

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THAÍS TRISTÃO TOVAR

**ESTUDO DA HEPATITE B OCULTA EM DOADORES DE
SANGUE DE VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA

2012

THAÍS TRISTÃO TOVAR

ESTUDO DA HEPATITE B OCULTA EM DOADORES DE SANGUE DE VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

Co-orientador: Prof. Dr. Fausto E. Lima Pereira

VITÓRIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

- T736e Tovar, Thaís Tristão, 1986-
 Estudo da hepatite B oculta em doadores de sangue de
Vitória, Espírito Santo / Thaís Tristão Tovar. – 2012.
 76 f. : il.
- Orientador: Iúri Drumond Louro.
 Coorientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.
 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.
1. Hepatite B. 2. Hepatite por vírus. 3. Antígenos de
superfície da hepatite B. 4. Doadores de sangue. I. Louro, Iúri
Drumond. II. Pereira, Fausto Edmundo Lima. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61

THAÍS TRISTÃO TOVAR

ESTUDO DA HEPATITE B OCULTA EM DOADORES DE SANGUE DE VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 28 de Fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro
Instituição: UFES
Orientador

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Instituição: UFES
Co-orientador

Prof. Dr. Flavia de Paula
Instituição: Ufes
Membro Interno

Prof. Dr. Ricardo Tristão Sá
Instituição: EMESCAM
Examinador Externo

VITÓRIA

2012

AGRADECIMENTOS

“Não tenho palavras pra agradecer tua bondade, dia após dia me cercas com fidelidade. Nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser, vem de ti Senhor”.

Ao prof. Dr. *Lúri Drumond Louro*, pela oportunidade e constante incentivo à produção científica, pelos excelentes ensinamentos, por acreditar em mim e me orientar desde a iniciação científica.

Ao prof. Dr. *Fausto Edmundo Lima Pereira* que sempre esteve solícito, pela constante ajuda, paciência e dedicação. Sem os seus ensinamentos a concretização desse projeto de mestrado não seria possível.

À prof. Dra. *Flavia de Paula* pela companhia durante os anos de laboratório e por aceitar participar da banca examinadora.

À *Eldinha* e *Mari* pelo carinho, amizade e companhia que começou na iniciação científica, permaneceu no mestrado e vai durar por toda a eternidade. Vocês foram fundamentais no desenvolvimento e finalização do projeto de mestrado e serão lembradas sempre com muito apreço.

Aos demais amigos do NGHM, em especial *Clarinha*, *Geise* e *Raquel*, que sempre com muita paciência e companheirismo dividiram a *Geneamp* comigo. Pessoal, obrigada por tornarem os dias nos laboratórios mais agradáveis.

Ao Dr. *Volmar Belisário Filho* e a toda a equipe do HEMOES pela autorização e auxílio na pesquisa, pela constante prontidão e disposição em ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

À minha família, base da minha existência, que sempre me fizeram acreditar que daria tudo certo. E deu! Vocês são incríveis.

RESUMO

A *Hepatite B Oculta* (HBO) é definida pela presença do DNA do VHB com carga viral geralmente baixa ($<200\text{UI/mL}$), no fígado ou soro de pessoas com antígeno de superfície (HBsAg) indetectável. Na maioria dos casos de HBO há positividade para o anticorpo contra o antígeno *core* da Hepatite B (anti-HBc). Na literatura constam poucos estudos sobre a prevalência da HBO no Brasil, bem como na população mundial. Existem relatos, muitas vezes controversos, que reportam frequências variáveis da HBO em indivíduos sem doença ou portadores de doença não relacionada com o fígado e em hepatopatas crônicos. Apesar dos esforços, faz-se necessário ainda uma melhor compreensão das razões para a persistência da baixa viremia do VHB na ausência de HBsAg detectável, do potencial risco de transmissão da HBO e do seu papel na progressão e agravamento de algumas hepatopatias. No estudo investigou-se a presença de HBO em 520 doadores de sangue de Vitória, Espírito Santo, com o objetivo de nortear políticas para incluir ou não a triagem molecular NAT (*Nucleic Acid Amplification Technique*) de bolsas de sangue. Para viabilizar a detecção molecular desenvolveu-se também uma metodologia de extração em *pool* de amostracapaz de detectar a presença do VHB na proporção de 1:40 com limite de detecção de 54UI/mL . Através da técnica de nested-PCR detectou-se a presença do VHB oculto em 0,2% (1/520) das amostras. Apesar da baixa prevalência de HBO detectada no estudo, um número considerável de portadores da infecção oculta podem não estar sendo detectados, se apenas a pesquisa de marcadores sorológicos da presença do VHB esta sendo realizada nas bolsas de sangue. Sendo assim é importante conhecer a prevalência da HBO em diferentes amostras da população para que se possa ter em mãos portadores da infecção oculta acompanhados prospectivamente a fim de tentar surpreender possíveis efeitos da presença do DNA do VHB em baixas concentrações nesses indivíduos.

Palavras-chave: Hepatite B Oculta. Vírus da Hepatite B. HBsAg negativo. Carga viral Baixa. Doador de sangue.

ABSTRACT

Occult hepatitis B (OHB) is defined as the presence of low levels of HBV DNA in the liver or serum of individuals testing hepatitis B surface antigen (HBsAg) negative. In most cases of OHB, sera are positive for hepatitis B core antibody. The literature contains quite a few studies on the prevalence of OHB in Brazil, as well as in the worldwide population. Such reports, often controversial, demonstrate that the OHB prevalence varies among healthy individuals or patients with diseases unrelated to the liver and patients with chronic liver disease. Despite efforts, it is necessary a better understanding of: the reasons for the persistence of low levels of HBV-DNA in the absence of detectable HBsAg, the potential risk of OHB transmission and its role in the progression and aggravation of some liver diseases. Therefore, it is interesting to know the prevalence of OHB indifferent population samples which allows de monitoring of carriers of the occult infection, followed prospectively in order to try to surprise the possible effects of the presence of low levels of HBV-DNA in these individuals. In this study we investigated the presence of Occult Hepatitis B in peripheral blood obtained from 520 healthy donors of Vitoria, Espirito Santo, with the aim of guiding policies to include or not the sensitive HBV-DNA nucleic acid amplification technique (NAT) screening in blood donations with a detection limit of 54UI/mL. In order to enable the molecular detection we had also developed a method that screens plasma samples in *pools* which is capable of detecting the presence of HBV in the ratio of 1:40. Through the technique of nested-PCR we found that 0,2% (1/520) had occult HBV in serum samples. Despite the low prevalence of OHB detected in the study, a considerable number of patients with occult HBV infection may not have been detected if the blood units were only tested for serological markers of HBV infection. So it is important to know the prevalence of OHB in one or more additional population groups, in order to follow up carriers of occult infection prospectively to determine possible effects of the presence of HBV-DNA in low concentrations in these individuals.

Keywords: Occult hepatitis B virus. Hepatitis B. HBsAg negative. Low viral load. Blood donors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. História Natural de Hepatite B.	17
Figura 2. Partícula viral e estrutura genômica do VHB	21
Figura 3. Representação esquemática da entrada do VHB em células susceptíveis.....	23
Figura 4. Rotas de desenvolvimento da HBO e diferenciação da Falsa HBO.	28
Figura 5. Representação esquemática da extração em <i>pools</i> de amostras com diluição serial (1:8, 1:64, 1:512 e 1:4096).....	42
Figura 6. Regiões virais amplificadas pelos iniciadores utilizados no estudo	44
Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida do produto do nested-PCR com a utilização dos primers HBV1 (A) (451pb) e 2 (B) (397pb).....	51
Figura 8. Resultado da diluição de 5µL do produto do nested-PCR da amostra H1 em 135µL de LoTE.....	51
Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras diluídas em LoTE.	52
Figura 10. Visualização em gel de poliacrilamida da possível amostra positiva, p58.....	53
Figura 11. Parte do sequenciamento da amostra p58 e do controle positivo utilizado na reação de nested-PCR	54
Figura 12. Parte do sequenciamento dos controles VHB positivo e do VHB oculto.....	55
Figura 13. Árvore filogenética construída a partir de sequências do VHB (controles positivos da PCR e VHB oculto).	56
Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida do produto do nested-PCR com a utilização dos primers HBV3 e 4.....	57
Figura 15. Resultado da amplificação de amostras HBsAg negativas com a utilização do par de primers HBV3 e 4.....	58
Figura 16. Resultado do teste da extração em <i>pools</i> de amostras	58
Figura 17. Diluição serial de amostras positivas para o DNA do VHB com carga viral de 14UI/mL e 54UI/mL em plasma HBsAg negativo.	59
Figura 18. Resultado da diluição serial das amostras com carga viral de 14UI/mL e 54UI/mL utilizando o par de primer HBV1 e 2.	60
Figura 19. Resultado da diluição serial das amostras com carga viral de 14UI/mL e 54UI/mL utilizando o par de primer HBV3 e 4.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Interpretação dos marcadores sorológicos da Hepatite B.	27
Tabela 2. Resumo de estudos acerca da detecção da HBO em doadores de sangue.....	30
Tabela 3. Iniciadores de PCR utilizados na amplificação de fragmentos do genoma do VHB. .	43
Tabela 4. Programa de amplificação utilizado na nested-PCR.	45
Tabela 5. Dados demográficos dos 520 doadores voluntários do estudo no período de Dezembro de 2010 a Fevereiro de 2011.....	48
Tabela 6. Dados sorológicos de 520 doadores voluntários do estudo no período de Dezembro/2010 a Fevereiro/2011.....	49

LISTA DE SIGLAS

APS	Persulfato de amônio
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno <i>core</i> da Hepatite B
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno “e” da Hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície da Hepatite B
BLAST	Basic local alignment search tool
cccDNA	DNA circular covalente fechado (do inglês: Covalently <i>closed circular DNA</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos tri-fosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
HBcAg	Antígeno do core do vírus da Hepatite B
HBeAg	Antígeno “e” do vírus da Hepatite B
HEMOES	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Espírito Santo
HBO	Hepatite B Oculta
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B (do inglês <i>Hepatitis B vírus</i>)
min	Minuto
NAT	Técnica De Amplificação De Ácido Nucléico (do inglês <i>Nucleic Acid Amplification Technique</i>)
NH ₄ OAc	Acetato de amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OBI	Hepatite B Oculta (do inglês <i>Occult Hepatitis B Infection</i>)
ORF	Fase Aberta de Leitura (do inglês <i>Open Reading Frame</i>)

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
rcDNA	DNA circular viral relaxado (do inglês: <i>relaxed circular DNA</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
seg	Segundos
TBE	Tris Borato EDTA
TE9	Tris EDTA pH 9
TEMED	N', N', N', N'- Tetrametiletilenodiamina
VHB	Vírus da hepatite B

LISTA DE SÍMBOLOS

cm centímetro

g grama

°C grau Celsius

h hora

® marca registrada

> maior que

<menor que

μl microlitro

ml mililitro

mM milimolar

M molar

ng nanograma

pb pares de base

% porcentagem

rpm rotações por minuto

s segundos

U unidade

X vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 HEPATITE B	16
1.2 VÍRUS DA HEPATITE B.....	18
1.2.1 Classificação	18
1.2.2 Estrutura Viral.....	19
1.2.2.1 Organização do Genoma.....	19
1.3 INFECÇÃO E REPLICAÇÃO DO VHB	21
1.4. RESPOSTA IMUNITÁRIA CONTRA VHB	24
1.4.1 Marcadores Sorológicos da Infecção pelo VHB	25
1.4.1.1 HBsAg – Antígeno de Superfície do VHB	25
1.4.1.2 Anti-HBs - Anticorpo contra o antígeno de Superfície do VHB	25
1.4.1.3 HBeAg - Antígeno “e” do VHB.....	26
1.4.1.4 Anti-HBe - Anticorpo contra o antígeno “e” do VHB	26
1.4.1.5 HBcAg – Antígeno “core” do VHB	26
1.4.1.6 Anti-HBc - Anticorpo contra o antígeno “core” do VHB.....	26
1.5 DIAGNÓSTICO DA HEPATITE B.....	27
1.6 HEPATITE B OCULTA.....	27
1.6.1 Hepatite B oculta em doadores de sangue:	29
1.6.2 Detecção da Hepatite B oculta:.....	32
1.6.2.1 Testes sorológicos	32
1.6.2.2 Técnicas de Amplificação de Ácido Nucléico (NAT).....	32
1.6.2.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	33
1.6.2.2.2 nested-PCR	33
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	38
3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	38
3.3 DEFINIÇÃO DO NÚMERO AMOSTRAL MÍNIMO	38
3.4 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	38
3.5 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO DE DOADORES DE SANGUE.....	39
3.6 ESTUDO DOS MARCADORES SOROLÓGICOS DA HEPATITE B	39
3.7 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DO DNA DO VHB.....	39

3.7.1 Extração do DNA	39
3.7.1.1 Extração do DNA dos Controles Positivos	40
3.7.1.2 Extração em <i>pools</i> de amostras.....	41
3.7.1.2 Parâmetros para avaliação da efetividade da extração	42
3.8 PESQUISA DO DNA DO VHB.....	43
3.8.1 Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida	45
3.9 SEQUENCIAMENTO DO VHB	45
4. RESULTADOS	47
4.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS.....	48
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	50
4.3 REAÇÃO DE NESTED-PCR	50
4.3.1 Amplificação com os primers HBV1 e 2	50
4.3.1.1 Resultado do sequenciamento dos controles VHB positivo da nested-PCR e do VHB oculto (p58)	53
4.3.2 Amplificação com os primers HBV3 e 4	56
4.3.3 Amplificação do pool de amostras	58
5. DISCUSSÃO.....	62
5.1 DETECÇÃO DA HBO EM DOADORES DE SANGUE DE VITÓRIA/ES	63
5.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS INICIADORES E AMPLIFICAÇÃO DO DNA DO VHB..	64
5.2.1 Considerações sobre a detecção do VHB oculto.....	65
5.2.1.1 Considerações sobre o sequenciamento do VHB oculto e controles positivo da PCR.....	66
5.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO DE EXTRAÇÃO em <i>pool</i> de amostras	67
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS	72
ANEXO	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 HEPATITE B

A hepatite B, causada pelo vírus da hepatite B (VHB), é um sério problema de Saúde Pública no mundo (GUIDOTTI E CHISARI, 2006; KIDD-LJUNGGREN et al., 2002). A OMS estima que aproximadamente dois bilhões de pessoas tenham sido infectadas e que mais de 350 milhões de indivíduos sejam portadores crônicos desse vírus, distribuídos em várias regiões do mundo (GUIDOTTI E CHISARI, 2006; FONSECA, 2007; LAI, 2003). Ásia, Pacífico Sul e África subsaariana têm a maior incidência e prevalência no mundo, enquanto, no Brasil, a região Amazônica, no Estado do Espírito Santo e na região Oeste do Estado de Santa Catarina tem áreas de maior prevalência (FONSECA, 2007; GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009).

A Hepatite B é apontada como uma das principais causas de câncer hepático, sendo responsável por 60% dos casos (LAI, 2003).

Os mecanismos de transmissão da hepatite B são as vias parenteral, sexual e perinatal. Entretanto, muitos casos de Hepatite B não possuem as vias de transmissão determinadas e identificadas.

A história natural da infecção do VHB varia com a idade (do hospedeiro) na qual ela ocorre. A infecção pela via vertical (perinatal), ou após o nascimento, até a primeira infância tem curso silencioso e raramente induz doença aguda. A cura (eliminação do HBsAg) é excepcional. Em mais de 90% dos casos o organismo desenvolve certa “tolerância”, gerando uma infecção crônica persistente, geralmente assintomática ou oligosintomática. Nos anos subsequentes a hepatite crônica pode evoluir para cirrose ou carcinoma hepatocelular. Muitos pacientes persistem com a infecção assintomática pro resto da vida (Figura 1) (MCMAHON, 2009; GUIDOTTI E CHISARI, 2006).

A infecção que ocorre após a maturação do sistema imunitário é diferente: a maioria dos casos vai desenvolver uma hepatite aguda oligosintomática ou hepatite leve que evolui para cura espontânea e eliminação do HBsAg em torno de 90 dias. Um pequeno percentual (5%) evolui para hepatite crônica, podendo desenvolver cirrose e carcinoma hepatocelular. Um pequeno número de casos evolui para hepatite aguda grave, com alta taxa de mortalidade, denominada hepatite fulminante. Na infecção sintomática o

período de incubação varia de 2 a 3 meses(Figura 1) (MCMAHON, 2009; GUIDOTTI E CHISARI, 2006).

É importante ressaltar que certos casos de cura da Hepatite B podem na verdade representar um caso de Hepatite B Oculta, no qual houve a eliminação do HBsAg, porém, ainda há a detecção do DNA do VHB por meio de técnicas moleculares. Existe ainda a possibilidade da infecção manifestar-se de forma silenciosa, com ausência de HBsAg detectável e com a presença do DNA do VHB, o qual também enquadra um caso de Hepatite B Oculta (Figura 1).

