



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
Ano 2012

**Mara Teresa  
Caldeira da Silva**

**Estudo da resposta imunológica à vacinação da  
hepatite B**



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
**Ano 2012**

**Mara Teresa  
Caldeira da Silva**

**Estudo da resposta imunológica à vacinação da  
hepatite B**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Lúcia Borges, Diretora do Serviço de Imuno-Hematologia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. - Aveiro e da Professora Doutora Rita Ferreira do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo incansável apoio durante todos os momentos da minha vida.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Pedro Domingues**  
Professor coordenador do mestrado em Bioquímica

**Dr. Fernando Jorge Almeida Mautempo Coelho**  
Diretor do Serviço de Medicina no Trabalho e Saúde Ocupacional do Centro Hospital do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro

**Dr.ª Lúcia Maria Ribeiro Borges**  
Diretora do serviço de Imuno-hemoterapia do Centro Hospital do Baixo Vouga, E.P.E- Aveiro

**Prof.ª. Doutora Rita Ferreira**  
Professora orientadora desta dissertação

## **agradecimentos**

À Professora Doutora Rita Ferreira e Doutora Lúcia Borges agradeço a orientação, apoio, paciência, disponibilidade, conhecimentos científicos, motivação, dedicação e valiosa contribuição para realização deste trabalho.

À Técnica Elizabeth Mesquita pela incansável ajuda, apoio, colaboração e incentivo demonstrado durante este trabalho.

Ao Doutor Fernando Mautempo pela sua ajuda, colaboração, disponibilidade, apoio e motivação que se fez sempre notar durante a realização deste trabalho.

A todos os restantes elementos do serviço de Imuno-Hemoterapia do Hospital Infante D. Pedro de Aveiro, por todo o apoio disponibilizado ao longo de todos estes meses.

Ao Centro de Histocompatibilidade do Centro em Coimbra e em especial ao Dr.º Artur Paiva, pela generosidade e disponibilidade demonstrada aquando da realização da parte laboratorial deste trabalho.

Aos meus colegas, Lisandra e Hugo agradeço a companhia, ajuda, amizade e os bons momentos que passamos durante estes meses de trabalho mas em especial à Lili por me ter aturado durante estes dois intensivos anos de mestrado.

À Vanessa pela generosidade e ajuda no tratamento estatístico deste trabalho.

Aos meus pais, pelo seu exemplo e apoio; sem eles, nada disto seria possível.

## palavras-chave

Vírus da Hepatite B (VHB), vacinação, imunização, ausência de imunização

## resumo

A infeção pelo vírus da hepatite B (VHB) constitui um problema de saúde pública. Mundialmente, dois biliões de pessoas estão infetadas com o VHB, 360 milhões tem infeção crónica e 600 000 morrem todos os anos com patologias hepáticas associadas à infeção pelo VHB ou carcinomas hepatocelulares.

No seu ambiente laboral, os profissionais da área da saúde estão expostos diariamente a múltiplas doenças como o VHB. Assim, torna-se estritamente necessário a implementação de programas de prevenção da transmissão deste vírus que incluem procedimentos adequados à prática ocupacional e a implementação de programas universais de vacinação.

Porém, tem-se verificado que alguns profissionais de saúde não ficam imediatamente imunizados após a administração das três dosagens da vacina recombinante contra o VHB. Cerca de 5 a 40% dos profissionais de saúde não apresentam níveis protetores de anticorpos à vacina da hepatite B após a imunização padrão.

Existem alguns fatores de risco que poderão estar associados à falha dos mecanismos imunológicos. Dados demográficos, índice de massa corporal, hábitos comportamentais de risco, condições de trabalho ou dados clínicos, parecem estar relacionados com a eficácia de resposta à vacinação.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a resposta imunológica numa amostra de profissionais de saúde do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E.-Aveiro, previamente vacinados contra o vírus da hepatite B, analisando diferentes fatores potencialmente subjacentes à eficácia imunológica da vacinação bem como a população linfocitária e leucocitária no sangue periférico.

Da análise destes parâmetros conclui-se que 40% dos profissionais de saúde em estudo não apresentavam um estado imunológico adequado após a administração das três dosagens da vacinação e uma quarta dose de reforço e que quer a idade, como a idade da primeira vacinação, serviço onde exerce a sua atividade profissional, regime de horários, hábitos comportamentais como tabaco ou consumo de álcool e história clínica relacionado com doenças imunossupressoras determinam como o sistema imunitário do individuo responde à vacinação VHB.

Este trabalho constituiu uma abordagem preliminar dos fatores que podem condicionar a resposta à vacinação VHB para a futura previsão de como os profissionais de saúde responderão à vacinação da hepatite B no sentido de garantir a sua proteção física no ambiente de trabalho.

**keywords**

Hepatitis B Virus (HBV), vaccination, immunization, immunization failure

**abstract**

Hepatitis B virus (HBV) infection is a health problem worldwide with two billion people infected with HBV, 360 million with chronic infection, and 600 000 die each year from HBV-related liver disease or hepatocellular carcinoma.

In their occupational environment, health care workers are exposed to multiple blood-borne pathogens such as HBV. Therefore, it is strictly necessary the implementation of prevention programs of HBV transmission, which include vaccination and the standardization of precaution guidelines.

The implementation of an immunization program in healthcare workers became the most important way to prevent the transmission of HBV infection resulting in a dramatic decline in the incidence and prevalence of chronic hepatitis B infection in many countries. There are some risk factors that may be associated with the failure of immunological mechanisms. Age, gender, body mass index, risks habits, working conditions and clinical data seem to be related with the effectiveness of vaccination effectiveness.

So, the aim of this study was to evaluate the immunization response of a population of health care workers from the Centro Hospital do Baixo Vouga, E.P.E.- Aveiro, vaccinated against the hepatitis B virus and the potential factors underlying the immune efficacy of vaccination and also relate with the leukocyte and lymphocyte population in peripheral blood.

From the analysis of all these parameters we concluded that 40% of health care workers showed a lack of an adequate immune state after administration of three dosages of vaccination and a booster dose. Age of the first vaccination, service where the health care worker exercises his professional activity, timesheet system, behavioral habits such as tobacco or alcohol consumption, related clinical diseases and immunosuppressive medication history seems to determine how the individual's immune system will respond to HBV vaccination.

This work constituted a preliminary approach to the prediction of how health care workers will respond to vaccination with protective antibody levels anti-hepatitis in order to ensure their physical protection on the working place.



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b><i>I. Introdução.....</i></b>	<b><i>1</i></b>
<b><i>II. Revisão da Literatura .....</i></b>	<b><i>3</i></b>
<b>2.1. O vírus da Hepatite B (VHB) .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Abordagem Histórica .....	3
2.1.2. Análise Epidemiológica .....	3
2.1.3. Virologia do VHB .....	5
2.1.4. Patogénese do VHB .....	6
2.1.4.1. Infecção aguda com VHB.....	6
2.1.4.2. Infecção crónica com VHB .....	7
2.1.5. Transmissão do VHB .....	10
2.1.6. Transmissão de VHB em unidades de cuidados de saúde .....	10
2.1.6.1. Profissionais de saúde, um grupo de risco .....	11
2.1.6.1.1. Prevenção da transmissão do VHB entre profissionais de saúde.....	12
2.1.6.1.2. Consequências económicas da transmissão de VHB entre profissionais de saúde.....	13
2.1.7. Abordagens terapêuticas .....	13
<b>2.2. Vacinação contra o VHB, uma forma de prevenção .....</b>	<b>13</b>
2.2.1. Imunização contra o VHB em profissionais de saúde.....	15
2.2.2. Ausência de resposta após vacinação contra o VHB .....	15
2.2.3. Redução de imunidade .....	18
2.2.4. Reforço da imunidade .....	20
<b>2.3. Métodos moleculares de deteção do VHB .....</b>	<b>20</b>
2.3.1. Definição da condição ativa ou inativa em infecção aguda ou crónica .....	21
2.3.2. Deteção quantitativa do genoma viral por reação em cadeia da polimerase .....	21
2.3.3. Determinação do VHB: abordagens geralmente utilizadas .....	21
2.3.4. Deteção do VHB e implicações na prática dos cuidados de saúde .....	22
<b><i>III. Objetivos .....</i></b>	<b><i>23</i></b>
<b><i>IV. Metodologia Experimental .....</i></b>	<b><i>25</i></b>
4.1. Caracterização da população em estudo .....	25

4.2. Análise epidemiológica dos dados .....	26
4.3. Análise Laboratorial: determinação da população linfocitária e leucocitária no sangue periférico .....	28
4.3.1. Seleção e preparação das amostras .....	28
4.3.2. Análise por citometria de fluxo.....	28
4.3.3. Análise Estatística .....	29
<b>V. Resultados.....</b>	<b>31</b>
5.1. Estudo do efeito de potenciais fatores de risco na resposta imunológica à vacinação contra o VHB.....	32
5.1.1. Efeito do índice de massa corporal na resposta imunológica à vacinação contra o VHB.....	34
5.1.2. Efeito da exposição ao risco de infecção na resposta imunológica à vacinação contra o VHB.....	35
5.1.3. Efeito dos hábitos tabágicos e do consumo de álcool na resposta imunológica à vacinação contra o VHB.....	37
5.1.4. Efeito do historial clínico na resposta imunológica à vacinação contra o VHB.....	38
5.2. Determinação dos parâmetros imunológicos no sangue periférico.....	41
<b>VI. Discussão.....</b>	<b>43</b>
6.1. Estudo do efeito de potenciais fatores de risco na resposta imunológica à vacinação contra o VHB.....	44
6.2. Determinação dos parâmetros imunológicos no sangue periférico.....	48
<b>VII. Conclusão.....</b>	<b>51</b>
<b>VIII. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>53</b>
<b>IX. Anexos .....</b>	<b>61</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica, genótipos e efeitos da migração. A vermelho estão representadas as áreas altamente endémicas; a azul, as áreas intermédias e a verde, as áreas baixas ( <i>adaptado de [1]</i> ). .....	4
Figura 2: O genoma do VHB ( <i>adaptado de [18]</i> ). .....	5
Figura 3: Locais de mutação do DNA viral do VHB ( <i>adaptado de [2]</i> ). .....	8
Figura 4: As quatro fases da infeção crónica do VHB ( <i>adaptado de [17]</i> ). .....	9
Figura 5: Classificação dos três grupos (RV, RRV e NRRV) de profissionais de saúde em estudo. ....	25
Figura 6: Caracterização da resposta imunológica contra o VHB dos profissionais de saúde em estudo, de acordo com os respetivos níveis de anti-HBs (n=20). ....	31
Figura 7: Caracterização dos grupos em relação ao género dos indivíduos que constituem a amostra em estudo na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20).....	32
Figura 8: Caracterização dos grupos em estudo em termos de idade dos indivíduos de cada grupo de profissionais que constituem a amostra em estudo. Média $\pm$ DP (n=20, p-value=0,8637). ....	33
Figura 9: Idade média à qual foi administrada a primeira vacina contra o VHB em cada grupo de profissionais em estudo. Média $\pm$ DP (n=20, p-value=0,8129).....	34
Figura 10: Índice de massa corporal médio dos indivíduos de cada grupo de profissionais que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB. Média $\pm$ DP (n=20, p-value=0,5225).....	35
Figura 11: Influência do risco de exposição à infeção dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB, de acordo com o serviço no qual exercem a sua atividade (n=20). ....	36
Figura 12: Efeito do horário de trabalho dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20).....	36
Figura 13: Influência dos hábitos de tabagismo dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20). ....	37
Figura 14: Influência dos hábitos alcoólicos dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20). ....	38
Figura 15: Influência da história clínica dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20).....	39
Figura 16: Influência da medicação na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20).....	39

Figura 17: Níveis de anti-HBs dos profissionais de saúde que demonstraram possuir um historial clínico relevante e que tomavam medicação regular (n=8). ..... 40

**INDICE DE TABELAS**

Tabela 1: Significado clínico dos resultados dos testes serológicos para a infecção pelo vírus da hepatite B (adaptado de [2]).	7
Tabela 2: Resposta à vacina do vírus da hepatite B numa população não saudável.	16
Tabela 3: Fatores associados a uma pobre ou ausência de resposta à vacinação contra o vírus da hepatite B (adaptado de [70]).	17
Tabela 4: Características demográficas dos profissionais de saúde em estudo (n=20).	31
Tabela 5: Parâmetros linfocitários e células leucocitárias avaliadas no sangue periférico dos profissionais de saúde dos grupos em análise (n=9).	41
Tabela 6: Contagem dos parâmetros linfocitários e células leucocitárias no sangue periférico dos profissionais de saúde dos grupos em análise (n=9).	42
Anexo 1: Parâmetros e fatores analisados para a amostra de profissionais de saúde em estudo.	61
Anexo 2 : Percentagem dos parâmetros linfócitos e leucocitários no sangue periférico de uma amostra dos profissionais de saúde em estudo.	62
Anexo 3: Contagem dos parâmetros linfocitários e leucocitários no sangue periférico de uma amostra dos profissionais de saúde em estudo.	63



**ABREVIATURAS**

- ✓ ALT – Alanina Aminotransferase
- ✓ Anti-HBc – Anticorpo para o Antígeno *Core* Nucleocapsial Viral
- ✓ Anti-HBe- Anticorpo para o Antígeno HBe
- ✓ Anti-HBs – Anticorpo para o Antígeno de Superfície do HBV
- ✓ cccDNA- Ácido Desoxirribonucleico Circular Covalentemente Fechado
- ✓ cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar
- ✓ CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*: Centro de Controlo e Prevenção de Doenças
- ✓ DGS – Direção Geral de Saúde
- ✓ DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- ✓ FDA- *Food and Drug Administration*: Administração de Alimentos e Fármacos
- ✓ AgHBc – Antígeno *Core* Nucleocapsial Viral
- ✓ AgHBe – Antígeno HBe
- ✓ VHB – Vírus da Hepatite B
- ✓ VHC – Vírus da Hepatite C
- ✓ VIH – Vírus da Imunodeficiência Adquirida
- ✓ AgHBs - Antígeno de Superfície do HBV
- ✓ CHC – Cancro Hepatocelular
- ✓ IgM – Imunoglobulina M
- ✓ IMC – Índice de Massa Corporal
- ✓ CPH – Complexos Principais de Histocompatibilidade
- ✓ OMS – Organização Mundial de Saúde
- ✓ PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- ✓ pb- Pares de bases
- ✓ PNV – Programa Nacional de Vacinação
- ✓ RIA – Radioimunoensaio
- ✓ RNA – Ácido Ribonucleico
- ✓ RT – PCR – Transcriptase Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase
- ✓ RV – Grupo de profissionais de saúde que fizeram vacinação e responderam
- ✓ RRV – Grupo de profissionais de saúde que fizeram vacinação e reforço e que responderam
- ✓ NRRV – Grupo de profissionais de saúde que fizeram vacinação e reforço e que não responderam

- ✓ UE – União Europeia
- ✓ VHPB – *Viral Hepatitis Prevention Board*: Prevenção e Controlo da Hepatite Viral

## I. Introdução

A infeção pelo vírus da hepatite B (VHB) constitui um problema de saúde pública [1]. Mundialmente, dois biliões de pessoas estão infetadas com VHB, 360 milhões têm infeção crónica e 600 000 morrem todos os anos com patologias hepáticas associadas à infeção pelo VHB ou carcinomas hepatocelulares, tendo-se verificado que este vírus é 50 a 100 vezes mais infecioso que o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) [2].

A interação entre o VHB e a resposta imune do hospedeiro define o curso clínico desta infeção. [3] O percurso natural deste vírus não é linear e o espectro clínico varia de um estado de portador assintomático para insuficiência hepática fulminante [1]. Este espectro é influenciado por polimorfismos genéticos associados a citocinas, hormonas e outros moduladores imunes. Para os indivíduos já infetados, o tempo de tratamento e a escolha da terapia antiviral depende do perfil clínico, sendo o objetivo principal desta terapia prevenir a progressão da infeção para cirrose hepática ou hepatocarcinoma [1].

A transmissão do VHB é realizada por exposição percutânea ou da mucosa a sangue ou a outros fluidos corporais infetados. A transmissão deste vírus tem sido observada através de várias formas de contato humano: perinatal/materno-infantil; elementos do agregado familiar; contacto sexual; partilha de agulhas; e no trabalho/cuidados de saúde [4]. No seu ambiente laboral, os profissionais da área da saúde são expostos diariamente a múltiplas patologias transmitidas por via sanguínea, tal como o vírus do VHB. O CDC (Centro de Controlo de Doenças) estima que 14,4% dos trabalhadores hospitalares estão infetados com VHB, em consequência da sua atividade profissional [5]. Os médicos, dentistas, enfermeiros, pessoal de laboratório e equipa do centro de diálise têm maior risco de contrair a infeção. O risco de transmissão depende da carga viral, das características da infeção e da frequência da exposição. Por consequência, é estritamente necessária a implementação de programas de prevenção da transmissão deste vírus que incluem a padronização de procedimentos adequados à prática ocupacional e a implementação de programas universais de vacinação [6].

A implementação de programas de imunização a profissionais de saúde tornou-se assim, o meio mais efetivo de prevenção desta infeção, resultando numa redução acentuada da incidência e prevalência da hepatite crónica em muitos países. Infelizmente, 5% a 10% dos indivíduos vacinados contra o VHB não desenvolvem uma resposta adequada com níveis de anticorpos anti-HBs apropriados [7]. No Centro Hospital do Baixo Vouga, E.P.E. - Aveiro também se tem constatado que alguns dos profissionais de saúde vacinados contra o

VHB não ficam imunizados contra esta patologia, embora ainda não tenham sido estudados os fatores subjacentes.

## II. Revisão da Literatura

### 2.1. O vírus da Hepatite B (VHB)

#### 2.1.1. Abordagem Histórica

Antes da descoberta do vírus da hepatite B (VHB), dois tipos de transmissão da hepatite eram diferenciados com base nas observações epidemiológicas: o tipo A foi considerado predominantemente transmitido pela via oral-fecal enquanto o tipo B era transmitido parentalmente [8]. Em 1963, Blumberg *et al.* [9], numa pesquisa de proteínas polimórficas do soro, descobriram um antigénio até então desconhecido no sangue de Aborígenes Australianos. Quatro anos mais tarde, foi reconhecida que a ocorrência deste antigénio estava relacionada com a hepatite do tipo B. Utilizando microscopia eletrónica, Dane *et al.* [10] identificaram no soro de pacientes infetados com hepatite B, partículas semelhantes a vírus que carregavam este antigénio na sua superfície. Em 1973, a natureza viral das partículas descobertas por Dane foi confirmada pela deteção de atividade endógena da uma DNA polimerase [11], permitindo que Robinson *et al.* [12, 13] detetassem e caracterizassem o genoma do VHB como sendo uma molécula pequena e circular de DNA de dupla-hélice.

A infeção pelo VHB resulta numa doença hepática aguda ou crónica e, com base em dados epidemiológicos, foi postulado em 1970 que este vírus podia representar uma causa de cancro hepático. Este fato conduziu a uma pesquisa de um agente parecido com o VHB em castores da América do Norte, onde tinha sido observado o desenvolvimento de cancro hepático [14].

O VHB e vírus relacionados formam uma família de vírus denominada *Hepadnaviridae*, nome derivado do seu hepatotropismo e genoma. Os hepadnavirus animais, apesar de não constituírem interesse para a medicina veterinária, constituem um importante modelo de estudo do VHB humano [15].

#### 2.1.2. Análise Epidemiológica

A infeção pelo vírus da hepatite B (VHB) constitui um sério problema de saúde a nível global e uma das infeções virais crónicas mais comuns. Aproximadamente 350 a 400 milhões de pessoas têm infeção crónica e cerca de 600 000 morrem por ano devido ao avançado estado da doença hepática ou cancro hepatocelular (CHC). O CHC é o quinto tipo

de cancro mais comum no mundo e a terceira causa principal de morte relacionada com cancro [8].

A infeção pelo VHB é altamente prevalente na Ásia, África e partes da Europa Ocidental e Oriental. A sua prevalência tem sido baixa na maior parte dos países desenvolvidos, pelo que não tem constituído um dos principais motivos para transplante hepático. No entanto, a migração da população de países com elevada prevalência para países com baixa prevalência tem influenciado a distribuição, incidência e a infeção pelo HBV em países com baixa prevalência, especialmente na Europa Ocidental, América do Norte e Austrália [1]. Portugal é um país de endemicidade baixa a intermédia, com cerca de 1,4% de portadores crónicos, segundo um estudo realizado em 2009 [16]. A distribuição da prevalência de VHB em todo o mundo é apresentada na Figura 1 [1].

