadores inferiores a 2%, integrassem nos programas nacionais de vacinação (até 1997) a vacinação contra a hepatite B dos adolescentes e recém-nascidos.

Sendo Portugal um país com baixa endemicidade, a vacinação iniciou-se para os grupos de risco em meados de anos 80 do século XX e a partir de 1995 a vacinação, teve caractér obrigatório para todos os adolescentes. No ano 2000, a vacina passou a ser administrada a todos os recém-nascidos, fazendo actualmente parte do Programa Nacional de Vacinação (PNV) (9).

Em suma, Portugal tem uma cobertura vacinal completa nos recém-nascidos, desde o ano 2000 e uma prevalência estimada de 0,36% de infectados pelos VHB.
Apesar desta mudança positiva, existem ainda cerca de 150.000 portadores crónicos do VHB. Esta é uma faixa da população em que é necessário monitorizar a doença, tratá-la e providenciar todo o apoio medicamentoso e social. É então neste contexto, que surge este trabalho de investigação com o intuito de 'saber mais, para melhor intervir'.
Uma noção aproximada da realidade portuguesa no que concerne à prevalência da infecção crónica pelo VHB, acompanhada de um quase desconhecimento sobre a presença e caraterísticas dos genótipos existentes, foram a grande motivação para implementar este trabalho de investigação.

Assim o objectivo principal deste trabalho foi conhecer o perfil epidemiológico da infecção pelo vírus da Hepatite B (VHB) no Norte de Portugal e, em particular, a distribuição genotípica do vírus.

Definiram-se ainda como objectivos secundários avaliar as eventuais relações entre a prevalência de determinados genótipos e variáveis como: a idade, vias de transmissão da infecção crónica, o género, estilos de vida e hábitos de ingestão alcoólica.

De forma análoga, avaliaram-se doseamentos dos marcadores víricos, o valor da carga viral e de outros parâmetros bioquímicos para avaliação da função hepática, tendo em vista, o estabelecimento de eventuais relações com os genótipos encontrados.

2.1 - Bibliografia

1. Carvalho A. Hepatites virais: actualidades e perspectivas. Coimbra Médica. 2005; 1 (5ª série):45-60.

2. Cortez-Pinto H, Marques-Vidal P, Monteiro E. Liver disease-related admissions in Portugal: clinical and demographic pattern. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2004 Sep;16(9):873-7.

3. Lecour H, Ribeiro AT, Amaral I, Rodrigues MA. Prevalence of viral hepatitis markers in the population of Portugal. Bulletin of the World Health Organization. 1984;62(5):743-7.

4. Santos A, Carvalho A, Tomaz J, Rodrigues V, Coxinho L, Bento D, et al. Prevalence of markers of hepatitis B infection in the adult population of the district of Coimbra. Acta Med Port. 2000 Jul-Aug;13(4):167-71.

5. Plymoth A, Viviani S, Hainaut P. Control of hepatocellular carcinoma through hepatitis B vaccination in areas of high endemicity: perspectives for global liver cancer prevention. Cancer Lett. 2009 Dec 1;286 (1):15-21.

6. Ministério da Saúde. Avaliação do programa nacional de vacinação e melhoria do seu custo-efectividade: 2º inquérito serológico nacional: Portugal Continental 2001-2002. DGS. 2004.

7. Kane M. Global programme for control of hepatitis B infection. Vaccine. 1995;13 Suppl 1:S47-9.

8. Alter MJ, Hadler SC, Margolis HS, Alexander WJ, Hu PY, Judson FN, et al. The changing epidemiology of hepatitis B in the United States. Need for alternative vaccination strategies. JAMA. 1990 Mar 2;263(9):1218-22.

9. DGS. Programa Nacional de Vacinação (PNV). Orientações Gerais. In: (Portugal) DGS, editor: http://www.dgs.pt/; 2008.

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

Os três hospitais que assistem a maior parte da população do Norte de Portugal situam-se na cidade do Porto: o Hospital de São João, o Hospital de Santo António e o Hospital Joaquim Urbano. O Hospital de São João e Santo António são hospitais centrais e de referência, na área da Gastrenterologia. O Hospital Joaquim Urbano está vocacionado para o tratamento das doenças infecciosas.

Os indivíduos em estudo, são provenientes destes dois últimos hospitais, da consulta de Medicina e Gastrenterologia do Hospital Santo António e da consulta geral do Hospital Joaquim Urbano, nos anos 2008 e 2009, e deverão constituir, uma boa aproximação da situação no Norte de Portugal, no que diz respeito à infecção pelo vírus da Hepatite B (VHB). O critério de inclusão no estudo foi a presença do antigénio de superfície do VHB (AgHBs), durante, pelo menos, seis meses.

As determinações laboratoriais na altura da responsabilidade do Serviço de Hematologia Clínica, área de marcadores víricos, permitiram um controlo mais rigoroso no que se refere à aplicação da tecnologia utilizada assim como se evitaram viéses de observador na medida em que, a autora, foi também a responsável pela execução de parte das técnicas laboratoriais. Acrescenta-se que, a autora tem particular interesse nesta temática das doenças víricas, já que, desde o ano de 1986, tem desenvolvido as suas actividades profissionais no laboratório de marcadores víricos, do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto.

3.1 - Levantamento de dados

Os dados relativos ao género, à idade, à forma de transmissão da infecção crónica pelo VHB, aos estilos de vida e aos hábitos de ingestão alcoólica, foram recolhidos dos processos dos doentes, com o apoio dos clínicos responsáveis. Utilizou-se uma grelha previamente definida, referente aos itens acima referidos, o que permitiu um levantamento uniforme dos dados existentes.

De acordo com as informações clínicas, as diferentes formas de transmissão foram descritas como sexual, vertical e intrafamiliar. Esta última, é considerada pelos clínicos, quando a transmissão ocorre dentro da família, mas não necessariamente através do contacto sexual, e quando não há evidências de outras formas de transmissão.

3.2 - Avaliação de parâmetros biológicos

Marcadores víricos

Tendo como base a permissa da positividade do AgHBs positivo durante, pelo menos, seis meses; a positividade deste marcador serológico, foi implementada, assim como a pesquisa do respectivo anticorpo, anti-HBs. Foi feita a pesquisa do antigénio HBe (AgHBe) e do seu anticorpo, o anti-HBe; e ainda a pesquisa do anti-HBc. Em todas as determinações foi utilizado o aparelho Vitros ECI, que utiliza técnicas de Quimioluminescência (da *Ortho-Clinical Diagnostics*, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido).

Carga viral

Foi utilizado o teste *VERSANT®HBV DNA 3.0 assay* (bDNA) (Bayer, Nova Iorque, EUA) que é um procedimento para a quantificação directa do ADN do VHB, através da amplificação do sinal emitido pelo ácido nucleico. Este ensaio, está padronizado em cópias, que varia de 2.000 a 100.000.000 cópias/ml. Valores menores que 2.000 cópias/ml são considerados 'não detecção do vírus'.

Genotipagem

Para a pesquisa dos genótipos do VHB, utilizou-se o teste *TRUGENE ® HBV genotyping kit.* Este teste foi usado, conjuntamente, com um outro, o *Open Gene ®DNA Sequencing System* (Bayer, Nova Iorque, EUA) e permite obter uma sequenciação bidireccional do antigénio de superfície e dos domínios B a E da transcriptase reversa do VHB. A sequenciação do ADN do VHB é comparada com uma 'biblioteca' de genótipos e mutantes já conhecidos, sendo elaborado um relatório final relativo ao genótipo que se pretende conhecer.

Avaliação bioquímica da função hepática

Sabe-se que são muitos os testes laboratoriais que detectam as alterações da função hepática, embora não definam a causa da doença hepática. Neste estudo, foram avaliados os seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT) cujos valores de referência variam de 10 a 36 U/L a 37ºC; aspartato aminotransferase (AST) cujos valores de referência, variam de 10 a 30 U/L a 37ºC; gama glutamil transferase (γ-GT) cujos valores de referência, variam de 10 a 66 U/L a 37ºC; fosfatase alcalina (FA) cujos valores de referência, variam de 45 a 122 U/L a 37ºC; alfa-fetoproteína (AFP) cujo valor de referência, é inferior a 10,9ng/ml. Os valores elevados num destes, ou em vários destes parâmetros analíticos, são indicadores de inflamação ou doença hepática. Todos

estes parâmetros foram avaliados utilizando um método enzimático cinético, no aparelho Cobas Integra 800 (*Roche*, Mannheim, Alemanha). Foi ainda feito o doseamento do Tempo de Protrombina (TP) no aparelho ACL TOP (*Instrumentation Laboratory Company*, Lexington, EUA).

Avaliação da doença hepática

Na avaliação da doença hepática, todos os indivíduos foram sujeitos a uma ecografia e/ou ultrassonografia.

No grupo de indivíduos em que a avaliação pela biópsia hepática foi aplicada, os resultados, foram classificados como necro-inflamatório, fibrose e esteatose.

A severidade da doença hepática, foi avaliada em conformidade com a classificação de Child, modificada em 1973 por Pugh (1). Esta classificação prevê a presença de três graus de severidade da doença hepática, de A a C. De acordo com esta classificação, o grau C corresponde a uma mortalidade em 5 anos de 88%, o grau B a 38% e o grau A a 29%.

Hábitos de ingestão alcoólica

Os hábitos de ingestão alcoólica, foram categorizados em menos do que, e mais do que, 20g/dia. A opção por esta classificação, teve por base estudos oriundos da OMS e de outras publicações científicas relevantes nesta área do conhecimento (2-3).

3.3 - A estrutura vírica do VHB e os genótipos

O Vírus da Hepatite B (VHB) é um membro da família *Hepadnaviridae*, cuja principal característica é o seu hepatotropismo. O vírus, contém um revestimento externo denominado antigénio de superfície (AgHBs) e um invólucro interno. Durante a infecção crónica, a produção do AgHBs, ocorre em grandes quantidades nos hepatócitos e é libertado sobre a forma de pequenas partículas e filamentos (partículas Dane). O invólucro interno é constituído pela proteína do core (AgHBc), que contém ADN vírico. Para além do ADN vírico, no *core* do vírus, encontra-se ainda a enzima responsável pela multiplicação do ADN vírico nas células já infectadas, que se designa como polimerase do ADN. O antigénio 'e' (AgHBe) é outra das proteínas do invólucro interno do vírus, apesar de algumas estirpes, mutantes, conseguirem reproduzir-se, sem dar origem ao AgHBe.

Numa primeira fase, o VHB, adere a um receptor de superfície do hepatócito, enquanto o invólucro interno é transportado pelo citoplasma celular até ao núcleo. Aí o ADN vírico é convertido numa forma fundamental para a estratégia replicativa do VHB, o ADNccc (*covalently closed circular DNA*). Posteriormente, a síntese e agregação organizada

ocorre no citoplasma originando novas estruturas víricas que são libertadas para a circulação, possibilitando a infecção crónica de novos hepatócitos. O ADNccc vai persistir no núcleo das células infectadas e torna-se uma reserva permanente e continuada da infecção crónica. Nas mutações do *core promotor basal* (CPB) e/ou *precore*, a produção do AgHBe pode ser reduzida ou mesmo eliminada. Este tipo de hepatite crónica B, provocada pelos vírus mutantes do pré-core, é muito expressiva na Europa Mediterrânea, onde se inclui Portugal. É responsável por cerca de 80% dos casos de hepatite crónica, com uma taxa muito baixa de resolução espontânea da infecção crónica, o que explica a sua cronicidade.

O antigénio de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) apresenta uma grande heterogeneidade serológica. As diferenças antigénicas do próprio AgHBs estabeleceram quatro subtipos principais: *adw*, *ayw*, *adr*, e *ayr* (4) o que permitiu, em definitivo, avanços nos métodos de diagnóstico, através da substituição da subtipagem pela genotipagem. As actividades da ADN polimerase e transcriptase reversas são eficientes e rápidas, mas propícias à ocorrência de erros. Até ao momento, foram detectadas variações nas sequências do VHB em quase todas as regiões do genoma (5).