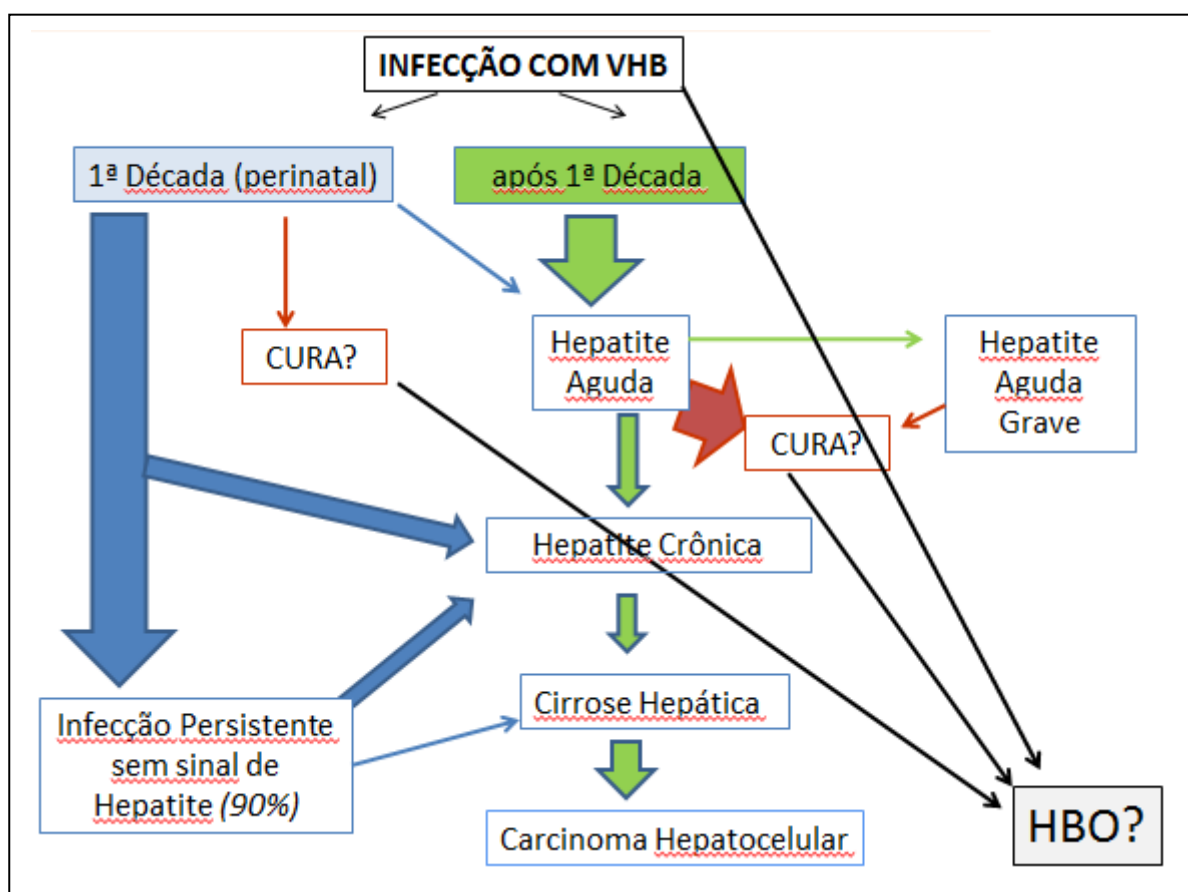


Figura 1. História Natural de Hepatite B. Setas em azul indicam o curso da infecção em crianças com menos de 10 anos e setas em verde, o curso da infecção após a maturação do sistema imune. Setas pretas indicam possíveis casos de Hepatite B Oculta (HBO).

1.2 VÍRUS DA HEPATITE B

1.2.1 Classificação

O VHB é membro da família *Hepadnaviridae* (Vírus de DNA hepatotrópico) por compartilhar características tais como: tamanho, ultraestrutura do vírion, organização da molécula de DNA e um mecanismo exclusivo de replicação por transcrição reversa (GUIDOTTI E CHISARI, 2006; FONSECA, 2007; MIGUEL, 2005). Apesar da preferência pelas células hepáticas, partículas de DNA dos hepadnavirus foram observadas em células dos rins, pâncreas e células mononucleares do sangue periférico (FONSECA, 2007; MIGUEL, 2005).

Esta família é dividida em dois gêneros, *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus*, representando os vírus cujos hospedeiros são mamíferos e aves, respectivamente. Os representantes do primeiro gênero são encontrados em humanos (HBV), marmotas (WHV), esquilos (GSHV) e primatas não humanos (HBV). Entretanto, o homem é o único reservatório de importância epidemiológica (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009).

Novas descobertas com relação à biologia do VHB revelam que este vírus tem uma diversidade viral complexa e apresenta diferentes subtipos e genótipos, de acordo com a homologia de nucleotídeos. Pelo menos oito genótipos são conhecidos com diferentes distribuições ao redor do mundo: A – H (MCMAHON, 2009; MALMSTRÖM; BERGLIN-ENQUIST; LIND, 2010). No Brasil, os genótipos mais comumente encontrados são o A, D e F (MELLO, 2007; BECKER, 2010).

Alguns estudos tentam correlacionar o genótipo com o potencial patogênico do vírus (MCMAHON, 2009). Existem relatos na literatura que as diferenças entre genótipos podem interferir na gravidade e curso da doença, na probabilidade de complicações e resposta ao tratamento além de, possivelmente, na vacinação (MALMSTRÖM; BERGLIN-ENQUIST; LIND, 2010).

1.2.2 Estrutura Viral

O vírion da hepatite B é uma partícula esférica, de dupla camada, com 42nm de diâmetro(COELHO, 2001). Possui uma estrutura central (nucleocapsídeo ou *core*) de 27nm de diâmetro, constituída pela proteína viral HBcAg, que contém em seu interior o material genético e proteínas virais. Já o componente externo (envelope) é composto de proteínas de superfície (HBsAg) incorporadas em lipídios derivados da membrana da célula hospedeira (Figura 2B)(COELHO, 2001; TANG E MCLACHLAN, 2002).

É possível ainda observar-se no soro de indivíduos com hepatite B, além da partícula viral completa, de 42nm, partículas subvirais menores não infecciosas (invólucros vazios). Essas partículas são imunogênicas por apresentarem em sua constituição o antígeno de superfície HBsAg, e podem assumir formas esféricas ou tubulares com aproximadamente 22nm de diâmetro e diâmetro variável, respectivamente(MIGUEL, 2005).

O VHB é um dos menores vírus conhecidos, com um genoma de aproximadamente 3,2kb de comprimento(FONSECA, 2007). O genoma do VHB é composto por uma molécula de DNA circular de dupla fita parcial (DNA circular viral relaxado ou rcDNA), em que uma das fitas, a negativa, forma quase um círculo completo, denominada fita L(-).A fita positiva, L(+), é menor, com a região 5'-terminal fixa, enquanto que a posição da extremidade 3' é variável. Desta forma, o comprimento da fita L(+) pode corresponder entre 50 a 90% do comprimento da fita complementar (MIGUEL, 2005; HOLLINGER E SOOD, 2010).

1.2.2.1 Organização do Genoma

O vírus B foi o primeiro vírus humano patogênico a ser sequenciado¹⁷. Seu genoma apresenta 4 fases abertas de leitura (ORFs – Open Reading Frames), responsáveis pela codificação e síntese das proteínas do envelope (*gene S*) e do *core* (*gene C*); da polimerase do VHB (*gene P*) e da proteína X(*gene X*) (Figura 2A)(FONSECA, 2007; AMINI-BAVIL-OLYAEE; TRAUTWEIN; TACKE, 2007; COELHO, 2001).

O *gene P* abrange cerca de 80% do genoma do VHB e se sobrepõe a todos os outros genes. Codifica uma polimerase que pode agir como: DNA polimerase, transcriptase reversa e RNase H, a qual encontra-se covalentemente ligada à extremidade 5' da fita L(-). Transcreve o maior RNA mensageiro do VHB (RNA pré-genômico ou pRNA) que é traduzido e depois processado a fim de produzir as proteínas do core e a polimerase (AMINI-BAVIL-OLYAEI; TRAUTWEIN; TACKE, 2007).

O *gene S* possui três códons de iniciação (ATG), e, por conseguinte codifica três diferentes proteínas de superfície (HBsAg): *Pré-S1* (Large protein ou L); *Pré-S2* (Middle protein ou M) e S (Small protein ou S). Tais proteínas são encontradas no envelope viral e os anticorpos neutralizantes são dirigidos a elas. Sugere-se que essas proteínas possuam um importante papel na ligação do vírus ao hepatócito, na montagem do vírion e na sua liberação pela célula (RODRIGUES, 2002; MIGUEL, 2005). O *gene S* é completamente sobreposto pelo *gene P*, razão pela qual mutações de resistência na polimerase podem, ocasionalmente, resultar em mudanças no *gene S* e consequentemente no envelope, o que pode afetar a antigenicidade do HBsAg (MARTIN-CARBONERO E SORIANO, 2010). Outra consequência de se alterar a antigenicidade do HBsAg é a evasão da proteção da vacina (MARTIN-CARBONERO E SORIANO, 2010).

O *gene C* codifica duas proteínas diferentes: antígeno core da hepatite B (HBcAg), que faz parte do nucleocapsídeo e o antígeno "e" da hepatite B (HBeAg), proteína solúvel secretada pela célula infectada (FONSECA, 2007).

O *gene X* codifica a proteína "X", presente em pequenas quantidades no tecido infectado embora suas funções ainda não sejam totalmente esclarecidas. Sabe-se entretanto, que a proteína "X" age como fator de transcrição responsável pela regulação de promotores virais e celulares. Estudos sugerem que a expressão desregulada do *gene X* tenha importantes consequências fisiopatológicas na infecção crônica pelo VHB, incluindo hepatocarcinogênese (MIGUEL, 2005; GUIDOTTI E CHISARI, 2006; CARVALHO, 2009).

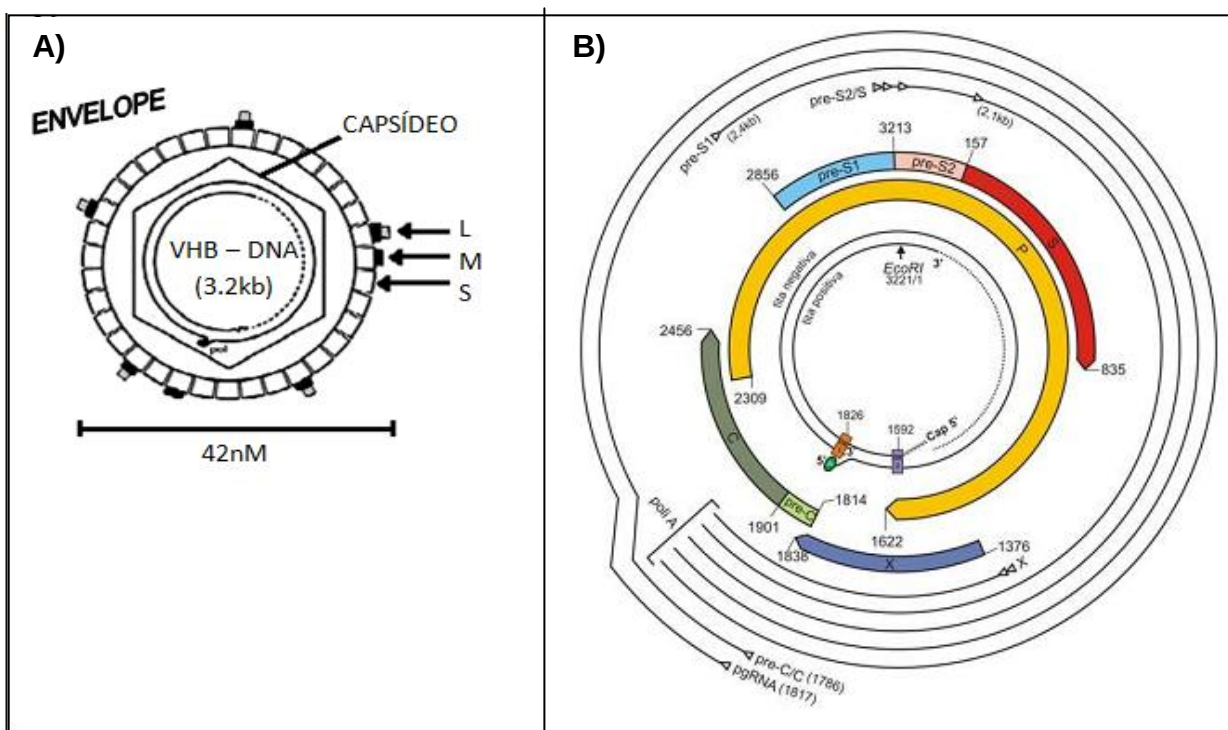


Figura 2. Partícula viral e estrutura genômica do VHB. (A) Ilustração da partícula viral composta por proteínas de superfície (L, M e S), capsídeo e genoma viral. (B) Representação da estrutura genômica viral. As barras coloridas referem-se aos genes virais e as barras pretas circundando os genes representam as quatro sequências transcritas do genoma viral.

Adaptado de: A) Rehmann; Nascimbeni (2005) e Block; Guo, H.; Guo, J.T. (2007) e B) Gomes (2003).

Nota: Figura adaptada pelo autor.

1.3 INFECÇÃO E REPLICAÇÃO DO VHB

O vírus B é altamente infectivo, sabe-se que uma só partícula viral é capaz de infectar o ser humano (FONSECA, 2007). É também altamente resistente podendo sobreviver ativo por vários dias no ambiente externo em condições normais (FONSECA, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Pode resistir durante 10 horas a 60 °C, durante 5 minutos à 100° C, ao éter e ao álcool a 90°C e permanecer viável após vários anos de congelamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O VHB circula primariamente no sangue e replica-se nos hepatócitos. No plasma, sua vida média varia de 1-3 dias, enquanto nos hepatócitos a vida média varia de 10-100 dias (FONSECA, 2007).

O processo replicativo do VHB é único e somente observado no gênero *Hepadnaviridae* (Figura 3) (TANG E MCLACHLAN, 2002). O VHB é um dos poucos vírus não-retrovirais conhecidos que utiliza a transcrição reversa como parte do seu processo de replicação (GUIDOTTI E CHISARI, 2006).

Sabe-se que as células parenquimais do fígado constituem o principal sítio de infecção pelo VHB. Entretanto, o mecanismo pelo qual o vírus entra na hepatócito ou em outras células susceptíveis ainda não é completamente compreendido. Sugere-se que o passo inicial para a fusão das membranas esteja relacionado com a interação de polipeptídios do envelope viral (aminoácidos 21-47 da região pré-S1) com proteínas da membrana celular hepática, incluindo: endonexina II, IL-6, anexina V, apolipoproteína e receptor de transferrina (GUIDOTTI E CHISARI, 2006).

Após o acoplamento das membranas, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e transportado para o poro nuclear. Lá, o material genético e proteínas virais são liberados no núcleo, onde o DNA circular viral relaxado (*rcDNA*) será reparado pela polimerase do hospedeiro em um mini-cromossomo epissomal, denominado *closed circular DNA* (a fita L(+) é completada por síntese e as pontas são ligadas) que serve como um modelo para a transcrição dos RNAs mensageiros virais (Figura 3) (GUIDOTTI E CHISARI, 2006).

No citoplasma do hepatócito, a polimerase viral e proteínas do *core* se reúnem em torno de um RNA mensageiro específico (pRNA) para formar o VHB-RNA contendo o capsídeo, dentro do qual o RNA é reversamente transcrito em DNA fita simples (*first single-strand viral DNA* - ssDNA); e em seguida degradado pela própria polimerase em sua atividade de *RNAse H* (GUIDOTTI E CHISARI, 2006; TANG E MCLACHLAN, 2002; COELHO, 2001).

Entretanto, a degradação do pRNA não é completa, o oligoribonucleótido terminal é emparelhado com a região *DR2*, próximo à extremidade 5' da fita L(-), onde atua como iniciador da síntese da fita L(+). Ou seja, o ssDNA serve de molde para a síntese parcial da segunda fita de DNA L(+) formando o *rcDNA* (TANG E MCLACHLAN, 2002).

O capsídeo viral, agora contendo DNA, pode seguir dois caminhos: Retornar ao núcleo para amplificar o cccDNA ou migrar para o Retículo Endoplasmático, onde irá interagir com proteínas do envelope viral inseridas na membrana da organela, provocando uma reação interna de brotamento, formando assim os vírions infectantes que são transportados para fora da célula pelo caminho secretório padrão (GUIDOTTI E CHISARI, 2006).

Em cada processo replicativo e durante o ciclo de vida do VHB, há chances do DNA viral incorporar-se ao genoma do hepatócito e expandir-se clonalmente junto à célula (MIGUEL, 2005).