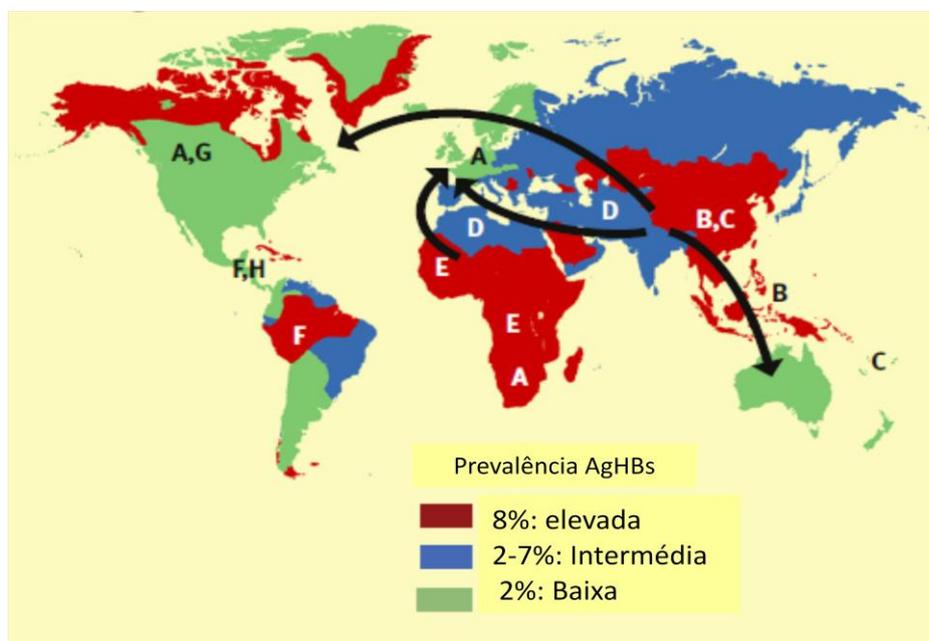


Figura 1: Distribuição geográfica, genótipos e efeitos da migração. A vermelho estão representadas as áreas altamente endêmicas; a azul, as áreas intermédias e a verde, as áreas baixas (*adaptado de [1]*).

Pela análise da Figura 1 pode-se constatar que existem oito genótipos distintos de VHB, com distribuição geográfica bem definida. Estes genótipos diferem em alguns aspetos importantes, incluindo a sua progressão natural e a resposta à terapia antiviral. Os genótipos A e B, por exemplo apresentam melhor resposta ao tratamento com interferão, e os genótipos C e D estão relacionados com um risco maior de desenvolvimento de hepatocarcinoma [17].

Na Europa, os genótipos A e D são os mais comuns. No leste da Ásia, são os genótipos B e C os predominantes. Da análise da figura 1 pode-se ainda observar que os AgHBs são altamente prevalentes na Ásia e África. As setas mostram o efeito da migração desde países em desenvolvimento para a Europa, América do Norte e Austrália. É de notar que existe uma significativa migração populacional de países com elevada prevalência de AgHBs para países com baixa prevalência. Este fato, a longo prazo, pode vir a influenciar significativamente a prevalência de AgHBs em países desenvolvidos, refletindo-se no aumento de casos de infecção pelo HBV nestes países [17].

### 2.1.3. Virologia do VHB

O VHB humano pertence à família dos *Hepadnaviridae*. O ser humano e os primatas superiores constituem os únicos hospedeiros deste vírus. O virião intacto, também denominado de partícula de Dane (Figura 2), compreende o DNA viral, rodeado por um nucleocapsídeo (proteína do núcleo ou antígeno) e uma camada externa que compreende a proteína da superfície do VHB ou antígenos (AgHBs). O seu genoma viral compreende uma dupla cadeia de DNA parcial com 3,2-kb e quatro ORFs (*open reading frames*). O genoma viral codifica a polimerase viral (que inclui a função de transcriptase reversa), proteínas de superfície, e as proteínas não estruturais (antígeno HBe e proteína X). O cccDNA (covalentemente fechado em DNA circular), que atua como o principal *template* transcripcional do vírus, persiste como um plasmídeo em hepatócitos infetados. Ele pode persistir após a terapia antiviral e mesmo após a aparente resolução da infecção [8].

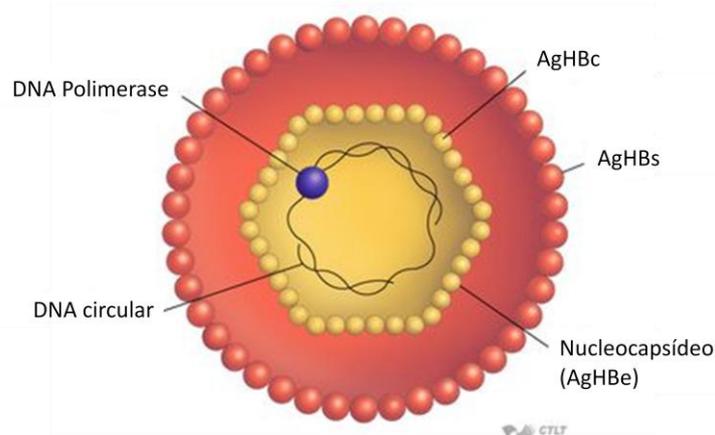


Figura 2: O genoma do VHB (adaptado de [18]).

A replicação do VHB dentro do hepatócito inicia-se após ligação do *core* do VHB ao recetor na sua membrana, passando primeiro para o citoplasma e depois para o núcleo onde se sintetiza então DNA para completar o genoma circular do vírus, e onde o DNA vai ser transcrito a RNA mensageiro. Este, por um lado é traduzido em proteínas (p. ex. AgHBs) e por outro lado é encapsulado num nucleocápsideo. No citoplasma, o RNA do nucleocápsideo vai servir de molde para a síntese da cadeia menos (-) e da cadeia (+) do DNA do vírus [19].

#### 2.1.4. Patogénese do VHB

A patogénese da doença hepática associada ao VHB está relacionada com a persistência e magnitude da replicação viral. O curso da infeção viral e a gravidade da lesão hepática são determinados pelo equilíbrio entre a replicação viral e os mecanismos de defesa da resposta imunológica do hospedeiro. As células citotóxicas específicas  $CD8^+$  T do vírus desempenham um papel fundamental na eliminação deste vírus. No entanto, células T supressoras ou reguladoras ( $T_{reg}$ ) inibem a função das células  $CD8^+$  T específicas em infeções crónicas por este vírus, contribuindo para a persistência viral. Um grande número de  $T_{reg}$  encontra-se tanto na circulação como no fígado de pacientes com VHB crónica [20].

##### 2.1.4.1. Infeção aguda com VHB

Para pacientes recentemente infetados com VHB e que desenvolvem hepatite aguda, o período de incubação médio (tempo de exposição até ao início de icterícia) é de 90 dias [21, 22]. A probabilidade de ocorrência de sintomas da hepatite devido a uma nova infeção pelo VHB é dependente da idade. Por exemplo, mais de 90% das infeções pelo VHB pré-natais são assintomáticas, enquanto as manifestações típicas da hepatite aguda estão cotadas em 5 – 15% das crianças recém-infetadas (1 a 5 anos de idade) e em 33 — 50% das crianças mais velhas, adolescentes e adultos [23]. Os pacientes com Hepatite B aguda podem evidenciar sinais e sintomas como náuseas, dor abdominal, vómitos, febre, icterícia, urina escura, alterações na cor das fezes e hepatomegalia ou esplenomegalia [24].

Os primeiros marcadores serológicos detetáveis em pacientes com infeção aguda pelo VHB foram o antigénio AgHBs e anticorpo anti-HBs. Nos 6 a 12 meses após a infeção, os anticorpos de imunoglobulina M para o antigénio central da hepatite B (anti-HBc) são indetetáveis. O total de anticorpos para o antigénio central da hepatite B persiste por toda a

vida e são encontrados em pacientes com infeção crónica, bem como aqueles que recuperaram da infeção [25].

Em pacientes que recuperam da infeção pelo VHB, os AgHBs são eliminados do sangue e os anti-HBs predominam durante a convalescença, pelo que a presença de anti-HBs indica imunidade à infeção pelo VHB. A maioria dos pacientes que recuperam da infeção natural, serão positivos para ambos os anticorpos anti-HBs e anti-HBc. A Tabela 1 apresenta um resumo dos marcadores serológicos presentes em várias fases do decurso da infeção pelo VHB [2].

Tabela 1: Significado clínico dos resultados dos testes serológicos para a infeção pelo vírus da hepatite B (adaptado de [2]).

<b>Marcadores serológicos virais</b>	<b>Definição</b>	<b>Significado clínico</b>
<b>AgHBs</b>	Antigénio de superfície do VHB	Diagnóstico de infeção
<b>Anti-HBs</b>	Anticorpo para o antigénio HBs	Imunidade/recuperação de uma infeção ou vacinação prévia
<b>AgHBc</b>	Antigénio central do VHB	Não medido no soro por rotina
<b>Anti-HBc</b>	Anticorpo para o antigénio HBc	Presença de infeção recente (IgM) ou exposição em alguma altura (IgG, não distingue de infeção crónica)
<b>AgHBe</b>	Antigénio HBe	Geralmente associada a alta concentração de DNA VHB
<b>Anti-HBe</b>	Anticorpo para o antigénio HBe	Pode ser encontrado com alto ou baixo nível de replicação viral
<b>VHB DNA</b>	Material genómico viral medido no soro	Reflete replicação viral e indica resposta à terapia

Os pacientes imunodeprimidos podem desenvolver a reativação da infeção pelo VHB anteriormente eliminada. [26, 27]. No entanto, a infeção aguda eliminada não é um fator de risco para subsequente cirrose ou carcinoma hepatocelular [28].

#### 2.1.4.2. Infeção crónica com VHB

A progressão natural da infeção crónica pelo VHB é diversa e não-linear. Os pacientes cronicamente infetados variam de portadores inativos com baixos níveis de replicação para aqueles pacientes com níveis mais elevados de vírus e inflamação ativa, que pode evoluir para cirrose e hepatocarcinoma (CHC). A infeção crónica é definida como a

persistência do AgHBs no soro pelo menos 6 meses após a infecção com inflamação hepática [2]. Estima-se que mais de 50% dos casos de cancro hepático em todo o mundo devem-se ao vírus do VHB e 89% destes casos ocorrem em países em desenvolvimento. A prevenção torna-se o fator mais significativo na redução do risco de desenvolvimento de cancro [29].

Após a infecção aguda pelo VHB nos adultos, 95% recuperam espontaneamente com uma eliminação viral que não necessita de tratamento. Nesse caso, o nível de replicação viral é quase invariavelmente muito alto. Eventualmente, a produção de AgHBe normalmente cessa. Nesta fase, o nível de replicação viral pode estar baixo ou elevado. Quando a negatividade do AgHBe está associada a níveis elevados de replicação, a hepatite associada pode ser referida como AgHBe-negativo. Neste caso verifica-se, frequentemente, a existência de mutações específicas no pré-centro ou centro da região promotora do DNA viral (Figura 3) [2].

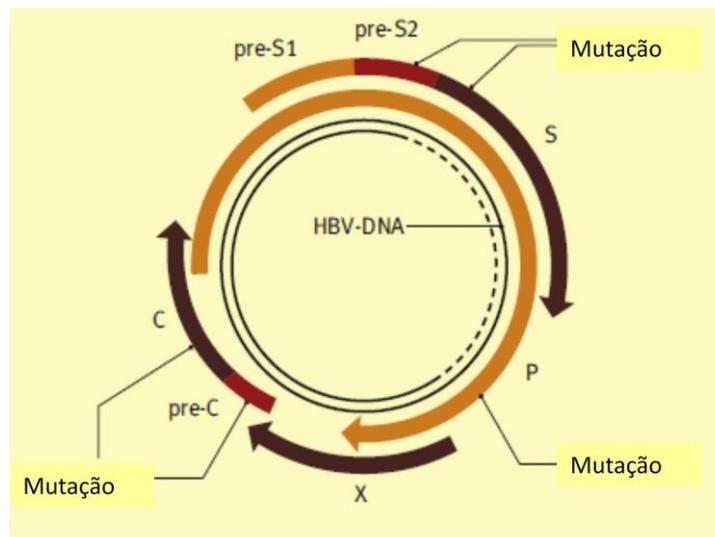


Figura 3: Locais de mutação do DNA viral do VHB (adaptado de [2]).

A mutação na região pré-C leva a uma falha de secreção do AgHBe no soro, assim este antígeno é negativo, apesar de um elevado nível de DNA [1].

Classicamente foram descritas quatro fases da infecção crónica pelo VHB, que englobam a *fase imuno-tolerante*, a *fase imuno-reativa*, a *fase inativa/resolução* e *fase de reativação* (Figura 4). Níveis elevados de replicação (geralmente mais de 10 milhões UI/mL de DNA VHB) podem ser observados na ausência de resposta inflamatória, a chamada *fase imuno-tolerante*. Esta fase raramente é mantida para a vida. A maioria dos pacientes com elevados níveis de replicação sustentada por um longo período de tempo irá desenvolver

lesão hepática progressiva que conduz a cirrose e/ou CHC. Durante esta fase não irá ocorrer reação entre as células citotóxicas T ao vírus [17].

Quando o vírus é reconhecido como um antígeno estranho pelo sistema imunológico, a *fase imuno-reativa* ocorre e é caracterizada por níveis elevados ou variantes da alanina transaminase (ALT), positividade para AgHBe e inflamação moderada a grave, na biópsia hepática. Durante esta fase, o DNA VHB no soro diminui e a secreção de AgHBe pode parar (seroconversão de AgHBe). Após isto, a maioria dos pacientes portadores da Hepatite B apresenta AgHBe negativo, baixo VHB no soro ( $< 2\ 000$  UI/mL) e ALT normal. Esta fase pode persistir com resposta sustentada e eficaz das células T citotóxicas. No entanto, alguns pacientes revertem desde a fase inativa para uma *fase de reativação*, com reaparecimento de níveis mais elevados de vírus apesar da negatividade de AgHBe. Não se observa inflamação hepática e fibrose progressiva [17]. As variações esperadas da serologia da hepatite, concentração de DNA VHB, ALT do soro e evidências histológicas hepáticas nas diferentes fases da infecção pelo VHB são apresentadas na Figura 4 [17].

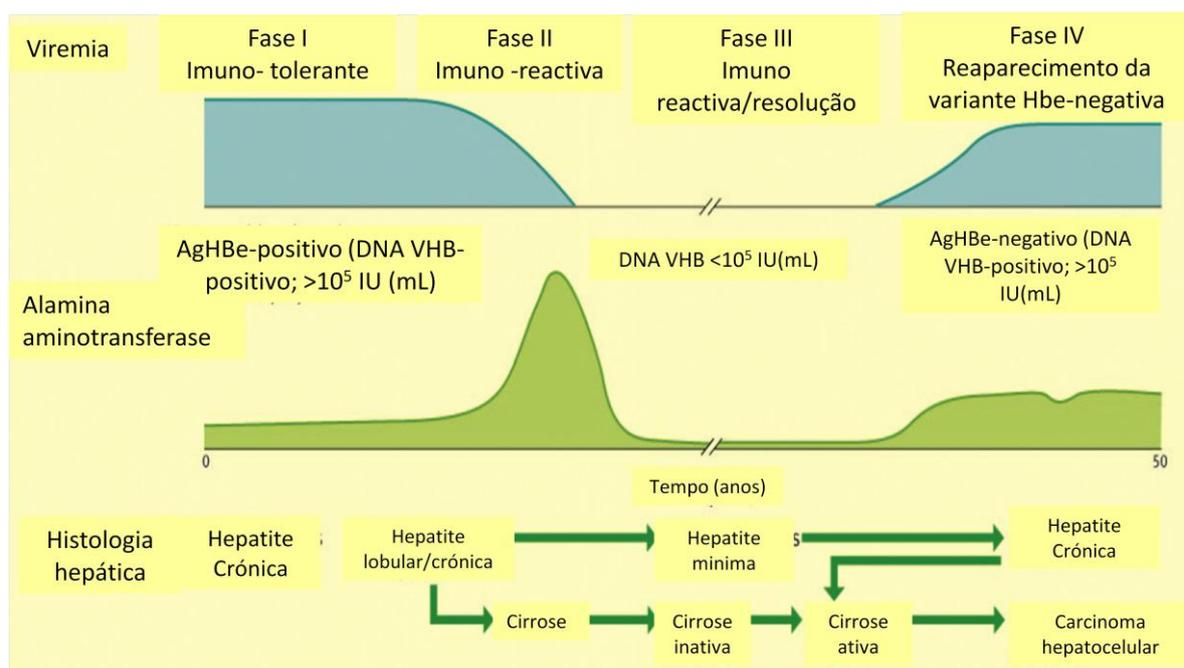


Figura 4: As quatro fases da infecção crônica do VHB (adaptado de [17]).

Pela análise da figura pode-se constatar que a melhor fase de tratamento é nas fases imuno/reativas e de reativação. Em última instancia, a realização de transplante hepático constitui o tratamento preferencial para indivíduos com infecção em avançado estado, com falha hepática, fígado descompensado e hepatocarcinoma [2].

### 2.1.5. Transmissão do VHB

O VHB é transmitido por exposição percutânea ou da mucosa a sangue infetado ou a outros fluidos corporais. A transmissão deste vírus tem sido observada através de várias formas de contato humano: perinatal/materno-infantil; elementos do agregado familiar; sexual; partilha de agulhas; e no trabalho/cuidados de saúde. A transmissão com a taxa mais elevada de infeção pelo VHB é encontrada através da via sanguínea. No entanto, outros fluidos corporais, como sémen e saliva são também fontes de infeção [4].

Os pacientes com infeção crónica pelo VHB constituem o principal veículo de transmissão. Porque o VHB pode permanecer estável e ativo no ambiente pelo menos 7 dias, a transmissão pode ocorrer indiretamente através de superfícies contaminadas ou outros objetos [2]. Antes da implementação do programa universal de imunização infantil contra a hepatite B, um número significativo de crianças (16 000 com menos de 10 anos de idade) foram infetadas nos Estados Unidos por contato com elementos do agregado familiar AgHBs positivos [28].

O vírus da hepatite B é eficientemente transmitido por contato sexual. O contacto sexual de indivíduos cronicamente infetados demonstra uma maior prevalência de infeção, em comparação com o agregado familiar ou pelo simples contato com pessoas infetadas. Os homens que têm relações sexuais com outros homens apresentam taxas mais elevadas de transmissão, do que a população em geral [30].

Os consumidores de drogas injetáveis estão em elevado risco de infeção pelo VHB devido a comportamentos de risco como a partilha de agulhas ou seringas. Vias ligadas a outras exposições por via cutânea para além de droga injetáveis, como tatuagem e acupuntura foram também relatadas [31].

### 2.1.6. Transmissão de VHB em unidades de cuidados de saúde

A transmissão de VHB em unidades de cuidados de saúde tem sido reconhecida como uma importante fonte de novas infeções pelo VHB em todo o mundo. A transmissão paciente-trabalhador e paciente-paciente foram observadas, embora as frequências destes dois tipos de transmissão sejam muito divergentes [2].

A transmissão de VHB de paciente para paciente pode resultar da exposição percutânea a materiais contaminados, sangue ou exposição das mucosas a medicação contaminada. A utilização de seringas contaminadas com VHB terá sido a causa de infeção

de 21 milhões de pessoas em todo o mundo em 2000 [32]. Os veículos de transmissão incluem *vials* de multidoses, dispositivos medidores de glicemia, agulhas de acupuntura e caneta de insulina [33]. No entanto, este tipo de transmissão raramente é relatado. A maioria das transmissões do VHB estão associadas à execução de procedimentos invasivos pelos profissionais de saúde e a maioria ocorreu antes do programa de vacinação contra a hepatite B e antes da implementação de precauções universais nas práticas de controle da infecção [34].

A transmissão paciente-trabalhador era bastante comum antes do programa de vacinação contra a hepatite B a profissionais de saúde; estima-se que 12 000 trabalhadores dos cuidados médicos foram infetados, por ano, nos Estados Unidos, na década de 1980 [34]. Felizmente, a maioria das transmissões ocupacionais podem ser impedidas por meio da implementação de procedimentos padrão de prevenção. No entanto e apesar das várias publicações sobre programas e estratégias de prevenção da transmissão da hepatite B, as infecções pelo VHB permanecem uma questão de saúde pública [35].

#### 2.1.6.1. Profissionais de saúde, um grupo de risco

No seu ambiente profissional, os profissionais de saúde são expostos a múltiplos agentes patogênicos transmitidos por via sanguínea como o VHB ou o VHC (vírus da hepatite C). O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*: Centro de Controle e Prevenção de Doenças) estimou que em 2003, 14,4 % dos trabalhadores hospitalares estavam infetados com VHB [36]. Médicos, dentistas, enfermeiros, funcionários de laboratórios clínicos e de centros de diálise têm maior risco de contrair esta infecção. No entanto, segundo um estudo realizado por Nagao *et al.* [37], a prevalência mais elevada de VHB é observada em dentistas. Dados de outro estudo sugerem que são os enfermeiros os mais frequentemente expostos à infecção (41 %), seguidos dos médicos (31 %) [38].

A transmissão da infecção de profissionais de saúde para paciente é rara e foi apenas descrita em alguns casos [38]. Dados de um estudo conduzido em vários países europeus incluindo França, Itália, Espanha, Reino Unido e Suíça mostraram que a transmissão de VHB entre profissionais de saúde estava significativamente correlacionada com fatores tais como o sexo, tipo de procedimento (por exemplo, utilizando uma agulha para sutura na veia ou artéria do paciente) ou a gravidade da lesão. O contato com pacientes com carga viral superior a  $6 \log_{10}$  cópias/mL aumenta o risco de transmissão até 11 vezes em comparação com uma carga viral inferior a  $4 \log_{10}$  cópias/mL [39].

