

Ana Paula de Torres Santos

**Padronização da PCR em Tempo Real para o Diagnóstico da
Hepatite B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof(a). Dr(a). Regina Célia Moreira

**São Paulo
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Santos, Ana Paula de Torres

Padronização da PCR em tempo real para o diagnóstico da hepatite B /
Ana Paula de Torres Santos - São Paulo, 2013.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde
de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Regina Célia Moreira

1. Hepatite B
2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real
3. Genotipo
4. Carga viral/métodos

SES/CCD/CD-276/13

Aos meus pais, Amaro e Vera, obrigada pelo amor, carinho, compreensão, paciência, cobranças, mas acima de tudo pelo estímulo sempre constante.

Aos meus irmãos Eduardo e Thais, obrigada por estarem sempre presentes.

A Manuela minha sobrinha, um pedacinho de gente que faz a vida da minha família cada dia mais feliz.

E ao meu cunhado Cássio e a minha cunhada Natalya obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença em todos os momentos de minha vida e por ter me permitido chegar até aqui.

A Prof^a Dr^a Regina Célia Moreira, minha orientadora, obrigada pela confiança e dedicação em transmitir seus conhecimentos, contribuindo muito para minha formação profissional.

Ao Prof^o. Dr^o. José Eduardo Levi, obrigada por todos os conhecimentos compartilhados nesses anos e pelo auxílio na execução do trabalho.

A Dr^a. Vera Aparecida dos Santos e ao Dr^o Cristovão Pitangueira Manguiera, por ter permitido que ficasse ausente em alguns momentos do laboratório para que esse trabalho fosse realizado.

Aos meus amigos Marcilio Figueiredo Lemos e Angela Maria Ferrari obrigada por sua dedicação, amizade e valioso auxílio dispensados não só na execução deste trabalho, mas ao longo desses anos de convivência.

À Angela Maria Spina, Isabel Takano Oba, Samira Julien Calux, companheiras do Laboratório de Hepatites do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.

À Cristina Oliveira Mendes pelos ensinamentos transmitidos durante a execução dos testes.

A Audrey Cilli Chirelli, Adriana Luchs e Simone Guadagnucci Morillo, pela amizade, apoio e pelas conversas descontraídas.

Aos meus parentes e amigos por todo o carinho e amizade recebida.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo-PPG-CCD-SES/SP. A todos os professores do mestrado, pela boa instrução fornecida, contribuindo para a obtenção desse título.

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências- CCD/SES por todos os serviços e orientação prestados no decorrer deste trabalho.

Aos amigos pós-graduandos do Programa de Pós Graduação em Ciências – CCD/SES.

Aos todos os funcionários do Instituto Adolfo Lutz, em especial do Centro de Virologia, que trabalham no dia-a-dia de forma silenciosa, realizando um trabalho tão importante de apoio aos pós-graduandos.

A todos do Laboratório de Imunologia da Divisão do Laboratório Central da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, obrigada pelo apoio e compreensão.

A FAPESP pelo apoio financeiro fornecido para a execução do trabalho.

E a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e que tenho certeza, sem a colaboração de cada uma delas não teria chegado ao fim.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: Microlitro

aa: Aminoácido

AgHBc: Antígeno do core do vírus da hepatite B

AgHBe: Antígeno e do vírus da hepatite B

AgHBs: Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

Anti-HBc: Anticorpo contra o antígeno do core do vírus da hepatite B

Anti-HBe: Anticorpo contra o antígeno e do vírus da hepatite B

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

bDNA: DNA ramificado

cccDNA (circular covalent closed desorribonucleic acid): ácido desorribonucleico covalente circular fechado.

Ct (cycle threshold): Ciclo limiar

ddNTPs: Trifosfatos de didesoxinucleotídeos

DNA (deoxyribonucleic acid): Ácido desoxirribonucléico

DNA polimerase: Polimerase do ácido desoxirribonucléico

dNTPs: Trifosfatos de desoxinucleotídeos

EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid): Ácido etileno diamino tetracético

Fita L: Fita longa do vírus da hepatite B

Fita S: Fita curta do vírus da hepatite B

HBV (Hepatitis B Virus): Vírus da hepatite B

HCC: Hepatocelularcarcinoma

HCV (Hepatitis C vírus): Vírus da hepatite C

HIV (Human Immunodeficiency Virus): Vírus da imunodeficiência humana

IC: Intervalo de Confiança

IgG: Imunoglobulina da Classe G

IgM: Imunoglobulina da Classe M

MgCL₂: Cloreto de Magnésio

MS: Ministério da Saúde

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORF (Open Reading Frame): Fase de leitura aberta

PCR (Polymerase Chain Reaction): Reação em cadeia da polimerase

Região P: Região de codificação da polimerase do DNA

Região pré-S1: Sequência entre o primeiro e o segundo códon de iniciação da região S

Região pré-S2: Sequência entre o segundo e o terceiro códon de iniciação da região S

Região S: Região de codificação das proteínas do envelope

Região X: Região de codificação do antígeno X

RNA (Ribonucleic Acid): Ácido ribonucléico

ROC (Receiver Operating Characteristics): Características Operacionais do Receptor

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris-borato-EDTA

UI: Unidades Internacionais

UI/L: Unidades Internacionais por Litro

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1: Esquema representativo do vírus da Hepatite B e suas quatro regiões codificadoras: C, S, P, X.....	19
Figura 2: Esquema representativo do ciclo de replicação viral do HBV.....	21
Figura 3: Distribuição Geográfica da infecção crônica do HBV.....	27
Figura 4: Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na Hepatite B aguda.....	40
Figura 5: Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite B crônica.....	40
Figura 6: Fluxograma de investigação laboratorial da hepatite B.....	41
Figura 7: Representação esquemática da Reação de PCR em Tempo-Real.....	43
Figura 8: Conjunto de “primers” e sondas utilizadas para os testes de padronização da PCR em Tempo Real.....	58
Figura 9: Distribuição dos genótipos do HBV identificados nas amostras utilizadas em nosso estudo.....	63
Figura 10: Amplificação da curva padrão.....	66
Figura 11: Representação da variabilidade entre réplicas.....	68
Figura 12: Avaliação da validade do teste PCR em tempo real tendo como teste ouro o COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®.....	69
Figura 13: Análise da validade do teste PCR em tempo real tendo como teste ouro o COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®.....	70
Figura 14: Análise da validade do teste PCR em tempo real tendo como teste ouro o COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan®.....	70
Figura 15: Avaliação da validade do teste PCR em tempo real tendo como teste ouro o COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan®.....	71
Figura 16: Curva ROC da avaliação do PCR quando relacionado aos kits COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan®.....	72

Tabela 1: Detecção das amostras de acordo com o conjunto de “primer” e sondas.....	64
Tabela 2: Resultados da Construção da curva padrão.....	65
Tabela 3: Resultados do teste de Reprodutibilidade após a análise de 26 amostras de soro ou plasma, realizado em triplicatas e em dias diferentes.....	67
Tabela 4: Valores médios e desvio padrão das medidas do teste real time PCR para HBV após os resultados dos testes de reprodutibilidade.....	68
Tabela 5: Acurácia do teste PCR em relação aos kits COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan®.....	71
Tabela 6: Validação do teste PCR em relação aos kits COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan®.....	71
Quadro 1: Distribuição geográfica e relevância clínica importante de genótipos do HBV e subgenótipo.....	24
Quadro 2: Programa para amplificação da região S + Polimerase do HBV.	54

INDICE

1. Introdução.....	17
1.1. O vírus da hepatite B (HBV).....	19
1.2. Replicação Viral.....	21
1.3. Subtipos e Genótipos do HBV.....	22
1.4. Epidemiologia do HBV.....	25
1.5. Transmissão do HBV.....	30
1.6. História Natural.....	32
1.7. Tratamento.....	35
1.8. Prevenção.....	37
1.9. Diagnóstico Laboratorial do Hepatite B.....	39
1.9.1. Ensaio sorológico.....	39
1.9.2. Ensaio moléculares.....	41
2. Objetivos.....	45
3. Material e Métodos.....	47
3.1. População e Amostras Utilizadas no Estudo.....	48
3.2. Aspectos éticos.....	48
3.3. Coleta e Preparo das amostras.....	49
3.4. COBAS AMPLICOR HBV MONITOR.....	49
3.5. COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®.....	50
3.6. Composição da Amostragem.....	51
3.7. Padronização da Técnica de PCR em Tempo Real.....	52
3.7.1. Extração do DNA viral.....	52
3.7.2. Genotipagem.....	53
3.7.2.1. PCR.....	53
3.7.2.2. “Primers”.....	53
3.7.2.3. Preparação de Desoxinucleotídeos.....	54
3.7.2.4. “Nested” PCR.....	54
3.7.2.4.1. Primeira PCR.....	54
3.7.2.4.2. Segunda PCR.....	54
3.7.2.4.3. Identificação do produto Amplificado.....	55
3.7.3. Sequenciamento.....	55

3.7.3.1. Reação de Sequenciamento por “Cycle Sequencing”	55
3.7.3.2. Precipitação das amostras após “Cyile Sequencing”, Desnaturação e Aplicação no gel das amostras amplificadas.....	56
3.7.3.3. Análises das sequências.....	56
3.7.4. PCR em Tempo Real.....	57
3.7.4.1. “Primers” e Sondas.....	57
3.7.4.2. Curva Padrão.....	59
3.7.4.3. Reação em cadeia Polimerase em tempo Real – Taqman PCR.....	59
3.7.4.4. Interpretação e Quantificação das Amostras.....	60
3.8. Análise Estatística.....	60
3.8.1. Reprodutibilidade do teste.....	60
3.8.2. Validade do Método.....	61
3.9. Sensibilidade do teste.....	61
3.10. Especificidade do teste.....	61
4. Resultados.....	62
4.1. Caracterização das Amostras.....	63
4.2. Genótipo das Amostras utilizadas.....	63
4.3. Escolha dos “Primers” e Sondas.....	64
4.4. Curva Padrão.....	65
4.5. Análise dos Resultados das amostras processadas pelos kits comerciais e pelo Real Time – Indicadores de Desempenho do Teste Padronizado.....	66
4.5.1. Teste de Reprodutibilidade.....	66
4.5.2. Validade do Teste.....	69
4.5.3. Teste de Especificidade.....	73
5. Discussão.....	74
6. Conclusão.....	81
Referências Bibliograficas.....	83
Anexos.....	96

RESUMO

A hepatite B é uma doença de interesse em saúde pública, acometendo cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo, das quais aproximadamente 350 milhões tornam-se portadoras crônicas. Os ensaios quantitativos de detecção do DNA viral são empregados para avaliar a infectividade do vírus e para o monitoramento do tratamento, sendo importante para avaliar a progressão da doença. O objetivo deste estudo foi padronizar a técnica de amplificação quantitativa em tempo real (PCR em tempo real) do DNA do vírus da Hepatite B e comparar a técnica com métodos comerciais (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan® e COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®). A amostragem foi constituída por 397 amostras de soro ou plasma recebidas e estocadas no laboratório de hepatites virais do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, no período de 2009 a 2011. Do total de amostras, 345 foram utilizadas para a comparação com os testes comerciais disponíveis e 52 amostras foram utilizadas para o teste de especificidade, sendo 27 amostras HIV positivas e 25 amostras HCV positivas, todas com AgHBS e Anti-HBc total não reagentes. Estas amostras foram inicialmente analisadas por testes comerciais e posteriormente pela técnica padronizada. Para o controle da quantificação, uma curva padrão foi construída em todas as reações, utilizando-se padrões internacionais produzidos pela Organização Mundial de Saúde, em diluições seriadas. Para a extração do DNA das amostras e padrão, foi utilizado kit comercial (QIAGEN®), seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante. Os testes foram realizados empregando o método do TaqMan – PCR, em um equipamento ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os “primers” e sondas utilizadas para a padronização foram selecionados a partir da literatura e os que apresentaram melhores resultados nos testes iniciais foram escolhidos para o estudo. A técnica de sequenciamento foi realizada nas amostras com carga viral quantificável. A técnica de PCR em tempo real padronizada apresentou resultados satisfatórios. Quando comparada com COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®, a técnica apresentou IC de 0,977 e Kappa de 100% e quando comparada com COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®, apresentou IC de 0,960 com Kappa de 97,6%. O teste mostrou 100% de especificidade quando comparado com amostras HIV e HCV positivas. Foi possível caracterizar o genótipo em 217 amostras das 236 com

carga viral detectável. Os genótipos identificados foram A, D, C, F e G. Através da técnica padronizada foi possível identificar amostras com valores baixos de carga viral e genótipos variados além de apresentar ótima sensibilidade e especificidade quando comparada com métodos comerciais, podendo ser utilizada na rotina diagnóstica do laboratório.

ABSTRACT

Hepatitis B is a disease of public health concern. Worldwide, it affects approximately 2 billion people, of whom approximately 350 million become chronic carriers. Quantitative assays for the detection of viral DNA are used to evaluate the infectivity of the virus and to monitor treatment, which is crucial to evaluate the progression of the disease. The aim of this study was to standardize real-time (real-time PCR) quantitative amplification of the DNA of hepatitis B and to compare this technique with commercial methods (COBAS AmpliPrep / COBAS® TaqMan and COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan®). The sample consisted of 397 serum or plasma samples received and stored at the laboratory of viral hepatitis from the Center of Virology, Instituto Adolfo Lutz, from 2009 to 2011. Of the total samples, 345 were used for comparison with the available commercial tests and 52 samples were used for the specificity test. Of these, 27 were HIV positive and 25, HCV positive, and all were HBsAg and anti-HBc nonreactive. These samples were initially analyzed by commercial tests and later by the standardized technique. To control the quantification, a standard curve was constructed in all reactions using international standards established by the World Health Organization, in serial dilutions. For the extraction of DNA samples and standard, a commercial kit used was (QIAGEN®) according to the manufacturer's instructions. The tests were performed using the TaqMan method - ABI 7300 PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers and probes used for standardization were selected from the literature and those presenting better results in initial tests were chosen for the study. Sequencing technique was performed on samples with measurable viral load. The standardized real-time PCR technique yielded satisfactory results. When compared with COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®, the technique presented CI 0.977 and Kappa index of 100%, and when compared with COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan® presented CI 0.960 and Kappa of 97.6%. The test showed 100% specificity when compared with HIV and HCV positive samples. We could characterize the genotype in 217 of 236 samples with detectable viral load. The identified genotypes were A, D, C, F and G. The standardized technique allowed the identification of samples with low viral load

and different genotypes in addition to presenting excellent sensitivity and specificity when compared with commercial methods; therefore it can be used in the routine diagnostic laboratory.

Introdução

1. Introdução

A hepatite é uma doença conhecida desde a antiguidade. Informações contidas na literatura chinesa já faziam referência à ocorrência de icterícia entre sua população há mais de cinco mil anos. Surtos de icterícia foram relatados na Babilônia há mais de 2.500 anos (Reuben, 2002; Freitas, 2009; Fonseca, 2010).

Escritos de Hipocrates, que viveu provavelmente 300 a 400 anos antes de Cristo, revelam historicamente que a icterícia seria provavelmente de origem infecciosa e o problema poderia estar no fígado; e o acúmulo de líquido no abdome (ascite) poderia ser causado por alguma doença crônica nesse órgão. (Reuben, 2002; Freitas, 2009; Fonseca, 2010).

No ano de 752, carta do Papa Zacharias a São Bonifácio, Arcebispo de Mainz (Alemanha), relata a ocorrência de um surto de icterícia contagiosa entre residentes da cidade. Informa ainda que estava recomendando quarentena aos moradores ictericos, como forma de evitar a doença. (Reuben, 2002; Freitas, 2009; Fonseca, 2010).

São conhecidas as epidemias de icterícia durante a guerra da Sucessão Austríaca (1743), de Napoleão no Egito (1798), Franco-Prussiana (1870) e Secessão Americana (1861-1865). Durante a guerra da Secessão Americana, mais de 40.000 soldados dos exércitos da União foram atingidos. (Reuben, 2002; Freitas, 2009; Fonseca, 2010).

A primeira descrição de hepatite transmitida por inoculação direta de sangue ou por produtos sanguíneos foi em 1885, durante uma campanha de imunização contra o vírus da varíola em trabalhadores de estaleiros em Bremen, Alemanha (Lurman, 1885; Ranger-Rogez, 2004).

Em 1947, MacCallum e Bauer introduziram os termos "hepatite A" para "hepatite infecciosa", transmitida pela rota via fecal-oral, com período de incubação de 2 a 6 semanas infectando, principalmente, crianças, e "hepatite B" para "hepatite do soro". Constatando-se que a epidemiologia destas doenças era diferente. Em 1965, com a descoberta no soro do antígeno Austrália por Blumberg *et.al.*, o vírus da hepatite B foi identificado e caracterizado. Sua relação com a hepatite B foi feita um ano depois por Okochi

& Murakami (1968) e por Prince (1968), recebendo posteriormente o nome de antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs). Entretanto, a visualização da partícula viral íntegra do HBV foi realizada somente em 1970 por Dane *et.al.* O antígeno presente na superfície da partícula viral foi associado com as infecções aguda e crônica (Cosser *et.al.*, 2008).

1.1. O vírus da Hepatite B (HBV)

O vírus da hepatite B (HBV) é um vírus envelopado pertencente à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*. A partícula viral apresenta 42 nm de diâmetro e é constituído de uma fita de DNA circular parcialmente dupla de aproximadamente 3.200 pares de bases, com uma fita longa ou L (-) e uma fita curta ou S (+). A totalidade do genoma do HBV é codificante, apresentando quatro fases de leitura aberta (ORF) designadas de pré-S/S, pré-C/C, P e X (Valla, 2003; Aliyu *et.al.*,2004; Khouro *et.al.*,2004).

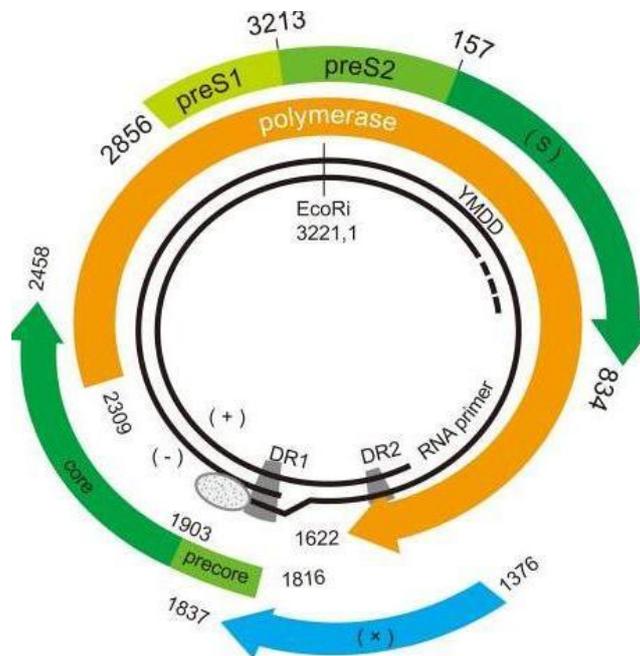


Figura 1: Esquema representativo do vírus da Hepatite B e suas quatro regiões codificadoras: C, S, P, X

Todos os genes são codificados pela fita longa e possuem pelo menos uma região de sobreposição a outro gene. O gene pré S/S codifica as proteínas que formam o AgHBs, e o pré C/C é responsável pela síntese do AgHBc e do antígeno e (AgHBe). O gene P codifica a polimerase viral e a região X é responsável pela síntese de uma proteína regulatória chamada proteína X (Gomes, 2007).

O gene pré-S/S codifica as proteínas que formam o antígeno de superfície do vírus (AgHBs). Ele inclui as regiões pré-S1, pré-S2 e S, com três códon de iniciação na mesma fase de leitura. A maior proteína que compõe o AgHBs, “large” (L), cujo códon de iniciação é localizado no início da região pré-S1, é codificada pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S. A proteína de tamanho intermediário designada de “medium” (M), é codificada pelas regiões pré-S2 e S. A menor proteína, “small” (S) é sintetizada a partir do códon de iniciação localizado no início da região S (Gomes, 2007).

A região pré-C/C possui dois códon de iniciação na mesma fase de leitura aberta (Gomes, 2007). O gene é traduzido em uma poliproteína Pré-core a qual é modificada em uma proteína solúvel, o antígeno “e” da hepatite B (AgHBe) e na proteína do nucleocapsídeo, o antígeno do core da hepatite B (AgHBc) (Lok *et.al.*, 2003).