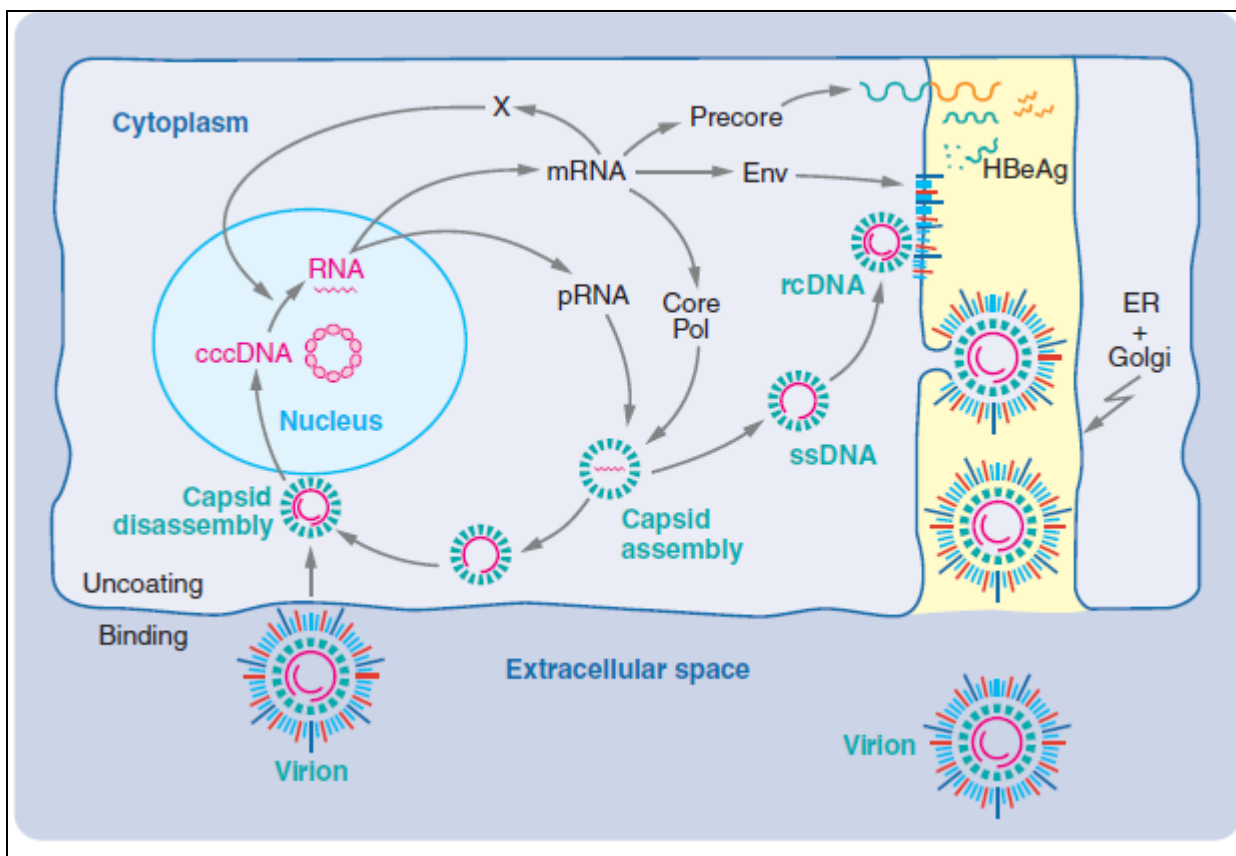


Figura 3. Representação esquemática da entrada do VHB em células suscetíveis. Após a fusão de membranas, o capsídeo é liberado no citoplasma e transportado para o núcleo. Lá o genoma viral é completado por síntese formando o cccDNA que é o modelo para a transcrição dos RNAs mensageiros (mRNA). Uma vez no citoplasma, os transcritos são traduzidos em proteínas correspondentes como mostrado na figura. A proteína pré-core é transportada para o Retículo Endoplasmático (ER) onde é processada e secretada como HBeAg. A proteína X não

entra no núcleo, porém interage com fatores de transcrição do citoplasmas os quais entram no núcleo e ativam regiões promotoras do VHB. As proteínas do envelope (Env) atravessam a membrana do ER e mantêm-se ali como proteínas integrais de membrana. As proteínas core e polimerase se reúnem em volta do RNA pré-genômico (pRNA) para formar o VHB-RNA contendo capsídeo. Nesse passo, o RNA será reversamente transcrito em DNA fita simples (ssDNA), a qual servirá de molde para a construção do DNA dupla fita parcial (rcDNA). O capsídeo pode agora interagir com as proteínas do Env inseridas na membrana da célula hospedeira, provocando uma reação de brotamento ou o capsídeo retorna para o núcleo para uma nova amplificação do cccDNA.

Fonte: GUIDOTTI E CHISARI, 2006

1.4. RESPOSTA IMUNITÁRIA CONTRA VHB

A resposta imunitária contra o VHB, inata e adaptativa, aparece rapidamente após a infecção. Células sensibilizadas para neutralizar o VHB são detectadas nas duas primeiras semanas da infecção, inclusive com o aparecimento de células citotóxicas no sangue periférico. No entanto, a ineficácia da resposta imunitária em eliminar o vírus induz mecanismos no fígado que impedem a exudação de células imunocompetentes permitindo a proliferação viral no hepatócito. Quando a resposta imune quebra essa barreira as células que contêm os vírus são atacadas e destruídas por mecanismos citotóxicos, levando ao aparecimento dos sintomas da hepatite B (GUIDOTTI E CHISARI, 2006).

Sendo assim, entende-se que durante a infecção pelo VHB, a resposta imune do hospedeiro pode provocar tanto dano hepatocelular quanto a eliminação do vírus (GUIDOTTI E CHISARI, 2006). A evolução do padrão de marcadores sorológicos depende do resultado da resposta imune do hospedeiro. A probabilidade do paciente curar a infecção pelo VHB correlaciona-se com a sua idade e com a força da resposta imune inicial (GANEM E PRINCE, 2004).

O escape viral e o aparecimento de mutações também dificultam o reconhecimento dos epítomos do VHB e assim, o vírus muitas vezes, consegue “se camuflar” do sistema imune inato, permanecendo indetectável até o início da resposta adaptativa, semanas mais tarde. Essa relativa invisibilidade do VHB deve-se à retenção dos transcritos no

núcleo e produção de mRNA poliadenilado com extremidade cap, assemelhando-se a estrutura normal dos transcritos celulares (GUIDOTTI E CHISARI, 2006).

Indivíduos que curaram uma infecção anterior são totalmente protegidos da reexposição. Porém a eliminação completa do vírus B após a recuperação clínica pode nunca ocorrer (MARTIN-CARBONERO E SORIANO, 2010).

1.4.1 Marcadores Sorológicos da Infecção pelo VHB

Durante o curso da infecção pelo VHB, os antígenos virais (HBsAg, HBcAg e HBeAg) induzem uma resposta imune específica. Nos pacientes imunocompetentes, a resposta imune leva à produção dos anticorpos anti-HBc, anti-HBe e o anti-HBs. O conjunto de antígenos e anticorpos específicos do VHB constitui o “sistema de marcadores da infecção”, que pode ser detectado no sangue periférico em determinado período após o início da infecção (Tabela 1) (RODRIGUES, 2002).

1.4.1.1 HBsAg – Antígeno de Superfície do VHB

O HBsAg é o marco da infecção pelo VHB (COELHO, 2001). Pode ser detectado no sangue 2 a 6 semanas antes do início dos sintomas (RODRIGUES, 2002), permanecendo detectável por 1-3 meses, podendo declinar a níveis indetectáveis dentro de 4-6 meses (RODRIGUES, 2002; MIGUEL, 2005).

1.4.1.2 Anti-HBs - Anticorpo contra o antígeno de Superfície do VHB

Semanas após a negativação do HBsAg, o anti-HBs passa a ser detectável na circulação, processo chamado de soroconversão. O anti-HBs é um anticorpo neutralizante que confere imunidade protetora contra a infecção pelo VHB (COELHO, 2001).

O desenvolvimento do anti-HBs pode ser ocasionalmente retardado após o desaparecimento do HBsAg, originando um período de janela imunológica que pode demorar semanas ou meses. A coexistência de HBsAg e anti-HBs é evento raro,

podendo ser encontrado em portadores crônicos, com anticorpos específicos contra o antígeno S, incapazes de neutralizar o vírus circulante (COELHO, 2001).

1.4.1.3 HBeAg - Antígeno “e” do VHB

O HBeAg surge no período de incubação e age como marcador de replicação viral e de alta infectividade do VHB (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009; FONSECA, 2010). A maior causa da discrepância entre a presença do DNA do VHB e ausência do HBeAg estaria relacionado com a infecção de uma cepa variante incapaz de produzir o HBeAg (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009). Essa mutação ocorre no códon 28, nucleotídeo 1896, onde há uma troca de guanina por adenina (G1896A), substituindo o aminoácido triptofano por um códon de parada na região pré-core. Tal alteração aumenta a virulência e contribui para o desenvolvimento de hepatites fulminantes (LAU et al., 2002).

1.4.1.4 Anti-HBe - Anticorpo contra o antígeno “e” do VHB

O anti-HBe é detectado 1 - 4 semanas após o desaparecimento do HBeAg (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009). Representa o primeiro sinal de resolução da doença, indicativo de redução da replicação viral (MIGUEL, 2005).

1.4.1.5 HBcAg – Antígeno “core” do VHB

O HBcAg é um antígeno intra-celular, não encontrado livre no plasma, salvo em exceções onde o vírion encontra-se desintegrado (COELHO, 2001).

1.4.1.6 Anti-HBc- Anticorpo contra o antígeno “core” do VHB

O Anti-HBc total é marcador utilizado na triagem para a Hepatite B por detectar tanto o anticorpo da classe IgG (imunidade por infecção passada ou imunidade por resposta vacinal) quanto o anticorpo da classe IgM (detectado na fase aguda). O anti-HBc é frequentemente o único marcador detectável na fase de janela imunológica (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009).

Tabela1. Interpretação dos marcadores sorológicos da Hepatite B.

<i>HBsAg</i>	<i>HBeAg</i>	<i>Anti-Hbc IgM</i>	<i>Anti-HBc</i>	<i>Anti-HBe</i>	<i>Anti-HBs</i>	
+	-	-	-	-	-	<i>Fase de incubação</i>
+	+	+	+	-	-	<i>Fase aguda</i>
+	+	-	+	-	-	<i>Portador com replicação viral</i>
+	-	-	+	+	-	<i>Portador sem replicação viral*</i>
-	-	-	+	-	-	<i>Provável cicatriz sorológica</i>
-	-	-	+	+ / -	+	<i>Imunidade pós-hepatite B</i>
-	-	-	-	-	+	<i>Imunidade pós-vacina</i>
-	-	-	-	-	-	<i>Ausência de contato prévio</i>

**Estado de portador assintomático ou doença crônica
(Adaptado do Guia de Vigilância Epidemiológica, 2009)*

1.5 DIAGNÓSTICO DA HEPATITE B

O diagnóstico da Hepatite B, bem como de suas fases evolutivas, baseia-se na análise do conjunto de marcadores sorológicos da Hepatite B. No entanto, para maior compreensão do diagnóstico é importante também analisar-se os marcadores de lesão celular (AST e ALT) e realizar a quantificação do vírus circulante no sangue pela metodologia de PCR (Polymerase Chain Reaction).

1.6 HEPATITE B OCULTA

Com a utilização de sensíveis técnicas de biologia molecular, em 1979 detectou-se pela primeira vez a presença de DNA do vírus da Hepatite B em sangue de doadores soronegativos para HBsAg (TABOR et al., 1979). Quadros iguais a este são classificados hoje como Hepatite B Oculta (HBO), definida pela presença do DNA viral

no fígado (detectável ou não no soro) de indivíduos HBsAg negativo detectado por ensaios imunológicos disponíveis (Figura 4)(HOLLINGER E SOOD, 2010; RAIMONDO et al., 2008; TORBENSON E THOMAS, 2002).

Cerca de 20% das HBO são negativas para todos os marcadores sorológicos da infecção pelo VHB, 50% são positivos para o anticorpo contra o antígeno *core* da Hepatite (anti-HBc+/±anti-HBs) e 35% são positivos para o anticorpo contra o antígeno de superfície (anti-HBs+/±anti-HBc)(HOLLINGER E SOOD, 2010).

Casos com ausência de HBsAg detectável por testes imunoenzimáticos usuais apresentando nível sérico do DNA do VHB superior a 200UI/mL, são rotulados como "falsa HBO" pois a negatividade do HBsAg nesses casos deve estar relacionada a mutações no gene "S" do vírus, em particular à substituição de uma glicina por arginina no códon 145 do HBsAg, produzindo assim um antígeno de superfície modificado que não é reconhecido por testes sorológicos disponíveis (Figura 4) (RAIMONDO et al., 2008; ALLAIN, 2004).

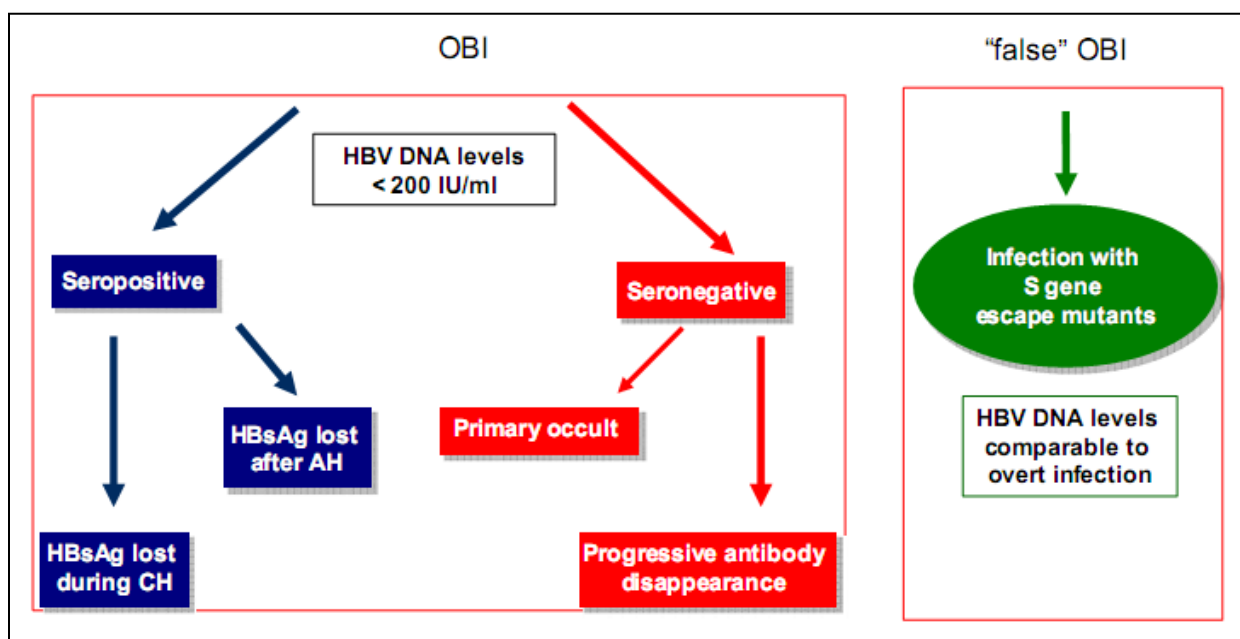


Figura 4. Rotas de desenvolvimento da HBO e diferenciação da Falsa HBO.(OBI) do inglês Occult Hepatitis B Infection.

Fonte: Raimondo et al., 2008

Possíveis mecanismos responsáveis pela Hepatite B Oculta têm sido propostos, como: mutações na sequência do DNA do VHB; integração do vírus em cromossomos de acolhimento; infecção das células mononucleares do sangue periférico; formação de imuno-complexos; resposta imune do hospedeiro alterada; e a interferência de outros vírus no VHB²⁸. Entretanto, as reais razões para a persistência da baixa viremia do VHB na ausência de HBsAg detectável permanecem indefinidas (TORBENSON E THOMAS, 2002).

A Hepatite B Oculta tem sido reportada em frequências variáveis em diferentes amostras de pacientes sem doença ou, portadores de doenças não relacionadas com o fígado e em hepatopatas crônicos (TORBENSON E THOMAS, 2002; AGHAKHANI et al., 2010; HOLLINGER, 2008).

No entanto, vários aspectos da HBO ainda não estão completamente esclarecidos, incluindo o significado clínico no que se refere ao risco de transmissão, reativação e progressão para doença hepática crônica; à associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular; e ao potencial em afetar a progressão e resposta ao tratamento da Hepatite C (TORBENSON E THOMAS, 2002; HU, 2002; HOLLINGER, 2008).

1.6.1 Hepatite B oculta em doadores de sangue:

Existem poucos estudos que enfocam na prevalência da Hepatite B Oculta na população mundial (Tabela 2). Em se tratando de transfusões sanguíneas, como o serviço de saúde pública brasileiro ainda não inseriu testes de biologia molecular para detecção do VHB na rotina de triagem, existe a possibilidade de transmissão do VHB oculto ou mesmo do VHB no período de janela imunológica.

Estudos que reportam a frequência da HBO em doadores de sangue de uma forma geral, independente do dado sorológico, são raros. Em Campinas, Brasil, detectou-se que 4% de 159 bolsas de sangue coletadas continham o VHB oculto (JARDIM et al., 2008) enquanto que na África a frequência de HBO em doadores de sangue foi de 0,005% (ALLAIN et al., 2009). Já na China foram encontrados 5 casos de Hepatite B

Ativa após transfusão de sangue com VHB oculto (LIU et al., 2010). Semelhantemente, no Japão foi detectado-se 158 bolsas de sangue com o VHB oculto. Destas, 39,8% (63/158) foram transfundidas e 12/63 receptores sanguíneos desenvolveram a Hepatite B Ativa (SATAKE et al., 2007) (Tabela 2).

A maioria dos estudos acerca da HBO em doadores de sangue focam na detecção do VHB oculto em uma amostra restrita dos doadores, os doadores anti-HBc positivos, uma vez que a probabilidade de detecção do VHB oculto nessa parcela de doadores é muito maior. Tal afirmação é comprovada por relatos na literatura, por exemplo, a análise de doadores anti-HBc positivos na Itália detectou um total de 4,86% (14/288) de HBO (MANZINI et al., 2007) enquanto que na Índia foi encontrado um total de 7,5% (31/413) (ASIM et al., 2010) e 30% (66/220) (PANIGRAHI et al., 2010) de HBO em doadores anti-HBc positivos (Tabela 2).

No Brasil existem poucas observações sobre a HBO. No Rio Grande do Sul a HBO foi detectada em 5/64 (7,81%) doadores positivos somente para o anti-HBc (SILVA et al., 2005). Já no Rio de Janeiro e Campinas a pesquisa da HBO foi feita em pacientes HIV positivos (*Human immunodeficiency vírus*) reportando um total de 14% (16/115) (SANTOS et al., 2003) e 5,03% (8/159) (JARDIM et al., 2008) de HBO (Tabela 2). No Espírito Santo, região endêmica para Hepatite B, existe um estudo no qual houve a detecção do DNA do VHB em 7/41 (17%) casos de carcinoma hepatocelular sem a presença do HBsAg (CARVALHO, 2009).