#### 2.1.6.1.1. Prevenção da transmissão do VHB entre profissionais de saúde

Em 1987, CDC publicou um programa universal de prevenção em resposta à crescente necessidade de melhorar a proteção tanto de profissionais de saúde como dos pacientes, durante os procedimentos de cuidados de saúde. Estes princípios gerais enfatizam que a maior fonte de transmissão de VHB, VHC, VIH e outras patologias provém do contato com sangue [40]. No entanto, deve-se ter em consideração que todos os fluidos corporais incluindo fluidos peritoneal, sinovial, pericardial, muco vaginal, sémen e líquidos cefalorraquidiano e amniótico também são vias de transmissão da infecção. Assim, é fundamental a aplicação de procedimentos de prevenção padrão [41], tais como a lavagem adequada das mãos e a utilização de luvas, máscaras e bata, que minimizam a exposição mucocutânea. A redução da manipulação de materiais afiados e a utilização de recipientes resistentes a perfurações para estes resíduos também poderão prevenir lesões ocupacionais [6].

Em 1997, um protocolo canadiano foi publicado para melhorar a gestão dos profissionais de saúde que foram expostos a agentes patogénicos transmitidos por via sanguínea. De acordo com este protocolo, a administração da vacina contra o VHB constitui o método efetivo, por excelência, para a prevenção da infecção por este vírus [42].

Um estudo realizado na Índia descreve que um grande número de profissionais de saúde teve pelo menos um acidente com objetos afiados durante a sua carreira profissional. A maioria dos profissionais afetados (60,5 %) procedeu à lavagem do local da lesão com água e sabão imediatamente após a sua ocorrência mas 14,8 % não tomaram esta precaução. Após acompanhamento durante um ano e meio, verificou-se que todos os participantes deste estudo eram AgHBs negativos e todos tinham recebido a vacinação contra o VHB como procedimento de prevenção [43].

Outro estudo realizado em França avaliou a disponibilidade de equipamento apropriado para prevenção da transmissão do VHB na sala de operações e verificou que apesar da consciencialização sobre o perigo de exposição durante os procedimentos de cuidados de saúde, a taxa de lesões provocadas por agulhas, permanece elevada [44].

#### 2.1.6.1.2. Consequências económicas da transmissão de VHB entre profissionais de saúde

A prevalência de hepatite tem repercussões em termos de custos de tratamento e profilaxia pré e pós exposição, A probabilidade de hospitalização e a sua duração é bastante elevada em pacientes AgHBs positivos, sendo a sua taxa de sobrevivência reduzida e a medicação administrada de elevado custo [45].

Exposições a pacientes co-infetados com o VHB envolveram custos de \$650 nos Estados Unidos, em 2007. Estudos mostram que a gestão de exposições ocupacionais é de elevado custo, tornando assim a prevenção economicamente mais viável [46]. Efetivamente, as lesões provocadas por instrumentos afiados têm um elevado custo económico associado aos testes de acompanhamento, profilaxia após exposição, aconselhamento, tratamento de trabalhadores infetados e questões éticas e legais [47]. Um estudo australiano, demonstrou um aumento significativo de lesões provocadas por agulhas entre 1990 a 1999. Os enfermeiros foram mais expostos do que qualquer outro profissional de saúde. O custo para a prevenção de exposição a fluidos corporais pela utilização de agulhas de segurança foi de cerca de \$365 000 por ano [48].

#### 2.1.7. Abordagens terapêuticas

O objetivo da terapia contra a infeção do VHB é prevenir a progressão para cirrose e reduzir o risco de desenvolvimento de CHC [1]. O tratamento da infeção pelo VHB tem sido melhorado nos últimos anos com o uso de interferão e com o desenvolvimento de antivirais orais análogos de nucleosídeos. A eficácia antiviral é medida pelo grau de supressão do DNA VHB e pelas taxas de perda de AgHBe e AgHBs, sendo refletida pela melhoria na histologia do fígado do paciente [49].

A escolha entre análogos nucleosídeos ou interferão depende das características virais e dos pacientes [49]. O interferão atua, induzindo um estado de resistência antiviral em células teciduais não infetadas, com efeitos imunomoduladores e antivirais [50]. Os análogos de nucleosídeos são antiviróticos orais que impedem a síntese de DNA VHB, inibindo a enzima transcriptase reversa, atuam como terminadores da cadeia de DNA [1].

## 2.2. Vacinação contra o VHB, uma forma de prevenção

A vacinação é a forma mais eficaz para o controlo global do VHB e prevenção de cancro, insuficiência e cirrose hepática. A Organização Mundial de Saúde (OMS) já referiu

a importância da prevenção da hepatite B desde a infância, recomendando que a imunização contra esta patologia seja incluída num programa universal de vacinação infantil [51].

A vacina contra o VHB está disponível mundialmente há duas décadas, no entanto somente em 1993 foi implementada no Programa Nacional de Vacinação (PNV) português, sendo umas das mais recentes [52]. Desde então, esta vacina é administrada a todos os recém-nascidos e a todos os jovens dos 10 aos 13 anos. Além da vacinação universal está ainda indicada a vacinação de grupos de risco, entre os quais se destacam os profissionais dos serviços de saúde, excluindo os que têm tarefas exclusivamente administrativas [16].

Ambos os tipos de vacinas disponíveis contra a hepatite B, derivadas do plasma ou de DNA recombinante, são muito eficazes [53]. Historicamente, a vacina contra hepatite B foi desenvolvida a partir de plasma humano de indivíduos infetados com VHB (vacina derivada de plasma). Este era inativado durante o processo de fabricação da vacina. Atualmente, por engenharia genética, é possível fazer a identificação e a clonagem molecular do genoma do vírus, com produção satisfatória de AgHBs em leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*. Estes AgHBs derivados de leveduras demonstram elevada segurança e eficiência. Esta vacina poderá também ser produzida por inserção de um plasmídeo contendo genes AgHBs em células de mamíferos [54, 55]. Estudos comparativos entre a vacina derivada de plasma e a vacina de DNA recombinante mostraram que a qualidade dos anticorpos produzidos tanto do ponto de vista de afinidade quanto de especificidade é semelhante [55].

Em Portugal, a vacina administrada é do tipo DNA recombinante. As doses administradas são de 0,5 mL (5 ou 10 µg antigénio, conforme a origem comercial) para indivíduos com 15 anos de idade ou menos e 1 mL (10 ou 20 µg antigénio,) para indivíduos com idade superior a 15 anos de idade [52].

A vacinação contra o vírus da hepatite B atua por indução de uma resposta imune completa com a produção de plasmídeos secretores de anticorpos anti-HBs conferindo imunidade humoral, e a produção de linfócitos B e T (incluindo células de memória) específicos para o AgHBs [56]. Os indivíduos submetidos à vacinação deverão ser previamente triados quanto à presença de anti-HBs e AgHBs no soro. Os indivíduos com sorologia positiva para o anti-HBs, devido à imunidade presente, estão dispensados da vacina. Os portadores crónicos de AgHBs também, pois não respondem a este estímulo antigénico. Os doentes em hemodiálise devem ser submetidos ao mesmo esquema de vacinação, porém devem receber doses de inóculo acima de 20 µg por dose aplicada [55].

Após a administração da vacina, deve-se testar a presença do AgHBs e do anti-HBs. O AgHBs positivo indica falha terapêutica. O anti-HBs positivo indica que a vacinação foi bem-sucedida [55]. Após 30 dias e 180 dias da imunização, aproximadamente 90 % dos adultos saudáveis e 95 % dos recém-nascidos, crianças, e adolescentes desenvolvem um nível apropriado de anti-HBs, que confere proteção ao indivíduo [57]. Em indivíduos saudáveis, a eficácia da vacina é aproximadamente de 100% [7].

Apesar das vacinas utilizadas serem altamente eficientes com uma taxa de 94 a 98 % de proteção contra a infecção crônica pelo VHB durante pelo menos 20 anos, esta está longe de ser perfeita, já que casos de falha de imunização e até mesmo total ausência de resposta já foram descritos [58].

### 2.2.1. Imunização contra o VHB em profissionais de saúde

Aos profissionais da área da saúde sob risco de contrair infecção pelo vírus da hepatite B é-lhes recomendado um programa de vacinação pelas autoridades de saúde competentes [59, 60]. Em Maio de 2010, a 63ª Assembleia Mundial de Saúde adotou resoluções prioritárias para a prevenção global e controlo da hepatite viral, recomendando a vacinação dos profissionais de saúde [61].

Na Europa e nos Estados Unidos da América, existem políticas com o objetivo de prevenir a transmissão ocupacional do VHB. Por exemplo, a União Europeia (EU) requer que todos os profissionais de saúde com maior exposição ao vírus tenham acesso a informação de prevenção e vacinação, e é política oficial em muitos países da UE a vacinação de todos os novos profissionais de saúde [62]. Organizações como a *Viral Hepatitis Prevention Board* (VHPB- Prevenção e Controlo de Hepatites Virais) confirmam esta política e estende a recomendação a estudantes de saúde nos primeiros anos de curso [63]. Adicionalmente, os princípios gerais estabelecidos internacionalmente incluem testes para pesquisa de anticorpos após a vacinação para assegurar que os profissionais de saúde estão protegidos e a administração de uma dose de reforço para aqueles que não ficaram imunizados [63].

### 2.2.2. Ausência de resposta após vacinação contra o VHB

Embora a vacinação contra o VHB seja altamente eficaz, 5 % a 10 % dos indivíduos não desenvolvem uma resposta adequada, tendo por base os níveis de anticorpos anti-HBs

[7]. Verifica-se ainda que a taxa de ausências de resposta à vacinação contra o VHB em populações não saudáveis é maior do que em populações saudáveis (Tabela 2).

Tabela 2: Resposta à vacina do vírus da hepatite B numa população não saudável.

Estudo	Diagnóstico	Resposta Anti-HBs (% sucesso)
<b>Ozdemir <i>et al.</i> [64]</b>	Doença renal crónica	4 – 45
<b>Bhamidimarri <i>et al.</i> [24]</b>	Hepatite C crónica	100
<b>Mendenhall <i>et al.</i> [65]</b>	Cirrose hepática	18
<b>Kahn [66]</b>	Infecção VIH	46
<b>Calycine <i>et al.</i> [67]</b>	Transplante de fígado	
	Antes do transplante	16
	Depois do transplante	7

O aparecimento de doença renal crónica, por exemplo, tem como consequências a acumulação de toxinas, desnutrição e anemia que resultam na diminuição da resposta imunitária à infeção, refletindo-se no prejuízo da função e adesão de neutrófilos, redução de quimiotaxia, reconhecimento e processamento antigénico, formação de anticorpos, e na fase secretora citológica das células T. Adicionalmente, ocorre também a diminuição da fagocitose e da eliminação de patogénicos intracelulares, produção aumentada de radicais superóxido, resultado em stress oxidativo, e menor secreção de moléculas de adesão, citocinas e fatores de crescimento [64].

Além disso, a resposta anti-HBs está inversamente relacionada com a idade [68] e com o peso corporal [69]; indivíduos mais jovens têm uma resposta mais eficiente à vacinação do que indivíduos mais velhos (Figura 5) e indivíduos não obesos desenvolvem um nível protetor mais elevado do que pacientes obesos. Esta diminuição de resposta à vacinação dever-se-á à ocorrência de alterações nas respostas imunes celular e humoral descrita em indivíduos mais velhos (idade superior a 30 anos) e obesos [68, 69].

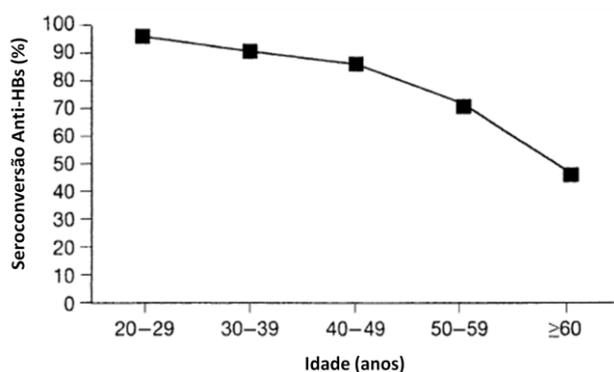


Figura 5: Relação entre a idade e a resposta à vacinação contra o vírus da hepatite B (adaptado de [68]).

Fatores adicionais associados a imunogenicidade reduzida da vacina contra o VHB são descritos na Tabela 3 [67-70].

Tabela 3: Fatores associados a uma pobre ou ausência de resposta à vacinação contra o vírus da hepatite B (adaptado de [70]).

<b>Fatores de Risco</b>
Sexo masculino
Obesidade
Idade (> 30 anos)
Fumador
Imunosupressão
Infeção VIH
Doença crónica hepática
Alcoolismo
Doença renal crónica
Local de injeção (glúteo vs. Deltoide)
Comprimento da agulha
Predisposição genética
Atividade profissional

Estudos sugerem também que mulheres saudáveis desenvolvem frequentemente uma resposta imune protetora mais forte à vacinação quando comparadas aos homens. As diferenças biológicas entre os sexos poderão ser um preditor significativo da resposta à vacinação [71].

A via de administração da vacina também poderá ser uma condicionante ao sucesso da resposta à vacinação. Um estudo realizado em profissionais de saúde em dois hospitais da Suécia confirmam que a vacina recombinante administrada por via intradérmica (i.d.) pode ser uma alternativa viável à administração intramuscular (i.m.), já que cerca de 5 % dos indivíduos em que lhes foi administrado a vacina por via i.m. demonstraram incapacidade de desenvolver imunidade [72].

Os indivíduos fumadores também apresentam as respostas humoral e celular diminuídas. De acordo com este dado, Winter *et al.* [73] demonstraram que o tabaco induz uma redução da capacidade de produção de níveis protetores de anti-HBs.

Indivíduos alcoólatras têm dificuldade na eliminação do vírus, relacionada com o comprometimento do sistema imunológico ocasionado pelo consumo de álcool. Os pacientes com cirrose de origem alcoólica, quando têm um episódio agudo de hepatite B, apresentam maiores riscos de desenvolverem a forma fulminante da doença [65].

A predisposição genética para a ausência de resposta à vacinação contra o VHB em indivíduos saudáveis foi avaliada num estudo retrospectivo efetuado em 598 indivíduos [74]. Os resultados deste estudo mostraram que 14 % dos indivíduos imunizados tinha níveis muito baixos anti-HBs ( $\leq 1\ 000$  unidades de radioimunoensaio, RIA) em comparação com uma média de 26 718 unidades de RIA em indivíduos com resposta positiva à vacinação. Uma análise dos Complexos Principais de Histocompatibilidade (CPH), sistema antigénio leucocitário humano (HLA) dos indivíduos com concentração mais baixa de anti-HBs, mostrou um aumento do número de homozigóticos para o haplótipo de CPH entre estes indivíduos [74]. Isto sugere que a resposta normal ao AgHBs é devido à presença de um gene dominante da resposta imune no CPH, devendo-se esta falha de resposta à ausência deste gene e à presença de ambos os cromossomas dos haplotipos MHC [74].

Para diagnosticar corretamente a ausência de resposta, o Centro de Controlo de Doenças e Prevenção (CDC) aconselha à medição dos níveis de anti-HBs, 1 a 6 meses após a última dose da escala de imunização [75]. A ausência de resposta é definida com uma concentração de anti-HBs inferior a 10 IU/L. Uma resposta insuficiente é definida por uma concentração de anti-HBs superior ou igual a 10 e inferior ou igual a 99 IU/L [76]. Estes indivíduos tendem a ter uma duração mais curta de anti-HBs detetável em comparação com indivíduos que desenvolvem concentração superior ou igual a 100 mIU/mL após a imunização HBV; indivíduos com resposta insuficiente podem perder anti-HBs no soro mais cedo do que os indivíduos que têm uma resposta de anti-HBs de 100 mIU/mL [76].

O Comité Consultivo do CDC defende testes generalizados após imunização contra VHB devido à alta probabilidade do sucesso da vacina. No entanto, os indivíduos com fatores de risco associados (Tabela 3) e/ou em elevado risco de contrair o VHB através de exposição profissional a sangue ou fluidos corporais, devem ser avaliados para resposta anti-HBs após a imunização [75].

### 2.2.3. Redução de imunidade

A memória imunológica envolve a persistência de anticorpos circulantes e/ou a capacidade de gerar uma resposta imune rápida após re-exposição ao antigénio. Os linfócitos B de memória têm a capacidade de responder rapidamente a antigénios previamente encontrados por meio de uma exposição clonal e diferenciação no plasma de células secretoras de anticorpos de elevada afinidade [56]. Estudos anteriores mostram que é possível detetar e quantificar linfócitos B de memória específicos para o AgHBs, através da

diferenciação destas células em células secretoras de anticorpo após estimulação *in vitro* [77].

Um número estimado de 13 % a 60 % dos indivíduos que responderam inicialmente à vacina contra o VHB podem perder anti-HBs detetáveis nos anos subsequentes a uma concentração inicial protetora anti-HBs [78]. Este fenómeno designa-se por redução de anticorpo ou redução de imunidade em oposição à verdadeira ausência de resposta. Estes dois padrões de resposta imunitária têm diferentes implicações clínicas. A redução de anticorpo pode ainda ser protetora contra a infeção crónica pelo VHB, apesar de níveis não detetáveis de anti-HBs. Esta proteção contra a infeção crónica pelo VHB na ausência de níveis detetáveis de anti-HBs foi demonstrada em populações onde o VHB era altamente predominante [79]. A advertência de proteção por meio da redução de imunidade indica que os indivíduos devem ter experienciado inicialmente uma resposta à imunização. Foi demonstrado que alguns indivíduos desenvolveram anti-HBc (provas de avanço da infeção pelo VHB) mas não desenvolveram uma doença crónica. Esta defesa ativa contra a infeção viral dever-se-á à ativação de uma resposta imunitária de memória [80].

Um estudo de 2004 realizado em crianças tailandesas [81] demonstrou que 15 anos após uma vacinação bem-sucedida, não se conseguiu detetar quaisquer níveis de anti-HBs em 30 % das crianças que foram vacinados logo à nascença. Anti-HBc foram detetados em 33 % dessas crianças e 1 criança tinha o antigénio de superfície do VHB detetável. Portanto, em alguns indivíduos com redução de anti-HBs, o risco de desenvolvimento do estado da infeção existe, sendo necessário o reforço da imunização para indivíduos que vivem numa área endémica do vírus da hepatite B [82].

A distinção entre indivíduos com redução de imunidade e indivíduos com total ausência de resposta à imunização (resposta anti-HBs desconhecida após a imunização) é possível com base na administração de uma única dose da vacina. O grau de resposta anti-HBs, 4 a 12 semanas após uma única dose de reforço de imunização, diferencia o padrão de resposta a dois anticorpos. Os indivíduos com verdadeira ausência de resposta não apresentarão quantidades detetáveis de anti-HBs no soro ou eventualmente poderão ter um pequeno aumento, enquanto os que apresentam uma redução dos níveis de anticorpo terão uma resposta significativa, normalmente  $\geq 10$  IU/L. [57]

#### 2.2.4. Reforço da imunidade

Os indivíduos com verdadeira ausência de resposta não estão protegidos contra a infecção do VHB apesar da adequada vacinação. Se houver exposição ao VHB, estes indivíduos devem ser tratados como um indivíduo que não foi previamente vacinado; a administração de imunoglobulina anti-hepatite B (globulina hiperimune) e revacinação são aconselhadas [78]. O CDC recomenda a consideração da revacinação de indivíduos que não responderam à imunização, com mais do que uma dose adicional de vacina, já que uma única dose pode resultar em 15 % a 25 % de indivíduos que desenvolverão anti-HBs protetores [78]. Se necessário, duas doses adicionais (3 injeções totais) podem ser administradas; estas administrações adicionais geralmente resultam em seroconversão em 30 % a 50 % em cada indivíduo em causa. Para os indivíduos com fatores de risco para uma ausência de resposta uma dose de 40 µg de vacina pode ser utilizada [57].

A administração de uma dose de reforço da vacina AgHBs resulta numa vigorosa resposta anamnésica, demonstrando assim que a memória imune contra a infecção pelo VHB dura mais tempo do que os anticorpos anti-HBs [56]. Estudos recentes detetaram num cirurgião infetado pelo VHB, linfócitos B de memória apesar de níveis de anti-HBs indetetáveis [83]. Em indivíduos que apresentaram uma boa resposta à vacinação, a memória imunológica permite uma proteção de longa duração contra o avanço da infecção pelo VHB [84].

### 2.3. Métodos moleculares de deteção do VHB

O diagnóstico de qualquer das formas clínicas da hepatite B realiza-se através de técnicas serológicas [85]. O desenvolvimento de ensaios moleculares para infeções virais transmitidas por via sanguínea tornou possível a deteção de infeções agudas num estado inicial da infeção comparativamente com as técnicas convencionais de medição da concentração de vírus presente no sangue durante as fases aguda ou crónica da infeção [25]. Tais técnicas revelam-se fundamentais não apenas para o diagnóstico, mas também para o acompanhamento da infeção viral, na avaliação do estado clínico do paciente e na monitorização da terapêutica específica [85].

Na ausência de AgHBs, o diagnóstico da infeção pelo VHB baseia-se na presença de DNA VHB somente em duas condições [86]: quando há suspeita de infeção primária ou em pacientes com anti-HBc isolado submetidos a imunossupressão, com o objetivo de avaliar o risco de reativação viral [85].

Para análise da variabilidade genética viral, procede-se normalmente à sequenciação do DNA VHB, seguida da comparação de sequências alvo e construção de árvores filogenéticas [25].