O gene P cobre aproximadamente 75% do genoma e codifica uma enzima com atividade de DNA polimerase, transcriptase reversa e RNaseH. A polimerase viral é composta por quatro domínios: o domínio aminoterminal, que atua como proteína terminal ou primase, sendo necessário para o início da síntese da fita curta; uma região denominada de “espaçadora” sem função definida; o domínio de transcriptase reversa e o domínio C-terminal que exibe atividade de RNase H (Gomes, 2007). Existe homologia entre a polimerase viral e outras transcriptases reversas, em particular estas enzimas compartilham o motivo Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD) essencial para a atividade de transcrição reversa (Gomes, 2007).

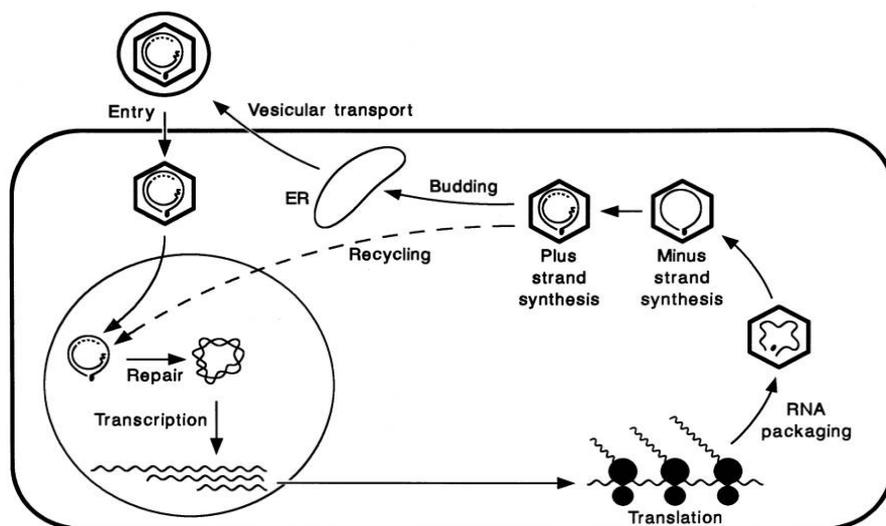
O gene X especifica um polipeptídeo em torno de 154 aminoácidos que pode ser detectado apenas nos hepatócitos infectados. Sua sequência é conservada entre os hepadnavírus que infectam os mamíferos, entretanto, este evento não acontece nos vírus que infectam as aves. Dessa forma, acredita-se

que o gene X não seja necessário para a encapsidação e replicação viral (Gomes, 2007).

1.2. Replicação Viral

O ciclo de replicação do HBV inicia-se com a adesão do vírus à membrana do hepatócito. No núcleo do hepatócito, a síntese da molécula de DNA do HBV é finalizada e o genoma viral é convertido em uma molécula de DNA circular, covalente e fechado (cccDNA). O genoma do HBV se replica por meio da transcrição reversa, via RNA intermediário. A molécula de cccDNA produz novas cópias do vírus, inicialmente através de um RNA pré-genômico, que funciona tanto como modelo para a transcrição reversa quanto para o RNA mensageiro para a síntese posterior das proteínas do nucleocapsídeo e da polimerase (Liang, 2000; Casey, 2000; Lok *et.al.*, 2000).

O RNA pré-genômico e as proteínas do nucleocapsídeo e da polimerase são encapsuladas na porção central do vírus, dentro do qual a transcrição reversa ocorrerá. Seguindo-se a transcrição, novas fitas negativa e positiva de HBV-DNA serão produzidas. Após a ligação às proteínas do envelope viral, novas partículas virais completas serão produzidas e liberadas (Figura 2) (Mello *et.al.*, 2001; Lin *et.al.*, 2004).



Fonte: Ganem, 2001

Figura 2: Esquema representativo do ciclo de replicação viral do HBV

1.3. Subtipos e Genótipos do HBV

A sequência completa do DNA genômico das cepas dos vários tipos de HBV são determinadas permitindo a análise dos genótipos. São conhecidos, dez diferentes genótipos do HBV (A a J), eles foram identificados e definidos por sequências divergentes. Em geral, o grau de divergência na sequência nucleotídica do HBV entre os dois genomas do mesmo subtipo é muito menor do que entre os dois genomas de HBV (Jia-Horng , 2011). Além dos genótipos, existem quatro principais subtipos sorológicos do HBV (adw, ayw, adr e ayr) e nove subtipos secundários: adw (adw2, adw4); ayw (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4); adr (adrq +, adrq -) e ayr (Becker *et.al.*, 2010).

Os genótipos do HBV têm uma distribuição geográfica distinta que prevalecem em diferentes partes do mundo. Genótipo A é encontrado principalmente na América do Norte e África. Genótipos B e C são predominantes no Sudeste Asiático e do Extremo Oriente, e este último tem sido associado com um risco aumentado de carcinoma hepatocelular. Genótipo D foi encontrado em todo o mundo com maior prevalência na região do Mediterrâneo, Oriente Médio e Sul da Ásia, particularmente na Índia. Genótipos E e F são predominantes na África Ocidental e na população indígena, respectivamente. Além disso, o genótipo G foi relatado nos EUA, França, Colômbia e Brasil e o genótipo H foi encontrado na América do Norte e Central (Alvarado-Mora *et.al.*, 2011). Recentemente, por meio de análises filogenéticas, um novo genótipo foi caracterizado no Vietnã e no Laos e designado como genótipo I (Yu, 2010); e o genótipo J foi identificado no Japão (Tatematsu *et.al.*, 2009).

Os genótipos foram ainda separados em subgenótipos se a divergência na sequência de nucleótidos inteira está entre 4% e 8%. Atualmente foram identificados, subgenótipos 1-5 do genótipo A, do B 1-8 subgenótipos, C 1-8 subgenótipos e D 1-7 subgenótipos. Genótipos do HBV e subgenótipos têm distintas distribuições geográficas, e muitas vezes apresentam características demográficas. HBV genótipo A1, A3, A4 e A5 são endêmicas na África, especialmente na África Ocidental, enquanto A2 genótipo é endêmica na Europa. Genótipos B e C são predominantes na Ásia e ilhas do Pacífico. Os

genótipos de HBV B e C, subgenótipos B2 e C2 são endêmicos em muitas partes da Ásia. B1 subgenótipo é endêmico no Japão. Subgenótipo C4 é encontrado em aborígenes da Austrália. Subgenótipos B3-B8, C1, C3 e C5-C8 foram isoladas no sul da Ásia, especialmente na Indonésia e nas Filipinas. Genótipo D é endêmico em todo o Mundo Antigo, incluindo África, do Norte e do Sudeste da Ásia, a região do Mediterrâneo, e na maioria dos países europeus. D1 subgenótipo é predominante na etnia muçulmana. D2 subgenótipo é endêmico na Rússia e na região do Báltico. Subgenótipos D2, D3, D5 e foram encontrados na Índia. Subgenótipos D4 e D6 são endêmicos na Oceania e Indonésia, respectivamente. Um novo subgenótipo D7 foi encontrado na Tunísia. HBV genótipo E é endêmico na África Ocidental e Central. Genótipos F, G e H são endêmicos na América. A variação de subgenótipos foram encontrados no sul da Ásia, Oceania e África do que em outras áreas do mundo, provavelmente indicando história evolutiva de HBV. A distribuição dos genótipos do HBV muitas vezes fornece pistas sobre a migração humana. HBV genótipo E é endêmica na África. E como genótipo é essencialmente ausente das Américas, apesar do comércio de escravos afro-americano, pelo menos até o começo do século 19, as cepas genótipo E pode ter sido introduzido na população geral Africana somente nos últimos 200 anos. A diversidade genética de HBV e da distribuição geográfica dos seus subgenótipos fornece uma ferramenta para reconstruir a história evolutiva de HBV e podem ajudar a complementar os dados genéticos no entendimento da evolução e migrações anteriores do homem (Guang-Wen , 2009)

Co-infecção com vários genótipos do HBV parece ser raro, abaixo de 5%. (Alcade *et.al.*, 2009).

Quadro1: Distribuição geográfica e relevância clínica importante de genótipos do HBV e subgenótipo

Genótipo	Subgenótipo	Distribuição Geográfica	Importância Clínica Relevante
A	A1	África	ND
	A2	Europa	Infecção Aguda, cronificação, mais sensíveis ao tratamento com interferon
	A3	África Ocidental	ND
	A4	África Ocidental	ND
	A5	África Ocidental	ND
B	B1	Japão	Hepatite Fulminante
	B2	Toda Ásia, exeto Korea	Hepatite aguda, HCC em sua maioria menores de 50 anos
	B3	Indonésia	ND
	B4	Indonésia, Vietnã	ND
	B5	Indonésia, Filipinas	ND
	B6	Indonésia	ND
	B7	Indonésia	ND
	B8	Indonésia	ND
C	C1	Sul da Ásia, Sul China	HCC e LC
	C2	Nordeste da Ásia, China	HCC e LC principalmente naqueles com mais de 50 anos
	C3	Indonésia, Oceania	ND
	C4	Austrália	ND
	C5	Indonésia, Filipinas	ND
	C6	Indonésia, Filipinas	ND
	C7	Indonésia	ND
	C8	Filipinas	ND
	C9	Tibet, China	ND
D	D1	Oriente Médio, a área do Mediterrâneo	Doença hepática crônica, HCC
	D2	Rússia, Região do Báltico, Índia	Nenhuma relevância clínica aparente
	D3	Indonésia, Índia	Infecção oculta pelo HBV
	D4	Oceania	ND
	D5	Índia	Nenhuma relevância clínica aparente
	D6	Indonésia	ND
	D7	Túnisia	ND
E	ND	África Ocidental e Central	ND
F	F Ia	América Central	HCC
		Chile, Alaska	ND
	F Ib	EUA	ND
	F II	Brasil, Venezuela, Nicarágua	ND
	F III	Venezuela, Panamá, Colômbia	ND
F IV	Argentina, Bolívia, França	ND	
G	ND	México, Canadá	ND
H	ND	México	ND
I	ND	Vietnã, Laos	ND
J	ND	Japão	HCC

*ND: Não determinada; HCC: Carcinoma hepatocelular; LC: Liver cirrhosis (Cirrose Hepática).

Fonte: Guang-Wen Cao, 2009, modificado

No Brasil, o genótipo mais comum é o genótipo A, seguido de genótipos D e F. As Regiões Norte, Nordeste e Sudeste têm maior frequência do genótipo A, enquanto o genótipo D é o mais frequente na Região Sul (Mello *et.al.*, 2007). Em algumas regiões, os genótipos B e C também são detectados em baixa prevalência, refletindo a presença de descendentes asiáticos dentro das populações destas regiões (Sitnik *et.al.*, 2004). A presença destes genótipos reflete a mistura de culturas no Brasil: Índio americano, Europeu e Africano raízes ancestrais, mostrando o país como um importante modelo para estudos de genética de populações, sugerindo uma influência do padrão de imigração para cada região. (Alcade *et.al.*, 2009).

É rara a presença do genótipo G no Brasil. Bottecchia *et.al.*, (2008) identificaram o genótipo G em um paciente infectado com o HBV e em apenas dois pacientes co-infectados com HIV. A presença do genótipo G tem sido associado, por alguns autores, com uma história de transmissão entre homens que fazem sexo com homens (Sánchez *et.al.*, 2007). Estudo realizado por Silva *et.al.*, (2010) identificou dois pacientes com este genótipo o que poderia de alguma forma ser associado a este comportamento sexual.

1.4. Epidemiologia do HBV

O HBV é um agente altamente infeccioso. Os vírus são estáveis a -20°C por vários anos e a 30°C por seis meses, quando mantidos em soro. Preparações virais aquecidas a 60°C durante quatro horas, devido a sua infecciosidade não é totalmente destruída. As preparações virais são inativadas pelo aquecimento a 98°C por um minuto e por calor seco a 160°C por uma hora. A desinfecção do material contaminado requer contato com uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, dissolvido em hidróxido de sódio a 0,5%, por 30 minutos (Liberto *et.al.*, 2002). O HBV apesar de ser muito resistente ao calor e a agentes físicos, plasma infectado pode ser inativo por aquecimento quando o material é aquecido a 60°C por 5 horas. (Khouro, 2004)

A hepatite causada pelo HBV é uma doença de grande importância para a saúde pública em todo o mundo. Aproximadamente 30% da população mundial ou cerca de 2 bilhões de pessoas apresentam evidência sorológica de

infecção atual ou passada pelo HBV. Destas estima-se que aproximadamente 360 milhões apresentam infecção crônica e 600.000 morrem anualmente devido à hepatite aguda, carcinoma hepatocelular e cirrose. (Valla, 2003; OMS 2011). A infecção crônica pelo HBV é a principal causa de HCC na Ásia e na África, onde o vírus é de transmissão endêmica, embora a incidência de HCC em portadores de hepatite B depende de diversos fatores, os resultados de um estudo prospectivo controlado revelaram a incidência anual de HCC em portadores hepatite B em 0,5% dos pacientes sem cirrose e 2,5% naqueles com cirrose. (Tinkle, Haas-Kogan, 2012).

Padrões de transmissão do HBV e a soroprevalência da infecção crônica por HBV variam muito em todo o mundo, apesar de estudos de soroprevalência em muitos países serem limitados, e a epidemiologia da hepatite B está mudando. Cerca de 50% das pessoas no mundo vivem em regiões em que HBV é altamente endêmica, ou seja, onde a prevalência da infecção crônica por HBV é > 8% entre os adultos e que de infecção resolvida ou crônica, isto é, anti-HBc positivo, é > 60%. Historicamente, mais 90% das novas infecções ocorreram entre lactentes e crianças jovens, como resultado da transmissão perinatal ou doméstico durante a primeira infância. Os programas de imunização infantil levaram a uma diminuição acentuada na incidência e prevalência entre os jovens e membros dessas populações vacinadas (Madani, 2007; Blaine *et.al.*, 2007). Países de endemicidade intermediária, ou seja, a prevalência do AgHBs de 2% - 7%, respondem por aproximadamente 43% da população mundial, nestes países, múltiplos modos de transmissão, ou seja, perinatal, familiar, sexual, uso de drogas injetáveis, e de relacionados a saúde, contribui para a carga da infecção. Regiões do mundo, com alta prevalência ou intermediário de AgHBs inclui grande parte da Europa Oriental, Ásia, África, Oriente Médio, e Ilhas do Pacífico (Goldstein *et.al.*, 2005). Em países de baixa endemicidade (ou seja, prevalência de AgHBs <2%), a maioria das novas infecções ocorre entre adolescentes e adultos e são atribuíveis a transmissão sexual e de drogas injetáveis. No entanto, em certas áreas de baixa endemicidade de HBV, a prevalência de infecção crônica por HBV é alta entre as populações indígenas (Weinbaum *et.al.*, 2008).

Existe uma variação de prevalência do HBV em todo o mundo, tendo uma distribuição bastante variada com prevalências baixas desde inferiores a 2% - na Europa Ocidental, América do Norte, Nova Zelândia, Austrália e Japão — até altas, superiores a oito por cento como encontradas na África, Sudeste Asiático e China (Khouro *et.al.*, 2004).

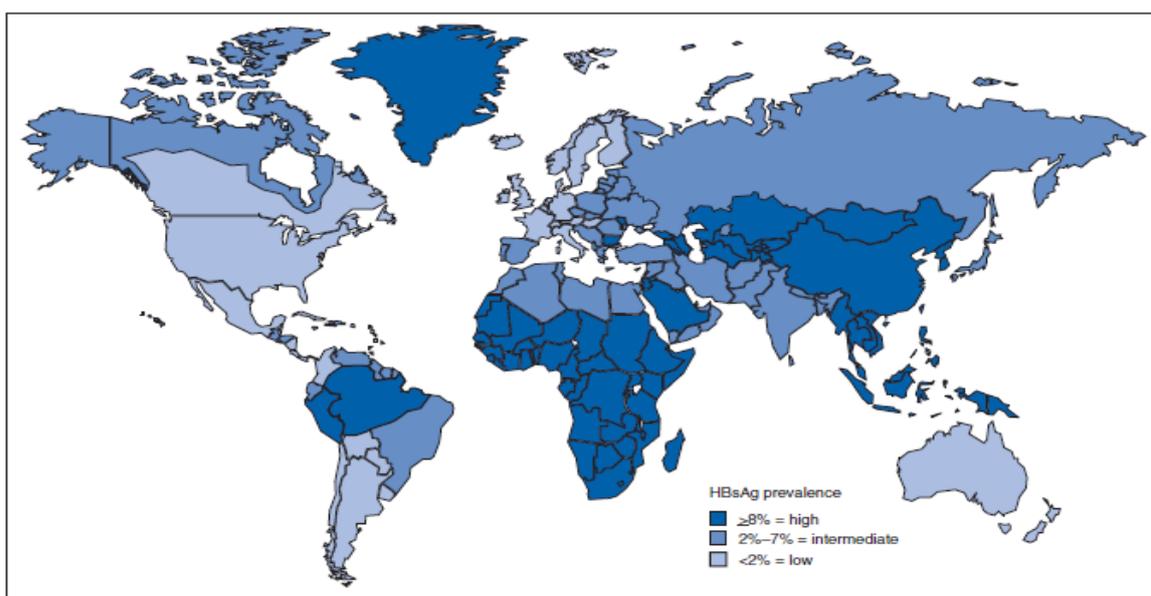


Figura 3: Distribuição Geográfica da infecção crônica do HBV *CDC 2006

Estima-se que cerca de 10 milhões de brasileiros já tenham entrado em contato com o vírus da hepatite B (CVE 2012). O Brasil é considerado pela OMS como área de incidência intermediária (Coser *et.al.*, 2008), a prevalência média é em torno de 8% na região Amazônica, 2,5% nas regiões Centro-Oeste, 2% na Sudeste e 1% na região Sul. (Khouro *et.al.*, 2004; Coser *et.al.*, 2008).

Segundo o Estudo de Prevalência de Base Populacional das Infecções pelos Vírus das Hepatites A, B e C nas Capitais do Brasil, desenvolvido a partir de uma demanda da Secretaria de Vigilância à Saúde, do Ministério da Saúde, com o apoio da Organização Panamericana de Saúde a prevalência para o marcador de exposição ao HBV (Anti-HBc), referente ao conjunto das capitais do Brasil foi de 7,4%. O percentual de expostos ao HBV na faixa etária de 10 a 19 foi de 1,1% e de 11,6% para o grupo de 20 a 69 anos. Esses resultados apontam para o aumento da exposição com a idade em consonância com os estudos de soroprevalência da hepatite B. Para o marcador AgHBs a

prevalência global referente ao conjunto das capitais do Brasil foi de 0,37%, classificando o conjunto das capitais do Brasil, como região de baixa endemicidade. A prevalência de AgHBs foi de 0,055% na faixa etária de 10 a 19 de 0,60% para os grupos de 20 a 69 anos (Ministério da Saúde, 2010).

Quando avaliamos os dados do Estudo de Prevalência por região o Brasil apresenta a seguinte situação (Ministério da Saúde, 2010):

- Região Norte: a região norte apresentou uma prevalência do anti-HBc de 10,9%. O percentual de expostos ao HBV na faixa etária de 10 - 19 foi de 0,94% e de 14,7% para o grupo de 20 - 69 anos. Esses resultados apontam para o aumento da exposição com a idade em consonância com os estudos de soroprevalência da hepatite B. Para o marcador AgHBs a prevalência foi de 0,63% classificando o conjunto das capitais do Norte, como região de baixa endemicidade. Na faixa etária de 10 a 19 não foi identificado nenhum indivíduo positivo para o AgHBs na população estudada. Na faixa etária de 20 a 69 anos a prevalência foi de 0,92%.
- Região Nordeste: A prevalência para o anti-HBc, foi de 9,13%. O percentual de expostos ao HBV na faixa etária de 10 a 19 foi de 2,12% e de 11,7% para o grupo de 20 a 69 anos. Esses resultados apontam para o aumento da exposição com a idade em consonância com os estudos de soroprevalência da hepatite B. Para o marcador AgHBs a prevalência referente ao conjunto das capitais do Nordeste foi de 0,42%, classificando o conjunto das capitais do Nordeste, como região de baixa endemicidade. A prevalência de AgHBs foi de 0,11% na faixa etária de 10 a 19 de 0,53% para o grupo de 20 a 69 anos.
- Centro Oeste: A prevalência para o marcador anti-HBc, foi de 4,30%. O percentual de expostos ao HBV na faixa etária de 10 a 19 foi de 1,28% e de 12,7% para o grupo de 20 a 69 anos. Esses resultados apontam para o aumento da exposição com a idade em consonância com os estudos de soroprevalência da hepatite B. Para o marcador AgHBs a prevalência referente ao conjunto das capitais do Centro-Oeste foi de 0,31% classificando o

conjunto das capitais do Centro-Oeste, como região de baixa endemicidade. A prevalência de AgHBs foi de 0,17% na faixa etária de 10 a 19 de 0,76% para o grupo de 20 a 69 anos.