Tabela 2. Resumo de estudos acerca da detecção da HBO em doadores de sangue.

Pesquisador	Amostra	Método de detecção	Frequência HBO	Sorologia amostra HBO (+)	Carga Viral
ALLAIN et al., 2009 ÁFRICA	1.149.507 doadores de sangue	- Nested PCR - qPCR	54/1.149.507 (0,005%)	-	-

MANZINI et al., 2007 - ITÁLIA	288 doadores anti-HBc(+)	-COBAS* -Nested PCR	14/288 (4,86%)	4/14 anti-HBs(+)	8 -108 UI/mL
ASIM et al., 2010 ÍNDIA	413 doadores anti-HBc(+)	Nested PCR	31/413 (7,5%)	12/31 anti-HBs(+)	-
PANIGRAHI et al., 2010 - ÍNDIA	220 doadores anti-HBc(+)	Nested PCR	66/220 (30%)	12/66 anti-HBs(+)	<10 ⁴ cópia s/mL
SATAKE et al., 2007 - JAPÃO	15.721 **	Individual- Donation (ID)-NAT	158/15721 (1,01%)	- 95/158 > anti-HBc(+) - 63/158 transfusões; 12/63 desenvolveram Hepatite B	< 10 cópias/mL
LIU et al., 2010 CHINA	2.972 pacientes transfusionados	Nested PCR	5/2972 (0,17%)	- 1/5 > anti-HBc(+) - 0/5 > anti-HBs(+)	< 500 cópias/mL
SILVA et al., 2005BRASIL <i>Rio Grande do Sul</i>	64 doadores anti-HBc(+)		5/64 (7,81%)	3/64 anti-HBs(+)	<1000 cópias/ml
SANTOS et al., 2003 – BRASIL <i>Rio de Janeiro</i>	115 indivíduos HIV(+) anti-HBc(+)	PCR	16/115 (14%)	- 4/16 > anti-HBc(+) - 4/16 > anti-HBc/ anti- HBs (+) - 8/16 > anti-HBc/ anti- HBs/ anti-HBe(+) - 9/16 > sob terapia antiretroviral	10 ² -10 ⁵ cópias/mL
JARDIM et al., 2008 – BRASIL <i>Campinas</i>	159 indivíduos HIV(+)	Nested PCR	8/159 (5,03%)	- 6/8 (75%) anti- HBc/anti-HBs (+)	-
	150 doadores de sangue		6/159 (4%)	- 6/6 (100%) anti-HBc / anti-HBs (+)	

* COBAS Ampliscreen HBV (Roche)

** Alíquotas armazenadas de doadores de repetição que se tornaram positivos para o VHB

1.6.2 Detecção da Hepatite B oculta:

Atualmente, o padrão ouro para a detecção do VHB oculto resume-se na triagem sorológica seguida pela análise do DNA viral por nested-PCR ou PCR em tempo real com limite de detecção de menos de 10 cópias por reação, a partir do soro ou de extratos de tecidos do fígado (RAIMONDO et al., 2008).

1.6.2.1 Testes sorológicos

Testes sorológicos são capazes de identificar frações antigênicas do vírus e anticorpos secretados contra o vírus. A principal técnica utilizada é o ensaio imunoenzimático (ELISA) que possui alta especificidade e sensibilidade. Através da pesquisa dos marcadores sorológicos é possível a confirmação do diagnóstico (Disponível em: <<http://www.elisa-development.com>>).

1.6.2.2 Técnicas de Amplificação de Ácido Nucléico (NAT)

No final dos anos 90, testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos (NAT - *Nucleic Acid Amplification Test*) tornaram-se comum em laboratórios de biologia molecular.

Têm-se como exemplos de NAT: a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), TMA (*Transcription Mediated Amplification*), NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*) e bDNA (*branched DNA*) (UNIMED-BH, 2006).

Em se tratando do rastreio do sangue doado, as técnicas NAT foram implementadas para detecção da infecção no período que precede o desenvolvimento de anticorpos, durante a fase inicial da mesma, constituindo assim um passo essencial para a segurança transfusional.

1.6.2.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica, descrita em meados da década de 80, por Mullis e colaboradores (Mullis & Faloona, 1987), que permite obter *in vitro* várias cópias de um determinado segmento de DNA, através de uma amplificação exponencial (FUNGAR, 2000).

A metodologia da PCR é desenhada de acordo com o princípio natural de replicação de ácidos nucleicos. Este é um processo que decorre em três passos, que em conjunto constituem um ciclo, repetindo-se por um número específico de vezes.

Desta forma um ciclo da PCR consiste nos seguintes passos:

1º) Desnaturação da dupla fita de DNA com a utilização de elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples;

2º) Hibridização ou Anelamento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleotídeos, obtidos por síntese química.

3º) Extensão da fita de DNA complementar com o auxílio de uma DNA polimerase obtida comercialmente.

Este processo ocorre em um termociclador, equipamento que automaticamente controla e alterna as temperaturas durante períodos programados de tempo para o número apropriado de ciclos de PCR.

1.6.2.2.2 nested-PCR

A técnica de nested-PCR é uma PCR em duas etapas. É útil quando impurezas que inibem a amplificação do DNA estão presentes nas amostras ou quando a quantidade de DNA do agente que se deseja detectar é muito pequena (FUNGAR, 2000).

Na primeira etapa da nested-PCR um par de *primer* é utilizado para amplificar um fragmento de DNA genômico, cujo amplicon é utilizado como molde para uma segunda etapa de amplificação com outro par de primers⁴². Este procedimento permitirá a

obtenção de um número suficiente de cópias para visualização em gel de agarose ou poliacrilamida (FUNGAR, 2000).

A nested-PCR é igualmente apropriada para detectar a presença de microrganismos que estão ocorrendo em baixa frequência na amostra em investigação. Este tipo de PCR em duas etapas chega a ser 1.000 vezes mais sensível que a PCR única(FUNGAR, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a presença do vírus da Hepatite B em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Espírito Santo (HEMOES) que não apresentem HBsAg detectável no sangue por testes sorológicos comercialmente disponíveis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência do VHB oculto em doadores de sangue do HEMOES;
- Desenvolver uma metodologia de extração em *pools* de amostras;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/UFES (nº de registro 016/11), em reunião realizada em 04 de Maio de 2011.

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para o estudo da Hepatite B Oculta foram utilizadas 520 amostras de sangue periférico (10mL) de doadores do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Espírito Santo (HEMOES), da Secretaria de Estado da Saúde (SESA), localizado na cidade de Vitória, Espírito Santo. A coleta, devidamente autorizada pelo diretor técnico do HEMOES, Dr. Volmar Belisário Filho (Anexo), foi realizada no período de Dezembro de 2010 a Fevereiro de 2011.

Para otimização da PCR utilizou-se como controle positivo o plasma de 10 pacientes com sorologia positiva para o HBsAg, os quais apresentavam baixa carga viral, devido ao tratamento em andamento. Tais amostras foram cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de Vitória/ES com carga viral máxima de 122UI/mL e mínima de 14UI/mL, quantificada pela técnica de PCR em tempo real (COBAS).

3.3 DEFINIÇÃO DO NÚMERO AMOSTRAL MÍNIMO

O cálculo amostral foi realizado através do programa Epi-Info (versão 3.5.1; Center for Disease Control and Prevention) com base na média anual de 30.000 doadores de sangue do HEMOES e na frequência de HBO em 1,43% doadores de sangue no norte da Índia. As amostras permitirão resultados com erro alfa se aproximando de 1% (intervalo de confiança de 99%).

3.4 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Todo e qualquer cidadão que após triagem clínica estivesse apto para a doação de sangue e que consentiu em participar por escrito, após o esclarecimento verbal sobre os objetivos e a metodologia de pesquisa, foi incluído no estudo.

É importante ressaltar que doadores positivos para o marcador sorológico HBsAg foram excluídos do estudo.

3.5 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO DE DOADORES DE SANGUE

A coleta de sangue periférico foi realizada nas dependências do HEMOES por profissionais competentes da área da saúde. O volume amostral de sangue coletado totalizou 10ml, acondicionado em tubos Vacuette® com gel separador (Vacuette do Brasil).

Os dados dos voluntários são confidenciais e material biológico armazenado foi eliminado após a análise e utilização dos resultados no projeto de pesquisa. O descarte foi realizado em lixo hospitalar sem qualquer tipo de identificação das amostras, para evitar extravio de informação.

3.6 ESTUDO DOS MARCADORES SOROLÓGICOS DA HEPATITE B

A detecção dos marcadores sorológicos do vírus da Hepatite B (HBsAg, anti-HBs e anti-HBc) é rotineiramente realizada por meio de testes imunoenzimáticos do tipo ELISA pelo HEMOES na triagem sorológica do sangue para doação.

3.7 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DO DNA DO VHB

3.7.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir de 10mL de sangue periférico de acordo com o protocolo de extração orgânica com Fenol-Clorofórmio e precipitação com Etanol e Acetato de Amônio padronizado pelo Núcleo de Genética Humana e Molecular da UFES.

As amostras de sangue periférico foram primeiramente centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm para separação do plasma. Retirou-se 350µL de cada amostra, volume este transferido para um novo tubo de polipropileno de 1,5mL. Em seguida, adicionou-se 280µL de TE9 e 70µL de SDS-proteinase K (5mg/ml em 10% de SDS) e o tubo foi incubado em banho-maria por 2 horas a 58 °C.

Após a incubação, iniciou-se a extração orgânica. Primeiro, foi adicionado 700µL de PC9 (Phenol Chloroform pH 9) a cada tubo os quais foram homogeneizados por 1 minuto. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 2 minutos. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante aquoso para um novo tubo com cuidado para que não ocorresse agitação e com isso as proteínas da interfase fossem ressuspendidas. O procedimento descrito acima foi repetido mais uma vez.

Após a extração orgânica iniciou-se a precipitação da amostra com etanol e acetato de amônio. A um volume prévio de 400µL, foi adicionado 100µL de 10M NH₄Ac e 1mL de etanol 100%, gelado. A amostra permaneceu no freezer -18°C por 30 minutos. Após este período, o tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos, em seguida descartou-se todo o líquido e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70%, gelado. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 2 minutos e descartou-se novamente todo o líquido, deixando o tubo secar de cabeça para baixo por 15 minutos. Por fim, após a secagem, adicionou-se 20 µL de LoTE e o tubo foi incubado a 37°C por 15 minutos. O DNA extraído foi armazenado em geladeira a 4°C.

3.7.1.1 Extração do DNA dos Controles Positivos

O DNA viral foi extraído a partir de 100µL de plasma HBsAg positivo, com baixa carga viral, cedido pelo LACEN, de acordo com o protocolo de extração orgânica com Fenol-Clorofórmio e precipitação com Etanol e Acetato de Amônio padronizado pelo Núcleo de Genética Humana e Molecular da UFES.

No primeiro passo transferiu-se 100µL de plasma para um tubo de polipropileno de 1,5mL. Em seguida, adicionou-se 260µL de TE9 e 40µL de SDS-proteinase K (5mg/ml em 10% de SDS) e o tubo foi incubado em banho-maria por 2 horas a 58 °C.

Após a incubação, iniciou-se a extração orgânica, de forma semelhante à extração realizada com o sangue periférico, sendo o diferencial restrito ao volume de PC9 utilizado, que nesse caso em questão totalizou 400µL.

Posteriormente iniciou-se a precipitação da amostra com etanol e acetato de amônio. A um volume prévio de 200µL adicionou-se 50µL de 10M NH₄Ac e 500µL de etanol

100%,gelado. A amostra permaneceu no freezer -18°C por 30 minutos e depois foi centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos. Em seguida todo o líquido do tubo foi descartado e adicionou-se ao precipitado 500 μL de etanol 70%, gelado. Os tubos foram centrifugados mais uma vez a 14000rpm, entretanto por 2 minutos, e descartou-se novamente todo o líquido, deixando o tubo secar de cabeça para baixo por 15 minutos. Por fim, após a secagem, adicionou-se 20 μL de solução de LoTE e o tubo foi incubado a 37°C por 15 minutos. O DNA extraído foi armazenado em geladeira a 4°C .

3.7.1.2 Extração em *pools* de amostras

A fim de diminuir o custeio da análise e também viabilizar a utilização da metodologia em desenvolvimento nas redes públicas de saúde, testou-se também a extração de DNA em *pools* de amostra.

Para testar a funcionalidade do *pool* de amostras diluiu-se 50 μL de plasma VHB positivo com carga viral de 122 UI/mL em 350 μL de água ultra pura, sob a nomenclatura A1. Essa primeira diluição (1:8) foi homogeneizada por 10 segundos e em seguida retirou-se 50 μL da solução diluída, o qual foi transferido para um novo tubo (A2). Ao volume aliquotado adicionou-se 350 μL água ultra pura, resultando em uma diluição 1:64. Tal processo foi repetido por mais duas vezes a fim de obter-se a diluição 1:512 (A3) e 1:4096 (A4), conforme exemplificado na Figura 5. Ao final da última diluição, visando manter-se volumes iniciais semelhantes no processo de extração, descartou-se 50 μL da solução amostral A4.

Paralelamente, diluiu-se 50 μL da mesma amostra VHB positiva utilizada no experimento descrito acima, em 350 μL de plasma HBsAg/ DNA do VHB negativo, sob nomenclatura P1. Seguindo os passos de diluição anteriormente expostos foi possível obter as amostras P2 (1:64), P3 (1:512) E P4 (1:4096) (Figura 5).

Para confirmação dos resultados obtidos, realizou-se o processo de diluição em *pools* de amostras uma segunda vez, agora sob a nomenclatura: A5 (1:8), A6 (1:64), A7 (1:512) e A8 (1:4096) - referente às amostras diluída em água ultra pura e P5 (1:8), P6

(1:64), P7 (1:512) e P8 (1:4096) – referente às amostras diluídas em plasma HBsAg negativo.

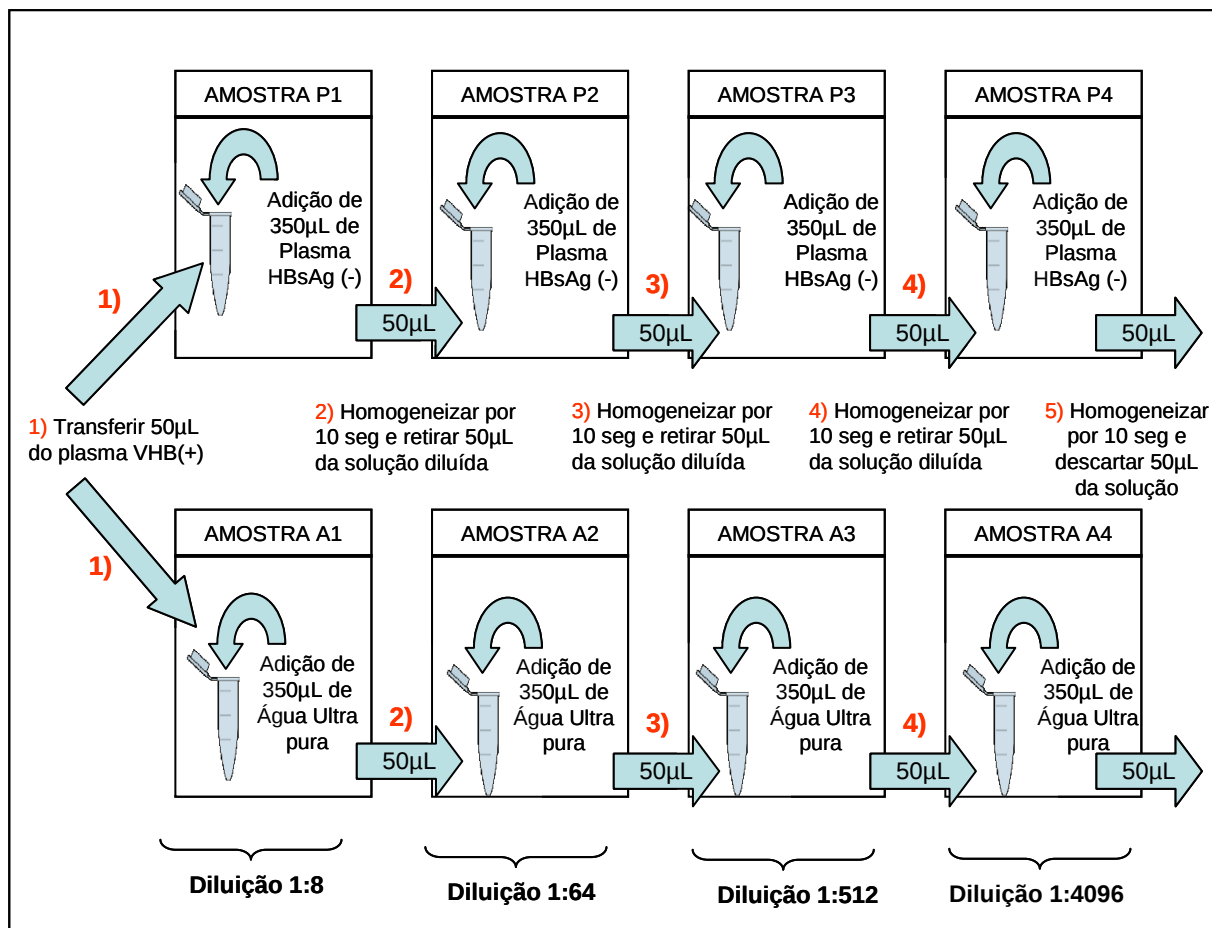


Figura 5. Representação esquemática da extração em pools de amostras com diluição serial (1:8, 1:64, 1:512 e 1:4096).