### 2.3.1. Definição da condição ativa ou inativa em infecção aguda ou crónica

Como internacionalmente estabelecido, para pacientes AgHBe positivos é necessário definir a infecção ativa em ensaios DNA VHB com limite de deteção de  $1,8 \times 10^2$  e intervalo dinâmico adequado para discriminar níveis de DNA VHB de  $1,8 \times 10^4$  IU/mL. A infecção crónica está normalmente associada a estes níveis de DNA VHB, sugerindo a presença da infecção [87]. Em pacientes AgHBe negativos e anti-HBe positivos, níveis persistentemente abaixo deste valor identificam os portadores inativos [88, 89]. A monitorização dos níveis de DNA VHB e ALT durante pelo menos 12 meses, em associação com a determinação do marcador de lesão hepática como IgM anti-HBc quando disponível, é necessário para excluir uma infecção ativa em pacientes AgHBe negativos e anti-HBe positivos com níveis normais de ALT e DNA VHB  $< 1,8 \times 10^4$  UI/mL na primeira avaliação [85].

### 2.3.2. Deteção quantitativa do genoma viral por reação em cadeia da polimerase

Desde a introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR) em meados dos anos 80, que esta técnica tem sido utilizada para a deteção de várias classes de agentes infecciosos, incluindo uma ampla gama de vírus. Esta técnica tem sido de grande utilidade na identificação de vírus incapazes de serem cultivados em laboratório ou que são cultivados com grande dificuldade. A utilização da técnica de PCR está também indicada para o diagnóstico de infeções cuja produção de antígeno é limitada ou naquelas cuja resposta serológica está comprometida ou ausente [90].

### 2.3.3. Determinação do VHB: abordagens geralmente utilizadas

Vários testes serológicos são utilizados frequentemente para o diagnóstico e monitorização da infecção pelo VHB. A presença no soro do antígeno HBs indica o tipo de infecção VHB (aguda ou persistente) enquanto o antígeno HBe serve como marcador da replicação viral ativa [19]. No entanto, a ausência de AgHBe (mutação pré-core) no sangue não exclui a replicação viral, e a concentração no soro de DNA VHB pode ser o marcador

mais indicado da atividade replicativa do VHB comparativamente com AgHBe [91]. Vários tipos de técnicas para medir a concentração de DNA VHB têm vindo a ser desenvolvidas e estão comercialmente disponíveis. Estes incluem um teste de hibridização líquida (Genostics, Abbott Laboratories, Chicago, IL, EUA); um ensaio de hibridação RNA-DNA (Digene Diagnostics, Silver Spring, EUA); ensaio de amplificação ramificada do sinal de DNA (bDNA) (Quantiplex HBV-DNA assay, Emeryville, CA, EUA) e análise de ácidos nucleótidos baseados em *crosslinking* (NAXCOR, Menlo Park, CA, EUA). Estes testes têm níveis variados de sensibilidade (1-5 pg/mL, que correspondem a 0,28 a  $1,4 \times 10^6$  cópias/mL) e, devido à falta da padronização inter-ensaios, a análise comparativa tem mostrado uma concordância insuficiente [92, 93].

#### 2.3.4. Detecção do VHB e implicações na prática dos cuidados de saúde

As técnicas moleculares de deteção e quantificação do genoma do VHB têm aplicações em várias áreas da prática dos cuidados de saúde. A presença e os níveis de AgHBs, AgHBe e DNA viral ditam a prática restrita ou não dos profissionais de saúde [25].

Aqueles que estão infetados com VHB mas que não têm AgHBe detetáveis, podem continuar a prática profissional sem limitações a menos que haja risco de transmissão para pacientes. Nos Estados Unidos da América, as recomendações para a prática restrita de profissionais de saúde infetados com VHB baseiam-se na presença ou ausência de AgHBe no soro [94]. No entanto, seis incidentes de transmissão envolvendo profissionais AgHBs positivos (cirurgiões AgHBe negativos) foram relatados no Reino Unido. A sequenciação nucleótida do DNA VHB dos cirurgiões e de pacientes infetados foi utilizado para confirmar a transmissão e examinar a estirpe de VHB envolvida. Verificou-se, assim, que todos os 6 cirurgiões eram portadores do vírus do VHB com a substituição nucleótida na região *pre-core* no genoma viral, no codão 28. Esta alteração de bases resulta num codão stop prematuro que previne a expressão do AgHBe mas não permite a continuação da replicação e auxilia a infeção viral na presença de anti-HBe. O DNA VHB foi detetado através da técnica de PCR nos seis cirurgiões, embora em concentração muito mais baixa do que em amostras controlo AgHBe positivas [83, 95]. Assim, as recomendações para a uma atividade laboral limitada por profissionais de saúde AgHBs positivos mas AgHBe negativos deverá basear-se na determinação da concentração de DNA VHB no soro, através de técnicas de amplificação [25].

### III. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar a resposta imunológica de uma amostra de profissionais de saúde do Centro Hospital do Baixo Vouga- E.P.E., Aveiro, previamente vacinados contra o vírus da hepatite B. Neste sentido procedeu-se:

- i. a um estudo epidemiológico e retrospectivo, onde se analisaram e correlacionaram dados como a idade, género, função e serviço profissional, horário de trabalho, dados antropométricos (peso e altura), hábitos de consumo de álcool, tabagismo, história médica, medicação regularmente consumida, idade da primeira vacina contra o VHB, escalas de vacinas e reforço.
- ii. a uma avaliação da população linfocitária (linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+) e leucocitária (leucócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células gama-delta) no sangue periférico de profissionais de saúde utilizando citometria de fluxo.



## IV. Metodologia Experimental

### 4.1. Caracterização da população em estudo

Mil e quinhentos profissionais de saúde do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro receberam a vacinação contra a Hepatite B entre 2007 e 2011. Destes, 20 foram incluídos no presente estudo. Os restantes 1480 foram excluídos por não apresentarem qualquer registo que pudesse pôr em causa o sucesso da imunização, ou seja ficaram imediatamente imunizados após a administração das três dosagens da vacinação.

Os profissionais de saúde foram selecionados a partir da base de dados do Serviço de Medicina do Trabalho e Saúde Ocupacional do H.I.P. Este estudo foi aprovado pela comissão de ética local e tendo em consideração as recomendações da declaração de Helsinkia.

A população em análise incluiu 12 indivíduos do sexo feminino e 8 indivíduos do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 26 e 64 anos. Estes indivíduos foram classificados e divididos de acordo com o seu estado de vacinação contra o VHB: indivíduos que fizeram vacinação e responderam (Grupo RV, n=6), indivíduos que fizeram vacinação e reforço e responderam (Grupo RRV, n=6) e indivíduos que fizeram vacinação e reforço e que não responderam (Grupo NRRV, n=8).

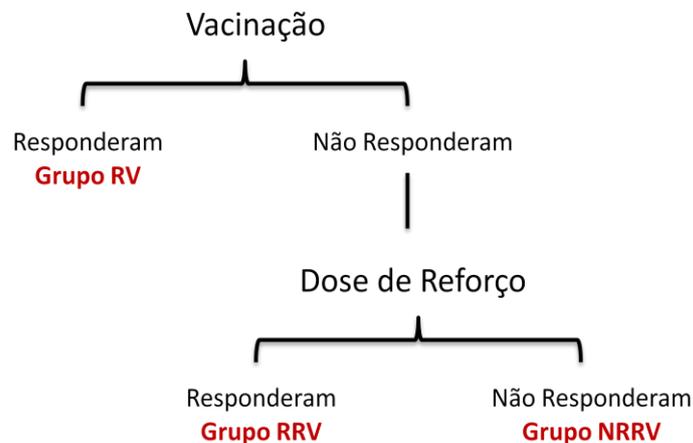


Figura 5: Classificação dos três grupos (RV, RRV e NRRV) de profissionais de saúde em estudo.

Nenhum dos sujeitos incluídos neste estudo tinham história clínica de infeção por VHB (AgHBs, anti-HBc), hepatite C ou vírus da imunodeficiência humana (VIH), e não se encontravam imunodeprimidos, aquando da realização deste trabalho. Os indivíduos vacinados receberam pelo menos três injeções intramusculares da vacina AgHBs recombinante em doses de 20 µg/mL (Enrerix® B). A concentração de anticorpo anti-HBs

foi quantificada em amostra de sangue periférico dos profissionais em estudo com a técnica de quimioluminescência direta utilizando como equipamento o ADVIA Centaur® XP Immunoassay system (SIEMENS, Ireland). Os indivíduos que não responderam à vacinação foram definidos como tendo anticorpos anti-HBs, abaixo de 10 mUI/mL após a administração de pelo menos três doses de vacina AgHBs. Para indivíduos que responderam à vacinação, a concentração de anti-HBs foi superior a 10 mUI/mL em amostras testadas pelo menos três meses após a última toma da vacina AgHBs. Os indivíduos com níveis de anti-HBs inferiores a 10 mUI/mL receberam, ainda, uma dose de reforço adicional de vacina recombinante por injeção intramuscular e o teste foi repetido após 6 meses da administração da mesma.

#### 4.2. Análise epidemiológica dos dados

No sentido de correlacionar os fatores de risco subjacentes à ausência de resposta imunológica à vacinação da hepatite B para cada profissional de saúde do Centro Hospital do Baixo Vouga, E.P.E - Aveiro analisaram-se os seguintes dados em cada um dos grupos considerados: idade, género, função e serviço profissional, horário de trabalho, dados antropométricos (como o peso e altura), hábitos de consumo de álcool, tabagismo e dados clínicos, tais como medicação, historial médico, idade da primeira vacina contra o VHB, escalas de vacinas e reforço.

Com base nos dados do peso e altura de cada profissional de saúde determinou-se o índice de massa corporal segundo a fórmula:

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$$

Os indivíduos em estudo foram caracterizados de acordo com o seu índice de massa corporal e segundo os requisitos dados pela Organização Mundial de Saúde, em indivíduos saudáveis (IMC entre 18,6 e 24,9), indivíduos com excesso de peso (IMC entre 25 e 29,9), indivíduos com obesidade de grau I (IMC entre 30 a 34,9), indivíduos com obesidade de grau II ou obesidade severa (IMC entre 35 e 39,9), e por fim, indivíduos com obesidade de grau III ou obesidade mórbida (IMC igual ou superior a 40). O IMC foi expresso em Kg/m<sup>2</sup>. [96].

No que se refere aos hábitos tabágicos de cada profissional de saúde em estudo, considerou-se fumador aquele que fumava mais de 3 cigarros por semana [97].

Em relação ao consumo de álcool, este foi categorizado de acordo com o número de bebidas alcoólicas ingeridas durante uma semana. Assim, o consumo alcoólico foi

classificado como moderado quando eram consumidas mais de seis bebidas por semana, ocasional para um consumo de 3 a 6 bebidas por semana ou infrequente quando 0 a 2 bebidas eram consumidas por semana [97].

No que diz respeito aos dados referentes à atividade profissional, função e serviço no qual o profissional de saúde exerce a sua atividade, cada sector hospitalar foi classificado de acordo com o risco de contrair infeção e segundo os critérios da Administração de Saúde e Segurança Ocupacional (*Occupational Safety and Health Administration*), em serviços de risco máximo, serviços de risco médio e serviços de risco mínimo [98]. Os serviços de urgência, obstetrícia e pneumologia foram considerados sectores de risco máximo de contrair infeção; os serviços de cirurgia geral, psiquiatria, medicina, pediatria de risco médio e os serviços administrativos, centro de operações (oficinas), radiologia, hotelaria e serviço de transportes de risco mínimo. O horário de trabalho de cada profissional também foi tido em consideração. Assim, de acordo com a sua atividade profissional e função exercida em cada sector hospitalar, cada profissional de saúde foi incluído em um dos dois regimes gerais de trabalho: horário fixo, com 8 horas de trabalho diárias pré-estabelecidas (4 horas de trabalho na parte da manhã e 4 horas de trabalho na parte da tarde) ou turnos, com 8 horas de trabalho seguidas mas que poderão ser realizadas a qualquer hora do dia (só na parte da manhã, só na parte da tarde ou só à noite).

Atendendo ao historial clínico, cada profissional de saúde incluído no estudo foi classificado como: historia clínica relevante se já tinha apresentado uma patologia associada a fenómenos de imunossupressão; historia clínica sem relevância se nunca apresentou uma patologia com influência imunológica. A medicação tomada no momento do estudo pelo profissional também foi registada. Os níveis de anti-HBs foram tidos em consideração para os profissionais com história clínica relevante e que tomassem medicação regular.

Para a recolha destes dados foi utilizado o Sistema de Apoio ao Médico (SAM), o Sistema de Gestão de Doentes Hospitalares (SONHO) e o Sistema de Informação para o Laboratório de Análises Clínicas (APPOLO) do Centro Hospital do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro.

### **4.3. Análise Laboratorial: determinação da população linfocitária e leucocitária no sangue periférico**

#### 4.3.1. Seleção e preparação das amostras

Foram selecionados aleatoriamente três indivíduos de cada grupo em estudo para colheita de sangue periférico para subsequente contagem da população linfocitária e leucocitária, nomeadamente para determinação da percentagem e contagem de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e células gama-delta por citometria de fluxo.

Assim, aproximadamente 2,7 mL de sangue periférico foi colhido para tubos com 1,6 mg de EDTA por ml de sangue, e processado num período máximo de 24 h. Procedeu-se à determinação do hemograma e com base nos resultados obtidos pipetou-se um volume de amostra correspondente a  $1 \times 10^6$  de células para cada um de 8 tubos teste, que foram incubadas com os anticorpos monoclonais para antígenos de membrana: CD3+ (CD3 PE, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CD4+ (CD4: FITC, SEROTEC, Raleigh, NC, USA) e CD8+ (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), adicionados nas quantidades recomendadas (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L e 1  $\mu$ L, respetivamente).

Após agitação e incubação à temperatura ambiente durante 10 minutos no escuro, adicionou-se 2 ml de *Facs Lysing Solution* (BDB, San José, CA, USA) previamente diluído 1:10, e incubou-se a mistura obtida durante 10 minutos no escuro à temperatura ambiente. A amostra foi posteriormente centrifugada durante 5 minutos a 1500 rpm à temperatura ambiente. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 1,5 ml de PBS (Gibco BRL- Life Technologies, Viena, Áustria) e centrifugado novamente. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 250  $\mu$ L de PBS. As células foram então analisadas por citometria de fluxo.

#### 4.3.2. Análise por citometria de fluxo

O intervalo da análise incluiu no mínimo 95% de linfócitos e não mais do que 5% de monócitos em mais de 10 000 eventos adquiridos por marcação das amostras de sangue periférico com os anticorpos monoclonais CD3+, CD4+ e CD8+. Os dados foram adquiridos utilizando o equipamento BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA). A análise do imunofenótipo de cada amostra de sangue periférico foi realizada com o *Software* SimulSET. Os resultados obtidos na análise dos quadrantes CD3+, CD4+, CD8+ foram corrigidos para marcação não específica por não linfócitos. O valor absoluto de células por microlitro de amostra foi calculado multiplicando a frequência de

células determinada por citometria de fluxo pelo valor da percentagem de leucócitos por 1000  $\mu\text{L}$ , obtida do hemograma.

#### 4.3.3. Análise Estatística

Os dados dos profissionais de saúde foram recolhidos das bases de dados informáticas do Centro Hospital do Baixo Vouga, E.P.E.- Aveiro e diretamente exportados para o programa Microsoft® EXCEL, onde foi realizado o cálculo de percentagens, médias e desvios padrão para as variáveis correspondentes assim como os respetivos gráficos.

Todos os resultados das variáveis quantitativas foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP).

A análise estatística e cálculo de p-value das variáveis quantitativas foram determinados utilizando o *software* GraphPad Prism 5 (versão 5.04).

A análise estatística não paramétrica de ANOVA foi utilizada para os testes estatísticos das várias variáveis quantitativas. Considerou-se diferenças significativas para valores de p-value  $< 0,05$  (com nível de confiança de 95%).



## V. Resultados

Vinte profissionais de saúde do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro foram incluídos no presente estudo, 40 % dos quais eram do sexo masculino, 15 % eram fumadores e 20 % apresentavam hábitos alcoólicos regulares. Na Tabela 4 são apresentados os aspetos demográficos que caracterizam os profissionais de saúde da amostra em análise.

**Tabela 4:** Características demográficas dos profissionais de saúde em estudo (n=20).

Características		Nº (%) de indivíduos
Sexo	Feminino	12 (60 %)
	Masculino	8 (40 %)
Idade		43,4 ± 11,5
IMC	Homem	26,81 ± 4,87
	Mulher	27,48 ± 6,77
Fumador		3 (15 %)
Hábitos Alcoólicos		4 (20 %)

A população em estudo foi, posteriormente, dividida em grupos de acordo com o seu estado de imunização contra o VHB avaliado pelos níveis de anti-HBs determinado laboratorialmente. Os indivíduos com resposta imunológica insuficiente evidenciaram anti-HBs inferior a 10 mIU/mL, os indivíduos com resposta imunológica insatisfatória apresentavam anti-HBs entre 11 e 100 mIU/mL e os indivíduos com resposta satisfatória manifestavam anti-HBs superiores a 100 mIU/mL. Assim, e como é possível verificar na Figura 6, 40 % dos profissionais de saúde em estudo apresentaram uma resposta imunológica insuficiente, 15 % mostraram uma resposta insatisfatória e 45 % evidenciaram uma resposta satisfatória, com níveis de anti-HBs superiores a 100 mIU/mL.

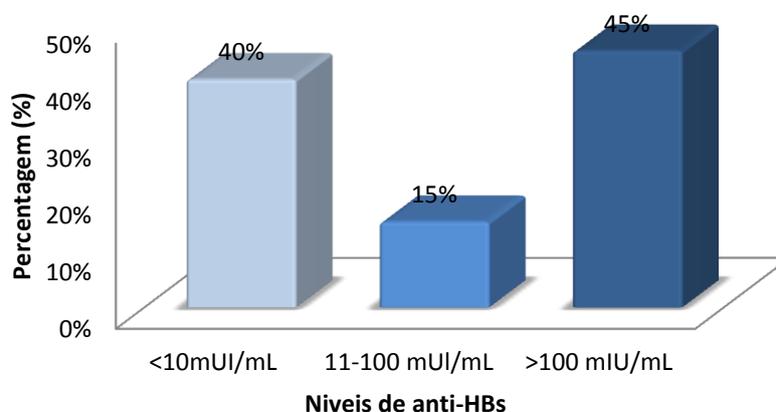


Figura 6: Caracterização da resposta imunológica contra o VHB dos profissionais de saúde em estudo, de acordo com os respetivos níveis de anti-HBs (n=20).

Com base na resposta imunológica a população de profissionais de saúde em estudo foi dividida em três grupos (Grupo RV, Grupo RRV e Grupo NRRV) conforme os níveis de anti-HBs detetados nos dois momentos de imunização, isto é, após a administração das três doses da vacinação contra o VHB e uma dose de reforço. Assim, o Grupo RV corresponde aos profissionais de saúde com uma resposta imunológica positiva após dois a três meses da administração da terceira dose da vacina (6 indivíduos), o Grupo RRV corresponde aos indivíduos que não responderam imediatamente após a administração das três dosagens da vacinação mas que após a administração de uma dose de reforço, obtiveram resposta imunológica à vacinação (6 indivíduos), e o Grupo NRRV corresponde aos indivíduos que não responderam em nenhum momento da imunização, nem após a administração das três doses da vacina, nem após a injeção de uma dose de reforço (8 indivíduos).

### 5.1. Estudo do efeito de potenciais fatores de risco na resposta imunológica à vacinação contra o VHB

Com o objetivo de avaliar a relação entre potenciais fatores de risco e a resposta imunológica à vacinação contra a hepatite B, analisaram-se os dados demográficos e clínicos para os grupos dos profissionais de saúde em estudo.

Para a influência do género na resposta à vacinação contra o VHB, verificou-se que no Grupo RV e no Grupo NRRV, 50 % dos indivíduos eram do sexo masculino enquanto no Grupo RRV este valor era apenas de 17 % (Figura 7).

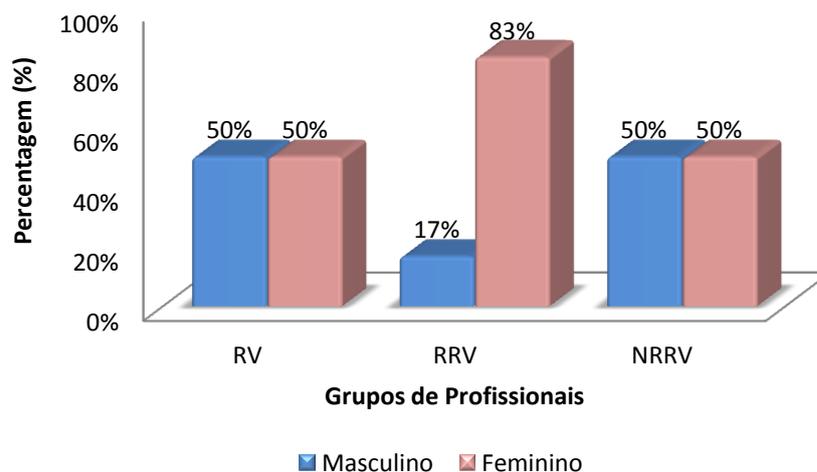


Figura 7: Caracterização dos grupos em relação ao género dos indivíduos que constituem a amostra em estudo na resposta imunológica à vacinação contra o HBV (n=20).