- Distrito Federal: A prevalência para o marcador de exposição ao HBV (anti-HBc), referente ao Distrito Federal foi de 3,07%. O percentual de expostos ao HBV na faixa etária de 10 a 19 foi de 1,24% e de 8,43% para o grupo de 20 a 69 anos. Para o marcador AgHBs a prevalência referente ao Distrito Federal foi de 0,26%, classificando o conjunto das capitais do Distrito Federal, como região de baixa endemicidade. A prevalência de AgHBs foi de 0,21% na faixa etária de 10 a 19 de 0,42% para o grupo de 20 a 69 anos.
- Sudeste: A prevalência para o marcador de exposição ao HBV (anti-HBc), referente ao conjunto das capitais do Sudeste foi de 6,33%. O percentual de expostos ao HBV na faixa etária de 10 a 19 foi de 0,61% e de 7,90% para o grupo de 20 a 69 anos. Para o marcador AgHBs a prevalência referente ao conjunto das capitais do Sudeste foi de 0,31% classificando o conjunto das capitais do Sudeste, como região de baixa endemicidade. Na faixa etária de 10 a 19 não foi identificado nenhum indivíduo positivo para o AgHBs na população estudada. Na faixa etária de 20 a 69 anos a prevalência foi de 0,40%.
- Sul: A prevalência para o marcador de exposição ao HBV (anti-HBc e AgHBs), referente ao conjunto das capitais do Sul foi de 9,59%. O percentual de expostos ao HBV na faixa etária de 10 a 19 foi de 1,58% e de 11,3% para o grupo de 20 a 69 anos. Para o marcador AgHBs a prevalência referente ao conjunto das capitais do Sul foi de 0,48%, classificando o conjunto das capitais do Sul, como região de baixa endemicidade. A prevalência de AgHBs foi de 0,17% na faixa etária de 10 a 19 de 0,55% para o grupo de 20 a 69 anos.

A região amazônica apresenta a maior endemicidade de HBV no Brasil, especialmente entre os indígenas. No entanto, os aspectos epidemiológicos e de transmissão de infecção por HBV em a região amazônica não são claras, principalmente as condições que favorecer alta prevalência. Estudos realizados por Costa e Kimura (2012) confirmam a alta prevalência de HBVDNA, estimada em 51,1%, nas comunidades indígenas do Curuçá e Itaquaí Rios, no Vale do Javari, do estado do Amazonas. Esta informação está em linha com outros achados de prevalência. Barros-Junior et.al. (2008) relataram prevalência em 51 (17,6%) pacientes da Amazônia brasileira. Em estudos realizados nos Estados da Bahia e Mato Grosso do Sul a prevalência foi de 18% e 24,7%, respectivamente, mostrando que a prevalência HBV-DNA é bastante heterogênea no Brasil.

Entre os cerca de 40 milhões de pessoas infectadas com o HIV em todo o mundo, estima-se 2-4 milhões estão cronicamente infectados com o HBV (Ranjbar et.al., 2011). As taxas de prevalência da coinfeção HIV/HBV, obtidas em estudos brasileiros de amostras provenientes de serviços de saúde, situam-se entre 5,3% a 24,3%. Tem-se observado aumento da incidência de complicações crônicas decorrentes das hepatites virais nessa população, o que difere do observado com as outras doenças oportunistas. Isso se explica pelo aumento da sobrevivência dos infectados pelo HIV a partir da utilização dos antirretrovirais. Tal fato propiciou tempo para que o HBV e o HCV desenvolvessem todo seu potencial letal entre os coinfectados. (Ministério da Saúde, 2010). Em geral, HBV tende a ser mais agressiva em indivíduos HIV-positivos do que em mono-infectados, com maiores taxas de portadores de HBV, maiores níveis de viremia HBV, episódios mais frequentes de ativação e mais rápida progressão para cirrose (Ranjbar et.al., 2011).

1.5. Transmissão do HBV

O HBV apresenta maior risco residual de transmissão por transfusão de sangue do que os vírus da hepatite C (HCV) ou o da imunodeficiência humana (HIV). A história natural da hepatite B é complexa e são influenciadas por muitos fatores, incluindo a idade no momento da infecção, fatores virais,

genótipo do HBV, mutações virais, nível de replicação, fatores do hospedeiro (sexo, idade e estado imunológico) e fatores exógenos, como a infecção simultânea com outros vírus hepatotrópicos ou álcool. (Fattovich, 2003).

O vírus é transmitido por exposição parenteral ou da mucosa com fluidos corporais de indivíduos HBsAg-positivos que têm infecção aguda ou crônica por HBV. As maiores concentrações de vírus estão em sangue e fluidos serosos, os títulos mais baixos são encontradas em outros fluidos, tais como a saliva e sêmen. A saliva pode ser um veículo de transmissão porém o beijo, é um modo improvável de transmissão. Não parece haver nenhuma transmissão do HBV através de lágrimas, suor, urina, fezes ou gotículas (CDC, 2011).

A mais importante via de transmissão é por contato sexual, seja heterossexual ou homossexual, com uma pessoa. Transmissão fecal-oral parece não ocorrer. No entanto, a transmissão ocorre entre homens que fazem sexo com homens, possivelmente através da contaminação de lesões da mucosa retal. Inoculação percutânea direta do HBV por agulhas durante uso de drogas injetáveis é um importante modo de transmissão. Transmissão do HBV também pode ocorrer por exposição percutânea, incluindo tatuagem, piercing e acupuntura, bem como picadas de agulha ou outras lesões de instrumentos cortantes sustentados por pessoal médico. Estas exposições representam apenas uma pequena proporção de casos notificados. Rupturas na pele sem punção com agulha aberta, como arranhões, escoriações cutâneas frescos, queimaduras ou outras lesões, também podem servir como rotas de entrada (CDC, 2011).

A transmissão perinatal de mãe para filho no momento do nascimento é muito eficiente. Se a mãe é positivo tanto para HBsAg e HBeAg, 70% a 90% das crianças serão infectadas na ausência de profilaxia pós-exposição. O risco de transmissão perinatal é de cerca de 10% se a mãe é positivo apenas para HBsAg. Cerca de 90% desses bebês infectados se tornaram doentes crônicos (Kesler, 2005; Coser *et.al.*, 2008, CDC, 2011).

Certos grupos populacionais são considerados de alto risco para a aquisição do HBV; entre eles incluem-se, profissionais da saúde, hemodialisados, hemofílicos, usuários de drogas, profissionais do sexo e

imunossuprimidos. A infecção mostra-se altamente prevalente em familiares de portadores crônicos e em indígenas da região amazônica (Ferreira, 2000).

A frequência de infecção e os padrões de transmissão variam em diferentes partes do mundo. Aproximadamente 45% da população global vive em áreas com alta prevalência de hepatite B crônica (havendo mais de 8% da população AgHBs positivo), 43% vive em áreas com prevalência moderada (tendo 2 a 7% da população AgHBs positivo) e 12% em áreas com baixa prevalência (menos de 2% da população é AgHBs positivo) (CDC, 2011).

1.6. História Natural

Existem variações da história natural da infecção pelo HBV, mas diversos fatores, incluindo fatores virológicos (carga viral, genótipo, e mutação viral), fatores imunológicos e idade do paciente, têm sido sugeridos (Koziel, 1998; Brunetto, *et.al.*, 1999; Ito *et.al.*, 2010). Além destes fatores, a história da família é um fator de risco bem conhecido para o desenvolvimento de HCC em pacientes com infecção crônica por HBV, sugerindo o papel de um fator genético no curso natural do HBV (Yu *et.al.*, 2000, Turati *et.al.*, 2012;). Pessoas com coinfeção pelo HIV correm o risco ainda maior de desenvolver cirrose, insuficiência hepática e hepatocarcinoma. (Valla, 2003, OMS 2011;).

As consequências da infecção por HBV aguda são altamente variáveis. O período de incubação varia entre 6 semanas e 6 meses, e desenvolvimento de manifestações clínicas é altamente dependente da idade. A infecção aguda pelo HBV costuma ser benigna na maioria das vezes. Dois terços dos indivíduos infectados apresentam formas assintomáticas e evolui para cura, um terço tem manifestações clínicas e desses, apenas 10% tornam-se portadores crônicos do vírus, podendo evoluir para hepatite crônica, cirrose hepática e hepatocarcinoma. A hepatite B crônica é um processo dinâmico, com uma fase replicativa precoce com doença hepática ativa e uma fase tardia com baixa replicação viral e remissão histológica da doença. Cerca de 1 a 2% dos casos agudos podem apresentar formas graves como hepatite fulminante ou necrose sub-fulminante (Lopes e Schinoni, 2011).

A infecção crônica por HBV é definida como a presença de AgHBs no soro, durante pelo menos 6 meses. O risco de desenvolver infecção crônica varia inversamente com a idade e é mais elevado (até 90%) para lactentes infectados no período perinatal (McMahon *et.al.*, 1985; Hyams, 1995).

O curso natural da infecção pelo HBV crônica, em geral, pode ser dividido em três fases: 1) imunotolerante; 2) imunoativa; 3) não replicativa. Existe uma divergência com relação se há ou não uma quarta fase. Para alguns autores, como Brandão-Mello (2008), a quarta fase seria a reativação, contudo para Fonseca (2007) e para Ferreira e Borges (2007) a reativação do HBV não é considerada como uma quarta fase e sim como um fenômeno biológico característico dos *Hepadnavirus* (Lopes, 2011).

A fase imunotolerante é mais comumente vista em crianças que adquiriram o HBV em transmissão perinatal ou nos primeiros anos de vida, sendo caracterizada pela positividade do AgHBs e do AgHBe, de altos níveis de carga viral (DNA-HBV), aminotransferases normais ou discretamente elevadas (ALT, AST), atividade necroinflamatória discreta com fibrose ausente ou mínima na biopsia hepática e curso assintomático (Ferreira; Borges, 2007).

Estudos experimentais sugerem que a função primordial do AgHBe seria de induzir ao portador do HBV (AgHBs+) o estado de imunotolerância. Em indivíduos que se infectaram com o HBV durante a fase adulta, o estado pode ser mais curto ou ausente. Pacientes que apresentam esta fase são considerados de baixo risco de progressão para cirrose hepática e hepatocarcinoma (Fonseca, 2007).

Na fase imunoativa ocorre uma reação inflamatória com efeito citopático. O AgHBe pode ser identificado no soro e percebe-se um declínio dos níveis séricos da carga viral. São encontrados também ALT e AST em níveis aumentados e presença de atividade necroinflamatória no fígado. A duração dessa fase em pacientes com infecção aguda é de, aproximadamente, três a quatro semanas (período sintomático). Para pacientes com infecção crônica, pode levar 10 ou mais anos para o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. Menos de 1% dos indivíduos infectados desenvolvem formas de hepatite fulminante pelo HBV (Pyrsoopoulos, 2011).

Na terceira fase ou fase não replicativa nota-se a presença no soro de AgHBs, anti-Hbe, títulos baixos ou indetectáveis de DNA-HBV, aminotransferases normais, mínima lesão histológica hepática, curso assintomático e de bom prognóstico. Muitos portadores inativos do HBV permanecem inativos por toda a vida. Poucos portadores inativos desenvolvem hepatite crônica B anti-HBe positivo (hepatite crônica residual pelo HBV) que se caracteriza por elevação dos níveis das aminotransferases, altos níveis de carga viral e doença hepática ativa (histológica). Invariavelmente, esses pacientes evoluem para cirrose hepática, contudo, o curso clínico e as sequelas da hepatite crônica B variam de indivíduo para indivíduo (Fonseca, 2007). A terceira fase pode persistir indefinidamente, terminar com a soroconversão do AgHBs ou pode ocorrer reativação da hepatite, sendo caracterizada pelo aparecimento da atividade necroinflamatória do fígado em pessoas que sejam portadoras inativas do HBV ou que tenham recebido diagnóstico de hepatite B resolvida (infecção previa pelo HBV, sem sinais virológicos, bioquímicos ou evidência histológica de doença viral) (Lok; McMahon, 2007).

É importante ressaltar que após a soroconversão do AgHBe para Anti-HBe, cerca de 20 a 30% dos pacientes apresentam elevados níveis de carga viral, aminotransferases elevadas e doença ativa histológica, caracterizando a reativação da doença (ou quarta fase); esses pacientes, em geral, são portadores de mutantes do vírus B (com mutação nas regiões pré-core e promotora do core do genoma viral) que deletam a expressão de AgHbe e são hoje denominados portadores de hepatite crônica B AgHBe negativa (Ferreira; Borges, 2007). Apesar da não produção de AgHBe, a replicação do HBV e a expressão do AgHBc no fígado não são afetadas. Dessa forma, a presença de transaminases alteradas, de DNA-HBV no soro e de AgHBc no fígado, permite o diagnóstico de hepatite crônica por HBV com mutação pré-core (Ferreira, 2000).

1.7. Tratamento

O principal objetivo do tratamento é reduzir o risco de progressão da doença hepática e de seus desfechos primários, especificamente cirrose, hepatocarcinoma e, conseqüentemente, o óbito. Desfechos substitutivos ou intermediários, tais como o nível de HBV-DNA, de enzimas hepáticas e marcadores sorológicos, estão validados e tem sido utilizados como parâmetros para inferir a probabilidade de benefícios da terapêutica a longo prazo, haja vista que a supressão da replicação viral de maneira sustentada e a redução da atividade histológica diminuem o risco de cirrose e de hepatocarcinoma (Ministério da Saúde, 2011).

Portanto, com o tratamento busca-se a negatificação sustentada dos marcadores de replicação viral ativa, HBeAg e carga viral, pois estes traduzem remissão clínica, bioquímica e histológica. O dano hepático determinando cirrose ocorre em pacientes com replicação ativa do vírus, sendo menor naqueles em que os níveis de HBV-DNA são baixos, apesar da persistência do HBsAg (Ministério da Saúde, 2011).

A avaliação do paciente pré-tratamento é fundamental, e objetiva selecionar os indivíduos que serão tratados. Além da história e exame físico cuidadosos é importante estar à disposição do médico, todas as provas de função hepática, que incluem: aminotransferases (ALT, AST), fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase, albumina sérica, provas de coagulação, bilirrubinas). As sorologias para o HBV (AgHbs, AgHbe/Anti-Hbe, Anti Hbc (total e IgM), Anti-Hbs), HCV e HIV, estes últimos para documentar possíveis coinfeções. Também, é fundamental, hoje, incluir-se nas provas laboratoriais, a quantificação do DNA-HBV sérico realizada pela reação em cadeia de polimerase (PCR). (Ferreira, Borges, 2007).

A indicação de tratamento baseia-se no grau de acometimento hepático observado por exame anatomopatológico do tecido hepático obtido por biópsia. Os principais marcadores de lesão hepática são as aminotransferases. Pacientes sem manifestações de hepatopatia e com aminotransferases normais são avaliados clinicamente e repetir os exames a cada seis meses (Ministério da Saúde, 2009).

O MS publicou a Portaria nº 2.561 de 28 de outubro de 2009 - **Atualização do protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da Hepatite Viral B**, a primeira escolha para o tratamento deve ser o interferon-alfa, 5 ou 10 MUI diárias, três vezes por semana, por 16 a 24 semanas. Pacientes que não apresentarem soroconversão em 16 semanas deverão ter seu tratamento prolongado até as 24 semanas. Essa portaria irá contemplar os pacientes com as seguintes características:

- idade superior a 2 anos;
- AgHBs (+) por mais de seis meses;
- HBeAg (+) ou HBV-DNA > 10⁴ cópias/mL (fase de replicação);
- ALT/TGO > 2 vezes o limite superior da normalidade;
- ter realizado, nos últimos 24 meses, biópsia hepática onde tenha sido evidenciada atividade necro-inflamatória de moderada a intensa (maior ou igual a A2 pela classificação Metavir ou atividade portal ou peri-septal grau 2 da classificação da Sociedade Brasileira de Patologia) e presença de fibrose de moderada a intensa (maior ou igual a F2 pelas classificações Metavir ou Sociedade Brasileira de Patologia); ausência de contra-indicação ao tratamento.

Os pacientes deverão ser monitorados com leucograma e plaquetas, principalmente nas fases iniciais do tratamento, além da realização da carga viral que é importante para monitorar a resposta a droga utilizada no tratamento. Os exames mínimos que o paciente deverá realizar durante o tratamento são: 1) hemograma com contagem de plaquetas; 2) ALT/AST a cada 15 dias no primeiro mês, e após, mensalmente. Recomenda-se a determinação da ALT/AST a intervalos que variam de 30 a 60 dias; indica-se, ainda, a avaliação tireoideana (T4 livre e TSH), além de glicemia em jejum a cada três meses. Diante de alterações críticas dentre as descritas acima, o paciente deverá ser encaminhado para um serviço de referência.

A escolha de qualquer uma das drogas deverá ser monitorada com testes de carga viral. Assim, a utilização de técnicas sensíveis específicas, reprodutíveis e baratas nos laboratórios da rede pública é fundamental, sendo possível otimizar os recursos públicos sem prejudicar a qualidade dos exames oferecidos.

O custo do tratamento de doentes com hepatite B foi avaliada e determinada em diferentes estudos. Como esses estudos foram realizados em diferentes áreas, épocas e sob diferentes condições, os resultados foram muito diferentes. No entanto, todos eles indicaram que os custos de tratamento de doenças crônicas como a hepatite B foram muito alta e poderia impor um grande fardo socioeconômico sobre os indivíduos e suas sociedades (Kalantari *et.al.*, 2012).

Um dos elementos que afetam o custo do tratamento é significativamente do regime de tratamento selecionado para os pacientes. Assim, é necessário calcular o custo de cada procedimento de tratamento separado (Kalantari *et.al.*, 2012).

1.8. Prevenção

A medida mais eficaz no combate à infecção pelo HBV é a imunização ativa dos indivíduos suscetíveis, com emprego das vacinas atualmente disponíveis, altamente eficientes e seguras. Essas vacinas tornaram possível o estabelecimento de programas de controle da infecção, que buscam a eventual erradicação da hepatite B e a profilaxia do hepatocarcinoma (Osti, Marcondes-Machado, 2010).

A primeira vacina licenciada para hepatite B foi nos Estados Unidos em 1981 e esta disponível desde 1982. As primeiras vacinas foram licenciadas derivada de plasma e compostos de AgHBs purificado, e as vacinas atualmente disponíveis são produzidos por tecnologia de DNA recombinante. A vacina contra a hepatite B é dada em uma série de três doses, mas formulações de vacina que emprega duas e quatro doses também foram licenciadas nos Estados Unidos para uso em alguns grupos de idade (Shepard *et.al.*, 2006).

A hepatite B pode ser erradicada por meio da imunização. O Ministério da Saúde já estendeu a faixa etária da imunização, antes até 19 anos, para indivíduos até 24 anos em 2011. Em 2012, a vacina passou a ser oferecida para os jovens até 29 anos (OMS 2012). Em 2013 ocorreu a ampliação da oferta da vacina para hepatite B para a faixa etária para 49 anos, mas todo indivíduo acima de 50 anos que buscar a vacina deverá ser vacinado

independente de comprovação de indicação. Para recém nascidos é indicado a imediata vacinação, preferencialmente nas primeiras 12 horas após o parto. Se a gestante tiver hepatite B o recém-nascido, deverá receber, além da vacina, a imunoglobulina contra a hepatite B nas primeiras 12 horas de vida, para evitar a transmissão de mãe para filho. A Imunoglobulina Humana anti-hepatite B (IGHAHB), é também indicada para pessoas não vacinadas, após exposição ao vírus da hepatite B nos seguintes casos: vítimas de acidentes com material biológico positivo ou fortemente suspeita de infecção por HBV; comunicantes sexuais de casos agudos de hepatite B; vítimas de abuso sexual; imunodeprimidos após exposição de risco, mesmo que previamente vacinados.