3.7.1.2 Parâmetros para avaliação da efetividade da extração

Para garantia da efetividade do processo de extração, a amostra de DNA foi submetida à análise de concentração e pureza, determinadas através da leitura de absorbância no espectrofotômetro (NanoDrop Thermo Scientific 1000).

3.8 PESQUISA DO DNA DO VHB

Para escolha e desenvolvimento dos *primers*, primeiramente buscou-se no GenBank mais de 100 sequências do VHB que englobassem os seus oito genótipos (A-H). As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA 4.1 Beta (disponível em: <<http://www.megasoftware.net/>>) e as regiões mais conservadas foram delimitadas e escolhidas como sequência dos iniciadores.

Para auxiliar na escolha das sequências, foi utilizado o programa Primer3 Input 0.4.0 (disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/>), que fornece uma predição da temperatura de anelamento dos iniciadores, da concentração das bases C e G e do potencial para dimerização e formação de estruturas secundárias. Foram realizadas buscas no BLAST (disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>) para verificar se os iniciadores possuíam homologia com sequências de outros organismos que não o VHB.

Foram utilizados dois pares de iniciadores desenvolvidos pelo Núcleo de Genética Humana e Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo, denominados: *HBV 1* e *HBV3* utilizados em reações de PCR e *HBV 2* e *HBV4*, utilizado em reações de nested-PCR tendo como molde o produto da amplificação com o iniciador *HBV1* e *HBV3*, respectivamente (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela3. Iniciadores de PCR utilizados na amplificação de fragmentos do genoma do VHB.

Nome do iniciador	Sequência(5`- 3`)	Posição (nt)	Fragmento amplificado
HBV 1	F1- AAGCCTCCAAGCTGTGCCTT	1866- 1885	451pb
	R1- CCACCAAATGCCCCTATC	2300- 2317	
HBV 2	F2- TGGCTTTGGGGCATGGACAT	1889- 1908	397pb
	R2- GAGTGTGGATTCGCACTCC	2267-2286	
HBV 3	F3- CTGCTGGTGGCTCCAGTTC	57- 75	371pb
	R3- CATCCTGCTGCTATGCCTCA	409- 428	
HBV 4	F4- CCTGCTCGTGTTACAGGCG	187- 205	207pb
	R4- GATGTGTCTGCGGCGTTTT	376- 394	

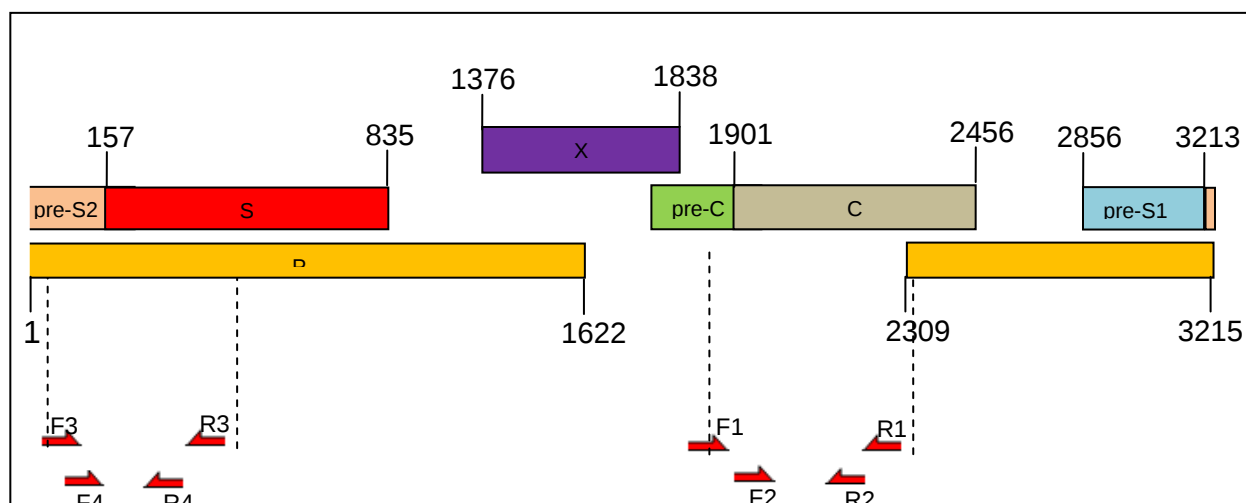


Figura 6. Regiões virais amplificadas pelos iniciadores utilizados no estudo (setas vermelhas).

Fonte: Gomes, 2003.

Nota: Figura adaptada pelo autor

Para validação dos iniciadores testou-se a amplificação das regiões de interesse em amostras cedidas pelo LACEN de Vitória/ES, que apresentavam diagnóstico sorológico positivo para o HBsAg e baixa carga viral.

As condições do programa de amplificação estão demonstradas na Tabela 4. Para a amplificação com os *primers* HBV1 e 3 (primeira etapa da nested-PCR), utilizou-se um volume de 5µL de DNA foi adicionado à mistura de reagentes, contendo 1U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, tampão da Platinum Taq DNA polimerase 1X, o par de iniciadores na concentração final de 0,4µM cada e água ultra pura para completar o volume final de 25µL.

Para a amplificação com os *primers* HBV2 e 4 (segunda etapa da nested-PCR), utilizou-se os mesmo reagentes e concentrações da amplificação com os *primer*HBV1 e 3, com exceção do volume de DNA adicionado, que neste caso, adiciona-se 2µL do produto de PCR (Tabela 4).

Todas as reações de amplificação para as regiões virais foram realizadas no termociclador Geneamp PCR system 9700 (Applied Biosystems®), na presença de um controle negativo e um controle positivo.

Tabela4. Programa de amplificação utilizado na nested-PCR.

	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Nº de Ciclos
HBV 1	94°C, 10min	94°C, 45 seg	59°C, 45 seg	72°C, 45 seg	72°C, 10 min	35X
HBV 2	94°C, 10min	94°C, 45 seg	58°C, 45 seg	72°C, 45 seg	72°C, 10 min	15X
HBV 3	94°C, 10min	94°C, 45 seg	60°C, 45 seg	72°C, 45 seg	72°C, 10 min	30X
HBV 4	94°C, 10min	94°C, 45 seg	63°C, 45 seg	72°C, 45 seg	72°C, 10 min	19X

3.8.1 Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida

Os produtos obtidos após a reação de nested-PCR foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 7% [8,75 mL de acrilamida 40%; 5 mL de TBE 10X; 350µL de APS (persulfato de amônio) 10%; 35µL de TEMED e água destilada para o volume final de 50 mL] por 2 horas e 30 minutos a 220V (HBV 1 e 2) e por 1 hora e 30 minutos (HBV 3 e 4), corados posteriormente com nitrato de prata 0,1%.

Foi incluído no nono ou décimo poço de cada gel, um padrão de peso molecular de 100pb (DNA ladder, Invitrogen® - Life Technology do Brasil). O gel foi arquivado com auxílio do sistema de fotodocumentação de géis (VilberLourmat®).

3.9 SEQUENCIAMENTO DO VHB

O produto de PCR a ser sequenciado foi purificado para retirada de nucleotídeos não incorporados e excesso de iniciadores. A purificação foi realizada utilizando o reagente ExoSAP-IT (USB®) de acordo com as instruções do fabricante.

Foram quantificadas 2µl de cada amostra no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®).

A cada amostra purificada foi adicionado 3,2pmol do *primer* HBV2 e água ultra pura para completar o volume de 7,0µl.

As amostras devidamente identificadas foram enviadas para o sequenciamento no Laboratório de Biotecnologia da pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, que utiliza o sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS

Os dados demográficos (Tabela 5) e o resultado do teste sorológico (Tabela 6) realizado nas 520 amostras do estudo estão resumidos nas tabelas a seguir.

Tabela5. Dados demográficos dos doadores voluntários no estudo.

GÊNERO [NºTOTAL (%)]	
Masculino	411 (79%)
Feminino	109 (21%)
IDADE (ANOS)	
Média	34,3
Amplitude	18 – 65
PROCEDÊNCIA	
Região Metropolitana	440 (84,6%)
<i>Vitória</i>	<i>128 (24,6%)</i>
<i>Cariacica</i>	<i>114 (21,9%)</i>
<i>Vila Velha</i>	<i>73 (14%)</i>
<i>Serra</i>	<i>63 (12,1%)</i>
<i>Viana</i>	<i>40 (7,7%)</i>
<i>Guarapari</i>	<i>13 (2,5%)</i>
<i>Fundão</i>	<i>9 (1,7%)</i>
Polo Linhares	11 (2,1%)
<i>Linhares</i>	<i>5 (0,96%)</i>
<i>João Neiva</i>	<i>2 (0,38%)</i>
<i>Aracruz</i>	<i>4 (0,76%)</i>
Central Serrana	5 (0,96%)
<i>Santa Tereza</i>	<i>1 (0,19%)</i>
<i>Santa Maria de Jetibá</i>	<i>2 (0,38%)</i>
<i>Santa Leopoldina</i>	<i>2 (0,38%)</i>
Sudoeste Serrana	17 (3,27%)
<i>Domingos Martins</i>	<i>10 (1,92%)</i>
<i>Venda Nova Do Imigrante</i>	<i>1 (0,19%)</i>
<i>Marechal Floriano</i>	<i>1 (0,19%)</i>
<i>Laranja da Terra</i>	<i>1 (0,19%)</i>
<i>Afonso Cláudio</i>	<i>4 (0,77%)</i>
Metrópole Expandida Sul	28 (5,38%)
<i>Piúma</i>	<i>1 (0,19%)</i>

<i>Anchieta</i>	26 (5,00%)
<i>Iconha</i>	1 (0,19%)
Caparaó (Iúna)	4 (0,76%)
Polo Cachoeiro (Jerônimo Monteiro)	12 (2,3%)
Noroeste (Nova Venécia)	1 (0,19%)
De fora do Estado	2 (0, 38%)
TOTAL	520

* Coleta realizada no período de Dezembro do 2010 a Fevereiro de 2011

A idade média dos voluntários no estudo foi de 34,3 anos com o valor máximo de 65 anos e mínimo de 18 anos. Dentre estes, 109/520 (21%) pertenciam ao gênero feminino e 411/520 (79%) ao gênero masculino. Com relação à procedência, a maioria dos voluntários reside na Região Metropolitana do Espírito Santo, totalizando 440/520(84,6%).

Tabela6. Dados sorológicos dos doadores voluntários no estudo.

MARCADOR SOROLÓGICO	GÊNERO	IDADE (Anos)	PROCEDÊNCIA	Nº/ TOTAL (%)
Anti-HBc (+)	11/14 ♂ 3/14 ♀	Amplitude: 21-57 Média: 37	10/14 Grande Vitória 2/14 Jerônimo Monteiro 1/14 Linhares 1/14 Campo Grande	14/520 (2,7%)
HIV (+)	2/2 ♂	Amplitude: 26 - 40 Média: 33	1/2 Cariacica 1/2 Linhares	2/520 (0,4%)
CHAGAS (+)	1/1 ♂	32	1/1 Santa Tereza	1/520 (0,2%)

♂ = Homem

♀ = Mulher

Não foi observada co-infecção HIV-Hepatite B. Dentre as amostras analisadas, 14/520 (2,7%) apresentaram o marcador viral anti-HBc, 2/520 (0,4%) mostraram-se positiva para o HIV e 1/520 (0,2%) apresentaram reação imunológica positiva para doença de Chagas.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Foi possível detectar a presença de DNA em todas as 520 amostras coletadas, com valor máximo de 309ng/μL e mínimo de 19ng/μL, com média de 52ng/μL de DNA. É importante ressaltar que a amostra com a menor concentração de DNA refere-se a um dos controles VHB positivo. Como foi obtido sucesso na amplificação de tal controle considerou-se o mínimo de 19ng/μL como o limiar para a amplificação. Não houve amostra com concentração de DNA menor que o limiar.

4.3 REAÇÃO DE NESTED-PCR

Todas as amostras de DNA extraídas foram submetidas à reação de nested-PCR para a obtenção de fragmentos de 451pb (HBV1), 397pb (HBV2), 371pb (HBV3) e 207pb (HBV4).

4.3.1 Amplificação com os primers HBV1 e 2

Em todas as 10 amostras HBsAg positivas com baixa carga viral, cedidas pelo LACEN, foi possível detectar a presença do VHB com a utilização do par de iniciadores HBV1 e 2. Tais amostras foram utilizadas como controle positivo em cada reação de nested-PCR. A seguir um gel representativo da eficiência da reação de nested-PCR com oito das dez amostras analisadas (Figura 7).

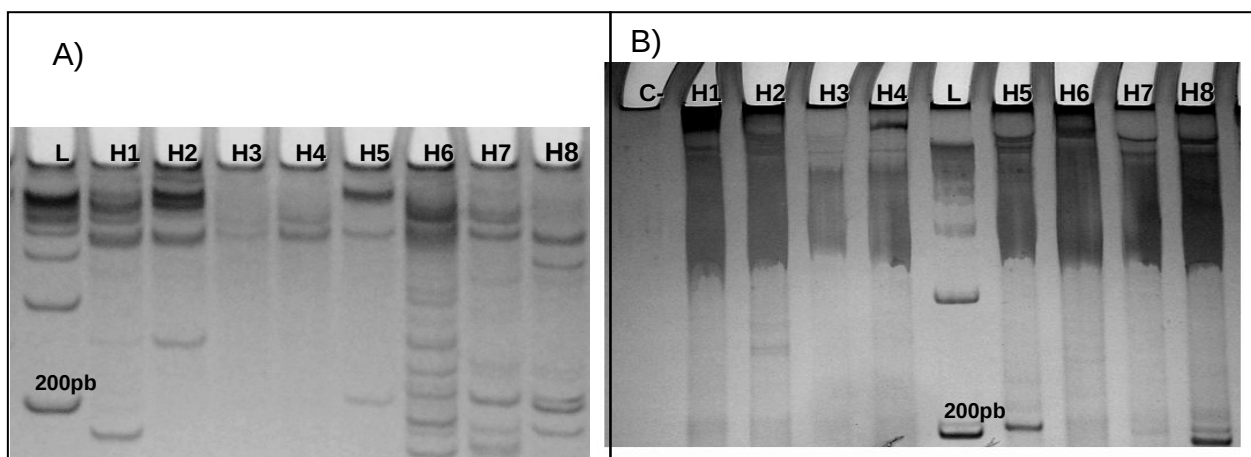


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida do produto do nested-PCR com a utilização dos primers HBV1 (A) (451pb) e 2 (B) (397pb). H1 a H8 equivalem a oito amostras de pacientes HBsAg positivos com baixa carga viral cedidas pelo LACEN. (L) Ladder de 100pb.

É interessante ressaltar que a visualização da banda de interesse na forma de um “borrão” significa que há um excesso de produto amplificado e dessa forma o mesmo satura no gel, formando o tal “borrão” ao invés de uma banda bem definida.

Para garantir que o borrão visualizado refere-se à banda de interesse diluiu-se 5µL do produto de PCR da amostra H1 em 135µL de LoTE e, testou-se em gel de poliacrilamida diferentes volumes dessa amostra diluída (2µL, 5µL, 8µL e 10µL) a fim de confirmar a eficiência da reação de nested-PCR por meio da nítida visualização da banda de 397pb (Figura 8).

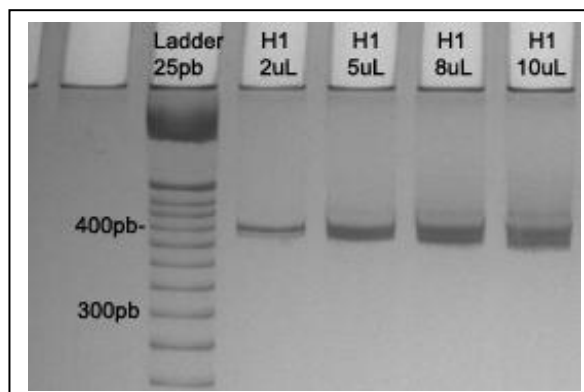


Figura 8. Resultado da diluição de 5µL do produto do nested-PCR da amostra H1 em 135µL de LoTE. Foram aplicados 2µL, 5µL, 8µL e 10µL do produto diluído em gel de poliacrilamida 7%. Ladder de 25pb.

Foi possível visualizar a banda de interesse independente do volume carregado no gel de poliacrilamida, entretanto, a corrida de 2 μ L de produto revelou uma banda melhor delimitada que as demais (Figura 8).

Para garantir a sensibilidade da reação, visando à detecção de amostras com carga viral baixa (aproximando-se de 1UI/mL) diluiu-se o 20 μ L do DNA extraído de uma amostra com carga viral de 31,3UI/mL (log 1,5) em 63 μ L de LoTE e 20 μ L do DNA extraído de outra amostra com carga viral de 44,5UI/mL (log 1,65) em 89 μ L LoTE (Figura 9).

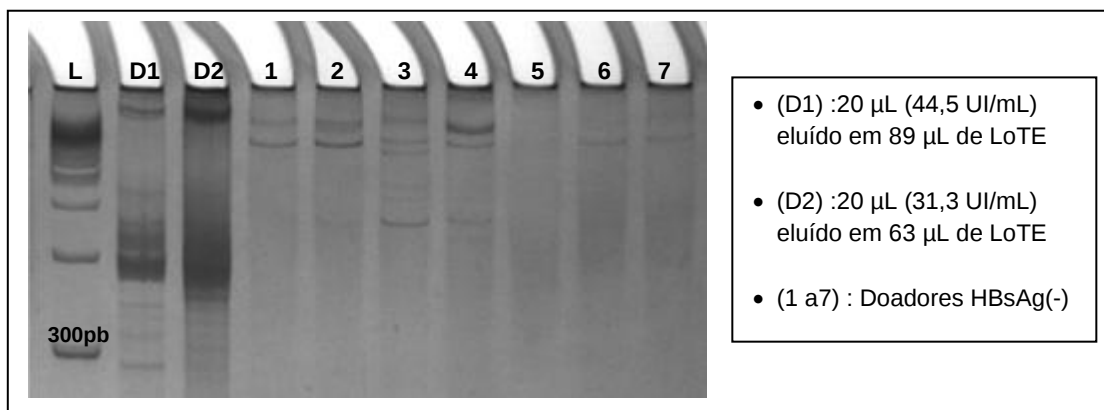


Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras diluídas em LoTE. (L) Ladder de 100pb.

Com relação ao resultado da triagem molecular para VHB em doadores de sangue HBsAg negativo de Vitória, Espírito Santo, utilizando o par de *primer* HBV1 e 2, foi obtido positividade para o DNA do VHB em 1/520 (0,2%) das amostras analisadas. Entretanto, não foi possível confirmar o resultado em duas novas amplificações (Figura 10). A amostra foi extraída pela segunda vez e re-amplificada, porém, não foi possível detectar a banda de interesse.

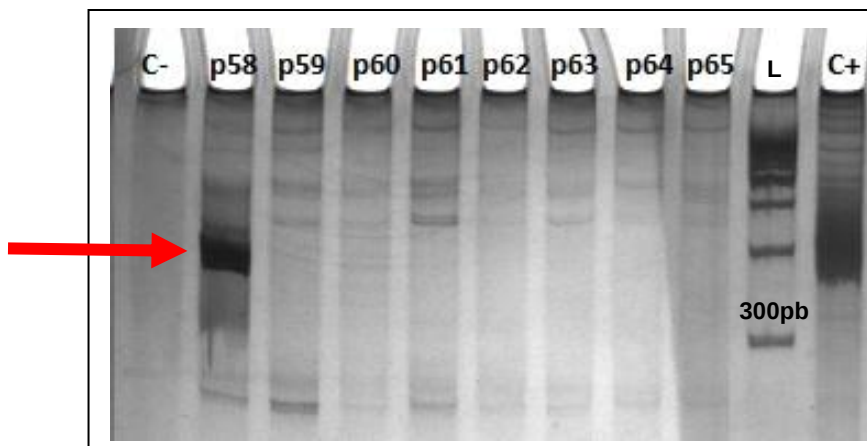


Figura 10. Visualização em gel de poliacrilamida da possível amostra positiva, p58. (C-) refere-se ao controle negativo da reação e (C+) ao controle VHB positivo. (L) Ladder de 100pb.

Para descartar a hipótese de contaminação com o controle positivo utilizado na PCR, sequenciou-se tanto o controle positivo quanto a possível amostra positiva (p58) (Figura 11). Vale lembrar que não foi observada nenhuma banda específica ou inespecífica na amplificação do controle negativo da reação.

4.3.1.1 Resultado do sequenciamento dos controles VHB positivo da nested-PCR e do VHB oculto (p58)

Para excluir a possibilidade de resultado falso-positivo devido à contaminação da reação, comparou-se a sequência de nucleotídeos do controle positivo e da amostra p58 (Figura 11).

Tais sequências foram alinhadas no programa DNA baser v.3.5.0 com a obtenção de 338 bases com ótima qualidade, 14% (47/338) ambiguidades e 0,6% (2/338) gaps. Foram realizadas também buscas no BLAST (disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>) que resultaram em 100% de similaridade com o Vírus da Hepatite B.

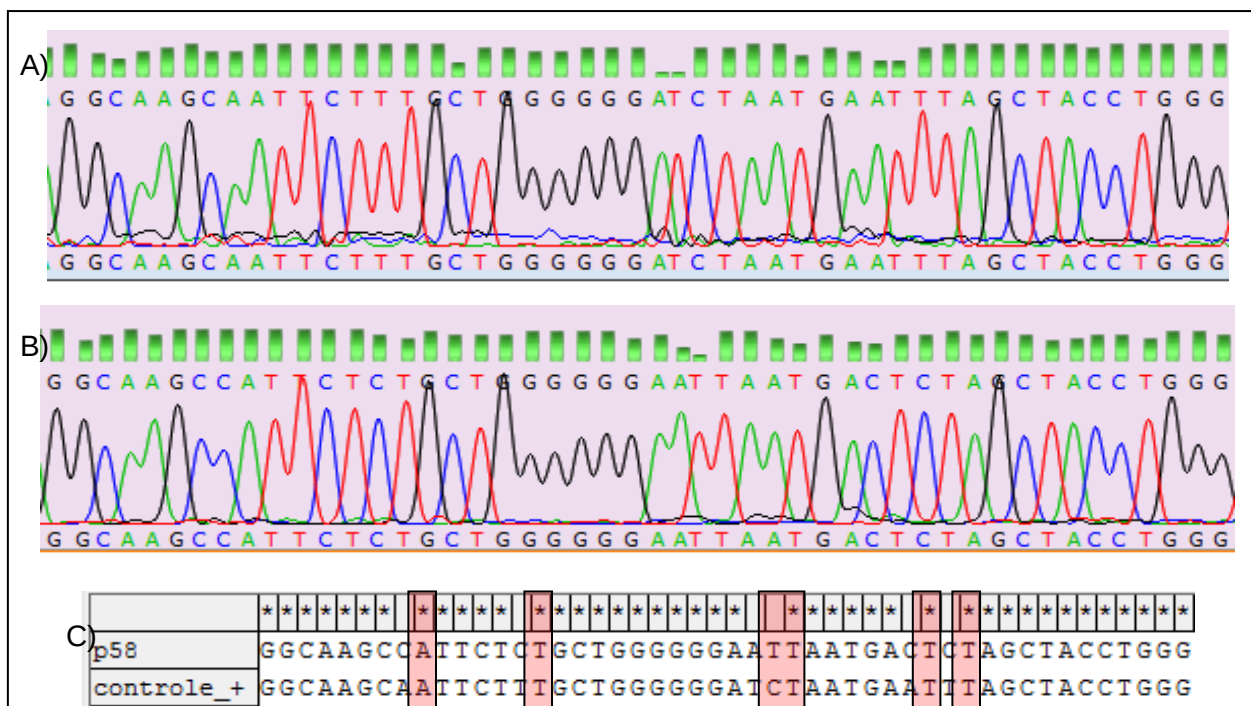


Figura 11. Parte do sequenciamento da amostra p58 e do controle positivo utilizado na reação de nested-PCR. A) Sequenciamento do Controle Positivo. B) Sequenciamento do possível VHB oculto (p58). C) Alinhamento das sequências no programa ClustalW (MEGA 4.0). Barras vermelhas evidenciam as ambiguidades.

Para garantia que a positividade da amostra p58 não foi resultado de contaminação com nenhuma amostra viral mantida em laboratório, sequenciou-se também todas as amostras positivas para o DNA do VHB armazenadas no NGH-UFES (Figura 12).

O resultado do alinhamento de oito controles VHB positivo e do VHB oculto, no programa DNA baser v.3.5.0, revelou um total de 70% de similaridade, 22 gaps, 111 ambiguidades.

	A	C	T	C	A	G	G	C	A	A	G	C	C	A	T	T	C	T	C	T	G	C	T	G	G	G	G	G	G	A	A	T	T	A	A	T	-
1. p58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. C+	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	C	-	-	-	-	
3. VHB 5	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	C	-	-	-	-	
4. VHB 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	
5. VHB 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6. VHB 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7. VHB 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8. VHB 6	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	
9. VHB 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	A	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	
10. VHB 8	-	-	-	-	G	A	-	-	-	G	C	T	T	T	-	G	T	G	G	G	-	G	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	G	-	-	G

Figura 12. Parte do sequenciamento dos controles VHB positivo e do VHB oculto. Bases diferentes quando comparadas com a sequência do VHB oculto são evidenciadas e as idênticas são representadas por um traço. (C+) e VHB5 referem-se à mesma amostra.

Todas as amostras analisadas apresentaram sequências de DNA não idênticas, com similaridade maior que 90% quando comparadas a sequências do VHB disponíveis em um dos principais bancos de dados internacionais (GenBank), indicando que as sequências obtidas realmente provinham de exemplares do VHB, ainda que diferentes entre si.

Vale ressaltar que o controle positivo utilizado na PCR em que houve a amplificação do VHB oculto foi novamente amplificado e sequenciado (VHB 5) a fim de excluir-se o erro humano (Figura 12).

Para melhor compreensão do resultado do sequenciamento, construiu-se uma árvore filogenética pelo método de Neighbor Joining (Saitou & Nei 1987), usando-se o teste de filogenia *Bootstrap*, com 1000 repetições (Figura 13).

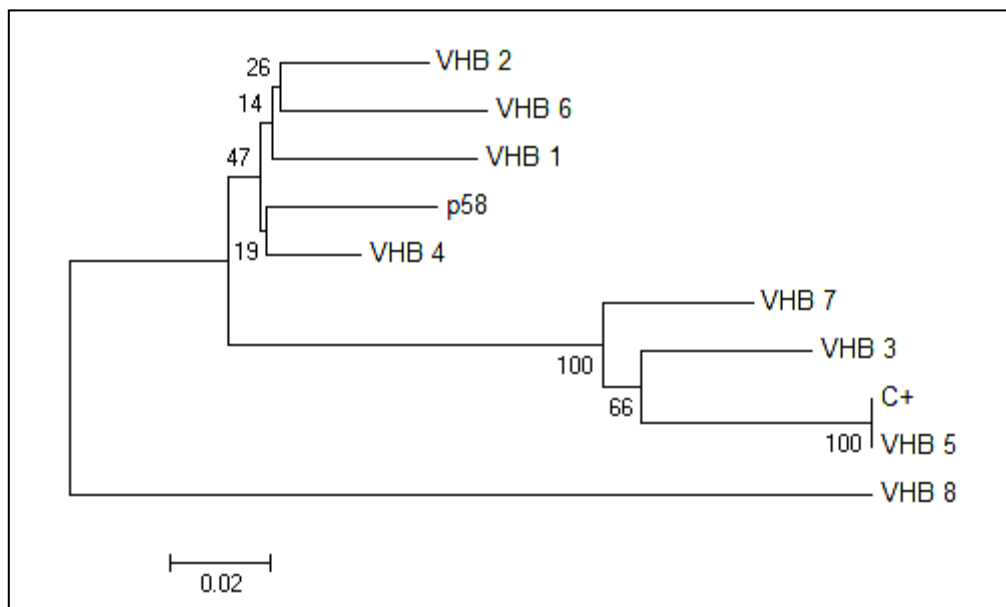


Figura 13. Árvore filogenética construída a partir de sequências do VHB (controles positivos da PCR e VHB oculto). Ramas com valores de *bootstrap* inferiores a 55% são consideradas como não resolvidas.

Valores de *bootstrap* inferiores a 55% são considerados como fracos, contudo, não deixam de ser indicativos de suporte para o grupo.

O valor de *bootstrap* igual a 100% demonstra que o controle positivo VHB 5 foi realmente utilizado como controle positivo na reação em que houve a amplificação do VHB oculto. E a distância do mesmo em relação a amostra p58 na árvore filogenética reforça a hipótese de que não houve contaminação.

O controle positivo nomeado VHB 4, apresentou maior similaridade com o VHB oculto detectado na amostra p58, apresentando um total de 19 ambiguidades. Já o controle positivo nomeado VHB 8 apresentou menor similaridade, com um total de 49 ambiguidades.

4.3.2 Amplificação com os primers HBV3 e 4

Dentre as 10 amostras HBsAg positivas, com baixa carga viral, cedidas pelo LACEN, foi possível detectar a presença do VHB em todas as amostras utilizando o par de iniciadores HBV3 e 4, amostras estas utilizadas como controles positivos em cada

reação de nested-PCR (Figuras 14A e 15). Entretanto, Não foi observado positividade em nenhuma das amostras de doadores de sangue.

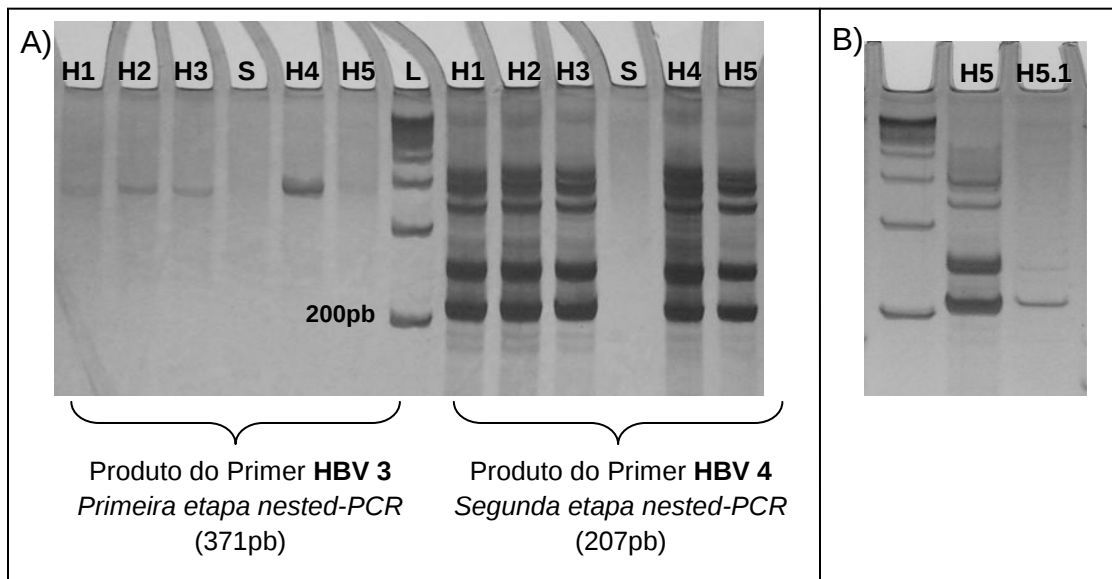


Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida do produto do nested-PCR com a utilização dos primers HBV3 e 4. A) (H1 a H5) Controles positivos para o VHB. (S) Amostra HBsAg negativa. (L) Ladder de 100pb. B) (H5) Amostra com menor carga viral (14UI/mL) e temperatura de anelamento de 63°C e H5.1 mesma amostra porém temperatura de anelamento a 64°C.

No resultado da amplificação com o *primer* HBV4 há visualização da banda de interesse como também de bandas inespecíficas. Sendo assim, na tentativa de melhorar a visualização da banda de interesse, tornando-a melhor delimitada, testou-se aumentar a temperatura de anelamento em 1°C, aumentando para 64°C.

Para o teste da nova condição da nested-PCR utilizou-se como amostra positiva o controle com menor carga viral (14UI/mL). Porém, o observado foi a diminuição da sensibilidade da reação (diminuição da saturação da banda no gel) (Figura 14B). Por esta razão, optou-se por manter a temperatura de anelamento a 63°C, uma vez que não há amplificação de bandas inespecíficas em amostras HBsAg negativas (Figura 15).

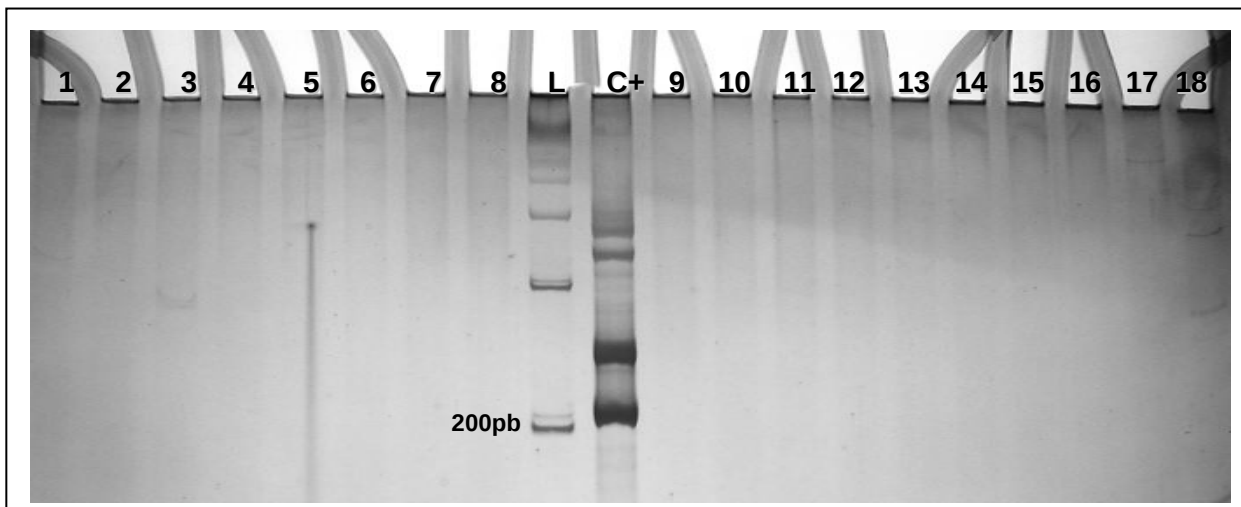


Figura 15. Resultado da amplificação de amostras HBsAg negativas com a utilização do par de primers HBV3 e 4. (1 a 18) Correspondem a 18 amostras HBsAg negativas. (C+) controle positivo utilizado na reação. (L) Ladder de 100pb.

4.3.3 Amplificação do pool de amostras

Os resultados obtidos nas duas rodadas de extração em *pools* de amostras foram semelhantes, confirmando a eficiência da técnica. Foi possível amplificar apenas a amostra diluída em plasma HBsAg negativo na proporção 1:8 (P1 e P5) (Figura 16).

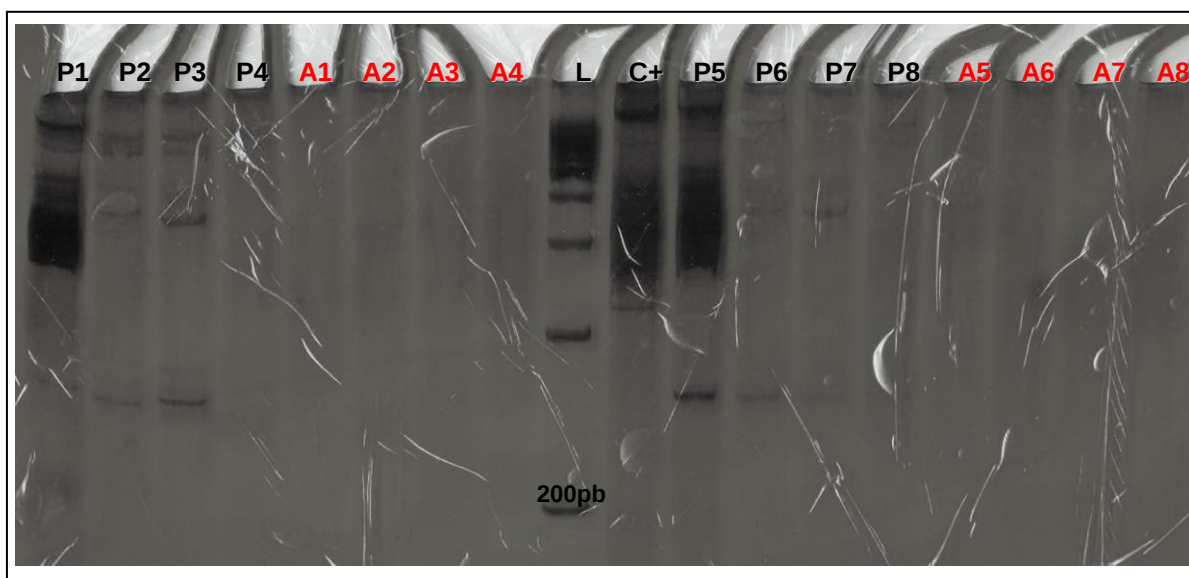


Figura 16. Resultado do teste da extração em *pools* de amostras. P1 a P8 correspondem a amostras de plasma VHB positivo diluído em plasma HBsAg negativo enquanto que A1 a A8 correspondem a amostra de plasma VHB positivo diluído em água ultra pura. P1 a P4 representa a primeira rodada de extração e P5 a P8 a replicata, assim como A1 a A4,

representam a primeira rodada de extração e A5 a A8 a replicata. (C+) Controle VHB positivo. (L) Ladder de 100pb.

Devido ao fato de ser possível a amplificação da amostra diluída na proporção 1:8 e não mais nas proporções seguintes (1:64, 1:512 e 1:4096) objetivou-se estudar o momento de perda de sensibilidade da extração através de diluições seriais (1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:60), conforme exemplificado na Figura 17.

Para descobrir o real poder de detecção da técnica desenvolvida e o número preciso de amostras a serem analisadas por *pools*, testou-se a diluição serial de amostras VHB positivas com carga viral de 14UI/mL e 54UI/mL.

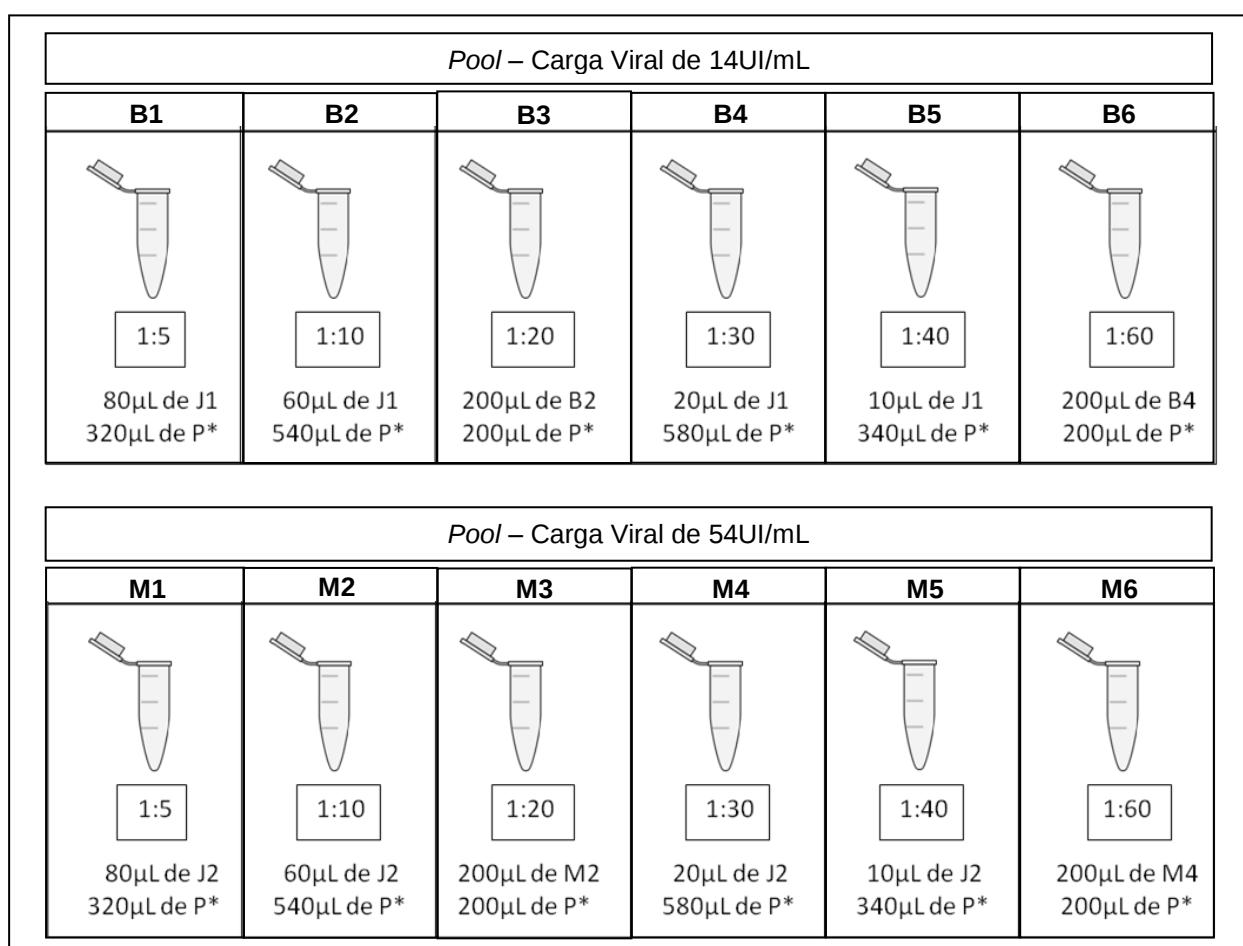


Figura 17. Diluição serial de amostras positivas para o DNA do VHB com carga viral de 14UI/mL e 54UI/mL em plasma HBsAg negativo. J1 (Amostra positiva para o DNA do VHB com carga viral de 14UI/mL). J2 (Amostra positiva para o DNA do VHB com carga viral de 54UI/mL). P* (Plasma HBsAg/DNA do VHB negativo).

Na amplificação do pool de amostras com o par de iniciadores HBV1 e 2 foi possível detectar o VHB em todas as diluições seriadas (1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:60) que utilizaram a amostra VHB positiva com carga viral de 54UI/mL (Figura 18A). Já no pool em que se testou a diluição serial da amostra positiva com carga viral de 14UI/mL, foi possível detectar o VHB apenas quando diluído na proporção 1:5 (Figura 18B).

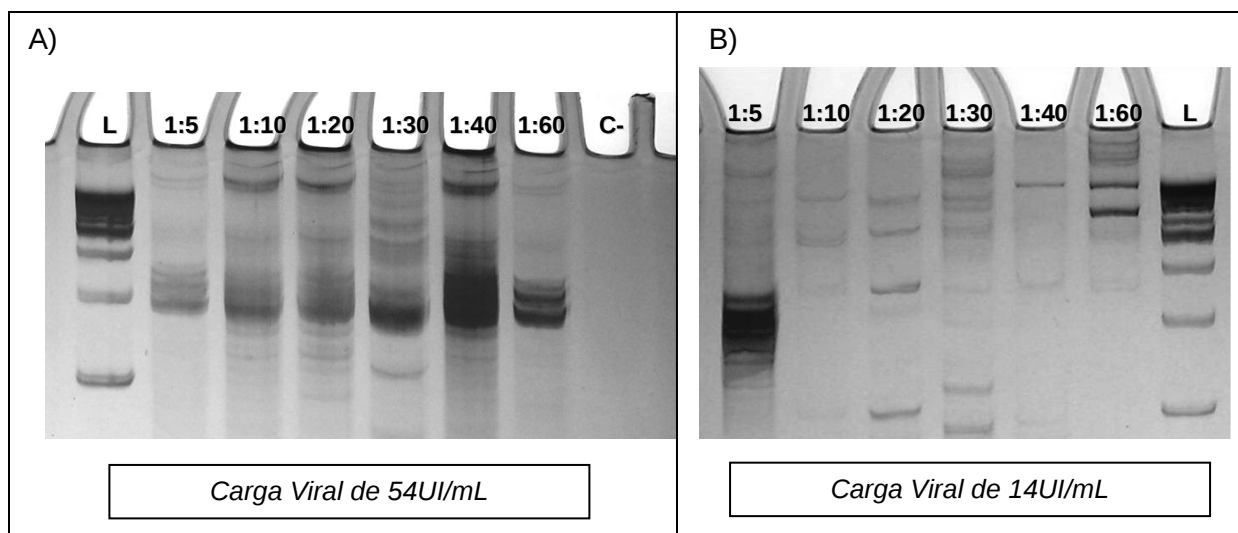


Figura 18. Resultado da diluição serial das amostras com carga viral de 14UI/mL e 54UI/mL utilizando o par de primer HBV1 e 2. A) Pool de amostra com carga viral de 54UI/mL em plasma HBsAg negativo. B) Pool de amostra com carga viral de 14UI/mL em plasma HBsAg negativo. (C-) Controle negativo. (L) Ladder de 100pb.

Na amplificação do pool de amostras com o par de iniciadores HBV3 e 4 foi possível detectar o VHB em nas seguintes diluições seriadas: 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 e 1:40, que utilizaram a amostra positiva com carga viral de 54UI/mL. Não havendo positividade quando a amostra VHB positiva foi diluída na proporção 1:60 (Figura 19).

Em se tratando da diluição serial da amostra VHB positiva com carga viral de 14UI/mL, quando realizada a amplificação com o par de iniciadores VHB3 e 4, não foi possível detectar o VHB (Figura 19).

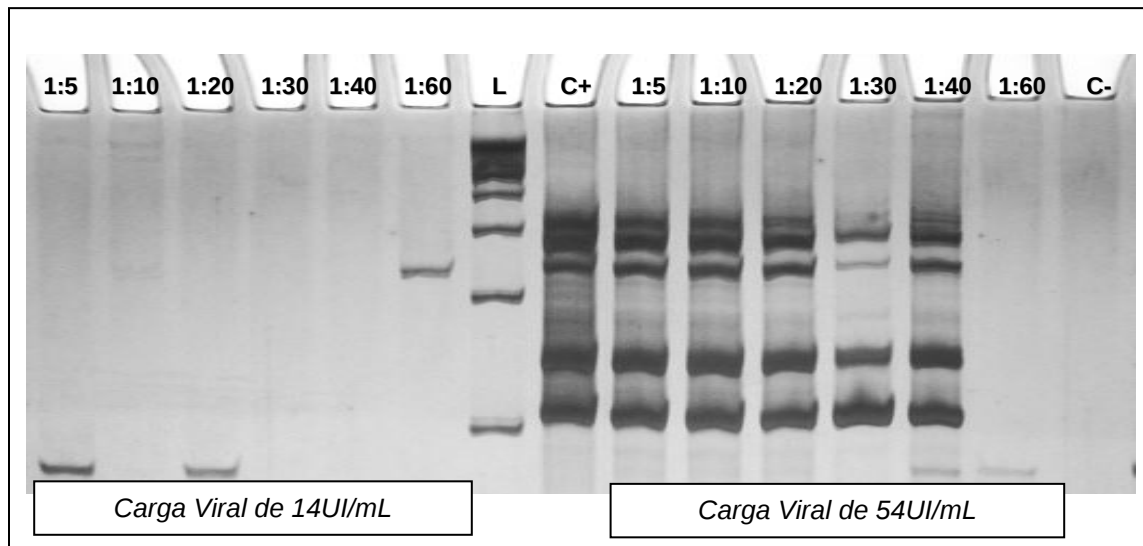


Figura 19. Resultado da diluição serial das amostras com carga viral de 14UI/mL e 54UI/mL utilizando o par de primer HBV3 e 4. (C+) Controle VHB positivo da reação de nested-PCR. (C-) Controle negativo. (L) Ladder de 100pb.

5. DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO DA HBO EM DOADORES DE SANGUE DE VITÓRIA/ES

O DNA do VHB foi detectado em 1/520 (0,2%) doadores de sangue HBsAg negativos de Vitória/ES. Estudos que reportam a frequência da HBO em doadores de sangue, de uma forma geral independente do dado sorológico, são raros. No Brasil, em Campinas, uma análise aleatória de 150 doadores de sangue revelou a presença de Hepatite B Oculta em 4% (6/150) das amostras analisadas(JARDIM et al., 2008). Existem também relatos da detecção da HBO em doadores anti-HBc positivos em países como Itália (4,86%)(MANZINI et al., 2007) e Índia (7,5%)(ASIM et al., 2010).

Sendo assim, percebe-se que embora a detecção da HBO nos doadores de sangue de Vitória-ES tenha sido inferior a relatos descritos na literatura, a simples existência de tal condição já enquadra um possível problema de saúde pública, uma vez que Yong Liu (2010) relata a existência de cinco casos de Hepatite B Ativa após a transfusão de sangue com o VHB oculto.

Então, considerando os 30.000 doadores voluntários ao ano no HEMOES associado à frequência de HBO detectada no estudo (0,2%), entende-se que em 1 ano haverá, possivelmente, a coleta de 60 bolsas de sangue com o VHB oculto. A impossibilidade de detecção desses casos por meio da triagem sorológica, como também a não informação ao doador, pode induzir um aumento da disseminação do VHB oculto de forma exponencial, fato este que ressalta a importância do estudo e detecção da HBO.

A Portaria nº262/2002 do Ministério da Saúde, de 05 de fevereiro de 2002, tornou obrigatório no âmbito da Hemorrede Nacional a inclusão de testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos (NAT) apenas para o HIV e o vírus da Hepatite C, em todas as amostras de sangue de doadores, abstendo-se de tornar obrigatória a detecção molecular do VHB.

Desta forma, sugere-se que os dados preliminares expostos pelo estudo sejam corroborados com uma amostra mais numerosa, para assim compreender se há necessidade de inclusão do teste NAT para o VHB na triagem molecular das bolsas de sangue, uma vez que, mesmo com a pesquisa de marcadores sorológicos da Hepatite

B, ainda existe o potencial risco de transmissão do VHB oculto, ou mesmo do VHB no período de janela imunológica, via transfusão sanguínea.

5.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS INICIADORES E AMPLIFICAÇÃO DO DNA DO VHB

Na detecção do VHB por meio de técnicas de biologia molecular, a escolha dos *primers* a serem utilizados caracteriza-se no passo crítico do estudo, uma vez que é necessário o uso de iniciadores capazes de detectar os múltiplos genótipos e variantes do VHB. Com isso, optou-se por usar dois pares de iniciadores (HBV1 e 2 / HBV3 e 4) que fossem específicos para o maior número possível de genótipos do VHB, com a finalidade de confirmar os resultados obtidos. Não foi observada homologia dos iniciadores com sequências de outros organismos que não o VHB.

Sabe-se que o padrão ouro atual para a detecção do VHB oculto é a análise do DNA viral pela técnica de nested-PCR ou PCR em tempo real. Entretanto, é importante ressaltar que os níveis séricos de DNA viral (<200UI/mL) em casos de HBO são muitas vezes inferiores ao limite de detecção de certos ensaios quantitativos (MELLO, 2007; HOLLINGER E SOOD, 2010). Sendo assim, a escolha da metodologia de análise deve ser bem criteriosa a fim de evitar resultados falso-negativos.

A metodologia escolhida pelo estudo foi a nested-PCR pelo fato do NGHM-UFES já estar equipado com todo o aparato laboratorial para a realização do projeto e também pelo baixo custo da técnica.

Em todas as reações realizadas no decorrer do estudo foi possível a amplificação do controle positivo, mostrando que a nested-PCR é uma técnica segura e confiável, que produz resultados satisfatórios utilizando-se de um pequeno volume amostral.

Quanto ao par de *primers* HBV1 e 2 optou-se por manter a visualização do borrão, ao invés da banda bem delimitada com o objetivo de detectar a Hepatite B Oculta, a qual caracteriza-se pela presença do VHB em baixa viremia. Dessa forma, entende-se que quanto menor a carga viral, menor será a saturação no gel e conseqüentemente menos espesso se tornará o borrão até o limite de visualização de uma fina banda em gel de

poliacrilamida. Então, mantendo a visualização do borrão existe uma maior possibilidade de se detectar amostras VHB positiva com baixa carga viral.

No estudo, o controle VHB positivo com menor carga viral apresentava 14UI/mL. Na amplificação de tal amostra foi possível a visualização do borrão, indicando assim a possibilidade de detecção de amostras com cargas virais menores que 14UI/mL.

Quanto ao par de primers HBV3 e 4, embora haja a visualização da banda de interesse e de bandas inespecíficas, optou-se pela permanência e manutenção das mesmas para não diminuir a sensibilidade da reação, de forma a não diminuir a saturação da banda de interesse. A ausência de tais bandas em amostras HBsAg negativas também representou um fator determinante na permanência das bandas inespecíficas.

5.2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A DETECÇÃO DO VHB OCULTO

A detecção do VHB oculto em 1/520 (0,2%) amostras de doadores de sangue foi possível com a utilização do par de primers HBV1 e 2, porém, não foi possível confirmar o resultado em uma nova amplificação. A fim de excluir-se o erro humano, tal amostra foi novamente extraída e re-amplificada, entretanto, o resultado permaneceu negativo. Posteriormente, tentou-se amplificar o VHB oculto com o par de *primers* HBV3 e 4 e, novamente não foi obtido sucesso na amplificação.

Sendo assim, entende-se que a impossibilidade de re-deteção do VHB oculto em 1/520 amostras analisadas, possivelmente, foi devido à degradação do DNA.

Estudos sobre a degradação do DNA extraído, armazenado em diferentes temperaturas (-20°C, -4°C e 27°C) revelam que há degradação da amostra independente da temperatura de armazenamento, embora em diferentes graus (amostras armazenadas em temperaturas mais baixas apresentam menor índice de degradação) (ALMEIDA et al., 2009).

Na realização do estudo, as alíquotas sanguíneas coletadas foram centrifugadas e, armazenou-se apenas o plasma em freezer a -18°C. Deixados transcorrer um período de dois meses para finalizar a coleta, iniciou-se o processo de extração de DNA. Ao

final de cada processo de extração, as amostras eram armazenadas em geladeira a -4°C.

Após o período de um mês, iniciou-se o processo de amplificação quando foi possível detectar o VHB oculto em 1/520 amostras analisadas.

Outro fato interessante a ser ressaltado envolve um caso peculiar na amplificação dos controles VHB positivo. A amostra uma vez extraída e eluída em 20µL de LoTE não deve ser usada até finalizar o seu volume. Ao gastar-se aproximadamente metade do volume estocado, a amostra começa a perder a positividade.

Diante do exposto entende-se que a impossibilidade de re-detecção do VHB oculto deve estar possivelmente relacionada com a forma de armazenamento do plasma, com o tempo prolongado entre coleta e amplificação, bem como com a baixa viremia do VHB em casos de HBO. Sendo assim sugere-se que a alíquota sanguínea, assim que coletada seja processada (extração e amplificação), ou então, que seja armazenada em nitrogênio líquido a temperaturas extremamente baixas, evitando assim a degradação do pouco material viral encontrado no plasma.

5.2.1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O SEQUENCIAMENTO DO VHB OCULTO E CONTROLES VHB POSITIVO DA PCR

Para excluir-se a hipótese de contaminação e garantir que a amostra positiva p58 realmente enquadra um caso de Hepatite B Oculta sequenciou-se 8/10 amostras VHB positivas armazenadas no laboratório e utilizadas no estudo. Não foi possível sequenciar 2/10 controles positivos pois o volume amostral estocado era insuficiente para a realização do procedimento.

É importante ressaltar que o controle positivo utilizado na reação em que se detectou o VHB oculto foi novamente extraído e sequenciado para assim garantir a fidelidade da leitura de nucleotídeos do sequenciamento.

A comparação do resultado do sequenciamento das nove amostras VHB positivas com a sequência do VHB oculto associado à análise dos dados da árvore filogenética

construída pelo método de Neighbor Joining revelou que as sequências de DNA não eram idênticas, com uma diferença de no mínimo 19pbe no máximo 49pb, salvo o controle positivo que foi re-sequenciado.

Ou seja, cada exemplar mantido em laboratório como também o VHB oculto apresentavam sequências de DNA diferentes entre si, embora similares a sequências do VHB disponíveis em bancos de dados públicos como o GeneBank.

O valor de *bootstrap* encontrado em cada nó da árvore filogenética indica o grau de confiança na estrutura da árvore e correspondem aproximadamente ao número de vezes em que aquela forma de organizar as sequências naquele nó da árvore foi observada.

Valores de *bootstrap* menores que 55% indicam incerteza nos pontos da árvore, e assim há necessidade de uma amostragem mais ampla a fim de obterem-se resultados mais precisos. Dessa forma entende-se que há necessidade de inclusão de um número maior de sequências virais para se construir uma árvore com maior confiabilidade dos resultados.

A detecção de valores de *bootstrap* altos nos nós das ramificações (>55%) indica que a grande maioria das árvores formadas tem de fato o aspecto encontrado.

Diante do exposto entende-se que a amostra considerada como positiva realmente enquadra um caso de VHB oculto, uma vez que o resultado do sequenciamento exclui a possibilidade de erro humano e de resultado falso-positivo devido à contaminação com os controles utilizados na reação.

5.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM POOL DE AMOSTRAS

Quanto à extração de DNA, obtido com a metodologia de extração a partir de sangue periférico, os bons resultados aqui apresentados relacionam-se com a eficiente padronização desenvolvida pelo NGHM-UFES.

Em se tratando do estudo da HBO em doadores de sangue, devido ao elevado número de amostras a ser processadas em um curto período de tempo o ideal é a realização da análise em “pool” de amostras.

Têm-se proposto na literatura a realização de *pools* de 5 amostras. Sendo assim, objetivou-se padronizar uma metodologia de extração em *pools* capaz de analisar o maior número de amostras possíveis ao mesmo tempo, o que diminui os custos e torna o procedimento viável às redes públicas de saúde.

A utilização do par de *primers* HBV1 e 2, na amplificação das amostras diluídas em *pools*, mostrou-se mais eficiente que o par de *primers* HBV3 e 4 por conseguir detectar a amostra positiva de carga viral de 54UI/mL em *pools* de 60 amostras e a amostra positiva com carga viral de 14UI/mL em pool de 5 amostras.

É importante ressaltar que devido ao fato da HBO normalmente manifestar-se em baixa viremia (<200UI/mL) a escolha de amostras VHB positiva, com cargas virais de 122UI/mL, 54UI/mL e 14UI/mL, a serem testadas nos *pools* foi intencional a fim de criar-se uma situação próxima do esperado em casos de HBO.

Como no pool de 5, 10, 20, 30 e 40 amostras foi obtido sucesso na amplificação utilizando os dois pares de *primers*, sugere-se que a diluição 1:40 seja a adotada na pesquisa do VHB oculto em amostras numerosas, estipulando o limite de detecção em 54UI/mL.

Vale lembrar que ainda se faz necessário a realização de estudos posteriores que tenham como objetivo a detecção de amostras VHB positivas, com baixa carga viral (inferior a 54UI/mL), diluídas em *pools*.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Hepatite B é uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo, controlada em países onde a vacinação foi implantada, como por exemplo o Brasil. A provável explicação da alta endemicidade para o VHB no Espírito Santo, deve-se ao fato da cobertura vacinal contra a Hepatite B ainda estar abaixo da meta mínima preconizada

pelo Ministério da Saúde, de 95% (dados da Secretaria de Estado da Saúde até Maio de 2011) e possivelmente devido à existência de portadores da HBO que uma vez não diagnosticados podem estar agindo como instrumento de disseminação da infecção. Entretanto, é importante ressaltar que o possível papel da HBO na progressão e agravamento de algumas hepatopatias é ainda assunto muito controverso.

No Espírito Santo existe apenas um estudo envolvendo a detecção do VHB oculto em pacientes com carcinoma hepatocelular (CARVALHO, 2009). Porém, na literatura constam também relatos de HBO em doadores de sangue, hepatopatas crônicos, em pacientes submetidos à hemodiálise ou transplante (TORBENSON E THOMAS, 2002).

Desta forma percebe-se a importância de detectar a existência da HBO em diferentes amostras da população, para que se possa ter em mãos portadores da infecção oculta acompanhados prospectivamente, a fim de tentar surpreender possíveis efeitos da presença do DNA do VHB em baixas concentrações nesses indivíduos.

A inserção da triagem molecular (NAT) das bolsas de sangue para o VHB irá ajudar a complementar os exames sorológicos de rotina utilizados nos hemocentros do país, viabilizando a detecção do VHB oculto como também o VHB no período de janela imunológica.

6. CONCLUSÃO

A prevalência da HBO em doadores de sangue HBsAg negativos de Vitória, Espírito Santo foi de 0,2% (1/520). Com o objetivo de viabilizar a pesquisa do VHB oculto em amostras numerosas, no estudo foi desenvolvido um teste de extração em pools de 40 amostras, com limite de detecção de 54UI/mL.

7. REFERÊNCIAS

- Aghakhani, A.; Banifazl, M.; Kalantar, E.; Eslamifar, A.; Ahmadi, F.; Razeghi, E.; Atabak, S.; Amini, M.; Khadem-Sadegh, A.; Ramezani, A. **Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with isolated hepatitis B core antibody: a multicenter study.** *Ther Apher Dial*, 14(3):349-53 (2010).
- Allain, J.P. **Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion.** *Vox Sanguinis*, 86:83-91 (2004).
- Allain, J.P.; Belkhir, D.; Vermeulen, M.; Crookes, R.; Cable, R.; Amiri, A.; Reddy, R.; Bird, A.; Candotti, D. **Characterization of occult hepatitis B virus strains in South African blood donors.** *Hepatology*, 49(6): 1868-76 (2009).
- Almeida, G. C. ; Montagner, F ; Endo, MS ; Gomes, BPFA . **Detecção da degradação do dna genômico extraído através da espectrofotometria e da reação de PCR.** In: 7ª Mostra Acadêmica da UNIMEP, 2009, Piracicaba-SP. Anais da 7ª Mostra Acadêmica da UNIMEP, (ALMEIDA, 2009).
- Amini-Bavil-Olyaei, S.; Trautwein, C.; Tacke, F. **Relevance of Hepatitis B Virus Genome Variability in Organ Transplantation.** *Hepatitis Monthly*, 7(1):35-41 (2007).
- Asim, M.; Ali, R.; Khan, L.A.; S.A. Husain, S.A.; Singla, R.; Kar, P. **Significance of anti-HBc screening of blood donors & its association with occult hepatitis B virus infection: Implications for blood transfusion.** *Indian J Med Res*, 132:312-317 (2010).
- Becker, C.E.; Mattos, A.A.; Bogo, M.R.; Branco, F.; Sitnik, R.; Kretzmann, N.A. **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.
- Carvalho, F.M. **Prevalência da mutação ser-249 no gene tp53 em pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática sem carcinoma hepatocelular diagnosticados em Vitória, Espírito Santo.** Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.
- Coelho, H. S. M. C. *GASTROENTEROLOGIA HEPATITES*. 1ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2001.
- Elisa. Disponível em: <http://www.elisa-development.com>. Acessado em: 02 de Fevereiro de 2012.
- Fonseca, C.F. **Histórico das hepatites virais.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(3): 322-330 (2010).
- Fonseca, J.C.F. **História natural da hepatite crônica B.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(6): 672-677 (2007).
- Fungar, M.H.P. **PCR na Micologia, Diagnóstico e Análise de Variabilidade.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 17, p. 12-16, 2000.

Ganem, D.; Prince, A.M. **Hepatitis B virus infection - natural history and clinical consequences.** *N Engl J Med.*, 350(11): 1118-29 (2004).

Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009, Caderno 6, p 23 – 45.

Guidotti, L.G.; Chisari, F.V. **Immunobiology and Pathogenesis of Viral Hepatitis.** *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1: 23–61 (2006).

Hollinger, F.B. **Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult.** *TRANSFUSION*, 48:1001-1026 (2008).

Hollinger, F.B.; Sood, G. **Occult hepatitis B virus infection: a covert operation.** *Journal of Viral Hepatitis*, 17:1–15 (2010).

Hu, K.Q. **Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications.** *J Viral Hepat*, 9(4):243-257 (2002).

Jardim, R.N.; Gonçalves, N.S.; Pereira, J.S.; Fais, V.C.; Gonçalves Junior, F.L. **Occult Hepatitis B Virus Infection in Immunocompromised Patients.** *Braz J Infect Dis*, 12(4):300-305 (2008).

Kidd-Ljunggren, K.; Miyakawa, Y.; Kidd, A.H. **Genetic variability in hepatitis B viruses.** *Journal of General Virology*, 83:1267–1280 (2002)

Lai, C.L.; Ratziu, V.; Yuen, M.F.; Poynard, T. **Viral hepatitis B.** *The Lancet*, 362: 2089-94 (2003).

Lau, G.K.K.; Leung, Y.; Fong, D.Y.T.; Au, W.; Kwong, Y.; Lie, A.; Hou, J.; Wen, Y.; Nanj, A.; Liang, R. **High hepatitis B virus (HBV) DNA viral load as the most important risk factor for HBV reactivation in patients positive for HBV surface antigen undergoing autologous hematopoietic cell transplantation.** *BLOOD*, 99(7):2324-2330 (2002).

Malmström, S.; Berglin-Enquist, I.; Lind, M. **Novel Method for Genotyping Hepatitis B Virus on the Basis of TaqMan Real-Time PCR.** *J. Clin. Microbiol.*, 48(4):110 (2010).

Manzini, P. et al. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica*, 92(12):1664-1670 (2007).

Martin-Carbonero, L.; Soriano, V. **New paradigms for treating hepatitis B in HIV/hepatitis B virus co-infected patients.** *J Antimicrob Chemother*, 65: 379–382 (2010).

McMahon, B.J. **The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B.** *Hepatol Int*, 3:334–342 (2009).

Mello, F.C.A.; Souto, F.J.D.; Nabuco, L.C.; Villela-Nogueira, C.A.; Coelho, H.S.M.; Franz, H.C.F.; Saraiva, J.C.P.; Virgolino, H.A.; Motta-Castro, A.R.C.; Melo, M.M.M.; Martins, R.M.B.; Gomes,

S.A. **Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates.** BMC Microbiol., 7: 103 (2007).

Miguel, J.C.; **Avaliação da imunogenicidade de vacina recombinante brasileira (Butang) contra hepatite B entre crianças do Rio de Janeiro.** Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro (RJ), 2005.

ncbi – genoma HBV. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso: Setembro de 2011.

Panigrahi, R.; Biswas, A.; Datta, S.; Banerjee, A.; Chandra, P.K.; Mahapatra, P.K.; Patnaik, B.; Chakrabarti, S.; Chakravarty, R. **Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for transfusion.** Virology Journal, 7:204 (2010).

Raimondo, G.; Allain, J.P.; Brunetto, M.R.; et al. **Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection.** J Hepatol, 49:652-657 (2008).

Rodrigues, V. C. **Hepatite B no Município de Riberão Preto (SP): Um estudo envolvendo cirurgiões-dentistas e auxiliares odontológicos.** Dissertação (Mestrado em Saúde na Comunidade) – Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2002.

Santos, E.A.; Yoshida, C.F.; Rolla, V.C.; Mendes, J.M.; Vieira, I.F.; Arabe, J.; Gomes, S.A. **Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 22(2):92-98 (2003).

Satake, M.; Taira, R.; Yugi, H.; et al. **Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program.** Transfusion, 47: 1197–1205 (2007).

Silva, C.M.; Costi, C.; Costa, C.; Michelon, C.; Oravec, R.; Ramos, A.B.; Niel, C.; Rossetti, M.L. **Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil.** J Infect, 51(1):24-9 (2005).

Tabor, E.; Hoofnagle, J.H.; Smallwood, L.A.; et al. **Studies of donors who transmit posttransfusion hepatitis.** Transfusion, 19(6):725-731 1979.

Tang, H.; McLachlan, A.A **Pregenomic RNA Sequence Adjacent to DR1 and Complementary to Epsilon Influences Hepatitis B Virus Replication Efficiency** Virology, 303(1): 199-210 (2002).

Torbenson, M.; Thomas, D.L. **Occult hepatitis B.** Lancet Infect Dis, 2: 479–486 (2002).

UNIMED-BH. Parecer do Grupo Técnico de Auditoria em Saúde 08/06 : Testes sorológicos de triagem para doenças infecciosas em doadores de sangue

Yong Liu, Y.; Li, P.; Li, C.; Zhou, J.; Wu, C.; Zhou, Y.H. **Detection of hepatitis B virus DNA among accepted blood donors in Nanjing, China.** Virol J, 7:193 (2010).

ANEXO



GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
CENTRO DE HEMOTERAPIA E HEMATOLOGIA DO ESPÍRITO SANTO - HEMOES

AUTORIZAÇÃO

O Centro de Hemoterapia e Hematologia do Espírito Santo (HEMOES), colaborador do projeto de pesquisa "*Estudo da Hepatite B Oculta em Doadores de Sangue e em Dependentes Químicos de Vitória, Espírito Santo*", autoriza o coordenador do projeto, Prof. Dr. Iúri Drumond Louro, a fazer o diagnóstico molecular da Hepatite B Oculta em alíquotas de sangue periférico, coletada de doadores que aceitam participar do estudo e tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, como também, autoriza o acesso ao cadastro e resultado da triagem sorológica dos doadores. Todas as informações serão obtidas através de identificação dos doadores por código independente, com a finalidade de que a identidade dos mesmos seja preservada.

Assinatura manuscrita de Dr. Volmar Belisário Filho, escrita em tinta preta sobre uma linha horizontal.

Dr Volmar Belisário Filho
Diretor Técnico HEMOES