Como se pode constatar da análise da Figura 7, os grupos RV e NRRV apresentam uma percentagem idêntica de indivíduos de ambos os sexos enquanto o grupo RRV caracteriza-se por apresentar um maior número de profissionais de saúde do sexo feminino.

Os grupos de profissionais de saúde em estudo foram também caracterizados em termos de idade (Figura 8) tendo-se verificado que no grupo RV a média de idades correspondeu a  $41,17 \pm 10,34$  anos, no grupo RRV a  $43,87 \pm 12,98$  anos e no grupo NRRV  $44,33 \pm 12,51$  anos. Porém, não se observam diferenças significativas entre os grupos de profissionais ( $p\text{-value} > 0,05$ ).

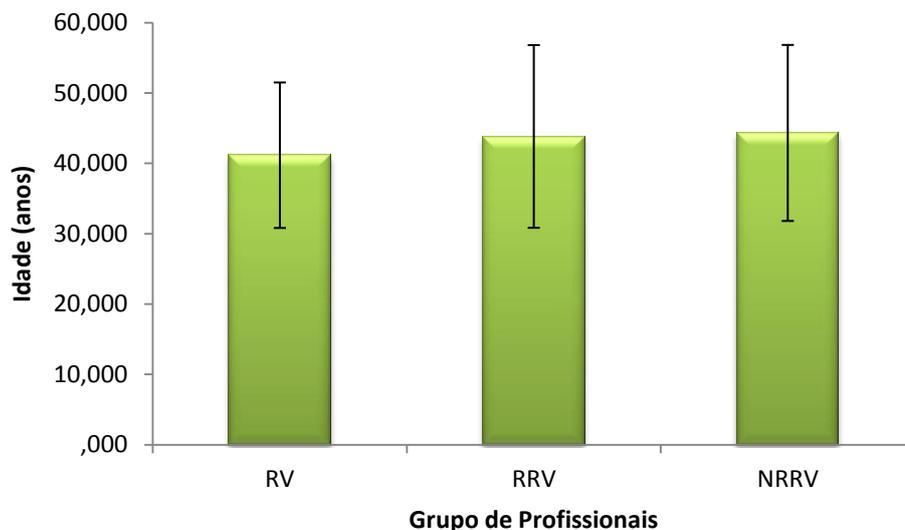


Figura 8: Caracterização dos grupos em estudo em termos de idade dos indivíduos de cada grupo de profissionais que constituem a amostra em estudo. Média  $\pm$  DP ( $n=20$ ,  $p\text{-value}=0,8637$ ).

Em termos de faixas etárias, para os grupos RV e RRV, verificou-se uma percentagem semelhante de indivíduos com idades inferiores a 30 anos, entre 30 e 50 anos e idade superior a 50 anos (17 %, 50 % e 33 %, respetivamente). No entanto, para o Grupo NRRV, observou-se uma percentagem maior de indivíduos com idades superiores a 50 anos (38 %) e uma diminuição de indivíduos com idades inferiores a 30 anos (13 %).

De modo a avaliar a influência da idade à qual lhes foi administrada a vacinação contra o VHB na resposta imunológica à mesma, recolheu-se informação relativa ao ano em que foi lhes administrada a primeira vacina contra a hepatite B e comparou-se entre os diferentes grupos de profissionais de saúde.

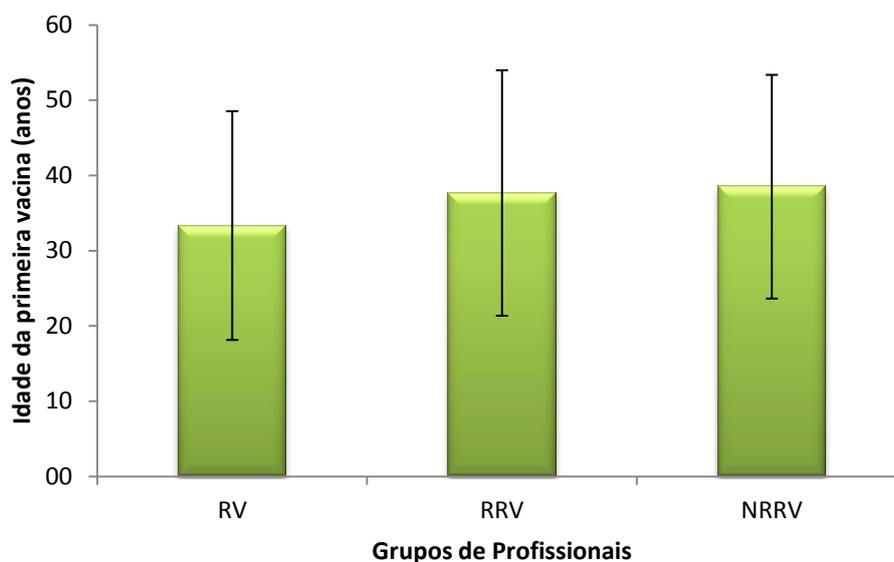


Figura 9: Idade média à qual foi administrada a primeira vacina contra o VHB em cada grupo de profissionais em estudo. Média  $\pm$  DP (n=20, p-value=0,8129)

Verificou-se que os indivíduos do grupo RV em média foram vacinados contra o VHB pela primeira vez aos  $33,3 \pm 15,20$  anos, no grupo RRV aos  $37,7 \pm 16,32$  anos e no grupo NRRV aos  $38,5 \pm 14,87$  anos (Figura 9), no entanto não se observam diferenças significativas entre os grupos.

Dividindo os profissionais por faixas etárias, para o Grupo RV verificou-se que mais de metade (67 %) dos indivíduos receberam a primeira vacinação entre os 31 e os 50 anos de idade, não existindo qualquer individuo que tenha recebido esta vacinação com mais de 50 anos. No entanto para o grupo RRV, 17 % da amostra tinha idades superiores a 50 anos quando lhes foi administrada a primeira vacinação. Este número aumentou para 25 % no Grupo NRRV, sendo este o grupo com o maior número de indivíduos com idades superiores a 50 anos que receberam a primeira dose da vacina contra o VHB. No que diz respeito aos profissionais mais jovens, com idade igual ou inferior a 30 anos no momento da primeira vacinação, encontram-se predominantemente no grupo RV (33 %), seguindo-se o grupo RRV (17 %) e com menor percentagem o grupo NRRV (13 %). Em todos os grupos, metade ou mais de metade dos indivíduos tinham idades compreendidas entre os 31 e os 50 anos quando lhes foi administrada pela primeira vez a vacinação contra o VHB.

#### 5.1.1. Efeito do índice de massa corporal na resposta imunológica à vacinação contra o VHB

De modo a relacionar o índice de massa corporal com a resposta imunológica à vacinação da hepatite B, calculou-se este mesmo parâmetro a partir da altura (em metros) e o

peso corporal (em quilogramas) para cada profissional de saúde, segundo a fórmula apresentada anteriormente no ponto 4.2. Posteriormente determinou-se o índice de massa corporal médio para os profissionais em cada grupo (Figura 10).

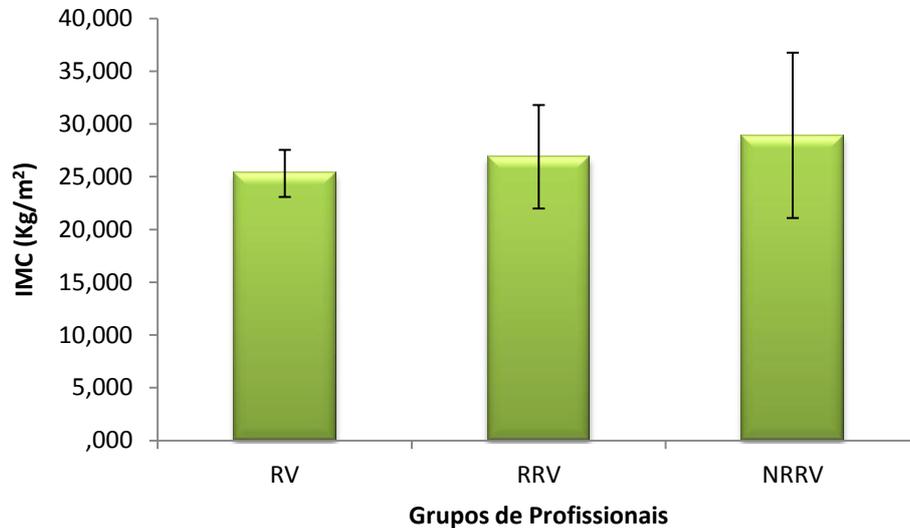


Figura 10: Índice de massa corporal médio dos indivíduos de cada grupo de profissionais que constituem a amostra em estudo. Média  $\pm$  DP (n=20, p-value=0,5225)

Verificou-se que para o grupo RV, o IMC médio era de  $25,31 \pm 2,23$ , o grupo RRV apresentava um IMC de  $26,88 \pm 4,90$  e o grupo NRRV mostrava um IMC de  $28,92 \pm 7,83$ . Todavia, não se verificou diferenças significativas entre os grupos de profissionais.

#### 5.1.2. Efeito da exposição ao risco de infeção na resposta imunológica à vacinação contra o VHB

Cada profissional de saúde do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. - Aveiro exerce a sua função num determinado serviço do hospital que foi caracterizado de acordo com o potencial risco de contrair a infeção pelo VHB e segundo os critérios da Administração de Saúde e Segurança Ocupacional (*Occupational Safety and Health Administration*), em serviços de risco máximo, serviços de risco médio e serviços de risco mínimo. [98] (ponto 4.2, alínea iv).

Assim e como se pode observar na Figura 11, verificou-se que tanto no grupo RV como no grupo RRV, 50 % dos indivíduos trabalhavam num serviço hospitalar de risco mínimo, 33 % exerciam a sua função num serviço de risco médio e por fim, apenas 17 % dos profissionais trabalhavam num serviço de risco máximo. Já no grupo NRRV, a

percentagem de profissionais que exerciam a sua função em serviços hospitalares de risco mínimo e de risco máximo é idêntica, cerca de 25 %. Por conseguinte, metade dos indivíduos deste grupo (50 %) trabalhava em serviços hospitalares considerados de risco médio.

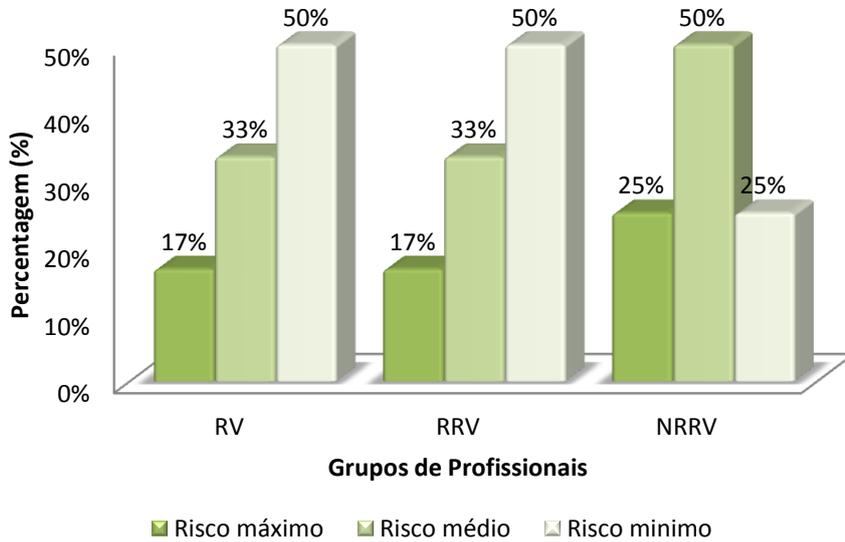


Figura 11: Influência do risco de exposição à infeção dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o HBV, de acordo com o serviço no qual exercem a sua atividade (n=20).

De acordo, com o sector hospital onde o profissional de saúde exerce a sua função e de acordo com a sua atividade, cada individuo possui um determinado horário de trabalho, que divide estes profissionais, em profissionais com horário fixo e profissionais com horário por turnos (Figura 12).

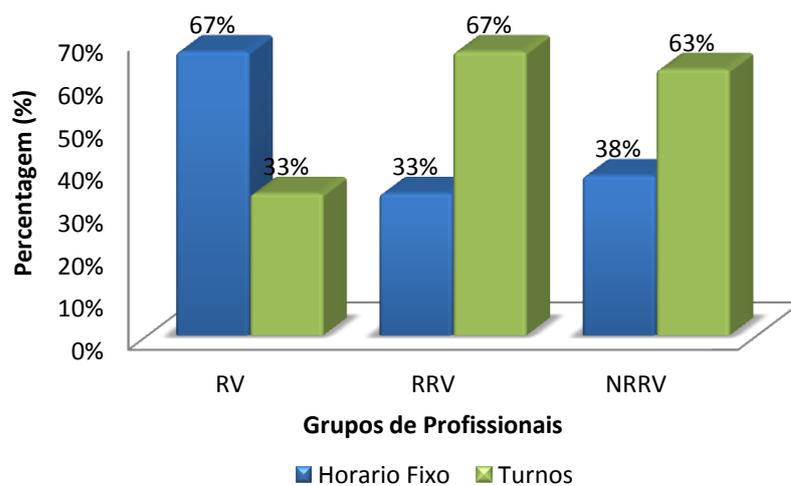


Figura 12: Efeito do horário de trabalho dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20).

De modo a verificar a influência deste parâmetro na resposta imunológica à vacinação da hepatite B, observou-se que no grupo RV, mais de metade (67 %) dos indivíduos trabalhava em horário fixo e somente 33 % trabalhava por turnos (Figura 12). O mesmo não se verificou no grupo RRV e NRRV, onde a maioria dos indivíduos trabalhava num regime por turnos, 67 % e 63 %, respetivamente, e apenas 33 % e 38 % exercia a sua atividade através do regime de horário fixo, seguindo a mesma ordem.

### 5.1.3. Efeito dos hábitos tabágicos e do consumo de álcool na resposta imunológica à vacinação contra o VHB

O tabaco e os hábitos alcoólicos têm sido apontados como fatores que podem influenciar a resposta à vacinação contra o VHB. Deste modo, para cada profissional de saúde envolvido no estudo, obteve-se informação relativa à quantidade de cigarros, aproximadamente, que cada indivíduo fumava por mês (Figura 13).

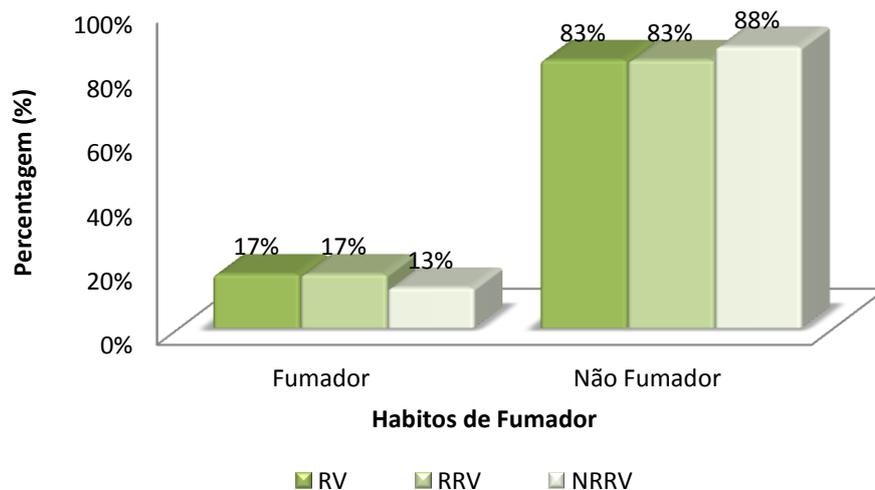


Figura 13: Influência dos hábitos de tabagismo dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20).

Como se pode constatar pela análise da Figura 13, a percentagem de não fumadores era substancialmente superior à percentagem de indivíduos fumadores nos três grupos. Os grupos RV e RRV apresentaram a mesma percentagem de indivíduos fumadores e não fumadores (17 % e 83 %, respetivamente) enquanto no grupo NRRV observou-se uma diminuição dos indivíduos fumadores (13 %) e consequentemente um aumento de não fumadores (88 %).

Tendo em consideração o número de bebidas alcoólicas ingeridas durante uma semana, o consumo de álcool por cada profissional de saúde foi classificado como infrequente, ocasional e moderado (Figura 14).

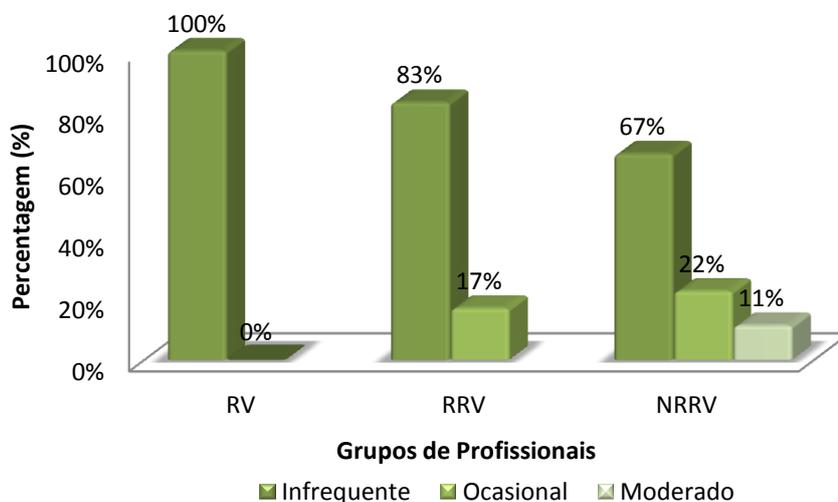


Figura 14: Influência dos hábitos alcoólicos dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20).

Assim, e de acordo com a Figura 14, no grupo RV todos os indivíduos tinham um consumo alcoólico considerado infrequente, com ingestão de 0 a 2 bebidas por semana. Já no grupo RRV, 17 % dos profissionais indicaram consumir álcool ocasionalmente, com uma ingestão de 3 a 6 bebidas por semana (consumo em ambiente social). O grupo NRRV é o único grupo em que 1 dos indivíduos referiu ser um consumidor moderado de álcool, com ingestão de mais de seis bebidas por semana.

#### 5.1.4. Efeito da história clínica na resposta imunológica à vacinação contra o VHB

Em relação à história clínica de cada profissional de saúde, este foi classificado como relevante ou sem relevância de acordo com a existência de patologias associadas a fenómenos de imunossupressão (Figura 15).

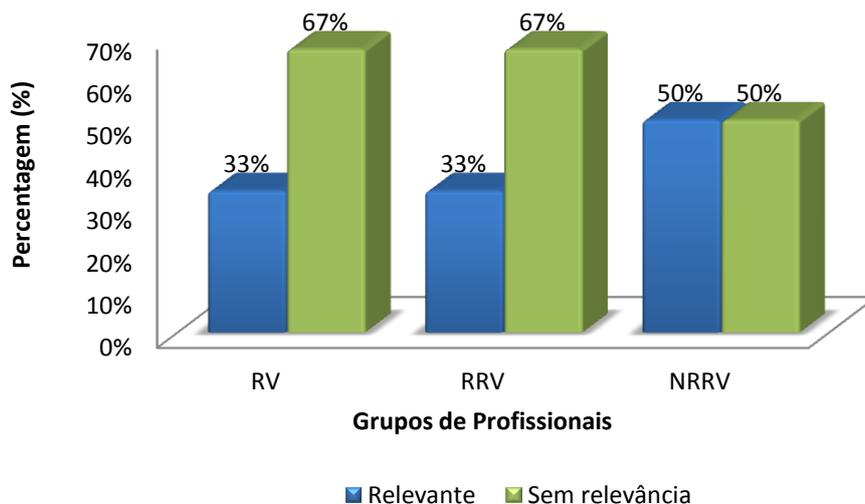


Figura 15: Influência da história clínica dos indivíduos que constituem a amostra em estudo, na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20).

Assim, e como é possível observar pela Figura 15, tanto no grupo RV como no grupo RRV apenas 33 % dos indivíduos apresentavam história clínica relevante, evidenciando patologias como síndrome de Gilbert, patologia degenerativa osteoarticular, depressão, diabetes, hipertensão e doenças respiratórias como asma. No grupo NRRV, a percentagem de profissionais com história clínica foi de 50 %. Neste caso, os indivíduos apresentam patologias como alergias respiratórias, diabetes e hipercolesterolemia.

Adicionalmente à história clínica, também foi considerada a medicação tomada por cada indivíduo na altura da vacinação (Figura 16).