A vacina pode ser administrada em três ou quatro doses separadas, como parte dos esquemas de imunização existentes. No Brasil é realizada em três doses, com intervalo de um mês entre a primeira e a segunda dose e de seis meses entre a primeira e a terceira dose (0, 1 e 6 meses). As populações como imunocomprometidos, portadores de insuficiência renal em programas de hemodialise e alguns bebês prematuros, devem fazer uso de esquemas especiais, conforme manual do CRIE (MS, 2006). A série completa de vacinas induz níveis de anticorpos protetores em mais de 95% dos bebês, crianças e adultos jovens. Proteção dura pelo menos 20 anos e é, possivelmente, ao longo da vida. Todas as crianças e adolescentes com menos de 18 anos de idade e não previamente vacinados devem receber a vacina. Pessoas em grupos de alto risco também devem ser vacinados. Os títulos de Anti-HBs considerados protetores são superiores a 10 UI/ml. Após três doses intramusculares de vacina contra hepatite B, mais de 90% dos adultos jovens e mais de 95% das crianças e adolescentes desenvolvem respostas adequadas de anticorpos. Porém, com a idade, ocorre queda da imunogenicidade e, aos 60 anos, aproximadamente 75% dos vacinados desenvolvem anticorpos protetores. Com o tempo, os títulos de anticorpos podem cair e até se tornar indetectáveis; porém, a proteção contra doença sintomática e infecção crônica persiste. As pessoas que responderam à vacina apresentam resposta anamnésica quando em contato com o vírus, demonstrando que as vacinas induzem memória imunológica, por isso, até o momento, não se recomenda revacinação de pessoas imunocompetentes.

1.9. Diagnóstico laboratorial da Hepatite B

O diagnóstico laboratorial da hepatite B se dá pelo resultado dos marcadores sorológicos, os testes mais comumente utilizados são os testes de ensaio imunoenzimáticos (ELISA) por sua praticidade, eficiência, detectando antígenos e/ou anticorpos específicos, mas também se mostram muito úteis no seguimento da infecção viral, na avaliação do estado clínico do paciente e na monitorização da terapêutica específica (CVE 2012).

1.9.1. Comportamento Sorológico

A partícula viral é composta por um antígeno de superfície (AgHBs), outro antígeno mais interno, que protege o ácido nucléico (AgHBc – Antígeno do core) e um outro antígeno solúvel (AgHBe), produzido em altas concentrações e liberado na circulação dos pacientes com intensa replicação viral (Valla, 2003). A presença AgHBs no soro é indicativo da infecção pelo HBV, mas não fornece informação sobre o estado de replicação do vírus. Sua presença pode ser detectada em soro 30 a 60 dias após a exposição ao HBV e persiste por períodos variáveis (Mahoney, 1999). O AgHBs é o primeiro marcador que aparece no curso da infecção pelo HBV. Na hepatite aguda, ele declina a níveis indetectáveis em até 24 semanas e também é marcador chave para determinar se a hepatite B tornou-se crônica (definida como a persistência do antígeno de superfície por pelo menos 6 meses). Em contrapartida, se ocorrer a resolução da doença, o AgHBs declina seguido por um aumento subsequente de anticorpos contra o antígeno (anti-HBs) HBV no soro esse é o anticorpo neutralizante e protetor. O marcador anti-HBs também é o indicador de resposta vacinal satisfatória, quando presente isoladamente em concentração superior a 10mUI/mL (Sablon & Shapiro, 2005).

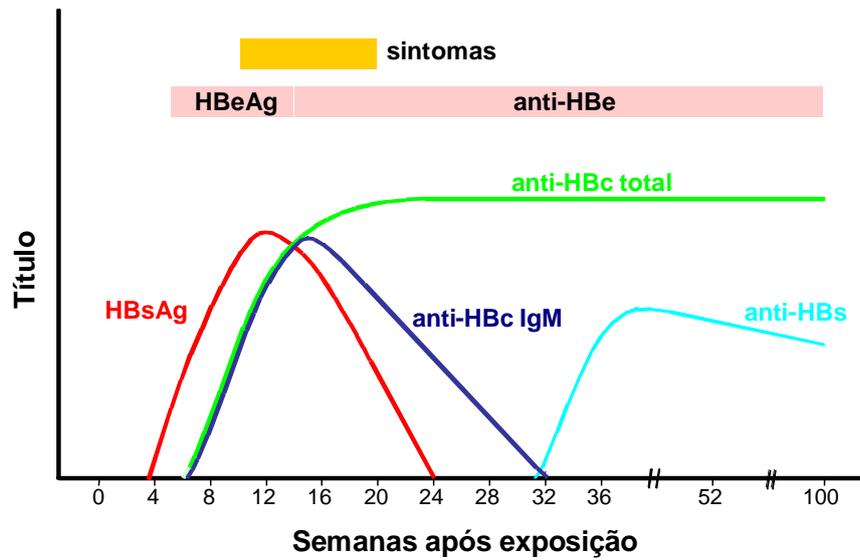


Figura 4: Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na Hepatite B aguda. Fonte: CDC 1995, modificado

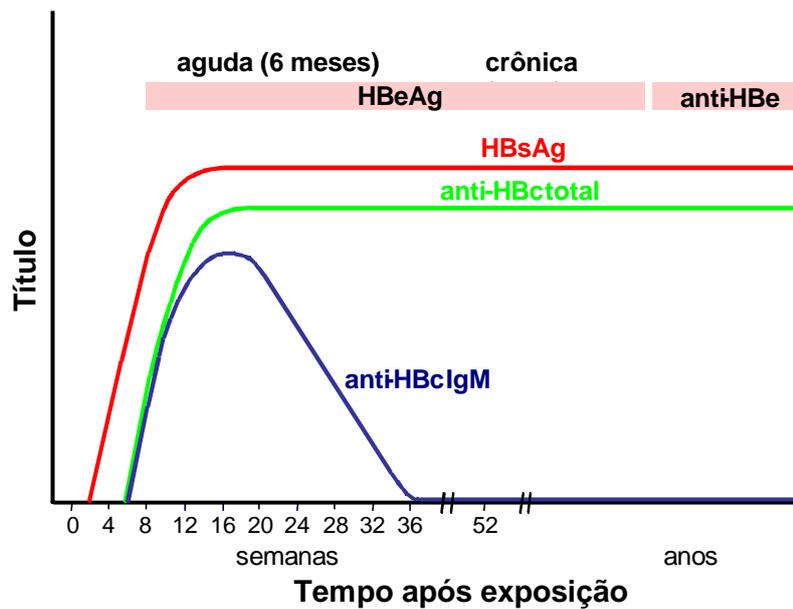
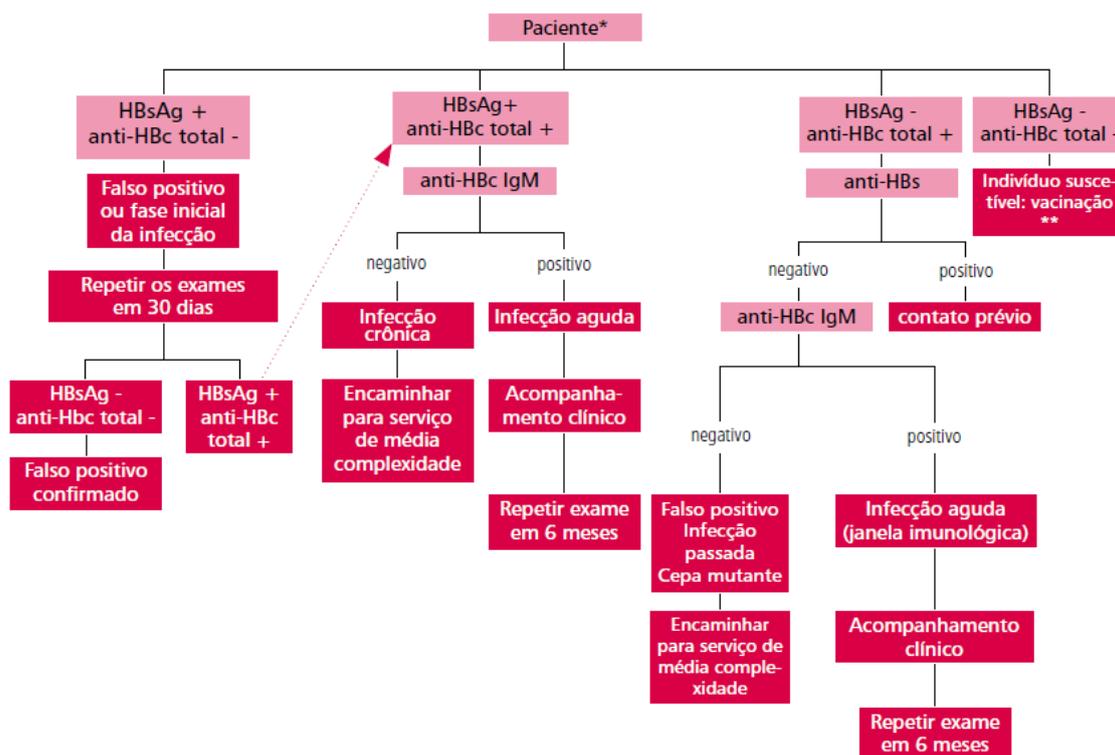


Figura 5: Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite B crônica. Fonte: CDC 1995, modificado

A presença do DNA do HBV no soro e do HBeAg são dois outros principais marcadores que aparecem precocemente, e são indicativos de

replicação viral ativa (Sablon & Shapiro, 2005). O HBV-DNA surge logo no início da infecção e atinge níveis séricos altos, em torno de 10^{10} cópias/mL em soro de pacientes com AgHBe positivo, apresentado níveis mais baixos em pacientes com AgHBe negativo. Isso significa que o HBV DNA quando avaliado de forma quantitativa, tem importância clínica, terapêutica e epidemiológica (Welzel, *et.al.*, 2006).



Fonte: Ministério da Saúde, 2008

Figura 6: Fluxograma de investigação laboratorial da hepatite B

1.9.2. Ensaios Moleculares do HBV

Os testes de biologia molecular são utilizados para detectar a presença do ácido nucléico do vírus. Os testes podem ser qualitativos que indicam a presença ou ausência do vírus na amostra pesquisada, quantitativos que indicam a carga viral presente na amostra ou de genotipagem que indicam o genótipo do vírus. (Ministério da Saúde, 2005).

Embora a pesquisa do DNA do vírus não ser recomendada para a avaliação da infecção rotineiramente, a detecção e a quantificação do DNA do HBV no plasma e no soro é importante para diagnosticar e monitorar a

infecção, bem como verificar a eficiência do tratamento retroviral e prever se o tratamento será bem sucedido além de monitorar o surgimento de cepas virais mutantes (WELZEL *et.al.*, 2006; GALLI *et.al.*, 2008).

O HBV-DNA deve ser utilizado em situações onde há indicação de agressão hepatocelular e suspeitas de que os pacientes desenvolveram cepas mutantes do vírus mediante pressão imunológica (pré-core) ou no curso de terapia anti-viral (YMDD). Nestas circunstâncias os marcadores sorológicos de replicação viral são negativos, sendo necessário fazer exames de biologia molecular, onde poderá ser detectado o DNA viral em alta circulação no soro, o que caracteriza replicação viral ativa (Ministério da Saúde, 2005).

Com o objetivo de organizar a realização dos testes de biologia molecular para o HBV na rede pública, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 2.561 de 28 de outubro de 2009 - Atualização do protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da Hepatite Viral B -. Essa portaria estabelece critérios de diagnóstico e tratamento.

Em todas as situações previstas, haverá a necessidade do acompanhamento do paciente, valendo-se de determinações de carga viral, seja no paciente portador assintomático com HBeAg reagente, ou no paciente com cirrose compensada/descompensada. O Ministério da Saúde conta com a colaboração dos laboratórios de Saúde Pública

A pesquisa quantitativa do DNA do HBV pode ser realizada por diferentes métodos:

1. amplificação do sinal (bDNA);
2. reação em cadeia da polimerase (PCR);
3. PCR em tempo real (TaqMan PCR) (Lu *et.al.*, 2006).

Diferentes ensaios moleculares comerciais foram desenvolvidos para a quantificação de DNA do HBV em amostras de plasma ou de soro. Um desses ensaios é o COBAS Amplicor HBV monitor® (Roche Diagnostics - utilizado até 2010) e COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan® (Roche Diagnóstica), que é baseado na amplificação do DNA através de primers específicos. Entretanto o custo desses ensaios são elevados para serem utilizados em países em desenvolvimento, onde a maior prevalência de os casos de HBV.

Recentemente a PCR em tempo real tem sido utilizada para a detecção e quantificação dos níveis de HBV em amostras de soro ou de plasma (Galli, *et.al.*, 2008). A PCR em tempo real é uma modificação da PCR convencional, que identifica o alvo com maior sensibilidade e especificidade e em menor tempo de reação. Este procedimento se baseia na detecção e quantificação de um sinal fluorescente cuja intensidade é diretamente proporcional à quantidade do produto amplificado durante a reação (Zhao *et.al.*, 2005, Lu, *et.al.*, 2006).

Na PCR em Tempo-Real, acrescenta-se, além dos iniciadores utilizados na PCR convencional, um oligonucleotídeo (sonda TaqMan®), com sua extremidade 5' ligada a um fluoróforo e sua extremidade 3' a uma molécula quencher, capaz de, por um fenômeno físico denominado FRET- Fluorescence Ressonance Energy Transfer, absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo após este ser estimulado por luz de comprimento de onda específico (Duarte, 2006).

Devido à propriedade 5'-3' exonuclease da enzima Taq DNA polimerase na reação de PCR, ocorre, durante a fase de extensão dos iniciadores, a separação de FAM e TAMRA da mesma molécula, o que abole o FRET, neste caso a fluorescência de FAM é captada pelo sistema óptico do aparelho de PCR em Tempo Real (Figura 7) (Drosten *et.al.*, 2000, Duarte, 2006).

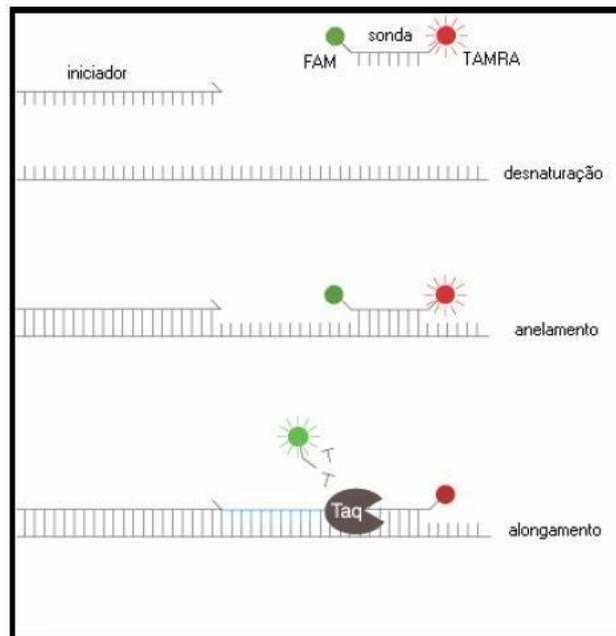


Figura 7: Representação esquemática da Reação de PCR em Tempo-Real

À medida que os ciclos da reação vão se sucedendo, aumenta o número de fluoróforos FAM livres do fenômeno FRET e conseqüentemente a fluorescência gerada. Quando a fluorescência emitida pelo fluoróforo atinge determinado limiar significativamente acima da fluorescência basal da reação e localizado na fase exponencial da mesma, o software do sistema correlaciona o ciclo que isto ocorre (Ct) com as informações decorrente da curva padrão paralela à reação, o que possibilita a quantificação das amostras (Duarte, 2006).

Diversos autores observaram que a PCR em tempo real é uma técnica altamente sensível e específica que apresenta resultados que podem ser correlacionados com os outros testes amplamente utilizados, também apresentaram dados relevantes sobre a possibilidade de detecção de cepas mutantes utilizando PCR em tempo real, tendo em vista a alta sensibilidade do método (Sablon & Shapiro, 2005).

A utilização da PCR em Tempo-Real na avaliação de amostras séricas de pacientes infectados pelo HBV reúne características qualitativas e quantitativas em um único teste, representando um avanço em relação à prática corrente, onde metodologias diferentes são usadas separadamente para detecção e quantificação.

A disponibilidade em nosso meio de tecnologia para realização de testes de PCR em Tempo-Real (testes comerciais), a necessidade do desenvolvimento de alternativas aos atuais (kits laboratoriais altamente custosos) e a relevância da infecção pelo HBV em nosso país motivou o desenvolvimento desse trabalho.

Objetivos

2. Objetivos

São objetivos desse trabalho:

- 1) Padronizar a técnica de amplificação em tempo real do DNA do vírus da Hepatite B;
- 2) Comparar as técnicas padronizadas com métodos comerciais;

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. População e Amostras utilizadas no Estudo

Foram analisadas no decorrer desse projeto, amostras provenientes de pacientes portadores crônicos do HBV, que estavam sendo atendidos para o início ou acompanhamento do tratamento por algum serviço de saúde do Estado de São Paulo e que foram acompanhados clinicamente e através de testes comercialmente disponíveis em todo território nacional, utilizados amplamente em toda a rede de laboratórios, aprovados e liberados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Foram utilizadas amostras negativas para HBV com sorologia positiva para HIV e HCV para a verificação da especificidade do teste.

A amostragem desse estudo foi constituída por 397 amostras de soro ou plasma de pacientes recebidas e estocadas no laboratório de hepatites virais do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, no período de 2009 a 2011. Essas amostras foram coletadas em Centros de Saúde e Hospitais Públicos do Estado de São Paulo, seguindo protocolo estabelecido pelo Laboratório, transportadas refrigeradas e acompanhadas de ficha com dados clínicos e laboratoriais de cada paciente.

As amostras utilizadas nesse estudo, processadas pela PCR em tempo real, foram primeiramente processadas pelos testes comerciais e, os resultados, liberados ao paciente.

3.2. Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPAL (CCD-BM 06/2009), segundo a resolução 196/96 sobre pesquisas envolvendo seres humanos, publicada pelo Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde – Brasília (1996) (cópia em anexo).

3.3. Coleta e Preparo das amostras

As amostras de soro foram coletadas em tubos de 8,0mL, sem anticoagulante, com gel separador e, no laboratório, foram armazenadas em dois microtubos de 1,7 mL. A primeira alíquota foi utilizada para a realização do teste comercial COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® da Roche Diagnóstica e, a segunda foi armazenada em freezer a - 20°C até o momento de utilização na reação da PCR em tempo real.

As amostras de plasma foram coletadas em tubos 5,0mL contendo EDTA, também separadas em duas alíquotas, sendo a primeira utilizada na realização do teste comercial COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan® da Roche Diagnóstica e a segunda alíquota foi armazenada em freezer a - 20°C até o momento de utilização na reação da PCR em tempo real.

O kit do COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® exigia que se utilizasse plasma como espécime clínico e, por esse motivo, foi utilizado soro no COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e plasmas no TaqMan®. Na padronização do teste, não foi observado diferença na utilização dos diferentes materiais clínicos.

3.4. COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®

O Teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® baseia-se em quatro processos principais:

1. Preparação da amostra
2. Amplificação por PCR do DNA alvo utilizando iniciadores complementares específicos para o HBV
3. Hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas para o alvo
4. Detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda por determinação colorimétrica

O teste permite, de forma simultânea, a amplificação por PCR do DNA do HBV e do DNA do Padrão de Quantificação do HBV. O reagente de mistura

principal contém um par de iniciadores específicos para o DNA do HBV e para o DNA do Padrão de Quantificação do HBV.

A quantificação do DNA viral do HBV é realizada utilizando o Padrão de Quantificação do HBV. O padrão de quantificação do HBV é um plasmídeo linearizado não infeccioso que contém locais de ligação no iniciador, idênticos aos do alvo do DNA do HBV e uma única região de ligação da sonda que permite que o amplicon do Padrão de Quantificação do HBV, se distinga do amplicon alvo do HBV. O Padrão de quantificação do HBV encontra-se incorporado em cada amostra de controle individual, em um número de cópias conhecido e é transportado através dos passos de preparação, amplificação por PCR, hibridização e detecção da amostra em conjunto com o HBV alvo. O analisador calcula os níveis de DNA do HBV presentes nas amostras de teste comparando o sinal do HBV alvo com o sinal do padrão de quantificação do HBV em cada amostra.