Os genótipos do VHB

São dez os genótipos para o VHB encontrados (A-J) e distribuídos por várias áreas geográficas do globo (4, 6-10).

Na Europa, os genótipos A e D são os mais frequentemente descritos. A classificação genotípica, baseia-se numa divisão intergrupos de aproximadamente 8% na sequência nucleotídea (11-12). Para além dos genótipos, o aparecimento de mutantes do VHB ocorrem e são capazes de provocar alterações *core promotor basal* (CPB) e/ou *precore*, no antigénio de superfície e na sequência genética da polimerase. Refira-se ainda a existência de mutantes que não permitem a síntese do AgHBe (13-14). Apesar deste conhecimento da estrutura vírica do VHB e da influência na evolução da infecção crónica pelo VHB (15-16), a relação exacta entre os genótipos e a patogenicidade da doença mantem-se largamente desconhecida (17), particularmente no continente europeu.

3.4 - Bibliografia

1. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Br J Surg. 1973 Aug;60(8):646-9.

2. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S87-96.

3. Dawson DA. Alcohol consumption, alcohol dependence, and all-cause mortality. Alcohol Clin Exp Res. 2000 Jan;24(1):72-81.

4. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. Hepatol Res. 2010 Jan;40(1):14-30.

5. Ganem D SR. Hepadnaviridae and their replication. 2001;in Knipe DM, Howley PM,Chanock RM, Monath TP, Roizman B, Straus SE, eds. Fields virology. 4th ed. Philadelphia:Lippincott-Raven:2703-37.

6. Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. J Gastroenterol Hepatol. 2002 Jun;17(6):643-50.

7. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Intervirology. 2004 Nov-Dec;47(6):289-309.

8. Halfon P, Bourliere M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, et al. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. J Viral Hepat. 2006 May;13(5):329-35.

9. Sloan RD, Strang AL, Ramsay ME, Teo CG. Genotyping of acute HBV isolates from England, 1997-2001. J Clin Virol. 2009 Feb;44(2):157-60.

10. McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. Hepatol Int. 2009 Jun;3(2):334-42.

11. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J Gen Virol. 1988 Oct;69 (Pt 10):2575-83.

12. Boot HJ, Cremer J, Koedijk FD, van Ballegooijen WM, Op de Coul EL. Improved tracing of hepatitis B virus transmission chains by phylogenetic analysis based on C region sequences. J Med Virol. 2008 Feb;80(2):233-41.

13. Avellon A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. J Med Virol. 2006 Jan;78(1):24-36.

14. Mendy M, D'Mello F, Kanellos T, Oliver S, Whittle H, Howard CR. Envelope protein variability among HBV-Infected asymptomatic carriers and immunized children with breakthrough infections. J Med Virol. 2008 Sep;80(9):1537-46.

15. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology. 2000 Mar;118(3):554-9.

16. Buster EH, Hansen BE, Lau GK, Piratvisuth T, Zeuzem S, Steyerberg EW, et al. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. Gastroenterology. 2009 Dec;137(6):2002-9.

17. Bahri O, Cheikh I, Hajji N, Djebbi A, Maamouri N, Sadraoui A, et al. Hepatitis B genotypes, precore and core promoter mutants circulating in Tunisia. J Med Virol. 2006 Mar;78(3):353-7.

CAPÍTULO 4 – ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E GENOTÍPICO DA INFECÇÃO CRÓNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE B EM PORTUGAL

RESUMO

A prevalência da infecção crónica pelo vírus da hepatite B (VHB) em Portugal é de aproximadamente 1%, e não existem até ao momento estudos sobre a prevalência dos diferentes genótipos neste país.

Este estudo, pretende conhecer a distribuição dos genótipos do VHB no norte de Portugal e conhecer as possíveis associações entre genótipos e género, vias de transmissão, marcadores víricos, carga viral e parâmetros bioquímicos para a avaliação da função hepática.

A amostra consiste em 340 indivíduos com infecção crónica pelo VHB, em que 42,9% eram mulheres. As avaliações dos parâmetros laboratoriais foram implementadas e as informações de carácter demográfico, incluindo hábitos de ingestão alcoólica, foram obtidos aquando da consulta dos processos clínicos.

Os resultados indicam a predominância do genótipo D (60,3%) e do genótipo A (31,5%). A transmissão por via intrafamiliar era predominante no género feminino, enquanto os homens eram infectados de igual modo por via perinatal, sexual e intrafamiliar. Ausência de HBeAg foi encontrada numa menor proporção de mulheres com o genótipo D quando comparadas com genótipo A (56,6% vs 82,1%, p=0,028). Níveis de carga viral elevados estavam associados significativamente e de forma independente com o genótipo D e com HBeAg. As Alanina e Aspartato aminotransferases (ALT e AST) estavam associadas com o género e HBeAg.

Os genótipos A e D são os que ocorrem em maior prevalência no norte de Portugal. Indivíduos infectados com genótipo D apresentavam valores mais elevados de carga viral. A presença do HBeAg estava associada com o genótipo D, carga viral, ALT e AST.

Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. **Epidemiological study of genotypes of hepatitis B vírus in northern Portugal**. J Med Virol. 2009 Jul; 81(7): 1170-6.

Reproduzido com a permissão de: *John Wiley and sons.*

Autorização nº 2520170831245

Journal of Medical Virology 81:1170–1176 (2009)

Epidemiological Study of Genotypes of Hepatitis B Virus in Northern Portugal

Ana Mota,[1,2] Fátima Guedes,[3] Jorge Areias,[1,4] Luciana Pinho,[1,2] and Margarida Fonseca Cardoso[1,5,6]*

[1]*Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Porto, Portugal*
[2]*Serviço de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA), Porto, Portugal*
[3]*Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal*
[4]*Serviço de Gastrenterologia, Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA), Porto, Portugal*
[5]*Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, (CIIMAR), Porto, Portugal*
[6]*Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto (ISPUP), Porto, Portugal*

While the overall prevalence of hepatitis B virus (HBV) infection in Portugal is around 1%, there are no published studies examining HBV genotypes in this country. This study aimed to survey HBV genotypes in the northern Portugal and to examine the possible associations between genotypes and gender, viral transmission routes, viral markers, viral load, and biochemical tests of liver function. The study sample consists of 340 patients with HBV infection of whom 42.9% were women. Tests were carried out for HBV genotypes and biochemical liver function while demographic information, including alcohol intake, was obtained from the patient files. The results indicate the predominance of genotype D (60.3%) and genotype A (31.5%). Intrafamilial transmission was predominant in female patients, while males were infected in equal proportions by perinatal, sexual, and intrafamilial transmission. Absence of HBeAg was found in a significantly smaller proportion of female patients with genotype D as compared to A (56.6% vs. 82.1%, $P = 0.028$). High viral load was associated significantly and independently with genotype D and HBeAg. Both alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST) were associated with gender and HBeAg. Thus, genotypes A and D were found to be the most prevalent in the north of Portugal. Patients infected with genotype D had higher levels of HBV DNA. HBeAg was associated with genotype D, viral load, and ALT and AST. ***J. Med. Virol. 81:1170–1176, 2009.*** © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: hepatitis B virus; genotypes; virological markers; viral load; liver enzymes; northern Portugal

INTRODUCTION

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is a major health problem, with approximately 350–400 million virus carriers worldwide [Alter, 2003]. At present, there is no information about the prevalence of HBV infection in Portugal. According to the most representative research in this field, patients infected chronically with HBV represent approximately 1% of the Portuguese population [Lecour et al., 1984; Santos et al., 2000].

Seven HBV genotypes (A–G) have been identified, with a worldwide geographical distribution [Kao, 2002; Norder et al., 2004; Halfon et al., 2006]. In addition, genotype H was described recently in American Indian patients [Arauz-Ruiz et al., 2002; Halfon et al., 2006]. In Europe, genotypes A and D are reported most frequently. Genotype classification is based on an inter-group divergence of 8% or more in the nucleotide sequence [Okamoto et al., 1988]. In addition to genotypes, stable HBV mutant strains displaying changes in the precore, core, surface, and polymerase gene sequences are found frequently, and mutants unable to achieve synthesis of HBeAg are particularly common [Avellon and Echevarria, 2006].

It was suggested that HBV genotypes may influence the clinical outcome of HBV infection [Kao et al., 2000]. Although the relationship between HBV genotype and pathogenicity remains largely unknown [Bahri et al.,

Grant sponsor: Forum Hematológico do Norte, Porto, Portugal.

*Correspondence to: Margarida Fonseca Cardoso, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Largo Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto, Portugal.
E-mail: mcard@icbas.up.pt

Accepted 24 March 2009
DOI 10.1002/jmv.21526
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

© 2009 WILEY-LISS, INC.

2006], current research indicates that an increase in the viral load is associated with liver injury, independent of serum alanine aminotransferase (ALT) levels or the presence of the HBeAg in the serum [Chen et al., 2007b; Wu et al., 2007].

Alcohol consumption in Portugal is 15% higher than in the rest of Europe [WHO, 2008b]. It is estimated that there are approximately 1 million alcoholics or excessive alcohol drinkers in Portugal [WHO, 2008b]. In 2003, a WHO survey showed an annual pure alcohol consumption of 9.49 L per capita [WHO, 2008a]. While this study does not suggest an association between alcohol consumption and severity of liver disease, it may be an important confounding factor for the incidence of hepatitis B.

The north of Portugal is populated by approximately 3.7–4 million inhabitants, with a slight predominance of females (51.62%), making up one-third of the country's total population. The region is characterized by an industrialized, and heavily populated western Atlantic coast, and a rural and sparsely populated interior plateau. In the north of the country, around 30% of the population is less than 25 years old, making this region one of the youngest in Portugal [INE, 2008]. At present, 4% of the population of Portugal consists of immigrants from Africa, Brazil, and Eastern Europe, although the north of the country has relatively fewer immigrants than the country as a whole [MAI, 2008].

The aim of this study was to assess the characteristics and distribution of HBV genotypes in the northern region of Portugal, and to identify the association between HBV genotypes linked with patient demographics, including alcohol intake and viral transmission routes. Viral markers for HBV, HCV (hepatitis C virus), and HIV (human immunodeficiency virus) were also considered, as was alcohol intake.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study population was composed of patients with HBV infection, documented by the presence of the HBsAg in the serum for at least 6 months. These patients were observed in the two hospitals in the city of Oporto: the Hospital de Santo António (HSA), where there is a hepatitis clinic, and the Hospital Joaquim Urbano (HJU), specializing in infectious diseases. Along with the Hospital de São João, these hospitals cover the majority of the patients from the north of Portugal.

The demographics, clinical, and medical history of the patients were retrieved from medical files. Demographic characteristics include age, gender, place of birth and residence, marital status, and alcohol consumption (categorized as less than or greater than 20 g/day). The presumed sources of HBV infection were also identified, with information provided by physicians, based on the clinical history and responses to a questionnaire. Four categories were considered: (1) perinatal transmission, (2) sexual intercourse, (3) intrafamilial sources of infection, and (4) other sources, including at least one incidence of intravenous drug use, blood transfusion, occupational exposure, iatrogenic exposure (e.g., endoscopy or coloscopy examination, history of surgery, acupuncture, or hemodialysis), or unknown. Sexual transmission was recorded for patients with a sexual partner infected with HBV. Intrafamilial transmission was recorded when all other routes of transmission were excluded.

Detection of Viral Markers in Serum

Serum samples were tested for HBsAg, antibody to HBsAg (anti-HBs), antibody to HBV core antigen (anti-HBc), HBeAg, and antibody to HBeAg (anti-HBe). Tests for co-infection by HCV and HIV types 1 and 2 were also performed. All tests were carried out by automated chemiluminiscent assays (Vitros ECi, Ortho-Clinical Diagnostics, Amersham, Buckinghamshire, UK).

HBV DNA Quantitation

HBV DNA levels were determined using the VERSANT® HBV DNA 3.0 assay (bDNA) (Bayer, Tarrytown, New York), a signal amplification nucleic acid probe assay for direct DNA quantitation. The assay quantification range is 357–17,900,000 HBV DNA IU/ml.

HBV Genotyping

HBV genotypes were identified by the TRUGENE® HBV genotyping kit. When used in conjunction with the Open Gene® DNA Sequencing System (Bayer), this kit provides a method for obtaining bi-directional sequences from overlapping surface antigens and domains B through E of the HBV genome reverse transcriptase region. The HBV genotype was identified automatically by comparing the sequence with a library of DNA sequences from the known HBV genotypes.

Biochemical Tests of Liver Function

ALT and AST (aspartate aminotransferase) were determined by enzyme tests without piridoxalphosphate. γ-glutamil transpeptidase (GGT) was determined by an enzyme test with γ-glutamil phosphatase. All tests were performed using the Cobas Integra 800 (Roche, Mannheim, Germany). Levels were considered above the normal range for results higher than 36, 30, and 66 U/L, respectively.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (version 16.0) and STATA (version 9.0) software with two-sided significance set at 5% throughout.

Qualitative variables were described as percentages and quantitative variables as mean, median, or geometric mean where necessary.

Proportions were compared using the Pearson χ^2 test (with continuity correction) as appropriate, or by Fisher's exact test. Continuous variables were compared with the

t-test, after log transformation so that assumptions were met, if necessary.

Statistical analysis of binary outcomes was performed using multivariable logistic regression analysis. Statistical analysis of viral load (a continuous variable) was performed using multiple linear regression analysis, to see which variables were associated with the outcome. Viral load was converted to a natural logarithm to normalize its skewed distribution of residuals and reduce the influence of outlying high values on regression coefficients, and adequately specify the relation of the considered outcome and independent variables. As a first step, factors found to be associated significantly at $P < 0.15$ in univariable regression were considered in a multiple regression analysis. In the second stage, a stepwise approach was applied. Both forward and backward selection methods were used to obtain the smallest number of explanatory variables to provide a well-identified model. The continuous variable modeling was tested by the fractional polynomial method, a procedure that make use of the full information available in the data when a linear relationship is not assumed [Royston and Altman, 1994]. Fractional polynomial modeling confirmed that the association with age was linear. Specific interactions between parameters of interest were also investigated, but none of these were significant. The Hosmer–Lemeshow goodness of fit test was used to check for lack of fit of the final logistic model. The determination coefficient was assessed for the final linear model.

RESULTS

The distribution of HBV genotypes among the 340 patients studied is shown in Table I. Genotypes D (60.3%) and A (31.5%) were predominant, and genotypes C, E, and F were found in minor proportions. Characteristics of patients infected by HBV strains from genotypes A and D are summarized in Table II.

Virological markers found among these latter patients are shown in Table III. Two patients infected by genotype D were negative for anti-HBc, and one of these was positive for HBeAg. Among female patients, absence of HBeAg was significantly more common in patients infected by HBV genotype A strains.

Co-infection with HCV was observed in 16 (5.5%) individuals, co-infection with HIV 1 and 2 was only found in males, three of whom were infected by genotype A and two additional patients with genotype D.

Determination of HBV DNA levels showed that the proportion of undetectable DNA values (as defined in the Materials and Methods Section) was similar for genotypes A and D (8.4% vs. 7.3%). However, the proportion of patients with values higher than the upper limit of the assay (17,900,000 IU/ml) was smaller in genotype A than genotype D (9.3% vs. 22%). When the viral load was examined for values between 357 and 17,900,000, a significantly higher level ($P < 0.001$) of viral load was observed in genotype D (geometric mean 391,954.1; 95% CI 238,828.3–643,321.6) as compared to patients with genotype A (geometric mean 95,463.6; 95% CI 54,268.54–167,929.6).

Only gender, HBV genotypes and HBeAg were found to be associated significantly with HBV DNA levels in the univariable analysis: females, patients with genotype D and HBeAg had a higher viral load (Table IV). Multiple regression analysis showed that the viral load was associated significantly with genotype D and HBeAg, with gender being excluded from the equation.

Biochemical tests of liver function (Table V) were performed at the same time as genotyping. In order to investigate these parameters, the percentage of upper reference values was calculated, and the median and the range were estimated only for those values.

ALT was elevated in a smaller proportion of female patients with genotype A (27%), as compared to those with genotype D (40.7%). However, in male patients elevated ALT levels were observed in a similar proportion in the two genotypes, but in much higher proportion than in females (around 60%).

The proportion of elevated values of AST in female patients was the same as for ALT in both genotypes; however, they did not correspond to the same patients. Again, a larger proportion of male patients with increased AST values were observed.

Elevated levels of GGT seem to be higher in patients with genotype A than in genotype D, regardless of gender.

In order to identify any association between increased levels of ALT and gender, age, genotype, HBeAg, and the presumed source of HBV infection, a univariable analysis by logistic regression was carried out (Table VI).

TABLE I. Genotypes Distribution and Origin

	Portuguese		Non-Portuguese		
Genotype	n	%	n	%	Origin
A	103	32.1	4	21.1	Two from Central Europe and two from Africa
C	0	0.0	2	10.5	China
D	201	62.6	4	21.1	Two from Oriental Europe and two from Africa
E	3	0.9	9	47.4	Africa
F	13	4.0	0	0.0	
D and F	1	0.3	0	0.0	
Total	321	100	19	100	

TABLE II. Demographic Characteristics of Individuals With Genotypes A and D*

	Genotype A (n = 107)		Genotype D (n = 205)	
	n	%	n	%
The presumed source of HBV infection				
Perinatal transmission				
Female	9/38	23.7	18/92	19.6
Male	13/69	18.8	15/113	13.3
Sexual transmission				
Female	5/38	13.2	14/92	15.2
Male	13/69	18.8	19/113	16.8
Intrafamilial transmission				
Female	15/38	39.5	37/92	40.2
Male	13/69	18.8	27/113	23.9
Others[a]				
Female	9/38	23.7	23/92	25.0
Male	30/69	43.5	52/113	46.0
Alcohol intake >20 g/day				
Female	6/33	18.2	19/76	25.0
Male	27/58	46.6	50/96	52.1
Median age ± SD				
Female	48.82 ± 11.97		41.41 ± 14.55	
Male	43.03 ± 13.73		43.88 ± 15.80	

*Total for each variable may not sum to the sample size due to missing data.
[a]Other sources, including at least one incidence of intravenous drug use, blood transfusion, occupational exposure, iatrogenic exposure (e.g., endoscopy or coloscopy, history of surgery, acupuncture, or hemodialysis), or unknown.

For patients with high ALT serum levels, three factors were found to be significant in the univariable analysis: gender, age, and HBeAg. After adjusting for the effects of other variables, multiple regression analysis showed that only gender and HBeAg was associated significantly with ALT. The multiple logistic regression analysis showed males having a significantly higher probability of increased ALT levels compared to females (OR = 3.835; 95% CI 2.234–6.586; $P < 0.001$) and that patients with HBeAg were more likely to have increased ALT levels than patients without HBeAg (OR = 3.020; 95% CI 1.695–5.381; $P < 0.001$).

TABLE III. Detection of Virological Markers in Serum

	Genotype A (n = 107)		Genotype D (n = 205)	
	n	%	n	%
Anti-HBc positive				
Female	28/28	100.0	84/84	100.0
Male	58/58	100.0	97/99	98.0
HBeAg negative				
Female*	23/28	82.1	47/83	56.6
Male	42/58	72.4	68/99	68.7
Anti-HBe positive				
Female	23/38	82.1	43/83	51.8
Male	39/69	67.2	62/99	62.6
Anti HCV positive				
Female	1/34	2.9	4/84	4.8
Male	4/66	6.0	7/105	6.7
Anti-HIV 1 and 2 positive				
Female	0/65	0.0	0/105	0.0
Male	3/65	4.6	2/105	1.9

*$P < 0.05$.

In addition, males were also more likely to have increased AST levels than females (OR = 2.086; 95% CI 1.245–3.496; $P = 0.005$), after adjusting for the effects of the other variables in the model. Furthermore, patients with HBeAg had a significantly higher probability of an increased level of AST (OR = 2.414; 95% CI 1.412–4.127; $P = 0.001$).

After adjusting for the effects of the other variables in the model, increased GGT serum levels were associated marginally with being male (OR = 2.009; 95% CI 1.005–4.016; $P = 0.048$) and with increasing age of the patient (OR = 1.021; 95% CI 0.999–1.044; $P = 0.060$).

DISCUSSION

The results of the study show that in the north of Portugal, HBV genotype D was predominant (60.3%), followed by genotype A (31.5%). These results are consistent with research that shows that genotype D is the most common genotype in Mediterranean countries [Echevarria et al., 2005; Ezzikouri et al., 2008]. Genotypes C, E, F, and dual infection by genotype D and F were also observed in the population studied. All patients with genotype F were born in mainland Portugal. The patients with genotype E (n = 12) included nine cases from Angola and one patient each from Mozambique, S. Tome, and Guinea-Bissau. The small prevalence of genotype E can be explained by the low immigration levels in this area, but may suggest a special category for people originating from or traveling frequently to the former Portuguese colonies.

The two most representative genotypes, A and D, were the focus of this study. With both genotypes, males

TABLE IV. Significant Predictors of Viral Load* by Linear Regression**

	Univariable analysis				Multivariable analysis[a]				
	Unstandardized coefficients	CI 95%		*P*	Unstandardized coefficients	CI 95%		Standardized coefficients	*P*
Gender (female as reference)	−0.826	−1.594	−0.058	0.035					
Age	−0.023	−0.049	0.004	0.096					
Genotype (genotype A as reference)	0.471	0.214	0.727	<0.001	0.379	0.109	0.649	0.181	0.006
HBeAg (negative as reference)	2.668	1.743	3.593	<0.001	2.539	1.624	3.453	0.358	<0.001

*ln viral load.
**Two hundred thirty-three individuals with viral load of between 357 and 17,900,000 IU/ml (quantification limits of VERSANT HBV DNA 3.0 assay (bDNA)).
[a]The model accounts for 17% variability of the viral load.

represented an increased prevalence of cases. The unequal gender distribution (57.1% male) observed, is in accordance with most published research. The median patient age was identical for patients with genotypes D and A, irrespective of gender.

Intrafamilial transmission appears to be the predominant presumed source of HBV infection in female patients (about 40% for both genotypes), while in male patients this was reduced to about 20%. Sexual transmission as the presumed source of infection was increased slightly in males, while perinatal transmission was increased in females.

Similar European studies carried out in the Netherlands [Toy et al., 2008] and France [Grandjacques et al., 2000] examining the transmission routes of HBV have shown that genotype A was found most often in patients considered with infection transmitted by the sexual route. In contrast, genotype D was most often found in patients with perinatal transmission.

An examination of alcohol intake revealed that males consumed more alcohol than females, irrespective of HBV genotypes. Increased alcohol consumption in males is consistent with the findings in the WHOSIS report [WHO, 2008b].

Anti-HBc was not found only in two male cases with genotype D, one with HBeAg and the other without HBeAg. The absence of anti-HBc may be explained by the existence of a precore stop *codon* mutation in HBeAg seroconversion, but the existence of this mutation was not sought [Chen et al., 2007a]. This situation must be taken into consideration and investigated routinely, since this atypical pattern can also reflect unusual HBV infection [Echevarria and Leon, 2004].

In female patients, absence of HBeAg was observed in a significantly smaller percentage in genotype D than in genotype A patients (56.6% vs. 82.1%, $P = 0.028$). In male patients, a similar proportion (about 70%) was observed with both genotypes. In contrast with this result, another Spanish study [Sanchez-Tapias et al., 2002] found that absence of HBeAg was more prevalent in patients with genotype D.

Co-infection with HCV or HIV 1 and 2 was observed in only a small proportion of patients.

Increased levels of viral load were associated significantly and independently with genotype D and with HBeAg.

Some investigators found that HBV infection remained active after seroconversion to anti-HBe in nearly 40% of patients with genotype D. These findings may explain the high prevalence of genotype D found in patients with chronic hepatitis B and anti-HBe in Mediterranean countries [Rodriguez-Frias et al., 1995; Grandjacques et al., 2000].

Many biochemical tests that detect abnormal liver function can indicate liver disease, but do not define the cause. The most common blood tests that assess liver

TABLE V. Biochemical Tests of Liver Function Greater Than Reference Values*

	Genotype A (n = 107)				Genotype D (n = 205)			
	n	%	Median	Range	n	%	Median	Range
ALT								
Female	10/37	27.0	71.5	40.0; 396.0	35/86	40.7	75.0	37.0; 1,044.0
Male	38/64	59.4	64.5	37.0; 608.0	69/107	64.5	57.0	37.0; 272.0
AST								
Female	10/37	27.0	56.0	32.0; 208.0	35/86	40.7	51.0	31.00; 871.0
Male	36/64	56.3	52.0	37.0; 702.0	52/107	48.6	45.0	31.0; 1,000.0
GGT								
Female	4/35	11.4	163.50	97.0; 256.0	7/81	8.6	76.0	68.0; 149.0
Male	16/64	25.0	150.00	69.0; 1,400.0	15/104	14.4	114.0	72.0; 210.0

*Parameters were evaluated only for a fraction of patients.

TABLE VI. Factors Associated With Increased Levels of ALT, AST, and GGT by Logistic Regression

	Univariable analysis				Multivariable analysis[a]			
	Unadj. OR	CI 95%		*P*	Adj. OR	CI 95%		*P*
ALT								
Gender (female as reference)	2.898	1.793	4.684	<0.001	3.835	2.234	6.586	<0.001
Age	0.982	0.966	0.998	0.026				
Genotype (genotype A as reference)	1.290	0.797	2.090	0.300				
HBeAg (negative as reference)	2.420	1.418	4.128	0.001	3.020	1.695	5.381	<0.001
Infection[b]				0.602				
Sexual	1.461	0.679	3.141	0.332				
Intrafamiliar	1.174	0.600	2.297	0.640				
Others	1.507	0.775	2.930	0.227				
AST								
Gender (female as reference)	1.838	1.144	2.952	0.012	2.086	1.245	3.496	0.005
Age	1.005	0.990	1.022	0.496				
Genotype (genotype A as reference)	0.981	0.605	1.591	0.939				
HBeAg (negative as reference)	2.206	1.309	3.717	0.003	2.414	1.412	4.127	0.001
Infection[b]				0.393				
Sexual	1.687	0.781	3.646	0.183				
Intrafamiliar	1.028	0.519	2.034	0.937				
Others	1.410	0.721	2.757	0.315				
GGT								
Gender (female as reference)	1.981	0.995	3.943	0.052	2.009	1.005	4.016	0.048
Age	1.021	0.999	1.043	0.065	1.021	0.999	1.044	0.060
Genotype (genotype A as reference)	0.561	0.298	1.057	0.074				
HBeAg (negative as reference)	1.129	0.546	2.333	0.744				
Infection[b]				0.133				
Sexual	2.293	0.724	7.258	0.158				
Intrafamiliar	1.270	0.409	3.948	0.679				
Others	2.686	0.953	7.573	0.062				

[a]Hosmer–Lemeshow test (ALT: $\chi^2 = 0.003$, $P = 0.999$; AST: $\chi^2 = 0.012$, $P = 0.994$; GGT: $\chi^2 = 9.566$, $P = 0.297$).
[b]The presumed source of HBV infection (perinatal as reference).

function include ALT, AST, and GGT. Blood levels of these enzymes are elevated roughly according to the degree of liver damage. ALT, AST, and GGT enzymes were also evaluated and associated with gender, age, genotype, HBeAg, and presumed transmission routes using multivariable analysis, which adjusts for the differences in the distribution of, and associations among, the other variables in the model. Two factors were found to be associated significantly and independently with increased levels of ALT, male gender (OR = 3.835; 95% CI 2.234–6.586; $P < 0.001$), and HBeAg-positivity (OR = 3.020; 95% CI 1.695–5.381; $P < 0.001$). A study conducted in San Francisco (USA) reported higher mean levels of ALT with infection with genotype A than with genotype D [Kato et al., 2004]. However, in this study, after controlling for gender and the presence of HBeAg, no significant differences were found between genotypes A and D.

Similarly, with regards to AST, only gender and HBeAg were associated significantly and independently. After adjusting for the effects of the other variables in the model, men were more likely to have increased levels of AST than women (OR = 2.086; 95% CI 1.245–3.496; $P = 0.005$). Patients with HBeAg had a significantly higher probability of having an increased level of AST (OR = 2.414; 95% CI 1.412–4.127; $P = 0.001$). In Spain, [Sanchez-Tapias et al., 2002] a comparison of AST values in patients with genotypes A and D did not reveal any significant differences; however, the investigators did not control for possible confounding variables. In this sample, elevated levels of GGT were associated marginally with being male and with increasing age.

In summary, this study examined a sample of people infected with HBV living in the north of Portugal, where genotypes A and D are predominant. Men and women differed in the distribution of presumed routes of transmission. While the most frequent transmission in female patients was intrafamilial, male patients were infected equally by perinatal, sexual, and intrafamilial paths. Alcohol intake was predominant among men. In female patients, absence of HBeAg was observed in a significantly smaller proportion of females with D genotype, as compared to those with A genotype, while in males statistically significant differences were not observed. HBeAg is associated with more severe liver damage.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Cristina Bacelar and all the staff from the Laboratory of Molecular Biology and the Laboratory of Viral Markers; Manuel Campos, Director of Clinical Haematology, Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA), Porto, Portugal; Luisa Jorge, MLA, University of Massachusetts, USA, for translation and editing assistance.

REFERENCES

Alter MJ. 2003. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. J Hepatol 39:S64–S69.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. 2002. Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. J Gen Virol 83:2059–2073.

Avellon A, Echevarria JM. 2006. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. J Med Virol 78:24–36.

Bahri O, Cheikh I, Hajji N, Djebbi A, Maamouri N, Sadraoui A, Mami NB, Triki H. 2006. Hepatitis B genotypes, precore and core promoter mutants circulating in Tunisia. J Med Virol 78:353–357.

Chen CH, Lee CM, Hung CH, Hu TH, Wang JH, Wang JC, Lu SN, Changchien CS. 2007a. Clinical significance and evolution of core promoter and precore mutations in HBeAg-positive patients with HBV genotype B and C: A longitudinal study. Liver Int 27:806–815.

Chen CJ, Iloeje UH, Yang HI. 2007b. Long-term outcomes in hepatitis B: The REVEAL-HBV study. Clin Liver Dis 11:797–816, viii.

Echevarria JM, Leon P. 2004. Hepatitis B virus genotypes identified by a Line Probe Assay (LiPA) among chronic carriers from Spain. Enferm Infect Microbiol Clin 22:452–454.

Echevarria JM, Avellon A, Magnius LO. 2005. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: Identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. J Med Virol 76:176–184.

Ezzikouri S, Chemin I, Chafik A, Wakrim L, Nourlil J, Malki AE, Marchio A, Dejean A, Hassar M, Trepo C, Pineau P, Benjelloun S. 2008. Genotype determination in Moroccan hepatitis B chronic carriers. Infect Genet Evol 8:306–312.

Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, Chevallier P, Pichoud C, Maisonnas M, Trepo C, Zoulim F. 2000. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: Correlation with viral persistence and disease severity. J Hepatol 33:430–439.

Halfon P, Bourliere M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, Renou C, Penaranda G, Saadoun D, Thibault V, Serpaggi J, Varastet M, Tainturier MH, Poynard T, Cacoub P. 2006. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: Correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. J Viral Hepat 13:329–335.

INE. 2008. Resident population (No.) by place of residence, sex and age group (by life cycles, 2007). Instituto Nacional de Estatística (Statistics Portugal).

Kao JH. 2002. Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. J Gastroenterol Hepatol 17:643–650.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. 2000. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology 118:554–559.

Kato H, Gish RG, Bzowej N, Newsom M, Sugauchi F, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Usuda S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. 2004. Eight genotypes (A–H) of hepatitis B virus infecting patients from San Francisco and their demographic, clinical, and virological characteristics. J Med Virol 73:516–521.

Lecour H, Ribeiro AT, Amaral I, Rodrigues MA. 1984. Prevalence of viral hepatitis markers in the population of Portugal. Bull World Health Organ 62:743–747.

MAI. 2008. Foreign Population in Portugal (2007). In: Affairs MdAIMoI, editor.

Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Intervirology 47: 289–309.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. J Gen Virol 69:2575–2583.

Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, Guardia J. 1995. Hepatitis B virus infection: Precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. Hepatology 22:1641–1647.

Royston P, Altman DG. 1994. Regression using fractional polynomials of continuous covariates: Parsimonious parametric modelling. Appl Statist 43:429–467.

Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. 2002. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. Gastroenterology 123: 1848–1856.

Santos A, Carvalho A, Tomaz J, Rodrigues V, Coxinho L, Bento D, Sa R, Porto A. 2000. Prevalence of markers of hepatitis B infection in the adult population of the district of Coimbra. Acta Med Port 13:167–171.

Toy M, Veldhuijzen IK, Mostert MC, de Man RA, Richardus JH. 2008. Transmission routes of hepatitis B virus infection in chronic hepatitis B patients in The Netherlands. J Med Virol 80:399–404.

WHO. 2008a. Adult per capita consumption. World Health Organization (WHO).

WHO. 2008b. WHOSIS World Health Organization.

Wu IC, Chow NH, Cheng PN, Liu WC, Young KC, Chang WL, Chen CY, Tseng KC, Chang TT. 2007. Characterization of viral kinetics in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. J Med Virol 79:663–669.

CAPÍTULO 5 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E GENOTÍPICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B NO NORTE DE PORTUGAL

RESUMO

Objectivo: Descrever o perfil epidemiológico e genotípico da infecção crónica pelo vírus da hepatite B na Região Norte de Portugal.

Métodos: Foram incluídos 358 indivíduos oriundos das consultas de especialidade que apresentavam resultados positivos para o antígeno da hepatite B durante pelo menos seis meses em dois hospitais do Norte de Portugal em 2008 e 2009. Os dados foram obtidos a partir dos processos clínicos, determinações laboratoriais feitas quando da genotipagem do vírus, ecografia e/ou ultra-sonografia e biópsia hepática. As características demográficas, marcadores víricos, carga viral e genótipos, e severidade da doença hepática foram avaliadas e comparadas entre sexos.

Resultados: Os genótipos A e D predominaram. A transmissão intrafamiliar ocorreu predominantemente nas mulheres. Um terço das mulheres apresentava ingestão alcoólica superior a 20 g/dia, aumentando para 58,9% nos homens. A ausência do AgHBe foi semelhante nos dois sexos (p = 0,662). Os parâmetros bioquímicos em geral, apresentaram-se com valores mais altos nos homens, assim como nos estágios necro-inflamatório e de esteatose hepática (p = 0,003).

Conclusões: As diferenças relativas às vias de transmissão da infecção pelo vírus da hepatite B entre homens e mulheres, poderão ser consequência de comportamentos de risco associadas ao género. A ingestão excessiva de álcool é predominante nos indivíduos do sexo masculino, assim como maior severidade da doença hepática em relação às mulheres.

Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. **Epidemiological and genotypic profile of hepatitis B virus in Northern Portugal.** Revista de Saúde Pública. 2010 44 (6) 1087-93.

Reproduzido com a permissão de: *Revista de Saúde Pública.*

Rev Saúde Pública 2010;44(6):1087-93

Ana Mota[I,II]

Fátima Guedes[III]

Jorge Areias[IV,V]

Luciana Pinho[II,IV]

Margarida Fonseca Cardoso[IV,VI,VII]

Perfil epidemiológico e genotípico da infecção pelo vírus da hepatite B no Norte de Portugal*

Epidemiological and genotypic profile of hepatitis B virus infection in Northern Portugal

RESUMO

OBJECTIVO: Descrever o perfil epidemiológico e genotípico da infecção crônica pelo vírus da hepatite B na Região Norte de Portugal.