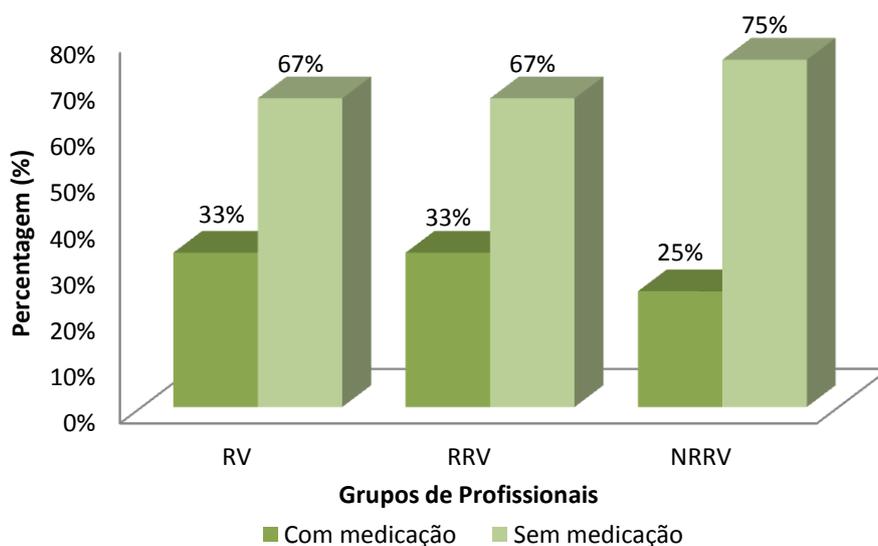


Figura 16: Influência da medicação na resposta imunológica à vacinação contra o VHB (n=20).

Em geral, e não especificando fármacos, observou-se nos grupos RV e RRV uma percentagem semelhante de indivíduos que tomavam medicação regular (33 %), enquanto no grupo NRRV este valor diminuiu para 25 %.

Tendo em consideração o tipo de medicamentos tomados por cada indivíduo, pode salientar-se que no grupo RV predominaram os anticoncepcionais (2 indivíduos), antiasmáticos e anti-hipertensivos (1 indivíduo). No grupo RRV, além de anticoncepcionais (1 indivíduo) também alguns profissionais tomavam anti-inflamatórios não esteroides com regularidade e somente um profissional deste grupo continha uma vasta lista de medicação regular que incluía bloqueadores beta, anti-agregantes plaquetários, anti-hipertensivos, diuréticos, ansiolíticos e anti-depressivos. No grupo NRRV, um dos indivíduos em estudo tomava anti-hipertensivos e outro anti-colesterolémicos, além de anticoncepcionais.

De modo a completar os resultados anteriores, relacionou-se também os níveis de anti-HBs de cada profissional de saúde em estudo com a sua história clínica e consequente medicação consumida. Os resultados abaixo (Figura 17) mostram a percentagem de profissionais que apresentaram história clínica relevante e que consequentemente consumiam medicação regular, e os respetivos níveis de anti-HBs.

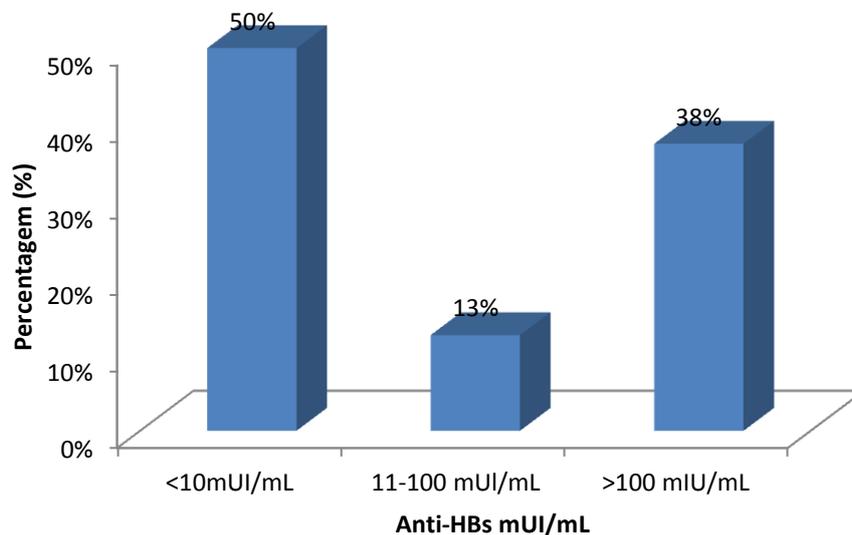


Figura 17: Níveis de anti-HBs dos profissionais de saúde que demonstraram possuir um historial clínico relevante e que tomavam medicação regular (n=8).

Dos 20 profissionais de saúde do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. - Aveiro que constituíam a amostra, observou-se que 8 dos mesmos apresentavam uma história clínica relevante e que, consequentemente consumiam medicação regularmente.

Deste 8 indivíduos, verificou-se que 50 % (ou seja 4 indivíduos) detinham menos de 10 mUI/mL de título de anti-HBs. Em menor percentagem (13 %) mostraram níveis entre 11 a 100 mUI/mL e, por fim, somente 38 % dos indivíduos demonstraram possuir níveis acima de 100 mIU/mL.

## 5.2. Determinação dos parâmetros imunológicos no sangue periférico

Para verificar as diferenças imunológicas entre cada grupo de profissionais de saúde do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. - Aveiro, determinou-se, através da técnica de citometria de fluxo, o número relativo e absoluto dos linfócitos específicos e células leucocitárias do sangue periférico de alguns indivíduos de cada grupo de profissionais.

Consequentemente, realizou-se a análise de três marcadores que permitiu a análise de vários tipos de leucócitos e linfócitos numa única medição, entre eles o total de leucócitos, linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+, a relação CD4+/CD8+, células gama-delta, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Estes resultados estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Parâmetros linfocitários e células leucocitárias avaliadas no sangue periférico dos profissionais de saúde dos grupos em análise (n=9).

Parâmetro (%)	Grupos de profissionais		
	RV	RRV	NRRV
Leucócitos (x1000 células/ $\mu$ L)	7,5 $\pm$ 0,9	10,7 $\pm$ 2,86	9,2 $\pm$ 3,00
Linfócitos (%)	32,10 $\pm$ 3,98	21,15 $\pm$ 8,69	28,03 $\pm$ 7,79
CD3+ (%)	21,73 $\pm$ 5,79	13,601 $\pm$ 5,35	20,35 $\pm$ 6,06
CD4+(%)	52,94 $\pm$ 10,31	53,57 $\pm$ 10,36	48,79 $\pm$ 9,81
CD8+(%)	41,58 $\pm$ 7,75	34,58 $\pm$ 13,52	42,66 $\pm$ 4,97
Razão CD4/CD8	1 $\pm$ 0,68	3,23 $\pm$ 2,40	1,39 $\pm$ 0,62
Gama-delta (%)	1,68 $\pm$ 0,35	5,40 $\pm$ 4,82	5,75 $\pm$ 5,93
Neutrófilos (%)	56,54 $\pm$ 5,13	68,59 $\pm$ 12,6	62,98 $\pm$ 6,84
Monócitos (%)	7,66 $\pm$ 3,60	5,68 $\pm$ 0,83	5,63 $\pm$ 0,94
Eosinófilos (%)	3,69 $\pm$ 1,27	1,59 $\pm$ 0,29	2,11 $\pm$ 1,24

Dos três grupos de profissionais em análise (Grupo RV, Grupo RRV e Grupo NRRV), o grupo RV foi considerado o grupo controlo já que dele constituíam os indivíduos que responderam à vacinação contra o VHB, assim que esta foi administrada.

No entanto, as diferenças observadas entre os grupos e no que diz respeito à percentagem dos parâmetros leucocitários e linfocitários no sangue periférico dos profissionais de saúde não foram significativas (p-value >0,05).

Após determinar a percentagem de cada parâmetro referido na Tabela 5, também se determinou o valor absoluto de células/ $\mu\text{L}$  (Tabela 6), realizando para tal os cálculos necessários que constam no ponto 4.3.3. da metodologia experimental.

Tabela 6: Contagem dos parâmetros linfocitários e células leucocitárias no sangue periférico dos profissionais de saúde dos grupos em análise (n=9).

Parâmetro (células/ $\mu\text{L}$ )	Grupos de profissionais		
	RV	RRV	NRRV
Contagem linfócitos	2426,83 $\pm$ 540,21	2122,36 $\pm$ 456,99	2503,81 $\pm$ 768,88
Contagem CD3+	1656,8 $\pm$ 573,12	1363,52 $\pm$ 227,25	1877,84 $\pm$ 755,79
Contagem CD4+	3911,89 $\pm$ 306,79	5520,31 $\pm$ 580,98	4604,48 $\pm$ 2296,84
Contagem CD8+	3157,28 $\pm$ 886,27	3923,84 $\pm$ 2485,16	3832,23 $\pm$ 849,12
Contagem gama-delta	128,23 $\pm$ 39,87	581,52 $\pm$ 536,16	519,56 $\pm$ 534,87
Contagem neutrófilos	4226,85 $\pm$ 492,01	7527,03 $\pm$ 3041,62	5884,78 $\pm$ 224,63
Contagem monócitos	568,55 $\pm$ 266,39	592,48 $\pm$ 103,55	531,23 $\pm$ 224,63
Contagem eosinófilos	277,55 $\pm$ 105,01	167,71 $\pm$ 48,58	167,71 $\pm$ 48,58

Tal como ocorreu anteriormente, na contagem dos parâmetros leucocitários e linfocitários também não se observaram diferenças significativas (p-value>0,05).

## VI. Discussão

Durante a sua atividade profissional, os profissionais estão expostos, diariamente, a múltiplas doenças transmissíveis pelo sangue tal como o vírus do VHB, estimando-se que 14,4 % dos trabalhadores dos hospitais estejam infetados com este vírus devido a acidentes de trabalho [5] pelo que a implementação de um programa padrão de vacinação é fundamental para a prevenção da transmissão desta doença no meio hospitalar. O meio mais eficiente de prevenção centra-se na implementação de um programa universal de imunização com a administração de vacinação segura e eficaz, a todos os indivíduos sob risco de contrair a infeção pelo VHB. Porém, tem-se verificado que alguns profissionais de saúde não ficam imediatamente imunizados após a administração das três dosagens da vacina contra o VHB. Cerca de 5 a 40 % dos profissionais de saúde não apresentam níveis protetores de anticorpos à vacina da hepatite B após a imunização padrão [99].

Existem alguns fatores de risco que poderão estar associados a esta ausência da resposta dos mecanismos imunológicos. O sexo, a idade, o índice de massa corporal, hábitos comportamentais de risco, condições de trabalho ou dados clínicos, parecem estar intimamente ligados à eficácia de resposta à vacinação.

Assim, este estudo pretendeu avaliar a resposta imunológica de uma amostra de profissionais de saúde, previamente vacinados contra o vírus da hepatite B, abordando os diferentes fatores subjacentes à eficácia imunológica da vacinação nestes profissionais com uma consequente avaliação da população linfocitária e leucocitária no sangue periférico dos profissionais de saúde em análise.

Após a seleção dos profissionais de saúde que constituíram a amostra em estudo (n=20), procedeu-se à determinação dos níveis de anti-HBs para cada um dos indivíduos de modo a verificar a sua resposta à vacinação contra o VHB. Esta resposta foi avaliada após 2 a 3 meses da administração da última dosagem da vacina. Verificou-se que 45 % dos profissionais de saúde apresentavam uma resposta satisfatória, com níveis de anticorpo superiores a 100mIU/mL e 40 % dos profissionais apresentavam níveis abaixo de 10 mIU/mL, evidenciando assim uma resposta insatisfatória à vacinação. Segundo a legislação em vigor, e no que diz respeito aos limites de título anti-HBs que cada profissional de saúde deverá apresentar aquando da execução da sua atividade profissional em ambiente hospitalar, está estipulado que não deverá ser menor que 10mIU/mL [76]. A cada profissional que apresente um título inferior a este valor é administrada uma quarta dose da vacinação de modo a reforçar a proteção imunológica com o consequente aumento dos

níveis de anti-HBs (dose de reforço) [76]. Dos vinte profissionais de saúde em estudo, em seis foi necessário administrar uma dose de reforço já que estes não apresentavam níveis anti-HBs que assegurava a sua proteção contra o vírus da hepatite B.

Com base na resposta à imunização contra o VHB verificou-se que os vinte profissionais de saúde do Centro Hospital do Baixo Vouga, E.P.E. - Aveiro não responderam igualmente às três dosagens da vacinação pelo que foram agrupados em três grupos de acordo com os níveis de anti-HBs detetados nos dois momentos de imunização, ou seja, após a administração das três doses da vacinação e uma dose de reforço.

### **6.1. Estudo do efeito de potenciais fatores de risco na resposta imunológica à vacinação contra o VHB**

De modo a avaliar o efeito de potenciais fatores de risco na eficácia da resposta imunológica à vacinação contra a hepatite B, realizou-se a análise de dados demográficos e dados clínicos dos grupos de profissionais de saúde.

Relativamente à influência do sexo na resposta à vacinação contra o VHB, os Grupos RV e Grupos NRRV continham o mesmo número de indivíduos do sexo feminino e do sexo masculino. No Grupo RRV, a maioria dos indivíduos eram do sexo feminino (Figura 7). No estudo realizado por Yen *et al.* [100] a percentagem de profissionais de saúde do sexo masculino que não responderam à vacinação contra o VHB foi de 26 % comparativamente aos indivíduos do sexo feminino com 10,95 %. De acordo com estes autores os indivíduos do sexo masculino têm uma maior pré-disposição para uma insuficiente resposta imunológica após a administração das três doses da vacina recombinante devido a diferenças biológicas em ambos os sexos. Este fato foi corroborado por Alimonos *et al.* [97] que verificou que 12,5 % dos homens (contra 5,2 % de mulheres) apresentou uma resposta insuficiente a esta mesma vacina, tendo sido necessário administrar uma dose de reforço para assegurar a proteção imunológica contra o vírus. Esta tendência foi observada no presente estudo dado que no grupo onde os indivíduos só revelaram uma resposta positiva à vacinação após uma dose adicional da vacina recombinante (grupo RRV), 83 % eram profissionais do sexo masculino.

A idade dos indivíduos parece também influenciar a resposta à imunização dos profissionais de saúde. Apesar de não se terem observado diferenças significativas, verifica-se uma tendência para o aumento da idade média dos indivíduos do grupo RV para o grupo NRRV (Figura 8). Em termos de faixas etárias verifica-se um aumento notório na percentagem de indivíduos com idades superior a 50 anos no grupo NRRV (38 %) em

comparação com os restantes dois grupos (33 %). Consequentemente, observa-se igualmente uma diminuição da percentagem de indivíduos com idades inferiores a 30 anos, 13 %, comparativamente com 17 % dos grupos RV e RRV).

Estes resultados são apoiados por estudos anteriores [97, 100] que descreveram que a idade está intimamente correlacionada com a eficácia do estado de imunização. Fishman *et al.* [68] reportaram um aumento significativo do risco de não-resposta à vacina da hepatite B entre os indivíduos com idade superior a 30 anos.

No que respeita à influência da idade da primeira administração da vacina recombinante contra a hepatite B na resposta individual à imunização, apesar de não se verificarem diferenças significativas entre os três grupos, foi possível observar uma tendência onde os indivíduos com resposta insatisfatória receberam a primeira dose com uma idade mais avançada do que aqueles que tiveram imediatamente uma resposta positiva após a administração desta vacinação (Figura 9). No grupo NRRV observou-se um maior número de indivíduos com idade superior a 50 anos que receberam pela primeira vez a vacinação contra o HBV (25 %). Esta tendência diminuiu substancialmente nos restantes grupos de profissionais com respostas satisfatórias à vacinação, grupos RV e RRV, que apresentaram uma percentagem mais elevada de indivíduos jovens (idade inferior a 30 anos) que receberam pela primeira vez as três dosagens da vacina recombinante. Clements *et al.* [101] ao analisarem uma população de 282 profissionais de saúde observaram também um aumento significativo da probabilidade de sucesso da vacinação VHB quando esta é administrada antes dos 30 anos de idade, dado que a partir desta idade se verifica uma diminuição das respostas humoral e celular. Neste sentido, estes autores sublinham a vantagem de se administrar a vacinação nos primeiros anos de vida a fim de garantir o sucesso vacinal.

Outro potencial fator de risco para a falha imunológica da vacinação VHB é o índice de massa corporal (IMC). Segundo Wood *et al.* [69] o IMC é um dos fatores estreitamente relacionados com a eficácia de resposta à vacinação contra a hepatite B em profissionais de saúde. Alimonos *et al.* [97] verificaram que dos 385 profissionais de saúde analisados, 14,9 % das mulheres com IMC igual ou superior a 42 Kg/m<sup>2</sup> não responderam eficazmente à vacinação, contrastando com 3 % que apresentava IMC inferior a 42 Kg/m<sup>2</sup>. Em relação aos profissionais do sexo masculino, 8,8 % dos que não responderam eficazmente à vacinação apresentavam um IMC inferior a 29 Kg/m<sup>2</sup>.

Neste trabalho embora não se tenham observado diferenças significativas possivelmente devido à pequena dimensão da população em estudo, foi possível, observar

uma tendência associada ao aumento do IMC no grupo de profissionais com resposta insatisfatória após a administração da vacina recombinante contra este vírus, grupo NRRV (Figura 10). Estes resultados podem ser explicados pela diminuição da resposta imune em indivíduos obesos ou até mesmo com excesso de peso (IMC superior a 25 Kg/m<sup>2</sup> segundo a OMS [51]). A obesidade tem sido associada à diminuição da produção de citocinas, diminuição da resposta à estimulação a antígenos, redução de macrófagos e funções de células dendríticas resultando num aumento da suscetibilidade a infecções por agentes patogénicos distintos, entre os quais o vírus da hepatite B [102].

No que diz respeito ao risco associado à exposição à infeção na resposta imunológica à vacinação contra o VHB, cada profissional de saúde em estudo foi classificado de acordo com o serviço hospitalar onde exercia a sua atividade profissional. Assim, verificou-se diferenças no grupo NRRV comparativamente aos restantes dois grupos (Figura 11), um aumento da percentagem de profissionais de saúde exerciam a sua função em serviços hospitalares considerados de risco médio (50 %) e de risco máximo (25 %). Estes resultados corroboram os dados de Ciorlia *et al.* [103] que em 1433 profissionais de Saúde observaram uma relação causa-efeito entre os sectores hospitalares classificados como de elevado risco de contrair a infeção e a falha na resposta imunológica à vacinação VHB, com um consequente aumento do número de acidentes de trabalho e serologia positiva ao marcador HBsAg. Estes autores demonstraram ainda que o risco de contrair infeção por este vírus aumentava 4,29 vezes em serviços considerados de risco máximo.

Neste mesmo estudo foi ainda sugerido que o horário de trabalho influencia a eficiência de resposta à vacinação de modo que o tempo de serviço poderia aumentar em 14 % o risco de uma serologia positiva ao AgHBs no teste de rastreio do VHB [103]. O sistema imunitário dos indivíduos não possui a mesma capacidade de defesa ao longo de todo o dia, já que para cada individuo existe um ciclo circadiano que determina as capacidades de defesa contra potenciais infeções dependendo da hora do dia. De noite o sistema imunológico encontra-se geralmente mais suscetível a infeções do que durante o dia [104].

No presente estudo observou-se que o grupo RRV e NRRV (com uma resposta não imediata e uma total ausência de resposta à vacinação, respetivamente) continham uma maior percentagem de profissionais de saúde que trabalhavam por turnos comparativamente com o grupo RV (Figura 12), o que corrobora a potencial associação entre o horário de trabalho e a eficácia de resposta à vacina recombinante contra a hepatite B. Assim, verificou-se que trabalhadores hospitalares que exerçam a sua atividade profissional num regime de

horários por turnos podem constituir um grupo propício a uma latente falha imunológica após a administração da vacinação contra o VHB.

Os hábitos tabágicos também parecem influenciar a eficácia funcional do sistema imunológico do próprio indivíduo. Estudos retrospectivos como o de Sopori [105] referem que a nicotina, um dos principais constituintes dos cigarros, tem a capacidade de suprimir o sistema imunitário, alterando as funções imunológicas como as respostas imune inata e adaptativa. *Alimonos et al.* [97] reportaram uma percentagem considerável de profissionais fumadores que não responderam à vacinação (21,9 %) contrastando com 78,1 % de indivíduos que responderam eficazmente à mesma. Esta associação não foi, no entanto, constatada no presente estudo dado que a dimensão da população fumadora era menor do que no estudo anteriormente referido, observando-se inclusive um aumento da percentagem de não fumadores no grupo NRRV (Figura 13).

Outro hábito comportamental bastante recorrente entre a população mundial é a ingestão de bebidas alcoólicas. A percentagem de profissionais de saúde que ingeriam ocasionalmente e moderadamente bebidas alcoólicas foi superior no grupo NRRV (22 % e 11 %, respetivamente), seguindo-se o grupo RRV (17 % e 0 %) e o grupo RV, com 100% de consumo infrequente (Figura 14). Os resultados sugerem que o grupo com uma resposta insuficiente à vacinação é aquele que demonstra uma maior percentagem de indivíduos que ingere bebidas alcoólicas com mais frequência. Assim, observou-se uma potencial conexão entre o consumo de álcool e a eficácia de resposta à vacinação já que o excesso de consumo de bebidas alcoólicas pode conduzir a uma deficiência imunitária, que poderá causar um aumento da suscetibilidade a certas infeções e diminuição da rapidez de resposta imunologia [104].

A história clínica está estreitamente interligado à eficácia de resposta à vacinação [106]. Indivíduos que apresentem patologias que exerçam imunossupressão estão mais suscetíveis à falha da mesma do que aqueles que não demonstram nenhuma patologia associada [107]. Os resultados obtidos neste estudo evidenciam diferenças entre o grupo NRRV e os grupos RRV e RV. No primeiro grupo, 50 % observou-se dos profissionais de saúde apresentava patologias associadas a fenómenos de imunossupressão como alergias respiratórias ou doença asmática (Figura 15). Em consequência, estes profissionais consumiam, também, medicação regular que poderia influenciar a resposta à vacinação. No entanto, não se verificaram diferenças significativas entre os três grupos de profissionais, ou seja, neste caso a medicação tomada por cada indivíduo não exerceu qualquer influência na

resposta positiva à vacina recombinante VHB, independentemente do tipo/classe da medicação consumida.

De modo a completar estes dados e a relacionar os níveis de anticorpo anti-HBs contra a hepatite B com a história clínica relevante e consequentemente medicação consumida por cada profissional, determinou-se os níveis de anti-HBs para cada um dos 8 indivíduos que apresentaram estas características. Assim, verificou-se que 50 % dos profissionais de saúde que apresentavam uma história clínica relevante exibiam um título de anti-HBs abaixo de 10 mUI/mL (Figura 17). Metade desta amostra possuía um nível de anti-HBs abaixo do título recomendado pela legislação, com resposta insuficiente, corroborando a existência de uma relação entre um historial clínico com patologias com capacidade imunossupressora (doença asmática e alergias respiratórias) e uma diminuição da eficácia de resposta à vacinação contra o VHB já que um sistema imune com um determinado grau de imunossupressão não consegue desenvolver níveis de anticorpos adequados e que confirmam proteção.

As alergias respiratórias e doença asmática são algumas das condições físicas que estão intimamente associadas a fenómenos de imunossupressão ou seja a supressão das reações imunitárias do organismo, que estão normalmente associadas à indução por medicamentos como corticosteroides, utilizados no tratamento destas doenças [107]. Os corticosteroides são hormonas que propiciam condições para que o organismo responda a situações de *stress* de diferentes causas como infeções, lesões traumáticas, queimaduras, hemorragias, dor ou situações de medo e luta. Exercem um efeito inibidor nas células de defesa do organismo, contendo propriedades anti-inflamatórias [108].

## **6.2. Determinação dos parâmetros imunológicos no sangue periférico**

Além da existência dos fatores de riscos anteriormente referidos (sexo, idade, IMC, função e serviço profissional, horário de trabalho, hábitos de consumo de álcool e tabagismo, história clínica e medicação consumida) e que predizem a eficácia e rapidez de resposta à vacinação contra o vírus da hepatite B, existem outros fatores que poderão influenciar o modo como a vacinação irá exercer a sua ação no sistema imunológico de cada indivíduo.

Estudos anteriores revelaram que a base molecular e celular para a não resposta ao AgHBs ainda é desconhecida. No entanto, a falha da resposta ao AgHBs tem sido atribuída a vários mecanismos que incluem defeitos na geração primária nas células T AgHBs específicas ou na disponibilidade de células B, destruição de células B AgHBs específicas

por células T citotóxicas e produção inadequada de citocinas à vacina recombinante da B [109].

Para três indivíduos selecionados aleatoriamente de cada grupo de profissionais de saúde do Centro Hospital do Baixo Vouga, E.P.E - Aveiro em estudo, foram determinados parâmetros leucocitários e linfocitários com o objetivo de encontrar possíveis diferenças entre os três grupos com respostas distintas à vacinação contra o VHB. Assim, estudou-se a população de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+, a razão CD4+/CD8+, células gama-delta, neutrófilos, monócitos e eosinófilos (Tabela 5 e 6). Verificou-se que existiam algumas diferenças principalmente entre o grupo controlo (grupo RV) e os restantes dois grupos, no entanto estas não são notoriamente significativas ( $p$ -value > 0,05) devido a existência de diversas variáveis que influenciam a percentagem/contagem destes parâmetros imunológicos e que não foram possíveis de controlar. Sexo, idade, alterações hormonais, *stress*, fatores genéticos, hora do dia (ciclo circadiano), alterações climáticas, algumas patologias associadas (não imunes) ou até hábitos alimentares são algumas dessas variáveis que podem influenciar significativamente a determinação dos valores dos parâmetros linfocitários e leucocitários. Além disso, a pequena dimensão desta amostra também contribuiu para a disparidade destes valores.

No entanto, é possível observar uma tendência para que a percentagem de linfócitos total, linfócitos T CD3+, monócitos e eosinófilos, nos grupos RRV e NRRV, seja inferior à percentagem do grupo RV (grupo controlo). Contrariamente e no que diz respeito à percentagem de leucócitos, linfócitos T CD4+, às duplas CD4+/CD8+, células gama-delta e neutrófilos nos grupos RRV e NRRV, estas encontra-se abaixo dos valores do grupo controlo. A percentagem de linfócitos T CD8+, no grupo RRV encontra-se abaixo da percentagem do grupo controlo e no grupo NRRV acima deste valor. Pelo contrário e relativamente à percentagem de linfócitos T CD4+, no grupo RRV existe uma tendência para que este se encontre acima da percentagem do grupo controlo.

Analisando cada percentagem de cada parâmetro celular em questão, verificar-se que para o caso dos leucócitos totais em 1000 células/ $\mu$ L, é o grupo RRV que apresenta uma tendência para um valor superior comparativamente com os restantes grupos. O mesmo sucede para linfócitos T CD4+, duplas CD4+/CD8+, neutrófilos e monócitos. No caso dos restantes parâmetros celulares, linfócitos totais, linfócitos T CD3+, CD8+ e eosinófilos, o grupo NRRV é o que apresenta o valor mais elevado.

A contagem dos parâmetros linfocitários e leucocitários nos três grupos analisados, verificou-se um pouco diferente das percentagens acima referidas: a contagem de linfócitos totais, e contagem de linfócitos T CD3+ no grupo NRRV tinham o valor mais elevado e o grupo RRV o valor mais baixo. Na contagem de linfócitos T CD4+, CD8+, células gama-delta e neutrófilos, o grupo RRV foi aquele que demonstrou valores mais elevados. Na contagem total de monócitos, verificou-se que o grupo RV continha uma contagem de monócitos superior ao grupo NRRV e inferior ao grupo RRV. Por fim, e no que respeita à contagem de eosinófilos, tanto o grupo RRV como o grupo NRRV demonstraram valores inferiores ao grupo controlo.

Pati *et al.* [99] verificaram uma diminuição da proliferação dos linfócitos T CD4+, com uma consequente disfunção celular entre indivíduos saudáveis em resposta à vacina VHB, demonstrando a disparidade entre uma baixa ou nenhuma resposta imunológica ao antígeno AgHBs juntamente com a resposta eficiente às células específicas T-helper AgHBs *in vitro*. A não resposta das células T pode resultar de uma falha das APC para processar o complexo proteína-antígeno em uma ou mais células T. Assim, estes os resultados destes autores sugerem uma inabilidade geral dos linfócitos T para serem ativados que poderá ser a consequência de uma inapropriada ativação prévia pelo antígeno [109].

A pré-disposição genética também constitui um importante fator que influencia a resposta à vacinação da hepatite B. Variações ao nível do CPH (complexo principal de histocompatibilidade), que contém genes que determinam mais da metade da nossa heritabilidade genética, desempenham um papel fundamental na diversidade genética e que sugerem como o sistema imunitário atua no reconhecimento e apresentação dos antígenos [110]. De facto, estudos pré-vacinação que relacionem a pré-disposição genética de cada profissional de saúde com uma resposta eficaz ou não eficaz poderão esclarecer melhor o modo como os fatores de risco estudados neste trabalho exercem influência na resposta à vacinação.

## VII. Conclusão

No presente estudo pretendeu-se avaliar a eficácia de resposta imunológica à vacinação contra a hepatite B numa amostra de profissionais de saúde do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E.- Aveiro. Os resultados obtidos na análise de uma amostra de 20 profissionais de saúde permitiram tirar as seguintes conclusões:

i) O sexo, a idade, o índice de massa corporal, hábitos comportamentais de risco como hábitos alcoólicos ou tabágicos, as condições de trabalho ou a história clínica influenciam os níveis de resposta à vacinação contra o VHB. Os indivíduos com idade superior a 50 anos, que receberam a primeira administração da vacinação VHB mais tarde (idade superior a 50 anos), com atividade profissional exercida em serviços de risco máximo e em regime de horários por turnos, com consumo mais frequente de bebidas alcoólicas e com historial clínico relacionados com doenças imunossupressoras são os mais suscetíveis a falha na imunização.

ii) As patologias de imunossupressão, como doença alérgica respiratória ou asma, influenciam o desenvolvimento de níveis de anti-HBs adequados e que conferem proteção contra o vírus da hepatite B.

No global, os resultados obtidos neste trabalho permitiram identificar alguns fatores demográficos e imunológicos que influenciam a resposta à vacinação e cuja análise deverá continuar em estudos futuros que abranjam outros centros hospitalares nacionais e avaliem, por exemplo, a influência de fatores genéticos na resposta à vacinação VHB e de que forma podem ajudar a prever essa resposta aquando da administração da vacina recombinante.



## VIII. Referências Bibliográficas

1. Mutimer, D.J. and Y.H. Oo, *Hepatitis B*. *Medicine*, 2011. **39**(9): p. 545-549.
2. Shepard, C.W., E.P. Simard, L. Finelli, A.E. Fiore, and B.P. Bell, *Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination*. *Epidemiologic Reviews*, 2006. **28**(1): p. 112-125.
3. Ni, Y.H., *Natural history of hepatitis B virus infection: Pediatric perspective*. *Journal of Gastroenterology*, 2011. **46**(1): p. 1-8.
4. Bond, W.W., N.J. Petersen, and M.S. Favero, *Viral hepatitis B: aspects of environmental control*. *Health Laboratory Science*, 1977. **14**(4): p. 235-252.
5. Polish, L.B., M.J. Tong, R.L. Co, P.J. Coleman, and M.J. Alter, *Risk factors for hepatitis C virus infection among health care personnel in a community hospital*. *American Journal of Infection Control*, 1993. **21**(4): p. 196-200.
6. Askarian, M., M. Yadollahi, F. Kouchak, M. Danaei, V. Vakili, and M. Momeni, *Precautions for health care workers to avoid hepatitis b and c virus infection*. *International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2011. **2**(4): p. 191-198.
7. Sjogren, M.H., *Prevention of hepatitis B in nonresponders to initial hepatitis B virus vaccination*. *American Journal of Medicine*, 2005. **118**(10 SUPPL.): p. 34S-39S.
8. Thomas, H.C., S. Lemon, and A.J. Zuckerman, *Viral Hepatitis*. 3<sup>a</sup> ed2005, United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd. 913.
9. Blumberg, B.S., B.J. Gerstley, D.A. Hungerford, W.T. London, and A.I. Sutnick, *A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis*. *Annals of Internal Medicine*, 1967. **66**(5): p. 924-931.
10. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*. *Lancet*, 1970. **1**(7649): p. 695-698.
11. Kaplan, P.M., R.L. Greenman, and J.L. Gerin, *DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen*. *Journal of Virology*, 1973. **12**(5): p. 995-1005.
12. Robinson, W.S., D.A. Clayton, and R.L. Greenman, *DNA of a human hepatitis B virus candidate*. *Journal of Virology*, 1974. **14**(2): p. 384-391.
13. Robinson, W.S. and R.L. Greenman, *DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate*. *Journal of Virology*, 1974. **13**(6): p. 1231-1236.
14. Summers, J., J.M. Smolec, and R. Snyder, *A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978. **75**(9): p. 4533-4537.
15. Miller, M.J., *Viral taxonomy*. *Clinical Infectious Diseases*, 1995. **21**(2): p. 279-280.
16. Severo de Almeida, J., Gomes, S., *Cobertura vacinal contra a Hepatite B dos profissionais de saúde do Centro de Saúde de Queluz*. *Revista Portuguesa Clinica Geral*, 2009. **25**: p. 628-32.
17. Thomas, H.C., *Hepatitis B and D*. *Medicine*, 2007. **35**(1): p. 39-42.
18. Heath, J.H.B.S.o.P. 2011; Available from: <http://ocw.jhsph.edu/imageLibrary/index.cfm/go/il.viewImageDetails/resourceID/438E07F0-98DD-FACF-4772E1FA3D3DA2A9/>.
19. Lee, W.M., *Hepatitis B Virus Infection*. *New England Journal of Medicine*, 1997. **337**(24): p. 1733-1745.
20. Fu, J., D. Xu, Z. Liu, M. Shi, P. Zhao, B. Fu, Z. Zhang, H. Yang, H. Zhang, C. Zhou, J. Yao, L. Jin, H. Wang, Y. Yang, Y.X. Fu, and F.S. Wang, *{A figure is presented}Increased Regulatory T Cells Correlate With CD8 T-Cell Impairment and Poor Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(7): p. 2328-2339.

21. Krugman, S., L.R. Overby, and I.K. Mushahwar, *Viral hepatitis, type B. Studies on natural history and prevention re-examined*. New England Journal of Medicine, 1979. **300**(3): p. 101-106.
22. Hoofnagle, J.H. and A.M. Di Bisceglie, *Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis*. Seminars in Liver Disease, 1991. **11**(2): p. 73-83.
23. McMahon, B.J., W.L.M. Alward, and D.B. Hall, *Acute hepatitis B virus infection: Relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state*. Journal of Infectious Diseases, 1985. **151**(4): p. 599-603.
24. Bhamidimarri, K.R., J. Park, and D. Dieterich, *Management of Hepatitis B Virus Coinfection: HIV, Hepatitis C Virus, Hepatitis D Virus*. Current Hepatitis Reports, 2011: p. 1-7.
25. Kao, J.H., J. Heptonstall, and D.S. Chen, *Molecular methods of measurement of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus infection: Implications for occupational health practice*. Occupational and Environmental Medicine, 1999. **56**(11): p. 730-734.
26. Ortiz-Interian, C.J., M.D. De Medina, G.O. Perez, J.J. Bourgoignie, F. Watkins, E. Velez-Robinson, and E. Schiff, *Recurrence and clearance of hepatitis B surface antigenemia in a dialysis patient infected with the human immunodeficiency virus*. American Journal of Kidney Diseases, 1990. **16**(2): p. 154-156.
27. Davis, C.L., D.R. Gretch, and R.L. Carithers Jr, *Hepatitis B and transplantation*. Infectious Disease Clinics of North America, 1995. **9**(4): p. 925-941.
28. Seeff, L.B., G.W. Beebe, and J.H. Hoofnagle, *A serologic follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army*. New England Journal of Medicine, 1987. **316**(16): p. 965-970.
29. Lai, C.L., E. Gane, Y.F. Liaw, C.W. Hsu, S. Thongsawat, Y. Wang, Y. Chen, E.J. Heathcote, J. Rasenack, N. Bzowej, N.V. Naoumov, A.M. Di Bisceglie, S. Zeuzem, Y.M. Moon, Z. Goodman, G. Chao, B.F. Constance, and N.A. Brown, *Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(25): p. 2576-2588.
30. MacKellar, D.A., L.A. Valleroy, G.M. Secura, W. McFarland, D. Shehan, W. Ford, M. LaLota, D.D. Celentano, B.A. Koblin, L.V. Torian, H. Thiede, and R.S. Janssen, *Two decades after vaccine license : Hepatitis B immunization and infection among young men who have sex with men*. American Journal of Public Health, 2001. **91**(6): p. 965-971.
31. *Guidelines for prevention of transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health-care and public-safety workers*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 1989. **38 Suppl 6**: p. 1-37.
32. Hauri, A.M., G.L. Armstrong, and Y.J.F. Hutin, *The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings*. International Journal of STD and AIDS, 2004. **15**(1): p. 7-16.
33. Samandari, T., N. Malakmadze, S. Balter, J.F. Perz, M. Khristova, L. Swetnam, K. Bornschlegel, M.S. Phillips, I.A. Poshni, P. Nautiyal, O.V. Nainan, B.P. Bell, and I.T. Williams, *A large outbreak of hepatitis B virus infections associated with frequent injections at a physician's office*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 2005. **26**(9): p. 745-750.
34. Gunson, R.N., D. Shouval, M. Roggendorf, H. Zaaijer, H. Nicholas, H. Holzmann, A. de Schryver, D. Reynders, J. Connell, W.H. Gerlich, R.T. Marinho, D. Tsantoulas, E. Rigopoulou, M. Rosenheim, D. Valla, V. Puro, J. Struwe, R. Tedder, C. Aitken, M. Alter, S.W. Schalm, and W.F. Carman, *Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections in health care workers (HCWs): guidelines for*

- prevention of transmission of HBV and HCV from HCW to patients. *Journal of Clinical Virology*, 2003. **27**(3): p. 213-230.
35. Gounden, Y.P. and J. Moodley, *Exposure to human immunodeficiency virus among healthcare workers in South Africa*. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2000. **69**(3): p. 265-270.
  36. Weinbaum, C., R. Lyerla, and H.S. Margolis, *Prevention and control of infections with hepatitis viruses in correctional settings*. *Centers for Disease Control and Prevention*. MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control, 2003. **52**(RR-1): p. 1-36; quiz CE1.
  37. Nagao, Y., H. Matsuoka, T. Kawaguchi, T. Ide, and M. Sata, *HBV and HCV infection in Japanese dental care workers*. *International Journal of Molecular Medicine*, 2008. **21**(6): p. 791-799.
  38. Bosques-Padilla, F.J., G. Vázquez-Elizondo, A. Villaseñor-Todd, E. Garza-González, J.A. Gonzalez-Gonzalez, and H.J. Maldonado-Garza, *Hepatitis C virus infection in health-care settings: Medical and ethical implications*. *Annals of Hepatology*, 2010. **9**(SUPPL. 1): p. 132-140.
  39. Yazdanpanah, Y., G. De Carli, B. Miguères, F. Lot, M. Campins, C. Colombo, T. Thomas, S. Deuffic-Burban, M.H. Prevot, M. Domart, A. Tarantola, D. Abitehoul, P. Deny, S. Pol, J.C. Desenclos, V. Puro, and E. Bouvet, *Risk factors for hepatitis C virus transmission to health care workers after occupational exposure: A European case-control study*. *Clinical Infectious Diseases*, 2005. **41**(10): p. 1423-1430.
  40. *Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 1987. **36** **Suppl 2**: p. 1S-18S.
  41. *Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings*. *The Kansas nurse*, 1989. **64**(1): p. 2-3.
  42. Moloughney, B.W., *Transmission and postexposure management of bloodborne virus infections in the health care setting: Where are we now?* *Canadian Medical Association Journal*, 2001. **165**(4): p. 445-451.
  43. Sharma, R., S.K. Rasania, A. Verma, and S. Singh, *Study of prevalence and response to needle stick injuries among health care workers in a tertiary care hospital in Delhi, India*. *Indian Journal of Community Medicine*, 2010. **35**(1): p. 74-77.
  44. Tarantola, A., F. Golliot, F. L'Heriteau, K. Lebascle, C. Ha, D. Farret, S. Bignon, A. Smail, C. Doutrelot-Philippon, P. Astagneau, E. Bouvet, and C.P.-N.B.B.F.E.S.T. the, *Assessment of preventive measures for accidental blood exposure in operating theaters: A survey of 20 hospitals in Northern France*. *American Journal of Infection Control*, 2006. **34**(6): p. 376-382.
  45. Steinke, D.T., T.L. Weston, A.D. Morris, T.M. Macdonald, and J.F. Dillon, *Epidemiology and economic burden of viral hepatitis: An observational population based study*. *Gut*, 2002. **50**(1): p. 100-105.
  46. O'Malley, E.M., R.D. Scott II, J. Gayle, J. Dekutoski, M. Foltzer, T.S. Lundstrom, S. Welbel, L.A. Chiarello, and A.L. Panlilio, *Costs of management of occupational exposures to blood and body fluids*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2007. **28**(7): p. 774-782.
  47. Rogowska-Szadkowska, D., M. Stanisławowicz, and S. Chlabicz, *Risk of needle stick injuries in health care workers: bad habits (recapping needles) last long*. *Przegląd epidemiologiczny*, 2010. **64**(2): p. 293-295.
  48. Whitby, R.M. and M.L. McLaws, *Hollow-bore needlestick injuries in a tertiary teaching hospital: Epidemiology, education and engineering*. *Medical Journal of Australia*, 2002. **177**(8): p. 418-422.

49. Ayoub, W.S. and E.B. Keefe, *Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2008. **28**(2): p. 167-177.
50. Bergman, S.J., M.C. Ferguson, and C. Santanello, *Interferons as Therapeutic Agents for Infectious Diseases*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2011. **25**(4): p. 819-834.
51. WHO, W.H.O.-. *Hepatitis B - Immunization, Vaccines and Biologicals* 2011 [5/12/2011]; Available from: [http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis\\_b/en/index.html](http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis_b/en/index.html).
52. Saúde, D.G.d. *PROGRAMA NACIONAL DE VACINAÇÃO 2006 - Circular Normativa Nº 08/DT de 21/12/2005*. [cited 2011; Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i007442.pdf>.
53. Chien, Y.C., C.F. Jan, H.S. Kuo, and C.J. Chen, *Nationwide hepatitis B vaccination program in Taiwan: Effectiveness in the 20 years after it was launched*. *Epidemiologic Reviews*, 2006. **28**(1): p. 126-135.
54. Chen, D.S., *Hepatitis B vaccination: The key towards elimination and eradication of hepatitis B*. *Journal of Hepatology*, 2009. **50**(4): p. 805-816.
55. *Erratum to General recommendations on immunization: Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP)(Morbidity and Mortality Weekly Report, 60, RR-2)*. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2011. **60**(29): p. 993.
56. Valats, J.C., E. Tuailon, N. Funakoshi, D. Hoa, M.C. Brabet, K. Bolloré, J. Ducos, J.P. Vendrell, and P. Blanc, *Investigation of memory B cell responses to hepatitis B surface antigen in health care workers considered as non-responders to vaccination*. *Vaccine*, 2010. **28**(39): p. 6411-6416.
57. Poland, G.A. and R.M. Jacobson, *Prevention of Hepatitis B with the Hepatitis B Vaccine*. *New England Journal of Medicine*, 2004. **351**(27): p. 2832-2838.
58. Ni, Y., L. Huang, M. Chang, C. Yen, C. Lu, S. You, J. Kao, Y. Lin, H. Chen, H. Hsu, and D. Chen, *Two Decades of Universal Hepatitis B Vaccination in Taiwan: Impact and Implication for Future Strategies*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(4): p. 1287-1293.
59. *Protection against viral hepatitis. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP)*. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control*, 1990. **39**(RR-2): p. 1-26.
60. Bonanni, P. and G. Bonaccorsi, *Vaccination against hepatitis B in health care workers*. *Vaccine*, 2001. **19**(17-19): p. 2389-2394.
61. Organization, W.H. *Viral hepatitis*. *World Medical Association*. October 2008 [cited 2011; Available from: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA63/A63\\_15-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_15-en.pdf).
62. Union, E., *DIRECTIVE 2000/54/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC)*, 2000, *Official Journal of the European Communities*.
63. FitzSimons, D., G. François, G. De Carli, D. Shouval, A. Prüss-Üstün, V. Puro, I. Williams, D. Lavanchy, A. De Schryver, A. Kopka, F. Ncube, G. Ippolito, and P. Van Damme, *Hepatitis B virus, hepatitis C virus and other blood-borne infections in healthcare workers: guidelines for prevention and management in industrialised countries*. *Occupational and Environmental Medicine*, 2008. **65**(7): p. 446-451.

64. Ozdemir, F.N., H. Micozkadioglu, Z. Arat, M. Turan, S. Gulmus, and M. Haberal, *The importance of A3 allele in response to hepatitis B vaccine in end-stage renal disease patients*. Transplantation Proceedings, 2004. **36**(9): p. 2615-2617.
65. Mendenhall, C., G.A. Roselle, L.A. Lybecker, L.E. Marshall, C.J. Grossman, S.A. Myre, R.E. Weesner, and D.D. Morgan, *Hepatitis B vaccination. Response of alcoholic with and without liver injury*. Digestive Diseases and Sciences, 1988. **33**(3): p. 263-269.
66. Kahn, J., *Preventing hepatitis A and hepatitis B virus infections among men who have sex with men*. Clinical Infectious Diseases, 2002. **35**(11): p. 1382-1387.
67. Calycine, N., G. Smallwood, J. Halcomb, M.W. Fried, T.D. Boyer, and D.H. Van Thiel, *Is vaccination against hepatitis B infection indicated in patients waiting for or after orthotopic liver transplantation*. Liver Transplantation and Surgery, 1998. **4**(2): p. 128-132+185-187.
68. Fisman, D.N., D. Agrawal, and K. Leder, *The effect of age on immunologic response to recombinant hepatitis B vaccine: A meta-analysis*. Clinical Infectious Diseases, 2002. **35**(11): p. 1368-1375.
69. Wood, R.C., K.L. MacDonald, K.E. White, C.W. Hedberg, M. Hanson, and M.T. Osterholm, *Risk factors for lack of detectable antibody following hepatitis B vaccination of Minnesota health care workers*. Journal of the American Medical Association, 1993. **270**(24): p. 2935-2939.
70. Hadler, S.C. and H.S. Margolis, *Hepatitis B immunization: vaccine types, efficacy, and indications for immunization*. Current clinical topics in infectious diseases, 1992. **12**: p. 282-308.
71. Rosić, I., S. Malićević, and S. Medić, *The significance of age and sex for the absence of immune response to hepatitis B vaccination*. Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo, 2008. **136**(1-2): p. 33-37.
72. Kruskall, M.S., C.A. Alper, Z. Awdeh, E.J. Yunis, and D. Marcus-Bagley, *The immune response to hepatitis B vaccine in humans: Inheritance patterns in families*. Journal of Experimental Medicine, 1992. **175**(2): p. 495-502.
73. Winter, A.P., E.A.C. Follett, J. McIntyre, J. Stewart, and I.S. Symington, *Influence of smoking on immunological responses to hepatitis B vaccine*. Vaccine, 1994. **12**(9): p. 771-772.
74. Alper, C.A., M.S. Kruskali, D. Marcus-Bagley, D.E. Craven, A.J. Katz, S.J. Brink, J.L. Dienstag, Z. Awdeh, and E.J. Yunis, *Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine*. New England Journal of Medicine, 1989. **321**(11): p. 708-712.
75. *Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for eliminating transmission in the United States through universal childhood vaccination. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP)*. MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control, 1991. **40**(RR-13): p. 1-25.
76. Poland, G.A., *Hepatitis B immunization in health care workers: Dealing with vaccine nonresponse*. American Journal of Preventive Medicine, 1998. **15**(1): p. 73-77.
77. Bauer, T. and W. Jilg, *Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination*. Vaccine, 2006. **24**(5): p. 572-577.
78. Weinbaum, C.M., I. Williams, E.E. Mast, S.A. Wang, L. Finelli, A. Wasley, S.M. Neitzel, and J.W. Ward, *Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection*. MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report.

- Recommendations and reports / Centers for Disease Control, 2008. **57**(RR-8): p. 1-20.
79. Beran, J., L. Hobzova, V. Wertzova, S. Kuriyakose, M. Leyssen, M. Surquin, and S. Houard, *Safety and immunogenicity of an investigational adjuvanted hepatitis B vaccine (HB-AS02V) in healthy adults*. Human Vaccines, 2010. **6**(7): p. 578-584.
  80. Agladioglu, S., U. Beyazova, A.D. Camurdan, F. Sahin, and A. Atak, *Immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine: Comparison of two different vaccination schedules*. Infection, 2010. **38**(4): p. 269-273.
  81. Lu, C.Y., B.L. Chiang, W.K. Chi, M.H. Chang, Y.H. Ni, H.M. Hsu, S.J. Twu, I.J. Su, L.M. Huang, and C.Y. Lee, *Waning immunity to plasma-derived hepatitis B vaccine and the need for boosters 15 years after neonatal vaccination*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1415-1420.
  82. McMahon, B.J., D.L. Bruden, K.M. Petersen, L.R. Bulkow, A.J. Parkinson, O. Nainan, M. Khristova, C. Zanis, H. Peters, and H.S. Margolis, *Antibody levels and protection after hepatitis B vaccination: Results of a 15-year follow-up*. Annals of Internal Medicine, 2005. **142**(5): p. 333-341.
  83. Sundkvist, T., G.R. Hamilton, D. Rimmer, B.G. Evans, and C.G. Teo, *Fatal outcome of transmission of hepatitis B from an e antigen negative surgeon*. Communicable disease and public health / PHLS, 1998. **1**(1): p. 48-50.
  84. Banatvala, J., P. Van Damme, and S. Oehen, *Lifelong protection against hepatitis B: The role of vaccine immunogenicity in immune memory*. Vaccine, 2000. **19**(7-8): p. 877-885.
  85. Mangia, A., F. Antonucci, M. Brunetto, M. Capobianchi, S. Fagioli, M. Guido, P. Farci, P. Lampertico, A. Marzano, G. Niro, G. Pisani, D. Prati, M. Puoti, G. Raimondo, T. Santantonio, A. Smedile, and F. Lauria, *The use of molecular assays in the management of viral hepatitis*. Digestive and Liver Disease, 2008. **40**(6): p. 395-404.
  86. Busch, M.P., S.A. Glynn, S.L. Stramer, D.M. Strong, S. Caglioti, D.J. Wright, B. Pappalardo, and S.H. Kleinman, *A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors*. Transfusion, 2005. **45**(2): p. 254-264.
  87. Chen, C.J., H.I. Yang, J. Su, C.L. Jen, S.L. You, S.N. Lu, G.T. Huang, and U.H. Iloeje, *Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA Level*. Journal of the American Medical Association, 2006. **295**(1): p. 65-73.
  88. De Franchis, R., A. Hadengue, G. Lau, D. Lavanchy, A. Lok, N. McIntyre, A. Mele, G. Paumgartner, A. Pietrangelo, J. Rodés, W. Rosenberg, D. Valla, A. Alberti, G. Dusheiko, S. Hadziyannis, P. Marcellin, M. Rizzetto, D. Samuel, D. Shouval, M. Alter, Y. Benhamou, P. Bonanni, F. Bonino, F. Bortolotti, J. Bruix, M. Brunetto, M. Colombo, G. Cooksley, A. Craxi, V. Desmet, P. Duclos, R. Esteban, P. Farci, G. Fattovich, C. Ferrari, J. Heathcote, J. Hoofnagle, Y.F. Liaw, S. Locarnini, M. Manns, P. Namgyal, N. Naoumov, J.M. Pawlotsky, R. Perrillo, S. Pol, P. Pontisso, G. Raimondo, M. Roggendorf, S. Schalm, H. Thomas, C. Trépo, P. Van Damme, H. Will, T. Wright, S. Zeuzem, F. Zoulim, C. Day, M. Levrero, F. Nevens, and C. Yurdaydin, *EASL international consensus conference on hepatitis B 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland Consensus statement (Long version)*. Journal of Hepatology, 2003. **39**(SUPPL. 1): p. S3-S25.
  89. Keeffe, E.B., D.T. Dieterich, S.B. Han, I.M. Jacobson, P. Martin, E.R. Schiff, H. Tobias, and T.L. Wright, *A Treatment Algorithm for the Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection in the United States: An Update*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2006. **4**(8): p. 936-962.

90. Rumsby, P., *PCR protocols - A guide to methods and applications: Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Academic Press Inc., CA, USA, 1990. pp. xviii + 482. \$39.95. ISBN 0-12-372181-40.* Food and Chemical Toxicology, 1991. **29**(11): p. 788-789.
91. Maruyama, T., A. McLachlan, S. Iino, K. Koike, K. Kurokawa, and D.R. Milich, *The serology of chronic hepatitis B infection revisited.* Journal of Clinical Investigation, 1993. **91**(6): p. 2586-2595.
92. Butterworth, L.A., S.L. Prior, B. Phillip J, J.L. Faoagali, W.G.E. Cooksley, and E. Cooksley, *Comparison of four methods for quantitative measurement of hepatitis B viral DNA.* Journal of Hepatology, 1996. **24**(6): p. 686-691.
93. Kao, J.H., M. Wood, P.J. Chen, M.Y. Lai, and D.S. Chen, *Comparison of two methods for quantification of hepatitis B viral DNA.* Journal of Gastroenterology and Hepatology, 1999. **14**(5): p. 423-426.
94. *Recommendations for preventing transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to patients during exposure-prone invasive procedures. Centers for Disease Control.* Bulletin of the American College of Surgeons, 1991. **76**(9): p. 29-37.
95. Heptonstall, J., *Transmission of hepatitis B to patients from four infected surgeons without hepatitis B e antigen.* New England Journal of Medicine, 1997. **336**(3): p. 178-184.
96. (WHO), W.H.O. *Global Database of Body Mass Index.* 2012; Available from: [http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html).
97. Alimonos, K., A.N. Nafziger, J. Murray, and J.S. Bertino Jr, *Prediction of response to hepatitis B vaccine in health care workers: Whose titers of antibody to hepatitis B surface antigen should be determined after a three-dose series, and what are the implications in terms of cost- effectiveness?* Clinical Infectious Diseases, 1998. **26**(3): p. 566-571.
98. Job classification, O.I., CPL 2-2.44C. Washington, DC: Oc8. Horowitz MM, Ershler WB, McKinney WP, Battiola RJ. Duration of cupational Health and Safety Administration, March 1, 1991.
99. Pati, N.T., Sukriti, Hissar, S., Agrawal, K., Rani, R., Sarin, S. K., *Decrease in CD4+ T lymphocyte proliferation responses and enhanced CD150 cell expression in health care workers non-responsive to HBV vaccine.* Vaccine 2007. **25**:1848-1855.
100. Yen, Y.-H., C.-H. Chen, J.-H. Wang, C.-M. Lee, C.-S. Changchien, and S.-N. Lu, *Study of hepatitis B (HB) vaccine non-responsiveness among health care workers from an endemic area (Taiwan).* Liver International, 2005. **25**(6): p. 1162-1168.
101. Clements, M.L., E. Miskovsky, M. Davidson, T. Cupps, N. Kumwenda, L.A. Sandman, D. West, T. Hesley, V. Ioll, W. Miller, G. Calandra, and S. Krugman, *Effect Of Age On The Immunogenicity Of Yeast Recombinant Hepatitis B Vaccines Containing Surface Antigen (S) Or Pres2+S Antigens.* Journal of Infectious Diseases, 1994. **170**(3): p. 510-516.
102. Karlsson, E.A. and M.A. Beck, *The burden of obesity on infectious disease.* Experimental Biology and Medicine, 2010. **235**(12): p. 1412-1424.
103. Ciorlia, L.A.S. and D.M.T. Zanetta, *Hepatitis B in healthcare workers: Prevalence, vaccination and relation to occupational factors.* Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2005. **9**(5): p. 384-389.
104. Bartlett, B.L., A.J. Pellicane, and S.K. Tying, *Vaccine immunology.* Dermatologic Therapy, 2009. **22**(2): p. 104-109.
105. Sopori, M., *Effects of cigarette smoke on the immune system.* Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(5): p. 372-377.

106. Platkov, E., E. Shlyakhov, Y. Glick, S. Khalemsky, and A. Fischbein, *Immunologic evaluation of hepatitis B vaccine application in hospital staff*. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, 2003. **16**(3): p. 249-253.
107. Gleichmann, E., Kimber, I., Purchase, F. H., *Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system*. Arch Toxicol, 1989. **63**:257-273.
108. Rahier, J., Moutschen, M., Van Gompel, A., Ranst, M. V., Louis, E., Segaert, S., Masson, P., Keyser, F., *Vaccinations in patients with immune-mediated inflammatory diseases*. Rheumatology, 2010. **49**:1815–1827.
109. Goncalves, L., B. Albarran, S. Salmen, L. Borges, H. Fields, H. Montes, A. Soyano, Y. Diaz, and L. Berrueta, *The nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation*. Virology, 2004. **326**(1): p. 20-28.
110. Hennig BJ, F.K., Broxholme J, Diatta M, Mendy M., *Host Genetic Factors and Vaccine-Induced Immunity to Hepatitis B Virus Infection*. . PLoS ONE 3(3), 2008.

## IX. Anexos

Anexo 1: Parâmetros e fatores analisados para a amostra de profissionais de saúde em estudo.

Individuo	Sexo	Data de Nascimento	Ano da primeira vacina	Ano do reforço	Altura (m)	Peso (Kg)	Serviço	Horário de trabalho	Hábitos de fumador (cigarros/dia)	Hábitos Alcoólicos (bebidas/semana)	Medicação Regular	Historial médico	Nível Anti-HBs (mIU/mL)
1	M	16-02-1948	2007	-	1,7	77,6	Obstetrícia	Turnos	0	3 a 6	-	-	<3,10
2	F	21-08-1956	2005	-	1,62	75,5	Arquivo	Fixo	5 a 8	0	Bloqueadores beta, Anti-agregantes plaquetários, Anti-hipertensivos, Diuréticos, Ansiolíticos, Anti-depressivos	Hipertensão Depressão	18,98
3	M	23-10-1960	2008	-	1,75	75,4	Oficinas	Turnos	0	0	-	-	78,83
4	F	23-01-1972	2008	-	1,5	45,7	Cirurgia geral	Turnos	0	0	-	-	<3,10
5	M	16-05-1974	2009	2011	1,67	54,0	Pneumologia	Turnos	0	4 a 5	Anti-inflamatórios não esteroides	Patologia degenerativa osteoarticular, Síndrome de Gilbert	314,39
6	F	15-04-1976	2008	2009	1,63	66,8	Psiquiatria	Turnos	0	0	-	-	5,09
7	M	31-05-1985	1996	2009	1,71	73,5	Medicina	Turnos	0	0	-	Alergias respiratórias	<3,10
8	F	25-06-1952	2005	2009	1,54	68,0	Radiologia	Fixo	0	0	-	-	13,82
9	F	12-01-1956	2007	2010	1,52	103,1	Hotelaria	Fixo	0	Ex-alcoólica	Anti-colesterolémicos	Hipercolesterolémia, Diabetes tipo II	<3,10
10	F	10-06-1986	1995	2010	1,66	74,5	Arquivo	Turnos	1 a 2	0	Anti-concepcional	-	157,37
11	F	05-12-1962	2010	2012	1,56	81,7	Medicina	Turnos	0	0	-	-	>1000
12	F	21-10-1983	1996	2011	1,72	79,7	Psiquiatria	Turnos	0	0	Anti-concepcional	-	154,08
13	F	22-11-1976	2008	2011	1,61	61,5	Pedriatria	Turnos	0	1 a 2	-	-	>1000
14	M	17-06-1981	1998	-	1,74	72,5	Urgências	Turnos	0	0	-	-	>1000

Estudo da resposta imunológica à vacinação da hepatite B.

15	M	24-08-1960	2008	-	1,65	78,9	Oficinas	Fixo	0	0	-	-	141,11
16	M	18-02-1969	2008	-	1,72	106	Motorista	Fixo	17 a 21	3 a 4	-	-	<3,10
17	F	09-12-1973	2007	-	1,65	62,5	Pediatria	Fixo	3 a 5	0	Antiasmático, anti-concepcional	Asma	898,82
18	F	06-12-1975	2006	-	1,58	59,1	Urgências	Turnos	0	0	Anti-concepcional	-	<3,10
19	F	03-04-1965	2005	-	1,62	64	Radiologia	Fixo	0	0	Anti-hipertensivos	Hipertensão, Alergias desconhecidas	>1000
20	M	17-02-1957	2006	-	1,72	88	Medicina do trabalho	Fixo	0	0	Anti-hipertensivos	Hipertensão	6,23

Anexo 2 : Percentagem dos parâmetros linfócitos e leucocitários no sangue periférico de uma amostra dos profissionais de saúde em estudo.

Parâmetros (%)		Indivíduos								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Linfócitos</b>		33,9	34,87	27,54	14,63	31,02	17,79	27,28	20,63	36,17
<b>CD3</b>	<b>Dentro linfócito</b>	71,41	74,16	54,84	69,12	63,71	61,49	59,47	76,11	75,5
	<b>Total celularidade</b>	24,21	25,86	15,11	10,12	19,76	10,94	16,24	17,5	27,31
<b>CD4</b>		44,97	49,27	64,59	54,88	63,22	42,62	48,21	58,87	39,28
<b>CD8</b>		45,65	46,44	32,64	29,22	24,57	49,96	45,9	36,93	45,14
<b>CD4+/CD8+</b>		1,24	1,53	0,23	0,55	5,18	3,97	1,41	0,76	1,99
<b>CD4-/CD8-</b>		1,6	0,94	1,25	2,31	1,34	0,9	2,03	1,24	0,99
<b>Gama-delta</b>		1,95	1,81	1,29	10,97	2,69	2,55	2,46	2,2	12,59
<b>Neutrófilos</b>		56,92	51,23	61,47	76,48	54,06	75,24	61,87	70,31	56,76
<b>Monócitos</b>		4,7	11,67	6,6	5,12	6,63	5,29	4,58	5,95	6,37
<b>Eosinófilos</b>		4,48	2,23	4,38	1,27	1,83	1,67	2,63	3	0,7

Anexo 3: Contagem dos parâmetros linfocitários e leucocitários no sangue periférico de uma amostra dos profissionais de saúde em estudo.

Parâmetros (células/ $\mu$ L)		Indivíduos								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Linfócitos</b>		2847,6	2615,25	1817,64	1594,67	2388,54	2383,86	1718,64	2537,49	3255,3
<b>CD3</b>	<b>Dentro linfócito</b>	5998,44	5562	3619,44	7534,08	4905,67	8239,66	3746,61	9361,53	6795
	<b>Total celularidade</b>	2033,64	1939,5	997,26	1103,08	1521,52	1465,96	1023,12	2152,5	2457,9
<b>CD4</b>		3777,48	3695,25	4262,94	5981,92	4867,94	5711,08	3037,23	7241,01	3535,2
<b>CD8</b>		3834,6	3483	2154,24	3184,98	1891,89	6694,64	2891,7	4542,39	4062,6
<b>CD4+/CD8+</b>		104,16	114,75	15,18	59,95	398,86	531,98	88,83	93,48	179,1
<b>CD4-/CD8-</b>		134,4	70,5	82,5	251,79	103,18	120,6	127,89	152,52	89,1
<b>Gama-delta</b>		163,8	135,75	85,14	1195,73	207,13	341,7	154,98	270,6	1133,1
<b>Neutrófilos</b>		4781,28	3842,25	4057,02	8336,32	4162,62	10082,16	3897,81	8648,13	5108,4
<b>Monócitos</b>		394,8	875,25	435,6	558,08	510,51	708,86	288,54	731,85	573,3
<b>Eosinófilos</b>		376,32	167,25	289,08	138,43	140,91	223,78	165,69	369	63