O padrão de quantificação do HBV compensa os efeitos de inibição e controla os processos de amplificação para permitir uma quantificação rigorosa do DNA do HBV presente em cada amostra. A linearidade desse teste comercial varia entre 60UI/mL a 38.000UI/mL.

A especificidade clínica do Teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR é de 100%.

3.5. COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®

O teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 é um teste de amplificação de ácidos nucleicos, utilizado para a quantificação do DNA do HBV em plasma humano. O teste baseia-se em dois processos principais:

1. Preparação da amostra
2. Amplificação simultânea por PCR do DNA alvo e a detecção de sonda de detecção oligonucleotídica duplamente marcada e clivada específica para o alvo.

O teste permite a preparação automatizada das amostras, seguida da amplificação e detecção automatizada por PCR do DNA alvo para o HBV e do DNA do Padrão de Quantificação (PQ) do HBV. O reagente de mistura principal

contém pares de iniciadores e sondas específicas para o DNA do HBV e para o DNA do PQ do HBV. A mistura principal foi desenvolvida para assegurar a quantificação equivalente dos genótipos de A a H do HBV. A detecção de DNA amplificado é efetuada através de uma sonda oligonucleotídica, duplamente marcada para o alvo e para o PQ, o que permite a identificação independente do amplicon do HBV e do amplicon do PQ do HBV.

A quantificação do DNA viral é realizada utilizando o PQ do HBV. Os efeitos de inibição são compensados e controla os processos de preparação e de amplificação, visando permitir uma quantificação mais rigorosa do DNA do HBV presente em cada amostra. O PQ é uma estrutura de DNA não infeccioso que contém sequências de HBV com locais de ligação ao iniciador idênticos aos do DNA alvo do HBV, e uma única ligação da sonda que permite que o amplicon do HBV se distinga do amplicon do HBV.

O PQ do HBV é incorporado em cada amostra a um número conhecido de cópias e é submetido aos passos de preparação da amostra subsequente, a amplificação por PCR simultânea a detecção das sondas de detecção oligonucleotídicas duplamente marcadas e clivadas. O analisador COBAS® TaqMan® calcula a concentração do DNA do HBV nas amostras teste comparando o sinal do HBV com o sinal do PQ do HBV em cada amostra e controle.

Todos os testes foram realizados seguindo rigorosamente as instruções do fabricante e tomando todos os cuidados de biossegurança.

3.6. Composição da Amostragem

A amostragem foi composta de: 142 amostras com resultados positivos pelo COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®; 94 amostras positivas pelo COBAS® TaqMan®; 109 amostras negativas pelo dois testes e 52 amostras de soros com resultados com negativos pela sorologia.

3.7. Padronização da PCR em Tempo Real

3.7.1. Extração do DNA viral

Todos os procedimentos de extração foram realizados na Seção de Virologia no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTUSP). Para evitar contaminação, todo o procedimento foi realizado em sala própria para extração e em Cabine de Segurança Nível II.

A extração do DNA do HBV foi realizada empregando-se o Kit Comercial QIAamp[®] DNA Mini and Blood Mini Handbook - QIAGEN[®], seguindo instruções do fabricante.

Em um tubo de microcentrífuga de 2,0 mL foi pipetado 20 μ L de QIAGEN Protease e, em seguida foram adicionados 200 μ L de amostra clínica; 200 μ L de tampão AL e 1 μ L de glicogênio (20mg/mL). Em seguida estas amostras foram agitadas por 15 segundos e centrifugadas (“spin down”) por 5 segundos. As amostras foram então incubadas a 56°C por 10 minutos e, após esse período, as amostras foram centrifugadas rapidamente para remover as gotas da tampa. Após este processo, ao microtubo foram adicionados 200 μ L de etanol (96-100%), novamente agitadas por 15 segundos e centrifugadas por 5 segundos. Com cuidado, o material contido no microtubo foi aplicado na mini coluna spin QIAamp (tubo de 2mL), o tubo contendo a coluna foi fechado e centrifugado a 6000 xg (8000 rpm) por 1 minuto. A mini coluna foi colocada em um tubo coletor limpo de 2mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado. A Mini coluna foi novamente aberta com cuidado e foram adicionados 500 μ L do tampão AW1, sem molhar a borda, fechada e centrifugada a 6000 xg (8000 rpm) por 1 minuto. A mini coluna foi colocada em um tubo coletor limpo de 2,0mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado. A mini coluna foi novamente aberta com cuidado e foram adicionados 500 μ L do tampão AW2, com cuidado para não molhar a borda, fechada e submetida à centrifugação a 20,000 xg (14,000 rpm) por 3 minutos. Depois da realização desses procedimentos, a mini coluna foi colocada em um tubo coletor limpo de 2,0mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado, a coluna foi centrifugada a 20,000 xg (14,000 rpm) por 1 minuto. O tubo contendo o filtrado foi descartado, mini coluna foi colocada em um

microtubo de 1,5 mL e, com cuidado, foram adicionados 200µL de tampão AE. A amostra foi incubada em temperatura entre 15 e 25°C por 1 minuto e centrifugada a 6000xg (8000 rpm) por 1 minuto. Após essa centrifugação a coluna foi descartada e as amostras foram acondicionadas em freezer -20°C.

3.7.2. Genotipagem

3.7.2.1. PCR

Com o objetivo de genotipar as amostras a serem analisadas, foi realizada a técnica de PCR “in House”, seguindo o método “nested” PCR descrito por Kaneko et.al. (1989a e 1989b) com algumas modificações (Pinho et.al., 1993). Os “primers” utilizados foram os da região S e da Polimerase do HBV e, essa técnica foi realizada em todas as amostras de soro e plasma que apresentaram carga viral detectável nos testes comerciais utilizados.

Para a realização da PCR “in House” foram utilizadas as amostras extraídas conforme descrito anteriormente no item 3.7.1.

3.7.2.2. “Primers”

Os “primers” utilizados na reação de amplificação da região S e Polimerase foram: HBS1F, L840 e HBS2F, 3’LAM2 (Prodimol Biotecnologia S/A, Belo Horizonte, Brasil). Os “primers” foram diluídos à concentração de 20pMoles/µL. Abaixo são apresentadas as sequências de bases nitrogenadas dos “primers” mencionados.

Região S e POL:

- HBS1F: 5´- GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC TTC – 3´.
- HBS2F: 5´- CGT GGT GGA CTT CTC TCA ATT TTC – 3´.
- L840: ACC CCA TCT TTT TGT TTT GTT AAG
- 3´LAM2: GTT TTG TTA GGG TTT AAA TG

3.7.2.3. Preparação de Desoxinucleotídeos (dNTPs)

Foram utilizados dNTPs (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil) diluídos em água ultrapura (MilliQ), na concentração de 2,5mM de dATP, de dCTP, de dGTP e de dTTP.

3.7.2.4. “Nested” PCR

3.7.2.4.1. Primeira PCR

A cada microtubo, contendo 10µL de DNA viral, obtido após extração Com kit comercial, foram adicionados 90µL da mistura da PCR. Essa mistura da PCR foi constituída por 66,5µL de água ultrapura, 10µL de Tampão 10X (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil), 6µL de dNTPs, 4µL de cloreto de magnésio (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil), 1,5µL de cada um dos “primers” HBS1F e L840, 0,5µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil). Após a adição da mistura da PCR, as amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, em termociclador, com programa específico, os quais estão representados nos quadros abaixo.

Quadro 2: Programa para amplificação da região S + Polimerase do HBV

REGIÃO S + P (1ª E 2ª PCR)		
Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	1 minuto
35	94°C	1 minuto
	56°C	1 minuto
	72°C	1 minuto
1	72°C	7 minutos

3.7.2.4.2. Segunda PCR (“Nested”)

Para a segunda PCR foram adicionadas 90µL da mistura, constituída por: 66,5µL de água ultrapura (MilliQ), 10µL de Tampão 10X (Invitrogen[®]), 6µL

de dNTPs, 4 μ L de cloreto de magnésio (Invitrogen[®]), 1,5 μ L de cada um dos “primers” HBS2F e 3LAMI2, 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]) foram adicionados 10 μ L do produto da primeira PCR. Os microtubos foram, então, levados ao termociclador utilizando programas específicos descritos no item anterior.

3.7.2.4.3. Identificação do Produto Amplificado

Após a amplificação, a identificação do produto obtido pela PCR, foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão tris-borato EDTA (TBE 0,5 X) com syber SAFE DNA gel stain (Invitrogen[®]). Para isto, foram aplicados 10 μ L do produto final da PCR misturado com 2 μ L tampão de corrida, constituído de blue juice 5%, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,1%. Além do padrão de quantificação (Low DNA Mass Ladder - INVITROGEN[®], São Paulo, Brasil), foram aplicados no gel controles positivos e negativos. As bandas foram observadas em transiluminador com luz ultravioleta e o gel foi fotografado em Sistema de Captura digital de Imagens (Imagem Acquisition and Analysis Software, UVP, INC.CA, USA). Uma cópia de cada gel foi impressa na impressora Digital Grafic Printer (UP-D890) para registro.

3.7.3. Sequenciamento

Os sequenciamentos foram realizados nas amostras em que apresentaram amplificação das regiões S e POL, como descrito anteriormente (Sanger *et.al.*, 1977), utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o “Kit” ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.7.3.1. Sequenciamento por “Cycle Sequencing”

A 2 μ L do DNA quantificado em comparação as bandas do Low DNA Mass Ladder, seguindo as instruções do fabricante (3-5ng) foram adicionados 2 μ L de “primer” HBS2F (SPF) e 3’ LAMI 2 (SPR), 4 μ L da mistura de reação do

“Kit” de sequenciamento que contém ddNTPs marcados e as enzimas AmpliTaq DNA Polimerase FS e rTth pirofosfatase, 4µL de tampão Tris-HCl (pH 9,0) e MgCl₂ 5 X e 8,0µL de água ultrapura (MilliQ) para um volume final de 20µL. As reações, as amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, em termociclador, com programa específico para a síntese da fita complementar e incorporação dos ddNTPs marcados (25 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos).

3.7.3.2. Precipitação das amostras após “cycle sequencing”, desnaturação e aplicação no gel, das amostras amplificadas.

Após a reação de “cycle sequencing”, as amostras foram precipitadas com Etanol, EDTA e Acetato de Sódio, para a retirada dos ddNTPs marcados não incorporados.

Aos 20µL de reação, foram adicionados 54µL de uma mistura contendo 2µL de EDTA 125mM, 2µL de acetato de sódio 3M e 50µL de Etanol absoluto. Os microtubos foram submetidos a agitação por inversão, 4 vezes e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos, ao abrigo da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 1650xg à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi invertida, para remoção de todo o sobrenadante e 70µL de etanol 70% foi adicionado ao precipitado. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1650xg à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o etanol foi retirado por inversão da placa e a mesma foi centrifugada invertida, apoiada em papel absorvente por 1 minuto a 185xg. A cada uma das amostras, foram adicionados 10µL de formamida HIDI (Life Technologies) e imediatamente as amostras foram denaturadas a 95°C por 5 minutos, colocadas em banho de gelo e levadas ao Sequenciador Automático ABI 3130xL (Life Technologies®).

3.7.3.3. Análise das Sequências

A classificação dos genótipos e foi realizada pela comparação do alinhamento das sequências de aminoácidos obtidas com as sequências já

conhecidas dos diferentes genótipos de HBV depositadas no Genbank. Para estas análises foram utilizados os programas EditSeq e Megalign do pacote DNASTar (Lasergene Inc., Madison, WI, EUA). A classificação dos genótipos foi confirmada pela ferramenta Genotyping disponível no site do NCBI (Rozanov *et.al.*, 2004).

3.7.4. PCR em Tempo Real

3.7.4.1. “Primers” e Sondas

Os “primers” e sondas utilizados para a padronização da PCR quantitativo em Tempo Real (TaqMan PCR) foram direcionados para as regiões S e Core do HBV e, para os testes, foram utilizados três conjuntos de “primers” e sondas. Foram escolhidas, inicialmente, três possibilidades de sequências de oligonucleotídeos, descritas por Compston *et.al.*, Drosten *et.al.*, e Aytay *et.al.*,

Inicialmente os “primers” e sondas foram ressuspendidos a uma concentração de 100 µM e, posteriormente, foi preparado um primeiro MIX 10X concentrado a partir do estoque e, no momento da reação, uma segunda MIX foi preparada em concentração adequada para cada conjunto.

Abaixo estão apresentadas as sequências de nucleotídeos dos “primers” e sondas utilizadas e as respectivas concentrações.

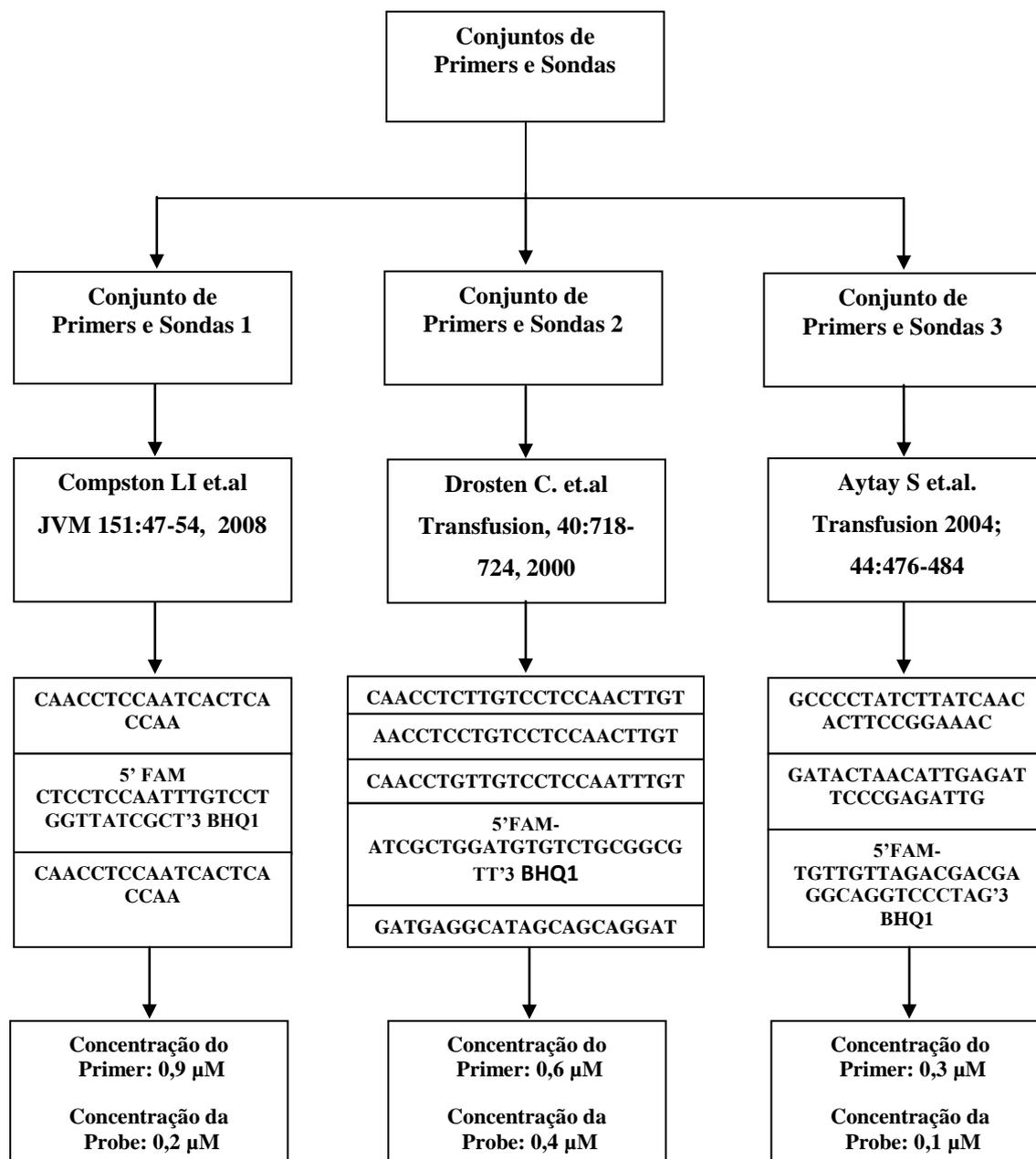


Figura 8: Conjunto de “primers” e sondas utilizadas para os testes de padronização da PCR em Tempo Real

Para a escolha do conjunto de “primers” e sondas que seriam utilizados para a padronização da PCR em tempo real, foram selecionadas 15 amostras HBV sabidamente positivas. Do total, 5 amostras haviam sido previamente genotipadas, sendo 2 amostras do genótipo A, 2 amostras do genótipo D e 1 amostra do genótipo C, porém sem a quantificação do DNA viral. As 10 amostras restantes, foram quantificadas pelo teste COBAS AMPLICOR® e

apresentavam valores de carga viral que variavam entre 70 UI/mL e 25.200 UI/mL. As 15 amostras foram processadas em triplicata e testadas com os 3 conjuntos de “primers”.

A extração do DNA do HBV foi realizada utilizando-se kit comercial Qiagen®, conforme descrito no item 3.7.1. Foi realizada a PCR convencional conforme descrito no item 3.7.2. Estas amostras então foram submetidas a PCR em Tempo Real e os resultados foram então analisados.

3.7.4.2. Curva Padrão

A quantificação da PCR em Tempo Real é feita com base em uma curva padrão externa que consiste em alíquotas de concentrações conhecidas. A amplificação e detecção da curva padrão foram realizadas paralelamente a amplificação das amostras que eram quantificadas.

A construção desta curva foi feita a partir padrão internacional da Organização Mundial de Saúde. Uma amostra com 1×10^6 UI/mL de DNA do vírus da hepatite B (HBV) foi diluída com soro negativo para hepatite B. Essas amostras foram diluídas de forma seriada, sendo as diluições de 100.000 UI/ml, 10.000 UI/ml, 1.000 UI/ml, 100 UI/ml, 10 UI/ml, 1 UI/ml, 0,1 UI/ml e soro negativo. As amostras foram extraídas e processadas em triplicata em todas as corridas da PCR em tempo real.

3.7.4.3. Reação em cadeia de Polimerase em Tempo Real - Taqman PCR

Todos os procedimentos da PCR foram realizados na Seção de Virologia no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTUSP). Para se evitar contaminação, foram tomados todos os cuidados, tais como utilização de salas separadas para a preparação do “master mix”, extração do DNA, amplificação e detecção de DNA, além do preparo do mix e extração de DNA que foram realizados em Cabine de Segurança Nível II.

A quantificação do DNA viral foi realizada empregando-se o teste da PCR quantitativo em Tempo Real (TaqMan PCR) conforme descrito por Kohmoto et.al. (2003).

Nesse trabalho foram usados 6-carboxifluoresceína (FAM) como fluoróforo e 6 tetrametilcarboxirrodamina (TAMRA) como quencher.

A reação foi realizada em um volume total de 25µL, sendo 12,5 µL do tampão TaqMan® Universal Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster Ca, USA), 5µL de água ultrapura, 2,5 µL do Mix contendo “primer” e sonda e 5µL do DNA extraído. A reação foi processada no equipamento 7300 Real time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster Ca, USA) com ciclagens de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60° por 1 minuto.

3.7.4.4. Interpretação e Quantificação das amostras

As amostras eram consideradas positivas quando a curva de amplificação exponencial cruzava o “Threshold” num ciclo e os perfis dos sinais emitidos pelos fluoróforos (repórter) e referência passiva (ROX) estivessem de acordo com os parâmetros.

3.8. Análise Estatística

A análise dos dados obtidos foi estruturada em duas partes: a reprodutibilidade do teste e a sua validade. A reprodutibilidade visa avaliar a concordância dos resultados do teste em condições idênticas, enquanto que a validade do teste diz respeito a estimar o quanto o teste expressa a verdade. Para a análise dos dados foi utilizado o programa EPEvaluator® e o SPSS.

3.8.1. Reprodutibilidade do teste

Para a análise da reprodutibilidade as medidas que utilizamos foram:

- Na análise da medida do teste na forma quantitativa, observamos a variação da medida entre indivíduos e a variação entre as medidas do mesmo indivíduo, com seus respectivos coeficientes de variação, coeficientes de correlação entre as réplicas e coeficiente de correlação intraclasse;

- Na análise da medida do teste na forma categórica (positivo e negativo), calcula-se a concordância entre as réplicas e o coeficiente Kappa, com seu respectivo intervalo de confiança.