MÉTODOS: Foram incluídos 358 indivíduos oriundos das consultas de especialidade que apresentavam resultados positivos para o antígeno da hepatite B durante pelo menos seis meses em dois hospitais do Norte de Portugal em 2008 e 2009. Os dados foram obtidos a partir dos processos clínicos, determinações laboratoriais feitas quando da genotipagem do vírus, ecografia e/ou ultra-sonografia e biópsia hepática. As características demográficas, marcadores víricos, carga viral e genótipos, e severidade da doença hepática foram avaliadas e comparadas entre sexos.

RESULTADOS: Os genótipos A e D predominaram. A transmissão intrafamiliar ocorreu predominantemente nas mulheres. Um terço das mulheres apresentava ingestão alcoólica superior a 20 g/dia, aumentando para 58,9% nos homens. A ausência do AgHBe foi semelhante nos dois sexos (p = 0,662). Os parâmetros bioquímicos em geral apresentaram-se com valores mais altos nos homens, assim como nos estágios necro-inflamatório e de esteatose hepática (p = 0,003).

CONCLUSÕES: As diferenças relativas às vias de transmissão da infecção pelo vírus da hepatite B entre homens e mulheres podem ser conseqüência de comportamentos de risco associadas ao género. A ingestão excessiva de álcool é predominante nos indivíduos do sexo masculino, assim como maior severidade da doença hepática em relação às mulheres.

DESCRITORES: Hepatite B, epidemiologia. Vírus da Hepatite B, isolamento & purificação. Fatores de Risco. Epidemiologia Descritiva.

[I] Programa de Doutoramento em Ciências Biomédicas. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS). Universidade do Porto. Porto, Portugal

[II] Serviço de Hematologia Clínica. Centro Hospitalar do Porto (CHP). Hospital de Santo António (HSA). Porto, Portugal

[III] Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal.

[IV] ICBAS. Universidade do Porto. Porto, Portugal

[V] Serviço de Gastrenterologia. CHP-HSA. Porto, Portugal

[VI] Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental. Porto, Portugal

[VII] Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto. Porto, Portugal

* Artigo redigido no idioma português de Portugal

Correspondência | Correspondence:
Margarida Fonseca Cardoso
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
Universidade do Porto
Largo Abel Salazar, 2
4099-003 Porto, Portugal
E-mail: mcard@icbas.up.pt

Recebido: 9/7/2009
Aprovado: 2/5/2010

Artigo disponível em português e inglês em: www.scielo.br/rsp

ABSTRACT

OBJECTIVE: To describe the epidemiological and genotypic profile of chronic hepatitis B infection in Northern Portugal.

METHODS: This survey comprised 358 subjects with positive serology for hepatitis B antigen for at least six months, recruited from specialist appointments in two hospitals in Northern Portugal between 2008 and 2009. Data were obtained from patient files, laboratory tests performed at the time of viral genotyping, echograms and/or ultrasonogram results, and liver biopsies. Demographic characteristics, viral markers, viral load and genotype, and severity of liver disease were evaluated and compared between sexes.

RESULTS: Genotypes A and D were predominant in both sexes. Intrafamilial transmission occurred mostly among female patients. One-third of females and 58,9% of males showed alcohol intake above 20 g/day. Absence of AgHBe was similar in both sexes (p = 0.662). Elevated biochemical parameters and presence of necroinflammatory activity and steatosis in liver biopsies were more frequent among male patients (p=0.003).

CONCLUSIONS: Differences in terms of route of HBV infection between men and women may be a consequence of gender-associated risk behaviors. Excessive alcohol intake is more frequent among males than females, as is more severe liver disease.

DESCRIPTORS: Hepatitis B, epidemiology. Hepatitis B virus, isolation & purification. Risk Factors. Epidemiology, Descriptive.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é um problema de saúde pública em Portugal, apesar de sua prevalência de infecção ser relativamente baixa: aproximadamente de 1%.[12,20] Por outro lado, um levantamento sorológico nacional em 2004 apontava 0,36% de indivíduos infectados cronicamente pelo VHB. Os estudos epidemiológicos sugerem a existência de cerca de 100 mil a 120 mil portadores crónicos do antigénio de superfície do vírus da hepatite B (AgHB).[12,20]

Em Portugal, as hepatites víricas são a segunda maior causa de doença hepática.[4] A mortalidade por cirrose hepática apresenta aproximadamente 2.500 casos por ano. Segundo estatísticas dos centros hospitalares, de 15% a 20% dos doentes com cirrose hepática estão infectados pelo VHB.[6]

O isolamento do VHB permitiu classificá-lo em nove subtipos de acordo com os determinantes antigénicos do AgHBs. Estudos recentes sugerem que os vários genótipos do VHB podem influir de forma diferenciada na gravidade de doenças hepáticas, como a cirrose, o carcinoma hepatocelular e na resposta ao tratamento.[21] Não há, no entanto, conhecimento exacto de que determinado genótipo do VHB esteja associado ou não ao maior risco de desenvolvimento da doença hepática mais grave.

Estudos epidemiológicos sugerem que certos genótipos são predominantes em algumas partes do mundo.[1,5] Verschuere et al[23] afirmam que, na Europa, os genótipos predominantes são do tipo A e D, assim como em Portugal, em particular no Norte do país.[14,15] Nos países de baixa endemicidade e nas faixas etárias não abrangidas pelos programas de vacinação obrigatórios, a via de transmissão sexual é mais freqüente nos indivíduos do sexo masculino, enquanto no feminino, a transmissão intrafamiliar parece ser a predominante.[14,22] A vacinação é obrigatória para todos os recém-nascidos em Portugal desde 2000.

O conhecimento das características dos indivíduos infectados poderá auxiliar na definição e na implementação de medidas relativas à redução do impacto negativo da infecção pelo VHB no doente e na redução do número de novos casos. O presente estudo teve por objetivo descrever o perfil epidemiológico e genotípico da infecção crônica pelo VHB.

MÉTODOS

Os indivíduos incluídos no estudo foram recrutados em consultas de gastrenterologia do Hospital Santo António e na consulta geral do Hospital Joaquim Urbano nos anos 2008 e 2009. O critério de inclusão foi a presença

do antigénio de superfície do VHB (AgHBs) durante pelo menos seis meses, num total de 358 indivíduos com infecção crónica pelo VHB.

A pesquisa do respectivo genótipo foi realizada por biologia molecular. A avaliação histológica, requerida pelos clínicos, foi efetuada em 292 indivíduos.

Dados relativos ao sexo, à idade, à forma de transmissão da infecção pelo VHB, aos estilos de vida e aos hábitos de ingestão alcoólica, foram colhidos pelos clínicos responsáveis, utilizando-se uma grelha previamente definida.

As formas de transmissão foram descritas como sexual, vertical e intrafamiliar. Esta é assim considerada quando a transmissão ocorre na família, não necessariamente por contacto sexual, e quando não há evidências de outras formas de transmissão.

Os hábitos de ingestão alcoólica foram categorizados em: menos do que 20 g/dia e mais do que 20 g/dia. A opção por esta classificação teve por base os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) e de outros artigos relevantes nesta área do conhecimento.[7,13]

Foi feita pesquisa de AgHBs e respectivo anticorpo, anti-HBs; do antígeno HBe negativo (AgHBe) e seu anticorpo, o anti-HBe; e do anti-HBc nas amostras. Foi utilizado o aparelho Vitros ECI, que usa técnicas de quimioluminescência (Ortho-Clinical Diagnostics, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido).

O teste VERSANT®HBV DNA 3.0 Assay (bDNA) (Bayer, Nova Iorque, EUA) é um procedimento para a quantificação directa do ADN do VHB por meio da amplificação do sinal emitido pelo ácido nucléico. Este ensaio está padronizado em cópias, que variam de 2 mil a 100 milhões de cópias/ml. Valores menores que 2 mil cópias/ml são considerados "não detecção do vírus".

Os genótipos foram identificados pelo teste TRUGENE ® HBV genotyping kit, em conjunto com o Open Gene ®DNA Sequencing System (Bayer, Nova Iorque, EUA), que permitem obter o seqüenciamento bidireccional do antigénio de superfície e dos domínios B a E da transcriptase reversa do VHB. O seqüenciamento do ADN do VHB é comparado a uma "biblioteca" de genótipos e mutantes conhecidos, e um relatório final relativo ao genótipo que se pretende conhecer é elaborado.

Os vários testes laboratoriais que detectam as alterações da função hepática não são capazes de definir sua causa. Neste estudo, foram avaliados os seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT) (valores de referência: de 10 a 36 U/L a 37ºC); aspartato aminotransferase (AST) (de 10 a 30 U/L a 37ºC); gama glutamil transferase (γ-GT) (de 10 a 66 U/L a 37ºC); fosfatase alcalina (FA) (de 45 a 122 U/L a 37ºC); alfa-fetoproteína (AFP) (inferior a 10,9 ng/ml). Valores elevados em um ou mais parâmetros analíticos são sinónimos de inflamação ou doença hepática. Os parâmetros foram avaliados utilizando método enzimático cinético em aparelho Cobas Integra 800 (Roche Mannheim, Alemanha).

O tempo de protrombina (TP) foi determinado no aparelho ACL TOP (Instrumentation Laboratory Company, Lexington, EUA).

Os indivíduos foram submetidos à ecografia e/ou ultrasonografia para avaliação da doença hepática.

No grupo de indivíduos em que a avaliação pela biópsia hepática foi aplicada, os resultados foram classificados como necro-inflamatório, fibrose e esteatose.

A severidade da doença hepática foi avaliada em conformidade com a classificação de Child modificada por Pugh et al.[17] Esta classificação prevê a presença de três graus de severidade da doença hepática, de A a C, em que o grau C corresponde à mortalidade em cinco anos de 88%, o grau B, de 38% e o grau A, de 29%.

Foi realizada adaptação desta escala, para caracterizar de forma mais rigorosa os indivíduos em estudo: (1) grau C, (2) grau B, (3) "outros", que incluem os indivíduos não só classificados como A, mas também outros sem doença hepática conhecida.

Os dados foram analisados pelo programa SPSS para Windows 16.0. Análise descritiva foi utilizada para a caracterização da amostra. As variáveis qualitativas foram descritas como percentagens e as quantitativas como médias ou médias geométricas, de acordo com a sua distribuição. O número total diferiu entre as variáveis analisadas, pois os processos que continham informação por preencher (*missings)* foram considerados. Todos os testes estatísticos foram bilaterais. O nível de significância adoptado foi de 0,05.

A comparação de proporções foi efetuada pelo teste de qui-quadrado de Pearson, com correcção para a continuidade sempre que os pressupostos eram verificados ou por meio do teste exacto de Fisher. A comparação das variáveis quantitativas foi feita pelo teste *t* para amostras independentes após a transformação da variável, se preciso, para verificarem-se os pressupostos necessários.

O estudo foi aprovado pelo Gabinete Coordenador de Investigação e pela Comissão de Ética da Saúde do Hospital de Santo António em julho de 2007. Foi obtido consentimento por escrito de todos os indivíduos.

RESULTADOS

Dos 358 indivíduos com infecção crónica pelo VHB, 43,3% (n = 155) eram do sexo feminino (Tabela 1). A quase totalidade (93,6%) era natural de Portugal, seguida dos indivíduos originários de África (Tabela 2). Em ambos os sexos, predominam os genótipos D (61,9% no sexo feminino; 58,6% no masculino) e A (26,5% no

Tabela 1. Características dos indivíduos estudados com infecção crónica pelo VHB por sexo. Portugal, 2008-2009.[a]

Variável	Sexo feminino (n = 155)		Sexo masculino (n = 203)		Valor p
	n	%	n	%	
Genótipos					
A	41	26,5	70	34,5	0,173[b]
C	1	0,6	1	0,5	
D	96	61,9	119	58,6	
E	7	4,5	7	3,4	
F	10	6,5	5	2,5	
D e F	0	0,0	1	0,5	
Média de idades (DP)	43,61	(14,3)	43,8	(15,0)	0,918
Local de nascimento					0,661
Portugal	147	94,8	188	92,6	
Estrangeiro	8	5,2	15	7,4	
Vias de transmissão da infecção					0,001
Vertical	38	24,5	45	22,2	
Sexual	24	15,5	32	15,8	
Intrafamiliar	56	36,1	42	20,7	
Outras[c]	37	23,9	84	41,4	
Ingestão alcoólica					<0,001
< 20 g/dia	86	66,7	72	41,1	
> 20 g/dia	43	33,3	103	58,9	
Marcadores víricos					
AgHBe negativo	110	71,0	153	75,4	0,662
Carga viral média geométrica (IC95%)	760.172,0	(403.325,8; 1.432.884,4)	590.072,1	(348.676,6; 998.690,3)	0,541
Parámetros bíoquimicos elevados					
Alanina amino transferase	48	41,7	121	59,6	<0,001
Aspartato amino transferase	48	41,7	100	49,2	<0,001
Fosfatase alcalina	7	4,5	22	10,8	0,038
Gama glutamil transferase	15	5,1	37	18,2	0,032
Alfa feto proteína	8	16,7	12	5,3	0,720
Biópsia hepática					0,003
Necro-inflamatório	20	20,8	42	31,1	
Fibrose	60	62,5	54	40,0	
Esteatose	16	16,7	39	28,9	
Classificação de Child-Pugh adaptada					0,060
Nível 1 grau C	1	0,8	4	2,3	
Nível 2 grau B	4	3,3	16	9,4	
Nível 3 (Outros)[d]	116	95,9	151	88,3	

[a] Os somatórios podem não corresponder ao total de indivíduos devido a *missings*.
[b] Só foram avaliados os genótipos mais importantes, A e D.
[c] Outras formas de transmissão incluem, pelo menos um contacto com drogas intravenosas, transfusão, exposição ocupacional, exposição iatrogénica (por exemplo: endoscopia, colonoscopia, história de cirurgia, acupunctura ou hemodiálise ou desconhecido).
[d] Inclui os indivíduos, não só classificados como grau A de Child-Pugh, mas também outros sem doença hepática conhecida.

sexo feminino; 34,5% no masculino). A presença dos genótipos C, E, F foi identificada em ambos os sexos, embora com pouca expressão e a dupla infecção pelos genótipos D e F foi observada apenas entre homens.

A média de idades entre homens e mulheres foi semelhante (média: 44; desvio-padrão – DP: 15 anos). Na avaliação das eventuais vias de transmissão, verificou-se que a transmissão sexual ocorreu em percentagens muito

Tabela 2: Genótipo e local de nascimento, para o sexo feminino (F) e masculino (M). Portugal, 2008-2009.

Genótipo	Português (N = 335)		Não Português (N = 23)		Origem
	n F / M	% F / M	n F / M	% F / M	
A	39 / 65	25,1 / 32,0	2 / 5	1,3 / 2,5	Europa e África
C	0 / 0	0,0 / 0,0	1 / 1	0,65 / 0,5	China
D	94 / 117	60,6 / 57,6	2 / 2	1,3 / 1,0	Angola, Moldávia, Ucrânia
E	4 / 0	2,6 / 0,0	3 / 7	1,9 / 3,4	África
F	10 / 5	6,5 / 2,5	0 / 0	0,0 / 0,0	
D e F	0 / 1	0,0 / 0,5	0 / 0	0,0 / 0,0	
Total	147 / 188	94,8 / 92,6	8 / 15	5,2 / 7,4	

próximas nos dois sexos (cerca de 16%). A transmissão intrafamiliar predominou no sexo feminino, com percentagem mais elevada, 36,1% (n = 56) face ao sexo masculino 20,7% (n = 42) (p < 0,001).

Homens e mulheres diferiram significativamente quanto aos hábitos de ingestão alcoólica (p < 0,001). Cerca de um terço das mulheres (33,3%) apresentou uma ingestão alcoólica superior a 20 g/dia e esta proporção aumentou nos homens (58,9%).

O AgHBe esteve ausente em 73,5% dos indivíduos.

A proporção de indivíduos com valores elevados dos parâmetros bioquímicos avaliados, apresentou-se significativamente mais alta nos doentes do sexo masculino relativamente aos do sexo feminino (p < 0,038) exceptuando-se a avaliação dos valores da alfa feto proteína.

Na avaliação dos resultados da biópsia hepática, prevaleceram os estágios "necro-inflamatório" e "esteatose" entre os homens. As mulheres apresentam proporção mais elevada de "fibrose" (p = 0,003).

Houve mais indivíduos do sexo masculino no grau C e B, segundo adaptação da classificação de Child-Pugh. Embora com significância marginal (p = 0,060), os indivíduos do sexo masculino apresentaram maior severidade da doença hepática.

DISCUSSÃO

Tal como noutros estudos Europeus,[2,10] os genótipos A e D predominaram, em ambos os sexos. Esta distribuição genotípica não parece depender do sexo (p = 0,173) e corresponde ao chamado "padrão Mediterrâneo".[2,8,19]

A quase totalidade dos sujeitos é natural de Portugal (93,6%), seguida de indivíduos predominantemente do sexo masculino de países de expressão Portuguesa, como Angola, Moçambique, São Tomé e Príncipe e Guiné-Bissau, antigas colónias portuguesas na África. A imigração proveniente da Ásia parece introduzir na população portuguesa o genótipo C, sendo os únicos dois casos observados relativos a indivíduos oriundos da China.

Estudo Italiano avaliou o perfil da infecção pelo VHB numa população de imigrantes (< seis meses) e obteve resultados semelhantes: predominância de indivíduos do sexo masculino, oriundos majoritariamente da África, seguidos por indivíduos dos países do Leste Europeu e Asiáticos e com distribuição genotípica semelhante à encontrada na presente amostra. Os fluxos migratórios parecem introduzir novos perfis genotípicos, e eventualmente alteram a taxa de incidência na população autóctone.[16] Face a estes resultados, como forma preventiva, sugere-se a triagem do AgHBs quando da entrada destes imigrantes em Portugal. Caso apresentem resultados negativos deverá ser realizada a respectiva vacinação e em caso de infecção pelo VHB estar já instalada, deve ser instituído o programa terapêutico adequado.[18]

A via de infecção parece diferir entre homens e mulheres estudados. A transmissão intrafamiliar foi a mais registada no sexo feminino (36,1%), enquanto a sexual apresentou valores semelhantes em ambos os sexos. Esta forma de transmissão é a mais freqüente nos países com baixa endemicidade, como a maioria dos países Europeus, dados confirmados em estudo Holandês.[22]

A ingestão excessiva de álcool é predominante nos indivíduos do sexo masculino: 58,9% (p < 0,001). Em outros trabalhos, principalmente na Holanda, constatou-se que o sexo masculino apresentava taxas de alcoolismo mais elevadas do que as do sexo feminino (9,5% e 3,6% respectivamente).[3] Em estudo Australiano de base populacional, observaram-se taxas mais elevadas de ingestão de álcool no sexo masculino (3,2%) do que no feminino (1,3%).[11] A taxa de absorção em mulheres, em relação aos homens para a mesma quantidade de álcool ingerido é de 30% a 50%, o que resulta em alcoolemia mais elevada entre mulheres.

Neste estudo observou-se elevada prevalência de indivíduos com ausência de AgHBe, à semelhança de um trabalho desenvolvido na França.[24] Estes achados sustentam a provável ausência de antigénio e sugerem eventual mutação na zona do pré-core ou core promotor.

Os indivíduos do sexo masculino apresentam valores mais elevados nos estádios necro-inflamatório e de esteatose hepática na biópsia (p = 0,003). A esteatose

pode estar associada aos hábitos de ingestão alcoólica, igualmente mais elevados entre homens.

Uma das limitações do estudo resulta do procedimento utilizado para obter a amostra estudada. No entanto, esta amostra deve apresentar aproximação satisfatória da situação da infecção pelo VHB no Norte de Portugal. Os hospitais estudados correspondem a um hospital central e de referência na região norte na área da Gastrenterologia, e um hospital voltado para o tratamento das doenças infecciosas, portanto assistem a maior parte dos doentes com infecção pelo VHB do Norte de Portugal. A amostra desta investigação é relativa a todos os indivíduos que recorreram às consultas de especialidade destas instituições, nos anos 2008 e 2009. É possível a existência de um viés relativo à não inclusão dos indivíduos que não foram à consulta. Contudo, não existe qualquer indicação para os considerar diferentes quanto aos dados analisados. Além disso, o peso relativo desses indivíduos na amostra foi reduzido, pois, por norma, os doentes com infecção pelo VHB eram avaliados semestralmente, e seguidos por dois anos, mesmo na ausência a uma ou mais consultas.

Outro viés relaciona-se com a presença de imigrantes em Portugal, com eventual infecção pelo VHB e oriundos de zonas de endemicidade elevada, cuja não avaliação poderia ter alterado o perfil epidemiológico da infecção pelo VHB. Nestas circunstâncias, o estatuto serológico para a infecção pelo VHB não seria conhecido, resultando num fenómeno de subnotificação, outro viés a considerar no estudo. Entretanto, este fenómeno parece ter impacto diminuto, na medida em que o actual Sistema Nacional de Saúde Português proporciona a universalidade e quase gratuidade dos cuidados médicos, mesmo à população imigrante. Por outro lado, de acordo com o Ministério da Administração Interna, a imigração é reduzida na região analisada, inferior aos 4% registados para a população Portuguesa.

Não parece haver relação directa entre o regime alimentar e a doença hepática, contudo, o excesso de ingestão alcoólica é um factor de risco conhecido no desenvolvimento da cirrose. Isto é particularmente importante nestes doentes, pois além de apresentarem infecção pelo VHB, mostram níveis elevados de consumo de álcool. Este é um hábito ainda muito comum em Portugal, com a existência de aproximadamente um milhão e 700 mil alcoólicos ou bebedores excessivos.[a]

De acordo com o estudo publicado em 2009,[9] a doença hepática ocupa em Portugal o quinto lugar no conjunto das dez principais patologias, de potenciais anos de vida perdidos aos 70 anos. Por todas estas razões, seria importante implementar em Portugal, um estudo nacional sobre a prevalência da infecção pelo VHB e sua caracterização detalhada, nomeadamente a determinação do genótipo do VHB. Com base nestes dados e no seguimento dos doentes infectados, seria possível desenvolver estudos de investigação que permitissem conhecimento mais aprofundado da patologia e da resposta do indivíduo ao tratamento. Seria possível, assim, investigar a associação entre os diferentes genótipos e a evolução mais severa da doença hepática e reduzir-se-ia consideravelmente o impacto negativo da infecção pelo VHB em Portugal.

Em termos de Saúde Pública, o acompanhamento clínico dos indivíduos com infecção crónica pelo VHB deve ser uma das preocupações máximas da tutela. Desde 2000, a vacinação para o VHB é obrigatória em todos os recém-nascidos. No entanto, é necessário implementar medidas continuadas de educação para a saúde, baseadas na prevenção, particularmente nas faixas etárias que não foram abrangidas pela vacinação, como os adultos sexualmente activos. Os indivíduos com infecção crónica pelo VHB devem receber informações pormenorizadas, que permitam a mudança de estilos de vida, sobretudo atitudes preventivas de transmissão da infecção pelo VHB, em nível intrafamiliar e nas práticas de sexo seguro. É também fundamental a triagem dos imigrantes, de modo a efetivar as sugestões acima referidas, evitando e prevenindo a propagação da infecção pelo VHB. Com estas medidas, espera-se uma baixa significativa da infecção pelo VHB nas gerações futuras.

[a] World Health Organization. Global Status Report on Alcohol 2004. Geneva; 2004[cited 2010 Apr 1] Available from: www.who.int/entity/substance_abuse/publications/global_status_report_2004_overview.pdf

REFERÊNCIAS

1. Bae SH, Yoon SK, Jang JW, Kim CW, Nam SW, Choi JY, et al. Hepatitis B virus genotype C prevails among chronic carriers of the virus in Korea. *J Korean Med Sci*. 2005;20(5):816-20. DOI:10.3346/jkms.2005.20.5.816
2. Basaras M, Arrese E, Blanco S, Sota M, de las Heras B, Cisterna R. Characterization of hepatitis B virus genotypes in chronically infected patients. *Rev Esp Quimioter*. 2007;20(4):442-5.
3. Bijl RV, Ravelli A, van Zessen G. Prevalence of psychiatric disorder in the general population: results of The Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 1998;33(12):587-95. DOI:10.1007/s001270050098
4. Carvalho A. Hepatites virais: actualidades e perspectivas. *Coimbra Med*. 2005;1:45-60.
5. Chu CJ, Lok AS. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology*. 2002;35(5):1274-6. DOI:10.1097/00042737-200409000-00010
6. Cortez-Pinto H, Marques-Vidal P, Monteiro E. Liver disease-related admissions in Portugal: clinical and demographic pattern. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16(9):873-7. DOI:10.1097/00042737-200409000-00010
7. Dawson DA. Alcohol consumption, alcohol dependence, and all-cause mortality. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24(1):72-81. DOI:10.1111/j.1530-0277.2000.tb04556.x
8. Echevarría JM, León P. Hepatitis B virus genotypes identified by a Line Probe Assay (LiPA) among chronic carriers from Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(8):452-4. DOI:10.1157/13066851
9. Giria J. O peso da doença hepática em Portugal. *Rev Gest Hosp*. 2009;42:30-2.
10. Halfon P, Bourlière M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, et al. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat*. 2006;13(5):329-35. DOI:10.1111/j.1365-2893.2005.00692.x
11. Hall W, Teesson M, Lynskey M, Degenhardt L. The 12-month prevalence of substance use and ICD-10 substance use disorders in Australian adults: findings from the National Survey of Mental Health and Well-Being. *Addiction*. 1999;94(10):1541-50. DOI:10.1046/j.1360-0443.1999.9410154110.x
12. Lecour H, Ribeiro AT, Amaral I, Rodrigues MA. Prevalence of viral hepatitis markers in the population of Portugal. *Bull World Health Organ*. 1984;62(5):743-7.
13. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):87-96. DOI:10.1053/j.gastro.2004.09.020
14. Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. Epidemiological study of genotypes of hepatitis B virus in northern Portugal. *J Med Virol*. 2009;81(7):1170-6. DOI:10.1002/jmv.21526
15. Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. Alcohol consumption among patients with hepatitis B infection in northern Portugal considering gender and hepatitis B virus genotype differences. *Alcohol*. 2010;44(2):149-56. DOI:10.1016/j.alcohol.2009.11.003
16. Palumbo E, Scotto G, Faleo G, Cibelli DC, Angarano G. Prevalence of HBV genotypes in South American immigrants affected by HBV-related chronic active hepatitis. *Braz J Infect Dis*. 2007;11(3):311-3. DOI:10.1590/S1413-86702007000300002
17. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*. 1973;60(8):646-9. DOI:10.1002/bjs.1800600817
18. Romea Lecumberri S, Durán Pla E, Cabezos Otón J, Bada Aínsa JL. Situatión inmunológica de la hepatites B en inmigrantes. Estrategias de vacunación. *Med Clin (Barc)*. 1997;109(17):656-60.
19. Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology*. 2002;123(6):1848-56. DOI:10.1053/gast.2002.37041
20. Santos A, Carvalho A, Tomaz J, Rodrigues V, Coxinho L, Bento D, et al. Prevalência dos marcadores de infecção pelo vírus da hepatite B na população adulta do distrito de Coimbra. *Acta Med Port*. 2000;13(4):167-71.
21. Sunbul M, Leblebicioglu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol*. 2005;11(13):1976-80.
22. Toy M, Veldhuijzen IK, Mostert MC, de Man RA, Richardus JH. Transmission routes of hepatitis B virus infection in chronic hepatitis B patients in The Netherlands. *J Med Virol*. 2008;80(3):399-404. DOI:10.1002/jmv.21098
23. Verschuere V, Yap PS, Fevery J. Is HBV genotyping of clinical relevance? *Acta Gastroenterol Belg*. 2005;68(2):233-6.
24. Zarski JP, Marcellin P, Leroy V, Trepo C, Samuel D, Ganne-Carrie N, et al. Characteristics of patients with chronic hepatitis B in France: predominant frequency of HBe antigen negative cases. *J Hepatol*. 2006;45(3):355-60. DOI:10.1016/j.jhep.2006.03.007

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

CAPÍTULO 6 – CONSUMOS DE ÁLCOOL ENTRE INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO CRÓNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE B NO NORTE DE PORTUGAL TENDO EM CONTA AS DIFERENÇAS A NÍVEL DE GÉNERO E DOS GENÓTIPOS

RESUMO

O abuso na ingestão de álcool é um assunto importante no que concerne à Saúde Pública. Portugal com uma população de cerca de dez milhões de habitantes, apresenta cerca de 10% de bebedores em excesso ou alcoólicos, e 1% de indivíduos infectados cronicamente pelo Vírus da Hepatite B (VHB). De forma a conhecer as características dos indivíduos com níveis elevados de ingestão alcoólica e dano hepático, um total de 298 indivíduos cronicamente infectados pelo VHB, genotipados e submetidos a biópsia hepática, foram classificados pela classificação de Child-Phug e separados por níveis de ingestão alcoólica, menos ou mais de 20g/dia. Não se verificaram diferenças no que concerne aos genótipos, os genótipos A e D predominavam em ambos. Uma percentagem elevada de homens (p <0,001) foi observada no grupo que ingeria mais de 20g/dia, assim como uma baixa percentagem de indivíduos com HBeAg negativo (p≤0,035). Neste grupo, os parâmetros bioquímicos como alanina aminotransferase (ALT) (p=0,006), aspartato aminotransferase (AST) (p=0,001), e gamma glutamiltransferase (GGT) (p <0,001) apresentavam valores elevados, numa proporção maior, face ao outro grupo. Na análise dos parâmetros hematológicos, verificou-se de forma significativa no grupo de indivíduos que fazem uma ingestão de álcool mais elevada valores mais baixos de plaquetas (p=0.042), do volume corpuscular médio (VCM) (p <0.001), e valores de tempo de protrombina (TP) significativamente mais elevados (p <0.001). Ainda neste grupo, e no que se refere às características da biópsia (p=0,002) e à classificação de Child Phug os resultados apontam para maiores níveis de severidade da doença hepática. A regressão logística indicou uma associação positiva entre maior dano hepático e ingestão elevada de álcool, que tende a aumentar com a idade. Nas mulheres verificou-se uma forte associação entre ingestão excessiva de álcool e dano hepático (*OR*=9,379, IC 95%: 0,859 a 468,422, P=0,037), embora os casos mais severos fossem encontrados em mulheres com mais de 45 anos de idade. Nos indivíduos com infecção crónica pelo VHB o álcool estava associado a um maior dano hepático. Não se verificou associação com os genótipos do VHB.

Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. **Alcohol consumption among patients with hepatitis B infection in northern Portugal considering gender and hepatitis B vírus genotype differences.** Alcohol. 2010 Mar; 44(2): 149-56.

Reproduzido com a permissão de *Elsevier Limited.*

Autorização nº 252017083124

Author's personal copy

ELSEVIER

Alcohol 44 (2010) 149–156

ALCOHOL

Alcohol consumption among patients with hepatitis B infection in northern Portugal considering gender and hepatitis B virus genotype differences

Ana Mota[a,b], Fátima Guedes[c], Jorge Areias[a,d], Luciana Pinho[a,b], Margarida Fonseca Cardoso[a,e,f,*]

[a]*ICBAS—Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Largo Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto, Portugal*
[b]*Serviço de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA), Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal*
[c]*Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal*
[d]*Serviço de Gastrenterologia, Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA), Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal*
[e]*CIIMAR—Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Rua dos Bragas 177, 4050-123 Porto, Portugal*
[f]*ISPUP—Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto, Praça Gomes Teixeira, 4099-002 Porto, Portugal*

Received 22 May 2009; received in revised form 4 November 2009; accepted 5 November 2009

Abstract

Alcohol abuse is an important public health problem. In Portugal with a population of 10 millions of inhabitants, there are around 10% of alcoholics or excessive alcohol drinkers and 1% of chronically infected patients with hepatitis B virus (HBV). To examine the characteristics of patients with higher levels of alcohol consumption and to investigate the association between alcohol consumption and liver damage a total of 298 chronically infected individuals, with HBV genotyped and submitted to liver biopsy, were classified with Child's grading and separated by habits of alcohol intake, less and greater than 20 g/day. No significant differences were observed about genotype but genotypes A and D were predominant in both of them. A higher percentage of males ($P < .001$) were observed in the group with alcohol intake above 20 g/day, as well a lower proportion of patients with HBeAg negativity ($P \leq .035$). In this group, biochemistry parameters, such as alanine aminotransferase ($P = .006$), aspartate aminotransferase ($P = .001$), gamma-glutamyl transferase ($P < .001$) were elevated in a significantly higher proportion than in the other group. The analysis of hematological parameters showed significantly lower values of platelets ($P = .042$) and mean corpuscular volume ($P < .001$) and significantly higher values of prothrombin time ($P < .001$) in the group with higher levels of alcohol consumption. The characteristics of biopsy ($P < .001$) and Child–Phug's classification ($P = .002$) revealed more severe results in this group. Logistic regression showed a positive association between liver damage and alcohol intake, increasing with age. In female patients, a strong positive association between alcohol intake and liver damage was also found (odds ratio: 9.379; 95% confidence interval: 0.859–468.422; $P = .037$); however, the most severe cases were only observed in women older than 45 years. In patients with HBV infection, alcohol is associated with a more severe liver disease. No evidence was found concerning association with HBV genotype. © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Hepatitis B; Genotypes; Alcohol consumption; Liver damage; Northern Portugal; Gender

Introduction

Alcohol abuse is an important public health problem with a significant morbidity and mortality (Gramenzi et al., 2006). Alcohol consumption in Portugal is 15% higher than in the rest of Europe. It is estimated that there are approximately 1 million alcoholics or excessive alcohol drinkers in Portugal (WHO, 2008b). A study conducted in 2003 by World Health Organization (WHO) showed an annual pure alcohol consumption of 9.49 liters per capita (WHO, 2008a). A Portuguese study confirmed that there are around 1 million of alcoholics or excessive alcohol drinkers (Pinto, 2000). According to WHO, in Portugal in the year 2004 the standardized death rate for chronic liver disease and cirrhosis, all ages, per 100,000 was 13.31 (WHO, 2009). The fact that Portugal had such a high liver disease–related mortality is not surprising, since Portugal was the fifth alcohol consumer in the world (Spirits, 2002).

Several epidemiologic studies suggest that chronic alcoholics are at risk of viral infections. Clinical and basic research has demonstrated that alcohol not only worsens

* Corresponding author. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Largo Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto, Portugal. Tel.: +351-22-206-22-79.
E-mail address: mcard@icbas.up.pt (M.F. Cardoso).

0741-8329/10/$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi: 10.1016/j.alcohol.2009.11.003

Author's personal copy

the natural history of chronic viral hepatitis, like hepatitis B virus (HBV) but also seems to interact with the viral replication cycle leading to an unusual serum virologic profile and/or modification in the serum concentration of viral particles (Nalpas et al., 1998).

HBV is a major cause of hepatocellular carcinoma (HCC) in the world (Wang et al., 2003). The infection with HBV and its interaction with alcohol consumption are very well documented, and it is possible to verify that the progression to more severe liver disease is very rapid and aggressive. In a physiological way, it was demonstrated that several signals activated by HBV X protein are potentiated cooperatively by alcohol, including tumor necrosis factor-alpha and ethanol-induced apoptosis by a caspase-3-dependent mechanism. Those mechanisms could be implicated in the synergistic effect of alcohol drinking and viral hepatitis on liver injury (Gao, 2002). In the transgenic mice model, viral replication is enhanced by alcohol consumption (Larkin et al., 2001), suggesting that alcohol upregulates HBV gene expression and replication. This would promote not only higher viral loads but also trigger an antiviral immune response leading to severe bouts of liver disease.

Several studies (Saunders et al., 1983) have shown that patients with alcoholic cirrhosis showed evidence of past or current infection with HBV more commonly than did healthy nonalcoholic subjects (Bassendine et al., 1983; Goudeau et al., 1981; Inoue, 1977; Mills et al., 1981). A longitudinal study of hepatitis B surface antigen–positive healthy blood donors tested in Japan between 1972 and 1975 found that alcohol consumption greater than 27 g/day (duration of alcohol use not stated) was associated with more than a fivefold increase in the relative risk for development of HCC (Oshima et al., 1984). A study that compared two case series suggested that patients with HCC caused by chronic HBV and chronic alcohol are approximately 10 years younger than patients with HCC caused by chronic HBV alone (Ohnishi et al., 1982; Pereira et al., 1994).

A case–control study, performed in Albania, showed that individuals with HBV infection and excessive alcohol intake had an increased probability (odds ratio [OR]: 26.9; 95% confidence interval [CI]: 4.9–147) of developing chronic hepatitis and cirrhosis when compared with patients without these or other liver disease. Although not significant, interaction was suggested between HBsAg and alcohol intake (Kondili et al., 1998). A study among the Portuguese population also found that alcohol intake was the most important risk factor to HCC, with a frequency of 5.2% in patients with alcoholic hepatic cirrhosis (Oliveira et al., 2001).

The sudden increase in alcoholic liver disease among women showed their susceptibility to the hepatotoxic effects of alcohol. Women tended to present more severe liver disease than men, particularly alcoholic hepatitis, and did so after a shorter period of excessive drinking and at a lower daily alcohol intake. Differences in body size and composition may be partly responsible for the greater susceptibility of women but differences in immune reactivity between the sexes may also play a part (Saunders et al., 1981).

The aim of this study was to assess the characteristics of patients with hepatitis B infection with higher levels of alcohol consumption in the northern region of Portugal, and to investigate the association between alcohol consumption and liver damage, considering gender and genotype differences.

Material and methods

Patients

Most of the patients with hepatitis B infection (documented because of the presence of HBsAg in serum for at least 6 months) from the North of Portugal are treated in three hospitals in the city of Oporto: Hospital de São João, Hospital de Santo António, and Hospital Joaquim Urbano. The patients of this study were observed in the Hospital de Santo António and Hospital Joaquim Urbano. The study was approved by the Health Ethics Committee of Hospital de Santo António, and written consent was obtained from all participants. HBV genotypes were determined in 298 patients using a molecular method. Histologic evaluation was performed in all of them. Only individuals who were older than 16 years were included in this study. In Portugal, since 2002 the law forbids sale of alcoholic drinks to individuals less than 16 years.

Clinical findings

Information relating to patient demographics, biologic, histologic, and medical history was recorded from medical files. Demographic characteristics include the following: age, gender, place of birth, and residence, as well as marital status. The presumed sources of HBV infection were recorded. According to information provided by the physicians, this classification is based on the patient clinical story and the answers to a set of questions. The presumed source of HBV infection is classified as sexual transmission when the physician has no doubt about this source. The intrafamilial transmission presumed source is considered when transmission seems to occur inside the family group but not necessarily by sexual way, and there is no evidence of other ways of transmission.

Alcohol consumption was also evaluated and categorized as less than 20 g/day and greater than 20 g/day, based on the WHO classification and other important references in this area (Anderson, 1996a, b; Dawson, 2000; Fiellin et al., 1998).

Detection of virologic markers in serum

The study population was tested routinely for HBsAg, anti-HBs, and anti-HBc. HBeAg and anti-HBe antibody were also evaluated using Vitros ECI (Ortho-Clinical Diagnostics, Amersham, Buckinghamshire, UK).

Author's personal copy

HBV DNA quantification

HBV DNA levels were determined using VERSANT® HBV DNA 3.0 assay (bDNA) (Bayer, Tarrytown, NY, USA), which is a signal amplification nucleic acid probe assay for the direct quantification of human hepatitis B viral DNA in HBV-infected patients. The quantification range of the assay is from 2,000 to 100,000,000 HBV DNA copies/mL. Values below the lower quantification limit are reported as "<2,000" HBV DNA copies/mL noted as "virus not detected."

HBV genotyping

HBV genotypes were determined by the TRUGENE® HBV genotyping kit. When used in conjunction with OpenGene® DNA Sequencing System (Bayer) the kit provides a method to obtain bidirectional sequence from overlapping surface antigen and from domains B to E of reverse transcriptase region of HBV. The HBV DNA sequences are queried against a library of known genotypes and mutations to deliver a TRUGENE HBV genotyping report.

Liver enzymes and other blood parameters

Numerous biochemical tests that detect abnormal liver function can help in the confirmation of the presence of liver disease but cannot define the cause. The most common blood tests that assess liver function include the following: alanine aminotransferase (ALT) with reference values of 10–36 U/L at 37°C and aspartate aminotransferase (AST) with reference values of 10–30 U/L at 37°C, which are contained within the liver cells. Inflammation of the liver causes these enzymes to be released in the blood in abnormally high amounts. Blood levels of these two enzymes are roughly elevated in proportion to the degree of liver damage. The other blood test performed for detection of eventual liver damage was gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) with reference values of 10–66 U/L at 37°C, alkaline phosphatase (AP) with reference values of 45–122 U/L at 37°C, and alpha-fetoprotein with reference values less than 10.9 ng/mL. To investigate liver enzymes, elevated levels were separated from normal levels. All parameters were performed with Cobas Integra 800 (Roche, Mannheim, Germany).

Hematological parameters like mean corpuscular volume (MCV) and platelets were also evaluated, with normal levels respectively, between 80 and 100 fL and between 150 and 400×10^9/L; both evaluated with Advia 120 (Bayer). Prothrombin time (PT) was performed in ACL TOP (Instrumentation Laboratory Company, Lexington, MA, USA).

Liver biopsy

In the group of individuals with information about histologic lesions, the following characteristics of liver disease were evaluated: necroinflammatory, fibrosis, and esteatosis.

Child–Pugh classification

Assessment of liver damage was evaluated when genotyping was performed. Child's grading of disease severity in chronic liver disease was classified with Pugh's 1973 modifications (Pugh et al., 1973) based on information recorded from medical files. This classification has three grades, from A to C: grade C is the severest, corresponding to an overall 5-year mortality of 88%, grade B to 38%, and grade A to 29%. Because this classification is used to assess the prognosis of chronic liver disease, mainly cirrhosis, in these studies, three categories were considered to evaluate liver damage in the studied population: (1) Child grade C, (2) Child grade B, and (3) others, including patients classified as Child grade A and patients without liver disease reported.

Statistical analysis

The distribution of viral load and PT was logarithmically transformed. The results are given as geometric means with 95% CI. For the other quantitative variables, results are given as arithmetic means with 95% CI. *t*-Test for independent samples was used to compare the groups defined as alcohol intake under or above 20 g/day. Qualitative variables were described as percentage and compared using the Pearson chi-square test (with continuity correction) as appropriate or by Fisher exact test. Variability in the number of participants included in the analyses is because of incomplete data sets.

The association between alcohol intake and liver damage was analyzed separately for male and female patients.

For the male patients, the statistical analysis of the association between alcohol intake and the binary outcome (Child's grade equivalent C or B vs. others, including patients classified as Child grade A and patients without liver disease reported, as reference) was performed using logistic regression analysis. Two models were created for the regression analyses. The crude model consisted only of the dependent variable and alcohol intake group as independent variable, whereas in the adjusted model the effect of alcohol intake was corrected for age. Hepatitis B genotype was not included because of not being statistically significant. To analyze the possible difference in the association between the outcome and alcohol intake with age, an interaction term was added. For the interaction term a P value lower than .10 was considered to be significant. The continuous variable modeling of age was tested through the fractional polynomial method; a procedure that makes use of the full information available in the data when a linear relationship is not assumed (Royston and Altman, 1994). Fractional polynomial modeling confirmed that the association with age was linear. The Hosmer–Lemeshow goodness of fit test was used to check the lack of fit of the final logistic model.

In female patients, only five cases were classified as Child's grade equivalent C or B. Because of this reduced number, the association between alcohol intake and the binary outcome, Child's grade equivalent C or B versus

Author's personal copy

Child's grade equivalent A, and patients without liver disease reported, was analyzed considering Fisher exact test and an exact method to construct confidence limits for OR. Female patients were divided according to their median age (45 years old) to analyze the possible difference in the association between the outcome and alcohol intake with age.

Statistical analysis was performed with SPSS (version 16.0) and STATA (version 9.0) and two-sided significance of 5% was used throughout.

Results

Table 1 shows a description of the total studied sample ($n = 298$) by alcohol intake levels: 52.0%, less than 20 g/day ($n = 155$) and 48.0% greater than 20 g/day ($n = 143$). No significant differences between the study groups were observed with respect to genotype distribution and age. Genotypes A and D were predominant in both groups of individuals. However, a significantly higher percentage of males ($P < .001$) were observed in the group

Table 1
Characteristics of individuals according to alcohol intake

	Alcohol intake <20 g/d ($N = 155$)		Alcohol intake >20 g/d ($N = 143$)		
Chacteristics	*n*	(%)	*n*	(%)	*P*
Genotypes					.910[a]
A	50	(32.3)	45	(31.5)	
C	1	(0.6)	1	(0.7)	
D	92	(59.4)	88	(61.5)	
E	5	(3.2)	7	(4.9)	
F	7	(4.5)	2	(1.4)	
Gender					<.001
Female	86	(55.5)	41	(28.7)	
Male	88	(44.5)	102	(71.3)	
Age mean (95% CI)	43.4	(41.0–45.7)	45.3	(43.1–47.5)	.231
Routes of transmission					.048
Perinatal	41	(26.5)	30	(21.0)	
Sexual	35	(22.6)	21	(14.7)	
Intrafamilial	45	(29.0)	42	(29.4)	
Unknown	34	(21.9)	50	(35.0)	
Viral markers					
Anti-HBc positive	154	(99.4)	142	(99.3)	1.000
HBeAg negative	103	(66.5)	118	(82.5)	.002
Anti-HBe positive	101	(65.2)	110	(76.9)	.035
Viral load[b] geometric mean (95% CI)	638,450.9	(349,654.2–1,165,778.9)	306,753.6	(161,280.4–583,500.2)	.101
Biochemistry parameters greater than reference values					
ALT	76	(49.7)	94	(66.2)	.006
AST	66	(42.9)	92	(64.8)	.001
AP	6	(4.0)	16	(11.5)	.028
GGT	20	(13.4)	52	(37.4)	<.001
Alpha-fetoprotein	6	(4.6)	11	(8.7)	.284
Characteristics of biopsy					<.001
Necroinflammatory	11	(15.7)	31	(21.7)	
Fibrosis	50	(71.4)	31	(21.7)	
Esteatosis	9	(12.9)	81	(56.6)	
Hematological parameters					
Platelet $\times 10^9$/L mean (95% CI)	194.3	(182.7–205.9)	175.3	(160.6–189.9)	.042
MCV mean (95% CI)	92.3	(91.2–93.6)	86.7	(85.2–88.3)	<.001
PT geometric mean (95% CI)	12.7	(12.4–13.0)	14.0	(13.5–14.5)	<.001
Child–Phug's classification					.002[c]
Grade C	1	(0.7)	4	(3.3)	
Grade B	4	(3.0)	15	(12.3)	
Others[d]	130	(96.3)	103	(84.4)	

CI = confidence interval; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; AP = alkaline phosphatase; GGT = γ-glutamyl transpeptidase; MCV = mean corpuscular volume; PT = prothrombin time.

[a] Evaluated only with genotypes A and D.

[b] Evaluated only for patients with viral load between 2,000 to 100,000,000 hepatitis B virus DNA copies/mL.

[c] Evaluated considering Child's grade equivalent C or B versus others.

[d] Including patients classified as Child grade A and patients without liver disease reported, as reference.