Para o cálculo dessa medida foram utilizadas 26 amostras com diferentes valores de carga viral, testadas em triplicata e em três ensaios em dias diferentes.

3.8.2. Validade do Método

Para a realização da comparabilidade entre a metodologia padronizada e os testes comerciais disponíveis foram utilizadas análises estatísticas onde foi utilizado o coeficiente de Kappa entre os métodos e a análise de Pearson.

3.9. Sensibilidade do teste

Para a determinação da sensibilidade do teste foi utilizado um padrão internacional da Organização Mundial de Saúde, esse padrão apresenta carga viral de 1×10^6 UI/mL. Esse padrão foi diluído de forma seriada, obtendo as concentrações de 100.000 UI/ml, 10.000 UI/ml, 1.000 UI/ml, 100 UI/ml, 10 UI/ml, 1 UI/ml, 0,1 UI/ml e negativo. Nessas amostras foram realizadas três procedimentos de extração e todas as amostras foram processadas em triplicata, totalizando um total de 9 ampliações por ponto.

3.10. Especificidade do teste

Amostras negativas para a hepatite B, confirmadas por testes sorológicos para a pesquisa do Anti-HBc total e AgHBs, foram empregadas para análise da especificidade do nosso teste. Foram analisadas 52 amostras de soros, sendo que entre elas, 27 amostras eram provenientes de pacientes com sorologia HIV positiva e 25 amostras positivas para o HCV.

Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterização das amostras

A amostragem desse estudo foi constituída por 345 amostras de soro e plasma, destas 178 (51,6%) eram provenientes de pacientes do sexo masculino e 167 (48,4%) eram provenientes de pacientes do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 1 a 82 anos.

4.2. Genótipo das amostras utilizadas

Todas as amostras que apresentaram valores detectáveis de carga viral pelas técnicas de COBAS COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® HBV MONITOR® e pelo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® - 236 amostras – foram genotipadas. Foi possível caracterizar o genótipo em 217 (92%) das amostras analisadas. Os genótipos identificados foram: genótipo A (104 amostras); genótipo D (90 amostras); genótipo F (12 amostras); genótipo C (10 amostras) e genótipo G (1 amostra). O gráfico abaixo representa os resultados da caracterização genotípica do estudo.

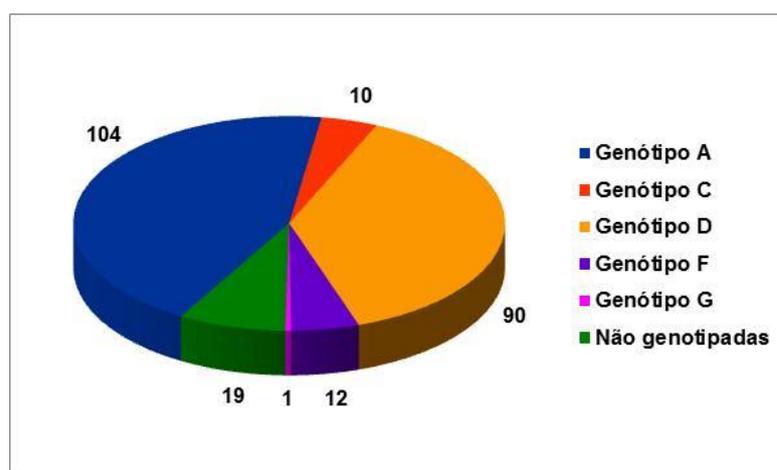


Figura 9: Distribuição dos genótipos do HBV identificados nas amostras utilizadas em nosso estudo

4.3. Escolha dos “Primers” e das Sondas

Os testes realizados com as 15 amostras para a escolha dos “primers”, e das sondas, os melhores resultados foram os obtidos com a utilização do conjunto 2, seguido do conjunto 3 e, o de menor detecção, foi o conjunto 1. O conjunto 2 (Drosten *et. al.*) identificou os 3 diferentes genótipos (2 amostras genótipo A, 2 amostras genótipo D e 1 amostra genótipo C) e, com melhor eficiência os diferentes valores de carga viral, os conjuntos 1 e 3 não conseguiram detectar amostras do genótipo A, ambos detectaram apenas as amostras do genótipo C e D.

Das 10 amostras escolhidas de forma aleatória, com valores de carga viral que variaram entre 70 a 25.200UI/mL, o conjunto de “primer” 1 detectou apenas 3 das 10 amostras, o conjunto 2 detectou 10 das 10 amostras e conjunto 3 detectou 9 das 10 amostras. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Detecção das amostras de acordo com o conjunto de “primer” e sondas

Nº Real Time	Nº da Amostra	Resultado Amplicor em UI/mL	Resultado Primer 1	Resultado Primer 2	Resultado Primer 3
1	14943	70	Indetectável	Detectável	Detectável
2	16104	212	Indetectável	Detectável	Detectável
3	16762	409	Indetectável	Detectável	Detectável
4	3585	1.150	Detectável	Detectável	Detectável
5	6987	2.570	Indetectável	Detectável	Detectável
6	3394	7.140	Indetectável	Detectável	Indetectável
7	98707	8.030	Detectável	Detectável	Detectável
8	98708	12.800	Indetectável	Detectável	Detectável
9	98711	20.400	Detectável	Detectável	Detectável
10	3883	25.200	Indetectável	Detectável	Detectável

Após a realização dos testes iniciais com as 05 amostras com genótipo conhecido, os resultados obtidos mostraram que o conjunto com melhor detecção foi o conjunto 2, seguido do conjunto 3 e o de menor detecção foi o conjunto 1.

Assim, o conjunto de “primer” escolhido para o estudo foi o 2 por ter detectado com uma melhor performance diante dos genótipos variados e por detectar as amostras com diferentes valores de carga viral.

4.4. Curva Padrão

Foram realizadas corridas para avaliação da curva padrão externa, utilizando sete diluições em cada curva, num total de 21 reações. Foi possível observar o Ct que cada uma das concentrações e a ausência de contaminação do teste pela não obtenção de sinal em nenhuma das águas adicionadas em cada corrida, nos quais não havia moléculas alvo.

Tabela 2: Resultados da Construção da curva padrão

Curva Padrão					
UI/mL	Ct 1	Ct 2	Ct 3	Média	DP
100.000 UI/mL	28,55	28,87	28,4	28,61	0,24007
10.000 UI/mL	33,4	33,48	33,26	33,38	0,11136
1.000 UI/mL	36,37	36,91	36,63	36,64	0,27006
100 UI/mL	39,48	*	*	39,48	*
10 UI/mL	*	*	*	*	*
1 UI/mL	*	*	*	*	*
0,1 UI/ml	*	*	*	*	*
Água	*	*	*	*	*

* Não detectável, Ct = Threshold cycle, DP= Desvio Padrão

A curva padrão foi construída em todos os ensaios, sempre utilizando os padrões da OMS em várias diluições, mínimas e máximas, de acordo com o descrito no capítulo “casuística e métodos”. Os padrões foram utilizados em triplicatas, para corrigir possíveis erros de pipetagens, podendo, até, excluir algum ponto fora do esperado.

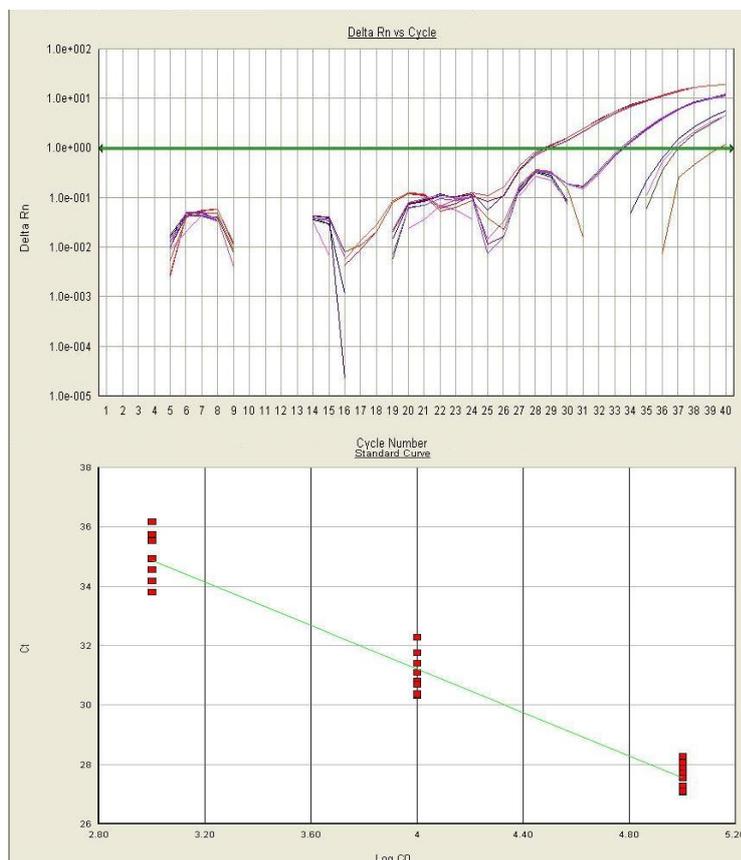


Figura10: Amplificação da curva padrão

Através do Ct obtido para cada reação, o número de UI/mL foi calculado pelo software da plataforma SDS ABI 7300® interpolando o Ct detectado em cada reação, na relação linear observada entre os Ct da curva padrão externa.

4.5. Análise dos Resultados das amostras processadas pelos kits comerciais e pelo Real Time – Indicadores de Desempenho do Teste Padronizado

4.5.1. Teste de Repetibilidade

Resultados observados na análise das 26 amostras com diferentes valores de carga viral testadas em triplicata e em três ensaios em dias diferentes (N=234).

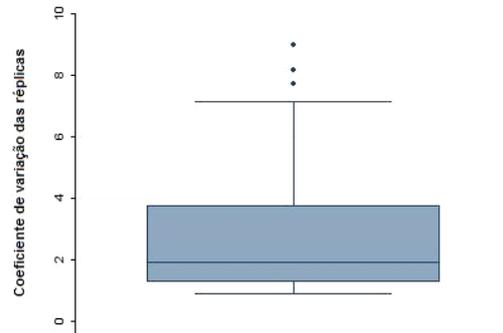
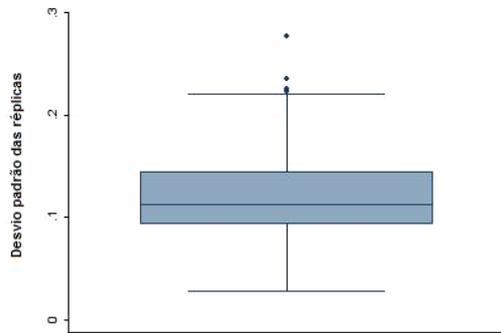
Tabela 3: Resultados do teste de Reprodutibilidade após a análise de 26 amostras de soro ou plasma, realizado em triplicatas e em dias diferentes.

Nº da amostra	Média	Média	Média	Média	DP	CV%
Real Time	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Total		
15	2,95	2,80	2,51	2,75	0,224804	8,17%
24	8,85	9,13	9,05	9,01	0,139997	1,55%
29	8,29	8,46	8,41	8,39	0,089059	1,06%
36	3,45	3,22	3,01	3,23	0,222690	6,90%
41	3,03	3,49	3,34	3,29	0,235490	7,17%
47	4,12	4,01	3,85	3,99	0,136158	3,41%
49	3,30	3,31	3,17	3,26	0,076007	2,33%
52	8,42	8,65	8,57	8,55	0,112566	1,32%
60	6,82	6,91	6,74	6,82	0,084088	1,23%
67	8,38	8,59	8,53	8,50	0,106412	1,25%
70	8,65	8,86	8,78	8,76	0,106277	1,21%
73	3,61	3,73	3,47	3,60	0,133094	3,69%
76	4,34	4,23	4,12	4,23	0,110777	2,62%
80	3,91	3,96	3,63	3,83	0,179675	4,69%
85	3,11	2,98	2,88	2,99	0,112976	3,78%
91	3,40	2,90	2,95	3,09	0,277211	8,98%
97	8,74	8,88	8,93	8,85	0,096687	1,09%
109	4,37	4,27	4,21	4,28	0,082620	1,93%
110	4,45	4,49	4,30	4,42	0,098887	2,24%
115	3,09	2,82	2,66	2,86	0,220767	7,72%
121	3,13	3,11	3,08	3,11	0,027903	0,90%
123	8,66	8,89	8,86	8,81	0,124552	1,41%
125	8,03	8,20	8,17	8,14	0,093246	1,15%
130	3,39	3,35	3,28	3,34	0,053025	1,59%
134	8,74	9,02	8,94	8,90	0,144338	1,62%
138	5,26	3,17	3,34	3,93	1,159088	29,53%

Tabela 4: Valores médios e desvio padrão das medidas do teste real time PCR para HBV após os resultados dos testes de reprodutibilidade

Réplicas	Medida 2	Medida 3
Medida 1	$r = 0.985 (0.000)$ ICC = 0.983 (0.970 – 0.996)	$r = 0.989 (0.000)$ ICC = 0.984 (0.972 – 0.996)
Medida 2	-	$r = 0.999 (0.000)$ ICC = 0.998 (0.997 – 0.999)

ICC: Coeficiente de correlação intraclassa
r = coeficiente de correlação de Pearson



Análise de 26 amostras em trêplicas

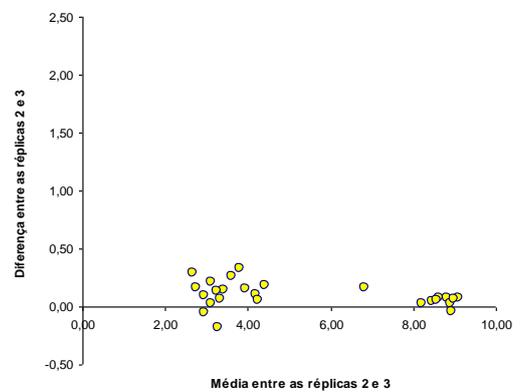
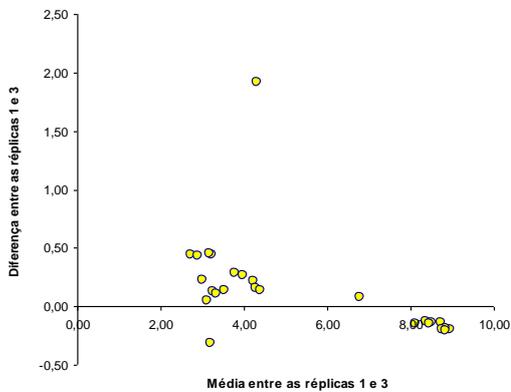
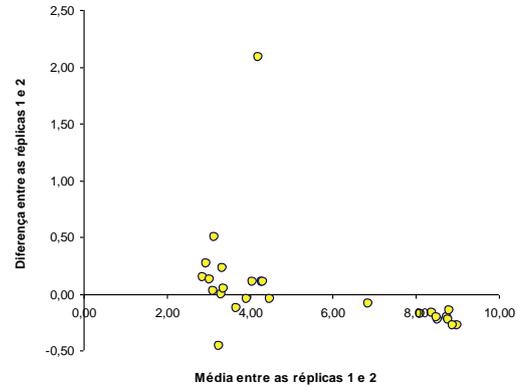
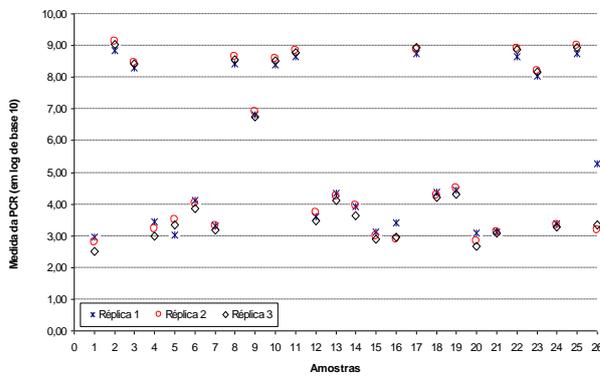


Figura 11: Representação da variabilidade entre réplicas

4.5.2. Validade do Teste

Para a análise de validade e reprodutibilidade do teste PCR em tempo real foram comparados seus resultados com os kits Amplicor e TaqMan. Quando comparamos os resultados obtidos entre o testes PCR e COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® , as medidas apresentadas no EP Evaluator® mostram uma forte correlação, igual a 0,977 e significativa ($p = 0,000$), e erros que se distribuem em torno de zero, o que comprova uma ótima concordância entre os testes PCR e COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® . Outro indício de excelente concordância é a quase superposição da linha de regressão (linha vermelha do scatter plot) com a linha correspondente a uma concordância perfeita (linha preta tracejada do scatter plot), o que corresponde a um coeficiente de regressão próximo de 1 (o coeficiente de regressão do modelo correspondente a inclinação da reta foi igual a 1,018 (0,983 – 1,052)).

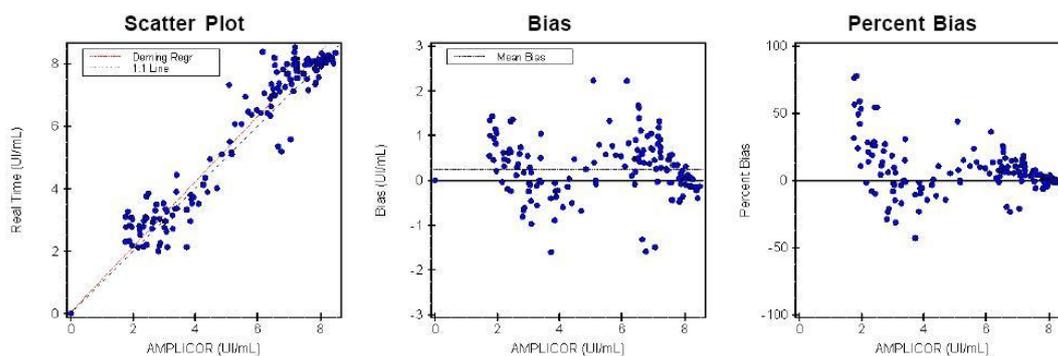


Figura 12: Avaliação da validade do teste PCR em tempo real tendo como teste ouro o COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®

Quando comparando os testes obtivemos um índice de Kappa de 100%, com 100% de concordância entre os resultados positivos e negativos.

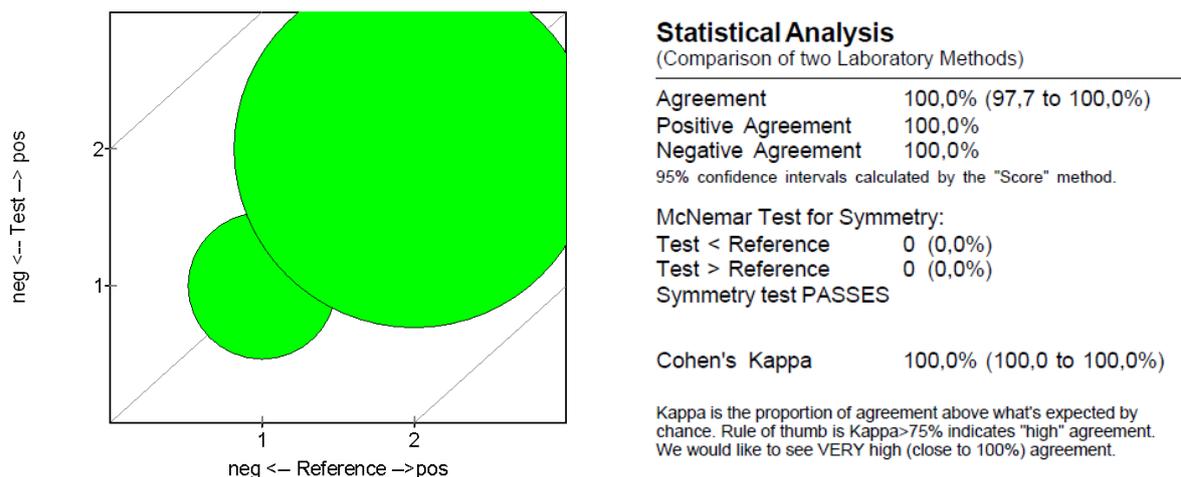


Figura 13: Análise da validade do teste PCR em tempo real tendo como teste ouro o COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®

Resultado semelhante foi observado quando comparado com o kit da COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®, onde a correlação entre as medidas foi significativa igual a 0,96 ($p = <0,001$), e coeficiente de regressão próximo de um (0,913).

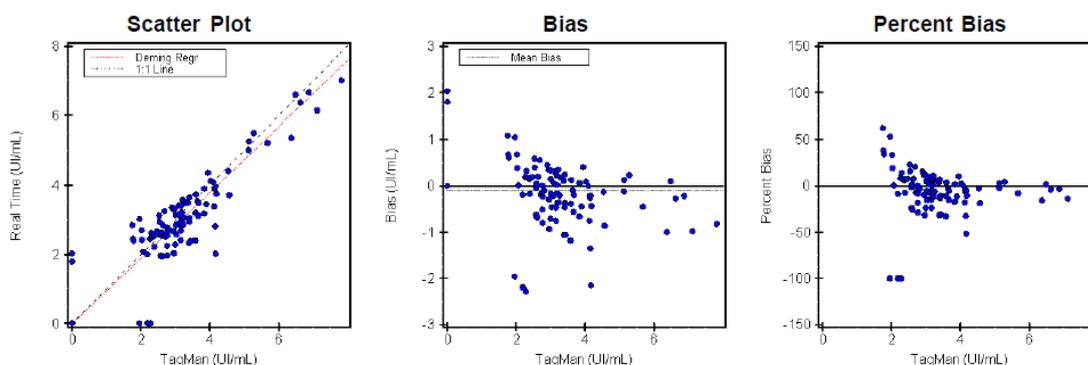


Figura 14: Avaliação da validade do teste PCR em tempo real tendo como teste ouro o COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®

Em 97,2% dos casos houve concordância dos resultados com um kappa igual a 94,4%. Tanto a sensibilidade quanto a especificidade assumiram valores acima de 96%, comprovando excelente acurácia do teste PCR nas duas comparações feitas.

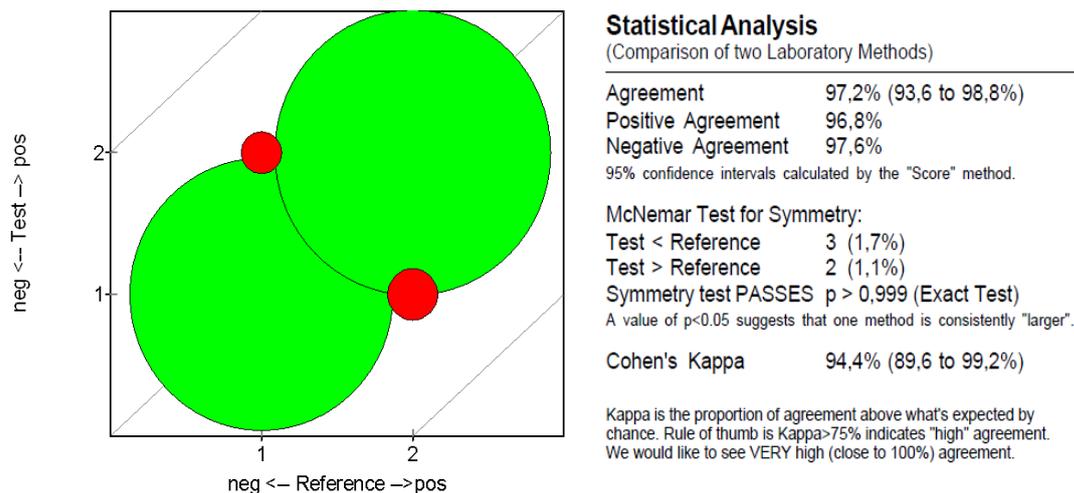


Figura 15: Análise da validade do teste PCR em tempo real tendo como teste ouro e COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®

Tabela 5: Acurácia do teste PCR em Tempo Real em relação aos kits COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®.

PCR	COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®	COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®
Coeficiente de correlação de Pearson	0.977 (p<0.001)	0.960 (p<0.001)
Coeficientes de regressão (Slope)	1.018 (0.983 – 1.052)	0.913 (0.874 – 0.953)
Concordância (%)	100% (97.7% – 100%)	97.2% (93.6% - 98.8%)
Índice Kappa	100% (100% – 100%)	94.4% (89.6% - 99.2%)
Sensibilidade	100% (100% – 100%)	96.8% (93.2% - 100%)
Especificidade	100% (100% – 100%)	97.7% (94.4% - 100%)
Valor preditivo positivo	100% (100% – 100%)	97.8% (94.9% - 100%)
Valor preditivo negativo	100% (100% – 100%)	96.5% (92.6% - 100%)

Tabela 6: Validação do teste PCR em Tempo Real em relação aos kits COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®

PCR	COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®		COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Positivo	142	0	91	2
Negativo	0	24	3	83
Total	142	24	94	85

As curvas ROC na avaliação do teste PCR em relação aos kits COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e pelo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

comprovam a acurácia do PCR, onde a área sob a curva (estatística C) quando comparada a Amplicor foi de 0,984 e quando comparado ao TaqMan igual 0,9688, medidas estas muito próximas de 1, o que seria a condição perfeita de diagnóstico do teste analisado, ou seja, 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

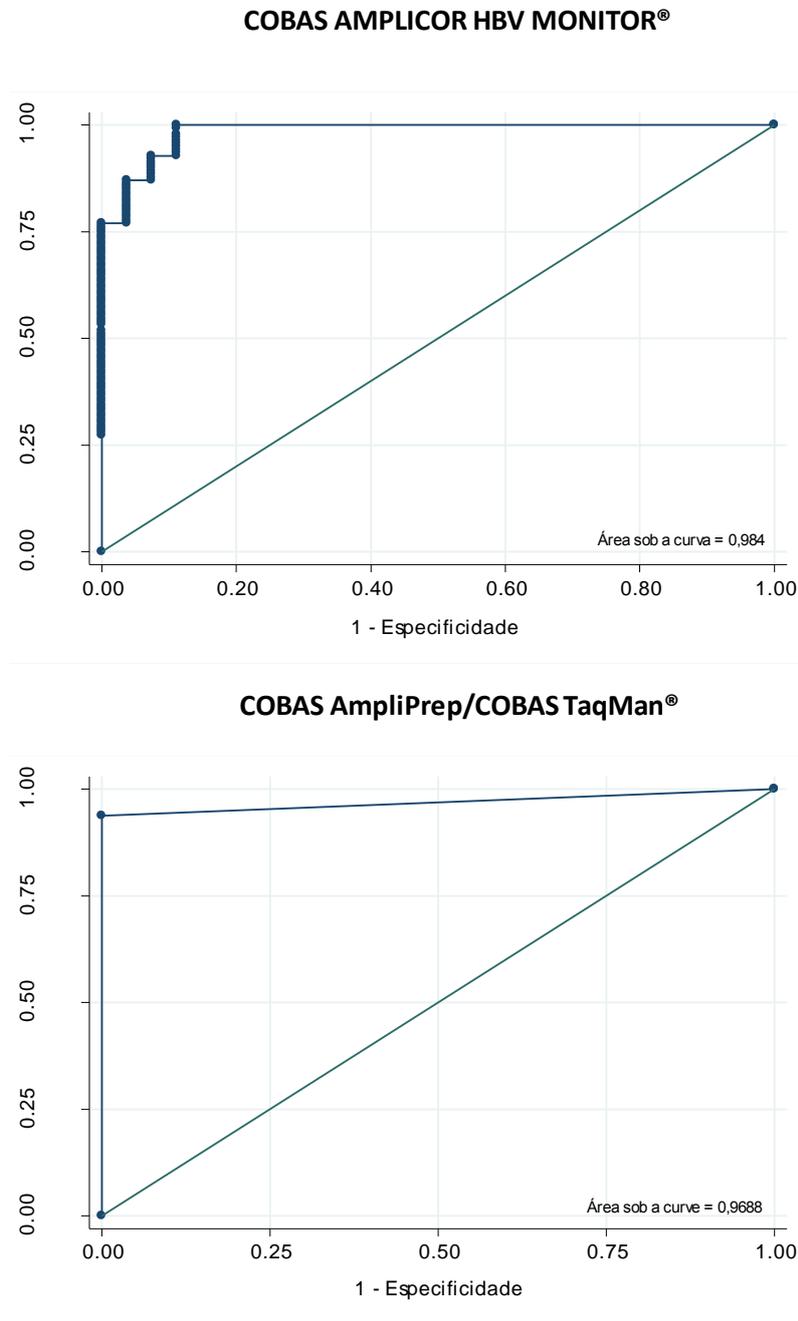


Figura 16: Curva ROC da avaliação do PCR em Tempo Real quando relacionado aos kits COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®

4.5.3. Teste de Especificidade

Foram realizadas sorologias para Anti-HBc total e AgHBs em quarenta e nove amostra HIV positivas e quarenta amostras HCV positivas, destas 27 amostras HIV positivas apresentaram sorologia negativa para HBV e 25 amostras HCV positivas apresentaram sorologia negativa para HBV. Todas as amostras que apresentaram sorologia negativa foram extraídas e processadas por PCR em tempo real para hepatite B e todas as amostras testadas apresentaram resultados negativo demonstrando 100% de especificidade, nenhuma amostra apresentou reação cruzada frente ao HBV.

Discussão

5. Discussão

O desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico tem importância fundamental no controle epidemiológico e clínico do HBV. Os testes moleculares são empregados largamente na atualidade como ferramentas de acompanhamento da doença, auxílio no planejamento e acompanhamento terapêutico. Ensaio de DNA confiáveis e mais baratos são muito importantes para o controle e tratamento de infecção pelo HBV em países de baixa renda.

Nesse estudo foram avaliadas amostras de pacientes provenientes da rede pública de saúde do estado de São Paulo, onde a maioria dos pacientes eram adultos. As amostras foram escolhidas aleatoriamente e o grupo foi dividido entre homens e mulheres.

A genotipagem do HBV é uma ferramenta importante para o prognóstico da evolução da doença e tratamento. Além de ser importante para a compreensão da evolução e epidemiologia do vírus, uma vez que os genótipos variam de acordo com a região geográfica e muitas vezes correlacionadas com fatores de risco.

O objetivo principal da identificação dos genótipos na casuística foi verificar a eficiência do teste na detecção dos diferentes genótipos do HBV, uma vez que os kits comerciais disponíveis são produzidos em países europeus, onde os genótipos circulantes são diferentes dos encontrados na nossa população. Como esperado, os genótipos mais prevalente na população estudada foram os genótipos A e D e estes resultados coincidem com os estudos sobre a prevalência de genótipos no Brasil. Nesse estudo, foi identificada, também, uma cepa do genótipo G, que não é frequente na nossa população e, esse resultado, nos possibilitou, também, avaliar o nosso teste frente a uma cepa de genótipo raro em nosso meio. A cepa viral do genótipo G era proveniente de uma paciente HIV positiva, esse resultado é semelhante ao encontrado por Silva *et.al.*, (2010). Estudos realizados por Bottecchia *et.al.*(2008) demonstrou que pacientes com HBV genótipo G apresentaram mutações a lamivudina e mostrou grandes variações genéticas entre as amostras, esse dado demonstra a importância da circulação do genótipo G no Brasil para o tratamento do HBV. No entanto, dados epidemiológicos e clínicos

ainda são limitados, provavelmente devido à baixa ocorrência em todo o mundo. Os genótipos A e D são os mais prevalentes no mundo todo, inclusive no Brasil, enquanto que o genótipo F é um genótipo prevalente nas Américas e, o genótipo C é característico da população de etnia oriental, também bastante frequente na população do Estado de São Paulo devido ao grande número de orientais. Compri *et.al.*, (2012) encontraram os genótipo A, D e C em crianças, adolescentes e seus familiares no estado de São Paulo. Moraes *et.al.*, (1996) encontraram os genótipos A, D e F no Rio de Janeiro. Estes mesmos genótipos também foram descritos em populações de Goiânia e Santa Catarina. (Teles *et.al.*, 1999; Carrilho *et.al.*, 2001; Viana *et.al.*, 2005).

Inicialmente, identificamos na literatura sequencias de “primers” e sondas que haviam mostrado bom desempenho nos testes padronizados. Selecionamos os três pares de “primers” e testamos os conjuntos nas mesmas condições e utilizando as mesmas amostras. As amostras foram caracterizadas de acordo com a carga viral, pois deveríamos utilizar reagentes que possibilitassem a detecção de amostras independente dos valores de carga viral e, também, que fosse capaz de identificar amostras de todos os genótipos.

O conjunto de “primer” escolhido para o estudo foi o Drosten por ter detectado com melhor desempenho diante dos genótipos variados e por detectar as amostras com diferentes valores de carga viral. Drosten (2000), já havia demonstrado a eficiência do teste. A técnica de PCR em tempo real proporciona sensibilidade suficiente para a utilização do teste em bancos de sangue e é útil na rotina de laboratório clínico devido à facilidade de manuseio.

No trabalho utilizamos a técnica TaqMan e não Syber devido a ser mais específica e ocorrer menos interferência no material. (Simpson *et.al.*, 2000; Rodríguez-Lázaro 2013).

Todos os testes quantitativos devem ser acompanhados de uma curva padrão, sendo fundamental para a padronização da técnica de PCR em tempo real e para a calibração dos testes, determinando o número de ciclos a serem utilizados, a concentração de “primers”, a determinação do ponto de corte (ct – threshold cycle). O ct é menor quanto maior for a carga viral inicial. A acurácia da curva padrão é melhor quando se utiliza um padrão da OMS, escolhido para a utilização em nosso estudo.

Analisando a figura 10, podemos observar que, no início da reação, ocorrem “ruídos”, devido ao excesso de reagentes livres. A determinação do c_t possibilita verificar o ciclo inicial (Ciclo 28), quando detectamos a maior concentração do DNA presente em nosso padrão e, além disso, nos permitiu verificar qual o c_t para a detecção das amostras com carga viral baixa. Observamos, também, excelente reprodutibilidade nos testes, pois, como as reações foram feitas em triplicatas, podemos verificar a superposição dos valores, indicando elevada concordância entre as leituras. A reta obtida corrobora com essa afirmação.

Assim, como acontece com muitos outros testes de PCR em tempo real, em nosso teste não foi utilizado nenhum controle interno. Controles internos podem compensar as diferenças na eficiência de extração de DNA entre amostras, e inibição da PCR devido à mistura de reação. A normalização da reação foi realizada com o padrão de referência internacional, o que apresenta ampla aceitação do ensaio. A comparação com outros ensaios comercialmente disponíveis, tais como o COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® foram úteis para avaliar o desempenho clínico do ensaio PCR em tempo real.

As análises mostram uma ótima repetibilidade do teste PCR em tempo real, com uma baixa variabilidade média entre réplicas, o que era esperado em relação a dois testes medindo uma mesma grandeza nas mesmas amostras biológicas. As análises de repetibilidade são importantes para a validação do ensaio para verificar se ocorre a variação dependendo do dia da análise.

Observando graficamente a figura 11, verifica-se que a variabilidade entre as réplicas foi pequena, assim como as diferenças entre medidas em sua maioria foi em torno de zero, com a ocorrência de apenas uma observação destoante. Essa avaliação é importante para que se possa verificar possíveis erros de pipetagem.

Comparado com o teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®, este ensaio tem eficácia equivalente a um custo reduzido. Os resultados para as amostras clínicas obtidas com os testes de PCR em tempo real e COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® foram concordantes. As medidas apresentadas no EP Evaluator® mostram uma forte correlação e erros que se distribuem em

torno de zero, o que comprova ótima concordância entre os testes PCR e COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®. Outra demonstração de excelente concordância, é a quase superposição da linha de regressão (linha vermelha do scatter plot) com a linha correspondente a uma concordância perfeita (linha preta tracejada do scatter plot), o que corresponde a um coeficiente de regressão próximo de 1. Estudo de comparação realizado por Shi et.al.(2009), encontrou uma alta correlação entre o teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e a PCR em tempo real, no estudo realizado na China foram utilizadas 118 amostras no qual encontraram um índice de correlação de 0,948 e $p < 0,001$.

Resultado semelhante foi observado quando comparado com o kit da COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan®, onde a correlação entre as medidas foi significativa e coeficiente de regressão próximo de 1. Na grande maioria dos casos houve concordância dos resultados. Tanto a sensibilidade quanto à especificidade assumiram valores acima de 96%, comprovando excelente acurácia do teste PCR nas duas comparações feitas.

As tabelas 5 e 6 demonstram a eficácia do nosso teste, quando comparamos o resultado do PCR em Tempo Real com o do AMPLICOR HBV MONITOR® o teste apresenta um alto Valor Preditivo Positivo e Negativo, quando comparamos com o kit COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan® o PCR em Tempo Real apresenta alto Valor Preditivo Positivo Negativo.

A análise de curvas ROC tem larga aplicação ao nível da investigação clínica, nomeadamente, quando se pretende analisar se uma dada variável numérica discrimina com exatidão uma dada doença. É uma situação de investigação em tudo muito semelhante à análise da validade de um teste diagnóstico, caracterizada pelo cruzamento dos valores obtidos do teste diagnóstico com outro teste *goldstandard* que indica se o indivíduo é doente ou não doente, as curvas ROC na avaliação do teste PCR em relação aos kits COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® e COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan® comprovam a acurácia do PCR, onde a área sob a curva (estatística C) quando comparada a COBAS AMPLICOR HBV MONITOR® foi de 0,984 e quando comparado ao COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan® foi igual 0,9688, medidas

estas muito próximas de 1, o que seria a condição perfeita de diagnóstico do teste analisado, ou seja, 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Para a quantificação do DNA do HBV, há uma variedade de ensaios comerciais disponíveis, que são utilizados rotineiramente em laboratórios de diagnóstico. A maioria dos ensaios quantitativos comerciais tem um limite superior de detecção limitado. Assim, amostras clínicas precisam ser diluídas e novamente testadas para obter a carga viral exata. Este PCR em tempo real "in-house" apresenta uma detecção de aproximadamente 10^8 IU/mL e, portanto, as amostras não necessitam de diluição e, portanto não precisam ser novamente testadas novamente. A detecção de carga viral de aproximadamente 10^8 IU/mL também foi encontrada em outros trabalhos (Daniel *et.al.*, 2010). Além dessa limitação a maioria dos kits comerciais disponíveis é produzida na Europa e devido aos genótipos presentes nessa região serem diferentes dos que circulam em nosso meio é necessário o desenvolvimento de técnicas que possam detectar com eficiência os genótipos circulantes em nosso país.

Os testes disponíveis utilizam um volume de amostra de 1mL, enquanto que para os teste de PCR em tempo real foi utilizado apenas 200 μ L de amostra para extração, o que pode minimizar os riscos na coleta de amostra para o paciente e diminuir o número de amostras rejeitadas devido ao volume de ser insuficiente.

Uma grande aplicação desse teste será a utilização do teste em pacientes atendidos pelo SUS, provenientes de centros de referência e que necessitam desta avaliação. Isso possibilitará a troca de drogas disponíveis, interrupção no momento adequado do tratamento, o que auxilia não só o médico na interpretação clínica, mas, principalmente o paciente que se beneficiará com a inclusão de novos tratamentos.

O método desenvolvido tem um valor agregado ao possibilitar uma redução nos custos menor que o kit comercial, além da redução no tempo de execução do teste (tempo médio de realização – incluindo extração - 4 horas).

Com a implantação desse método no laboratório de hepatites será possível a realização de projetos de pesquisa de interesse clínico, epidemiológico, de saúde pública e estará apto a atender demanda de

diagnóstico para a hepatite B de pacientes provenientes dos centros de referência do Estado de São Paulo.

Visando a qualidade dos resultados, apesar da técnica de PCR em Tempo real ser de fácil execução, é necessário que o laboratório que execute esta técnica tenha um programa de garantia da qualidade que contemple todos os sistemas analíticos em todas as respectivas fases analíticas. Como também, o programa deve ser capaz de detectar problemas e identificar oportunidades de melhoria. Neste contexto, o supervisor, coordenador ou responsável técnico deve ter tido treinamento, experiência e especialização na área. Os profissionais que executam as técnicas devem ter nível superior e experiência comprovada na execução de técnicas de biologia molecular e devem atuar sob supervisão direta de um profissional qualificado. É importante também haver um programa de educação continuada para toda a equipe garantindo assim ótimos resultados.

Conclusões

6. Conclusões

1. A técnica padronizada apresentou resultados satisfatórios quando comparada com o método comercial utilizado, foi possível identificar amostras com valores baixos de carga viral e detectou amostras de genótipos variados.
2. A técnica padronizada apresentou um custo menor quando comparamos com o custo dos kits comerciais.
3. Considerando-se a sensibilidade analítica, precisão, especificidade e ampla faixa de detecção quantitativa oferecida pelo ensaio desenvolvido neste projeto, conclui-se que o mesmo atingiu seu objetivo, sendo o teste padronizado de alta qualidade podendo assim ser utilizado na rotina diagnóstica.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Alcade R; Melo FL; Nishiya A; Ferreira, S C; Langhi Junior M D; Fernandes S S; Marcondes L A; Duarte A J S; Casseb J. Distribution of hepatitis B virus genotypes and viral load levels in Brazilian chronically infected patients in Sao Paulo city. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 51 (5): 269-272, Setembro-Outubro, 2009.
- Aliyu, S.H.; Aliyu, M.H.; Salihu, H.M.; Parmar, S.; Jadal, H.; Curran, M.D. Rapid detection and quantitation of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using a new fluorescent (FRET) detection system. *Journal of Clinical Virology*, 30, 191-195, 2004.
- Alter M.J. Epidemiology and Prevetion of Hepatitis B. *Seminars in Liver Disease*, volume 23, number 1, 2003.
- Alvarado-Mora MV, Botelho L, Gomes-Gouvêa MS, de Souza VF, Nascimento MC, Pannuti CS, Carrilho FJ, Pinho JR. Detection of Hepatitis B virus subgenotype A1 in a Quilombo community from Maranhão, Brazil. *Virol J.*; 8: 415, 2011.
- Aytay S, Ohagen A, Busch MR, Alford B, Chapman JR, Lazo A. Development of a sensitive PCR Inhibition method to demonstrate HBV nucleic acid inactivation. *Tranfusion.* Volume 44, April, 2004.
- Barros-Junior GM, Braga WSM, Oliveira CMC, Castilho MC, Araújo JR. Hepatite crônica B oculta: prevalência e aspectos clínicos em população de elevada endemicidade de infecção pelo vírus da hepatite B na Amazônia ocidental brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop.*; 41:596-601, 2008.
- Becker CE, Mattos AA, Bogo MR, Branco F, Sitnik R, Kretzmann NA. Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, south of Brazil. *Arq. Gastroenterol.* vol.47 no.1 São Paulo Jan./Mar, 2010.

- Blaine HF, Bell B, Levy-Bruhl D, Shouval D, Wiersma S, Van Damme P. Hepatitis A and B vaccination and public health. *J Viral Hepat*;14(Suppl 1):1—5, 2007.
- Bottecchia M, Souto FJ, O KM, Amendola M, Brandão CE, Niel C, Gomes SA. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. *BMC Microbiol* 22: 8-11, 2008.
- Brandão-Mello, C. E. História natural da infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) em Indivíduos Imunocompetentes e Imunodeficientes. In: Araujo, E. S. A. de (Ed.), 2008, *O ABC das Hepatites: manual clínico para o manuseio e prevenção da Hepatite B*. São Paulo: Bristol-Myers Squibb. p. 38-64., 2008.
- Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F. Hepatitis B virus mutants. *Intervirology* 42: 69–80, 1999.
- Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JRR, Moreira RC, Bertolini DA, Mello IM et.al. Hepatitis B virus infection in haemodialysis centers from Santa Catarina State, Southern Brazil: predictive factors for infection and molecular epidemiology. *Hepatology*; 34(Pt.4): 612^a, 2001.
- Casey J. Hepatitis D virus. In: Schiff E, Hoofnagle JH (Editors). *Update on Viral Hepatitis*. AASLD Postgraduate Course pp: 83-87. 2000.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/PDFs/HBV_figure3map_08-27-08.pdf, 2006. Acessado em: 26/05/2012.
- Centers for Disease Control and Prevention Update: expanded availability of thimerosal preservative: free hepatitis B vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*; 49:642-51, 2000.
- Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 12. ed. Washington DC: Public Health Foundation, 2011.

- Centro Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hepatite/hepa_graficos.htm, 2012 Acessado em: 27/05/2012.
- Centro Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Guia de Vigilância Epidemiológica – São Paulo CVE, 2012.
- Compri AP, Miura I, Porta G, Lemos MF, Saraceni CP, Moreira RC. Hepatitis B virus infection in children, adolescents, and their relatives: genotype distribution and precore and core gene mutations. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.45 no.3 Uberaba May/June, 2012.
- Compston LI; Sarkobie F; Chengyao, L & Candotti, D. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of latent and persistent viral genomes in cellular or plasma blood fractions. J Virol Methods, 15: 47-54, 2008.
- Coser T.B.; Chesky M.; Paris, F.; Barth A.L.; Schmitt V.M.; Machado, A.B.M.P.. Rev HCPA. 28 (1), 5-9, 2008.
- Costa CA e Kimura LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus among the indigenous population of the Curuçá and Itaquai Rivers, Javari Valley, State of Amazonas, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 45(4):457-462, Jul-Aug, 2012
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen- associated hepatitis. Lancet; 1(7649): 695-8, 1970.
- Daniel HDJ, Fletcher JG, Chandy GM, Abraham P. Quantitation of hepatitis B virus DNA in plasma using a sensitive cost-effective "in-house" real-time PCR assay. Indian Journal of Medical Microbiology. Vol. 27 (2), pag. 111-115, 2009.

- David Rodríguez-Lázaro and Marta Hernández. Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Curr. Issues Mol. Biol.* 15: 25-38. *Curr Issues Mol Biol.* Mar 19;15(2):25-38, 2013.
- Drosten C, Weber M, Seifried E, Roth WK. Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening. *Tranfusion.* Volume 40, June, 2000.
- Duarte CAB. Detecção e quantificação do vírus da hepatite c através de RT-PCR em tempo-real [Tese]. Universidade Federal do Paraná, 2006.
- Fattovich G. Natural History and Prognosis of Hepatitis B. *Seminars in Liver Disease.* Volume 23. Number 1, Pág. 47-58. 2003.
- Ferreira MS, Borges AS. Avanços no tratamento da hepatite pelo vírus B. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(4):451-462, jul-ago, 2007.
- Ferreira, M. S. Diagnóstico e Tratamento da Hepatite B. *R. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília,* v. 33, n. 4, p. 389-400, jul./ago. 2000.
- Ferreira, M. S.; Borges, A. S. Avanços no Tratamento da Hepatite pelo Vírus B. *R. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília,* v. 40, n. 4, p. 451-62, jul./ago. 2007.
- Ferreira, M.S. Diagnóstico e Tratamento da hepatite B. *Ver. Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 33 (4): 389-400, jul-ago, 2000.
- Fonseca JCF. Histórico das Hepatites Virais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.43 no.3 Uberaba May/June, 2010.
- Fonseca, J. C. F. História Natural da Hepatite B Crônica. *R. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília,* v. 40, n. 6, p. 672-677, nov./dez. 2007.

- Freitas J. Hepatites Víricas: Perspectiva histórica. Acessado no site <http://www.aidsportugal.com/hepatitte>, em 23 de Abril de 2009.
- Galli, C; Orlandini,E; Penzo,L; Badiale, R; Caltran, G; Valverde,S & Gessoni, G. What is the role of serology for the study of chronic hepatitis B virus infection in the age of molecular biology. *J Med Virol*, 80: 974-79, 2008.
- Ganem D, Schneider RJ. Hepadnaviridae and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 2703-2737, 2001.
- Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol* 2005;34:1329—39, 2005.
- Gomes SA. Genoma Viral. In: Focaccia R. *Tratado de hepatites Virais*. São Paulo, Atheneu;. p. 107-113, 2007.
- Guang-Wen Cao. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol*. December 14; 15(46): 5761–5769, 2009.
- Hepatites virais no Brasil: situação, ações e agenda Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde. 2011.
- Hyams KC. Risk of chronicity following acute hepatitis B virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 20:992–1000, 1995.
- Ito K, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Bekku D, et.al. Risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Scand J Gastroenterol* 45: 243–249, 2010.

- Jia-Horng Kao. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. *Korean J Intern Med.* September; 26(3): 255–261, 2011.
- Kalantari H, Davari M, Akbari M, Hejazi SM, Kalantari M, Zakerin S, Shahshahan Z. The Estimation of Direct Medical Costs of Treating Patients With Chronic Hepatitis B and C in Iran. *Int J Prev Med.* March; 3(3): 191–196, 2012.
- Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol* 1989a; 27(9): 1930-3.
- Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N, Purcell RH. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989b; 86(1),312-6.
- Kesler, H.H. Comparison of currently available assays for detection of hepatitis B virus DNA in routine diagnostic laboratory. *Expert Rev. Diagn.* 5(4), 531-536, 2005.
- Khouro, M.E.; Santos, V.A. Hepatitis B: epidemiological, immunological, and serological considerations emphasizing mutation. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo* 59(4), 216-224, 2004.
- Koziel MJ. The immunopathogenesis of HBV infection. *Antivir Ther* 3: 13–24., 1998.
- Lai, C.L.; Ratziu, V.; Yuen, M.; Poynard, T. Viral hepatitis B. *The Lancet.* 362, 2089-2094, 2003.
- Liang TJ. The molecular virology of hepatitis B virus. In: Schiff E, Hoofnagle JH (Editors). *Update on Viral Hepatitis. AASLD Postgraduate Course* p. 78-82, 2000.

- Liberto MIM, Oliveira BCEPD, Cabral MC. Hepatites Virais. In: Santos NSL, Romanos MTV, Wigg MD. Introdução a Virologia Humana. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: p. 135-155, 2002.
- Lin CL, Kao JH, Chen BF, Lai MY, Chen DS. Application of hepatitis B virus genotyping and phylogenetic analysis in intrafamilial transmission of hepatitis B virus. *Clin Infect Dis*; 41: 1576-81, 2005.
- Lin KW, Kirchner JT. Hepatitis B. *Am Fam Physician*; 69: 75-82, 2004.
- Lok ASF, Chan HLY. Viral hepatitis B and D. In: O'Grady, J.C.; Lake JR, Howdle PD (Editors). *Comprehensive Clinical Hepatology*. Hartcourt publishers limited, London, UK, 2000.
- Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *AASLD Practice Guidelines*; p. 1-25, 2003.
- Lok, A. S. F; Macmahon, B. J. Chronic Hepatitis B. *Hepatology*., Baltimore, v. 45, n. 2, p. 507-539, Jan. 2007.
- Lopes TGS; Schinoni MS. Aspectos gerais da hepatite B R. *Ci. med. biol.*, Salvador, v.10, n.3, p.337-344, set./dez. 2011
- Lu,YQ; Han,JX; QI,P; Xu, W; Zu,YH & Zhu,BO Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real time PCR using efficient TaqMan probe and extraction of virus DNA . *World J Gastroenterol*, 12(45): 7365-70, 2006.
- Lurman A. Eine icterus Epidemic. *Berlin Klin. Wochenschr* 1855; 22: 20-3. Mac Callum FO, Bauer DJ. Homologous serum hepatitis. *Lancet* ii; 691-2, 1947.
- Madani TA. Trend in incidence of hepatitis B virus infection during a decade of universal childhood hepatitis B vaccination in Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 101:278—83, 2007.
- Mahoney FJ. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(2):351, 1999.

- McMahon BJ, Alward WLM, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, Maynard JE. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development development of the carrier state. *J. Infect. Dis.* 151:599–603, 1985.
- Mello CEB, Mendes CGF, Pernambuco CD. Diagnóstico imunossorológico das Hepatites virais. In: *Gastroenterologia Hepatites*. José Galvão Alves. 1ªed. Editora Rubio.. p: 13-42, 2001.
- Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, Saraiva JC, Virgolino HA, Motta-Castro AR, Melo MM, Martins RM, Gomes SA. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol* 7: 103, 2007.
- Ministério da Saúde. Manual CRIE. 3º Edição, 2006.
- Ministério da Saúde. Estudo de Prevalência de Base Populacional das Infecções pelos Vírus das Hepatites A, B e C nas Capitais do Brasil, 2010. Disponível em: http://www.aids.gov.br/publicacao/2010/estudo_de_prevalencia_de_base_populacional_das_infecoes_pelos_virus_das_hepatites_b. Acessado em: 24/05/2012.
- Ministério da Saúde. Hepatite Viral Crônica C. Protocolos Clínicos e Diretrizes terapêuticas. Secretaria de Assistência à Saúde Departamento de Sistemas e Redes Assistenciais. Extraído na íntegra da Portaria SAS/MS nº 863, de 04 de novembro de 2002.
- Ministério da Saúde. Hepatites virais. O Brasil está atento. Brasília-DF. 3º edição. 2008.
- Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o tratamento da Hepatite viral crônica B e Coinfecção. Brasília-DF. 2011.

- Moraes MT, Gomes AS, Niel C. Sequence analysis of the pre-S/S gene of hepatitis B virus strains genotypes A, D and F isolated in Brazil. *Arch Virol*; 114: 1767-73, 1996
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y et.al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*; 69: 2575-83, 1988.
- Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang*; 15 (5): 374-85, 1968.
- Osti C, Marcondes-Machado J. Vírus da hepatite B: avaliação da resposta sorológica à vacina em funcionários de limpeza de hospital-escola. *Ciênc. saúde coletiva vol.15 supl.1 Rio de Janeiro. June 2010.*
- Paraná R, Almeida D. HBV epidemiology in Latin América. *J Clin Virol*; S130-S133, 2005.
- Pinho JRR, Santos CA, Gonzales CLM, Bassit L, Barreto CC, Sáez-Alquezar H et.al. Detection of hepatitis B virus DNA by the polymerase chain reaction in anti-HBe positive chronic hepatitis B patients. *Rev Inst Trop São Paulo 1993; 35(6): 515-20.*
- Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 60 (3): 814-21, 1968.
- Pylsopoulos, N. T. Hepatitis B. *Medscape Reference*. 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/177632-overview>>. Acessado em: 02 abri. 2012
- Ranger-Rogez S, Denis F. Hepatitis B mother to child transmission. *Expert Rev. Anti-infective Ther*; 2(1): 133-45, 2004

- Ranjbar R, Davari A, Izadi M, Jonaidi N, Alavian SM. HIV/HBV Co-Infections: Epidemiology, Natural History, and Treatment: A Review Article. *Iran Red Crescent Med J*; 13(12):855-862, 2011
- Reuben A. Landmarks in hepatology: the thin red line. *Hepatol* 2002; 36:770-773.
- Sablon E; & Shapiro F; Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *Internacional J Med Sci*, 2: 8-12, 2005.
- Sánchez LV, Tanaka Y, Maldonado M, Mizokami M, Panduro A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of Mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. *Intervirology* 50: 9-15, 2007.
- Sanger F, Nichlen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74:5463-5
- Secretaria de Estado da Saúde São Paulo. Guia de orientações Técnicas. Hepatites B e C. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, 2002.
- Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev.*; 28:112-25, 2006.
- Shi M, Zhang Y, Zhu Ying-Hua, Zhang J, Xu Wei-Jia. Comparison of real-time polymerase chain reaction with the COBAS Amplicor test for quantitation of hepatitis B virus DNA in serum samples. *World J Gastroenterol* January 21; 14(3): 479-483, 2008.
- Silva AC, Spina AM, Lemos MF, Oba IT, Guastini Cde F, Gomes-Gouvêa MS, Pinho JR, Mendes-Correa MC. Hepatitis B genotype G and high frequency of lamivudine-resistance mutations among human immunodeficiency virus/hepatitis B virus co-infected patients in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Sep;105(6):770-8, 2010.

- Simpson, D.A.C., Feeney, S., Boyle, C., and Stitt, A.W. (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence, A versatile approach to quantitative PCR. *Mol. Vis.* 6, 178–183, 2000
- Sitnik R, Pinho JR, Bertolini DA, Bernardini AP, Da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *J Clin Microbiol* 42: 2455-2460, 2004.
- Sociedade Brasileira de Pediatria. Vacina contra hepatite B. *Rev. Assoc. Med. Bras.* Vol 52 nº 5. São Paulo Sept./Oct. 2006.
- Tanaka J. Hepatitis B epidemiology in Latin America. *Vaccine.* Feb 18;18 Suppl 1:S17-9, 2000.
- Tatematsu k; Tanaka Y; Kurbanov F, Sugauchi F; Mano S; Maeshiro T; Nakayoshi T; Wakuta M; Miyakawa Y; Mizokami M. A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype. *Journal of Virology*; 83:20 10538-10547; published ahead of print 29 July 2009 doi:10.1128/JVI.0046-09. October 15, 2009
- Teles SA, Martins RM, Vanderborght B, Stuyver L, Gaspar AM and Yoshida CF. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. *Artif Organs* 1999; 23: 1074-8.
- Tinkle CL, Haas-Kogan D. Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools. *Dove press journal. Biologics: Targets and Therapy.* 207-219, 2012.
- Turati F, Edefonti V, Talamini R, Ferraroni M, Malvezzi M, et.al. Family history of liver cancer and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 55: 1416–1425, 2012.
- Valla DC; Easl international consensus conference on hepatitis B. *Journal of Hepatology* 38, 533-540. 2003.

- Viana S, Paraná R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the Western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73 (4): 808-14.
- Weinbaum CM, Willians I, Mast EE, Wang SA, Finelli L, Wasley A, Neitzal SM, Ward J Recommendations for Identification and Public Health Management of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *MMWR*, September 19, 57 (RR08); 1-20, 2008.
- Welzel TM; Miley WJ; Parks TL; Goedert JJ; Whitby D; ORTIZ-CONDE BA; Real-time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *J Clin. Microbiol*, 44: 3325-33, 2006.
- World Health Organization. Documenting the Impact of Hepatitis B Immunization: best practices for conducting a serosurvey. *Immunization, Vaccines and Biologicals*, 2011.
- World Health Organization. Hepatitis B. Fact sheet N°204 July 2012 . Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Acessado em: 27 Agosto de 2012.
- Yu H, Yuan Q, Ge SX, Wang HY, Zhang YL, Chen QR, Zhang J, Chen PJ, Xia NS. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One.*; 5:e9297, 2010.
- Yu MW, Chang HC, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, et.al. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* 92: 1159–1164, 2000.
- Zhao JR; Bai YJ; Zhang QH; Wan Y; Li D; & Yan XJ; Detection of Hepatitis B virus DNA real-time PCR using TaqMan-MGB probe technology. *World J. Gastroenterol*, 11: 508-510, 2005.

PARECER CEPIAL

Projeto: **PADRONIZAÇÃO E IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA HEPATITE B.**(CCD-BM 06/2009)
Coordenador: **REGINA CÉLIA MOREIRA**

O projeto propõe uma nova metodologia para o diagnóstico de Hepatite B e pelo exposto, utilizará amostras de soro arquivadas, as quais foram utilizadas para o mesmo diagnóstico. Tendo em vista não haver uma nova doença para diagnosticar e que o projeto visa uma melhoria e sofisticação diagnóstica, a ausência de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido neste projeto pode ser aceita, com a ressalva de que, caso esse novo exame apresente maior sensibilidade e especificidade e venha detectar caso não detectado pelo exame sorológico convencional, que o paciente seja encontrado e informado e que ele tenha o atendimento necessário para seu caso, com a garantia de ser encaminhado a serviço de saúde especializado.

Dessa forma, considero o projeto **APROVADO com a ressalva da conduta do pesquisador no caso de novas detecções da doença nos soros dos pacientes em estudo.**



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



Projeto nº 0083D-2009/BM (Protocolo nº 1872/2009-IAL)

Padronização e Implantação da Técnica de PCR em Tempo Real para o Diagnóstico da Hepatite B

Coordenação: Regina Célia Moreira

Senhora Coordenadora,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico pela CCD-BM e após aprovação quanto aos aspectos éticos pela Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz/CEPIAL.


ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 17 de Dezembro de 2009

1ª via: CTC/IAL
2ª via: CCD
3ª via: Coordenador



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 - Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859



São Paulo, 29 de Outubro de 2009.

Protocolo: 26/2009

Projeto de Pesquisa: **CCD-BM 06/2009 - Padronização e Implantação da Técnica de PCR em Tempo Real para o Diagnóstico da Hepatite B.**

Pesquisador Responsável: Regina Célia Moreira

Prezado Pesquisador

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em reunião de outubro de 2009, em concordância com a Resolução 196/96 - CNS e suas resoluções complementares, o projeto acima apresentado na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX.2 da Resolução 196/96 - CNS cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Luz Marina Trujillo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL