

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**MOYRA MACHADO PORTILHO**

**DESENVOLVIMENTO DE TESTES DE DETECÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE B EM AMOSTRAS DE  
SORO E FLUIDO ORAL.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Medicina Tropical.

**Orientadora:** Dra. Livia Melo Villar

**RIO DE JANEIRO**

2013

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical  
Esta dissertação intitulada:**

**DESENVOLVIMENTO DE TESTES DE DETECÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE B EM AMOSTRAS DE  
SORO E FLUIDO ORAL.**

Apresentada por

**Moyra Machado Portilho**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Titulares

Dra. Natalia Motta de Araújo  
Dra. Ana Maria Bispo de Filippis  
Dra. Luciane Almeida Amado Leon

Suplentes:

Dr. Davis Fernandes Ferreira  
Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães

Dissertação apresentada no dia 21 de março de 2013.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hepatites Virais  
do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ,  
Rio de Janeiro,RJ.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me dado força e determinação para encarar as dificuldades e concluir este trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Dra Livia Melo Villar, pela dedicação e incentivo todo este tempo; por compartilhar comigo seus conhecimentos, com humildade e paciência, sendo essencial na minha formação científica. Serei eternamente grata a você!

À minha família, principalmente aos meus pais, Claudio e Elenice, e ao meu irmão, Lucas, por serem meus principais incentivadores. Pelo amor incondicional, pelas renúncias e por acreditarem sempre em mim e no meu sucesso.

Às minhas amigas, em especial à Natasha Rocha, Leticia Scalioni, Mariana Brum, Alessandra de Marca, Mariana Dias e Clarissa Ferreira, que sempre estiveram presentes na minha vida, fornecendo apoio na vida pessoal e durante o trabalho.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Hepatites Virais, Vanessa Marques, Marcia Paschoal, Nathália Motta, Adilson Almeida, Maristella Costa e Helena Medina, que sempre estiveram presentes no meu dia-a-dia, nos momentos difíceis e de descontração, pelo carinho e apoio.

Agradeço à toda a equipe do Laboratório de Hepatites Virais, principalmente a Dra Elisabeth Lampe, e às meninas do Programa de Diagnóstico Sorológico do LHV, Juliana Cruz e Elisângela Silva, por terem me ajudado na realização deste trabalho.

À equipe do Ambulatório de Hepatites Virais da Fiocruz, principalmente à Dra Lia Laura Lewis-Ximenez, agradeço pelo apoio no atendimento aos pacientes e coleta de amostras utilizadas neste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IOC, em especial, aos coordenadores e professores do Curso que contribuíram com todos os ensinamentos recebidos.

Aos amigos do Mestrado em Medicina Tropical que conquistei durante esses dois anos, pelos muitos momentos agradáveis nas aulas, bem como em Congressos e na inesquecível viagem para Santa Isabel do Rio Negro.

Às Dras Ana Maria Bispo e Flavia Barreto dos Santos, e às meninas do Laboratório de Flavivírus do IOC, que gentilmente nos permitiram utilizar o equipamento de PCR em Tempo Real em seu laboratório.

Agradeço à Capes, pelo fornecimento da bolsa de estudos.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte da realização deste sonho. Muito obrigada!

## RESUMO

A detecção e quantificação do DNA do vírus da hepatite B (HBV) são importantes para o diagnóstico da infecção, definição e monitoramento do tratamento antiviral. Entretanto o diagnóstico molecular é difícil em áreas remotas ou com poucos recursos devido ao custo dos métodos comerciais e pouca infra-estrutura para coleta, armazenamento e transporte de amostras de sangue. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método para quantificação do DNA do HBV em amostras de soro e fluido oral, e avaliar um método qualitativo “in house” para detecção do DNA do HBV em comparação com métodos comerciais disponíveis no mercado. Amostras pareadas de soro e fluido oral foram obtidas de 116 indivíduos, onde 66 eram reagentes para HBsAg no soro e 50 não apresentavam nenhum marcador sorológico no soro. As amostras de soro foram submetidas a testes imunoenzimáticos para detecção de marcadores sorológicos do HBV (HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, anti-HBcIgM, anti-HBe e HBeAg) e ao PCR em tempo real para quantificação do DNA do HBV (COBAS TaqMan HBV, Roche). O DNA do HBV foi extraído utilizando o conjunto de reagentes “High Pure Viral Nucleic Acid kit” (Roche Diagnostics, EUA) em amostras de soro e “RTP® DNA/RNA Virus Mini kit” (Invitex, Alemanha) para amostras de fluido oral. Para a detecção qualitativa do HBV foi realizada uma PCR com iniciadores para o gene do core, e para detecção quantitativa do HBV foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real com sondas TaqMan® na plataforma Line-Gene 9600 (Bioer Serves Life, Canada). Para obtenção da curva de quantificação foi construído um plasmídeo recombinante obtido a partir de amostras padrão do painel de quantificação do HBV (Optiquant HBV, Acrometrix, Life Technologis, EUA). As seguintes condições da PCR em tempo real foram avaliadas: concentração de DNA (5 e 7,5µL), temperatura de hibridização (60°C e 62°C), e números de ciclos (40 e 45 ciclos). A sensibilidade analítica da PCR em tempo real foi estimada em 10 cópias de HBV DNA/mL e a faixa de quantificação abrangeu cerca de 8 logs de 10. Para quantificação do DNA do HBV em soro e fluido oral foi necessário o aumento da temperatura de hibridização, e para o fluido oral também foi necessário o aumento da concentração de DNA (7,5 µL) e do número de ciclos (45). Entre as amostras de soro HBsAg reagentes, 64 foram quantificadas pela PCR em tempo real comercial e 28 pelo teste quantitativo “in house” com carga viral média igual a  $3,993 \pm 1,922$  e  $3,761 \pm 1,829$  log cópias de HBV DNA/mL ( $r=0,7643$ ;  $p<0,0001$ ), respectivamente, e concordância de 37,87%. Por outro lado, 8 amostras de fluido oral amplificaram pelo método quantitativo “in house”, com carga viral média igual a  $4,459 \pm 1,127$  log cópias de HBV DNA/mL ( $r=0,2994$ ;  $p=0,9453$ ). A PCR qualitativa “in house” foi capaz de detectar o DNA do HBV em 50 amostras de soro HBsAg reagentes apresentando 75% de concordância com o teste comercial quantitativo ( $p=1,000$ ), porém somente uma amostra de fluido oral foi detectada por este método. Concluímos que as metodologias qualitativa e quantitativa para detecção do DNA do HBV analisadas neste estudo apresentaram boa eficiência em amostras de soro, porém não foram eficientes em amostras de fluido oral. Estas metodologias podem ser bastante úteis para detecção molecular do HBV em áreas com recursos limitados.

**Palavras-chave:** Hepatite B, Diagnóstico Molecular, soro, fluido oral

## ABSTRACT

The detection and quantification of the DNA of Hepatitis B virus (HBV) are important to diagnose the infection, determine and monitor the antiviral treatment. However, the molecular diagnosis is difficult in remote areas or presenting low resources, because of the cost of commercial methods and few infrastructure for collection, storage and transport of blood samples. The objective of this study was to develop a method for quantification of HBV DNA in serum and oral fluid samples, and to evaluate an in house qualitative method for HBV DNA detection compared to commercial methods available in the market. Paired serum and oral fluid were obtained from 116 individuals, where 66 were HBsAg reactive in their sera and 50 did not present any HBV serological marker in sera. Serum samples were submitted to enzyme immunoassays for detection of HBV serological markers (HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, anti-HBcIgM, HBeAg and anti-HBe) and quantified by commercial real time PCR (COBAS® TaqMan HBV Test, Roche Diagnostics, EUA). HBV DNA was extracted using the commercial kit "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" (Roche Diagnostics, USA) in serum samples and "RTP® DNA / RNA Virus Mini Kit" (Invitex, Germany) for oral fluid samples. For HBV qualitative detection it was employed a PCR using primers for Core gene, and for quantitative detection of HBV it was employed a real time PCR methodology with TaqMan® probes in the Line-Gene 9600 (Bioer Serves Life, Canada) platform. To obtain the quantification curve, a recombinant plasmid was constructed using standard quantification panel of HBV (Optiquest HBV, Acrometrix, Life Technoligis, USA). The following PCR conditions were evaluated in real time PCR: DNA concentration (7.5 and 5 µL), annealing temperature (60° C and 62° C), number of cycles (cycles 40 and 45). The analytical sensitivity of real-time PCR was estimated at 10 HBV DNA copies/mL and the quantitation range comprised about 8 logs of 10. For quantification of HBV DNA in serum and oral fluid, it was necessary to increase the annealing temperature, and for oral fluid, it was also necessary to increase the concentration of DNA (7.5 µL) and the number of cycles (45). Among HBsAg reactive serum samples, 64 were quantified by commercial real time PCR and 28 by "in house" quantitative test, with mean viral load equal to  $3,993 \pm 1,922$  e  $3,761 \pm 1,829$  log copies of HBV DNA/mL ( $r=0,7643$ ;  $p<0,0001$ ), respectively, and concordance of 66.6%. Moreover, eight oral fluid samples were amplified by quantitative "in house" method, with average viral load equal to  $4,459 \pm 1,127$  log copies of HBV DNA/mL ( $r=-0.2994$ ,  $p=0,9453$ ). The qualitative "in house" PCR was able to detect HBV DNA in 50 HBsAg reactive serum samples, showing 75% of agreement with the commercial test ( $p=1.000$ ), but only 1 oral fluid sample has been detected by this method. We concluded that the qualitative and quantitative methods for the detection of HBV DNA analyzed in this study presented good efficiency in serum samples, but they were not effective among oral fluid samples. These methodologies can be useful for molecular detection of HBV in areas with limited resources.

Keywords: Hepatitis B, Molecular Diagnostics, serum, oral fluid

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estrutura da Partícula Viral Completa do vírus da Hepatite B.....	2
<b>Figura 1.2.</b> Estrutura Genômica do HBV .....	3
<b>Figura 1.3.</b> Modelo esquemático do ciclo replicativo do HBV .....	6
<b>Figura 1.4.</b> Distribuição global dos genótipos do vírus da Hepatite B .....	7
<b>Figura 1.5.</b> Distribuição da Hepatite B crônica no mundo.....	8
<b>Figura 1.6.</b> Curso clínico da Hepatite B aguda .....	13
<b>Figura 1.7.</b> Curso clínico da Hepatite B crônica.....	13
<b>Figura 1.8.</b> Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	15
<b>Figura 1.9.</b> Representação esquemática da reação de bDNA.....	17
<b>Figura 1.10.</b> Representação esquemática da reação de PCR em Tempo Real com a metodologia TaqMan .....	18
<b>Figura 1.11.</b> Representação esquemática da reação de PCR em Tempo Real com a metodologia SYBR Green® .....	19
<b>Figura 4.1.</b> Procedimento para coleta de fluido oral utilizando o coletor Salivette®.....	24
<b>Figura 5.1.</b> Alinhamento das sequências do HBV encontradas no GenBank. ....	42
<b>Figura 5.2.</b> Eletroforese em gel de agarose a 1,0% do produto de PCR da amostra de soro contendo $2 \times 10^5$ cópias de HBV DNA/mL. ....	43
<b>Figura 5.3.</b> Eletroforese em gel de agarose a 1,5% apresentando o inserto do vírus da hepatite B após a reação do DNA plasmidial com a enzima de restrição <i>Eco</i> RI .....	44
<b>Figura 5.4.</b> Gráfico ilustrativo da curva padrão utilizada na reação de PCR quantitativa obtida de diluições seriadas do plasmídeo recombinante com o inserto do vírus da Hepatite B. ....	45
<b>Figura 5.5.</b> Correlação entre valores de log cópias/mL obtidos a partir de amostras de soro HBsAg reagentes no teste Cobas TaqMan e PCR Quantitativo “in house” .....	51
<b>Figura 5.6.</b> Correlação entre valores de carga viral do HBV (log cópias/MI) obtidos a partir de amostras pareadas de soro e fluido oral pela técnica de PCR Quantitativo “in house” ....	54
<b>Figura 5.7.</b> Eletroforese em gel de agarose a 1,0% dos produtos do PCR qualitativo em amostras de soro de indivíduos HBsAg reagentes e não reagentes. ....	56
<b>Figura 5.8.</b> Eletroforese em gel de agarose a 1,0% dos produtos da PCR qualitativa em amostras de soro de indivíduos HBsAg reagentes e não reagentes .....	58



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.1.</b> Significado clínico dos marcadores sorológicos do HBV .....	14
<b>Quadro 4.1.</b> Reagentes utilizados na <i>qPCR</i> para HBV .....	36
<b>Quadro 5.1.</b> Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão.....	46
<b>Quadro 5.2.</b> Carga viral do HBV em cópias/mL e log cópias/mL das 64 amostras de soro HBsAg reagentes avaliadas pelo método comercial (Cobas Taqman HBV) e pelo método desenvolvido neste estudo (PCR quantitativa).....	49
<b>Quadro 5.3.</b> Comparação dos resultados obtidos para detecção do HBV DNA em amostras de soro utilizando a PCR qualitativa “in house” e o PCR quantitativo comercial (Cobas TaqMan HBV).....	56
<b>Quadro 5.4.</b> Comparação dos resultados obtidos para detecção do HBV DNA em amostras de soro utilizando a PCR qualitativa “in house” e o PCR quantitativo “in house”.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1.</b> Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR qualitativa.....	27
<b>Tabela 4.2.</b> Oligonucleotídeos e sonda utilizados nas reações de PCR quantitativa.....	32
<b>Tabela 5.1.</b> Distribuição da população estudada de indivíduos HBsAg reagentes de acordo com sexo e faixa etária.....	40
<b>Tabela 5.2.</b> Distribuição da população estudada de indivíduos HBsAg não reagentes reagentes de acordo com sexo e faixa etária.....	40
<b>Tabela 5.3.</b> Frequência de marcadores sorológicos de hepatite B em amostras de soro do painel de estudo.....	41
<b>Tabela 5.4.</b> Frequência dos marcadores sorológicos anti-HBc IgM, HBeAg e anti-HBe em amostras de soro do painel de estudo.....	41
<b>Tabela 5.5.</b> Carga viral do HBV (cópias/mL) e cycle threshold (ct) do painel de quantificação do HBV (OptiQuant Acrometrix), obtida pela PCR quantitativa “in house” utilizando duas concentrações de HBV DNA (volumes 5 µL e 7,5µL).....	47
<b>Tabela 5.6.</b> Carga viral (cópias/mL) de amostras HBV DNA reagentes obtidas pelo método comercial (Cobas TaqMan HBV) e o método desenvolvido neste estudo (PCR quantitativo) onde dois valores de temperatura de hibridização (TH) foram avaliados (60 °C e 62 °C).....	48
<b>Tabela 5.7.</b> Carga viral (cópias/mL) de amostras HBV DNA reagentes obtidas pelo método comercial (Cobas TaqMan HBV) e o método desenvolvido neste estudo (PCR quantitativo) onde aumentamos a temperatura de hibridização (de 60 °C para 62 °C) com duas diferentes concentrações de DNA (volume de 5 µL para 7,5µL de DNA). .....	48
<b>Tabela 5.8.</b> Carga viral do HBV (cópias/mL) e cycle threshold (ct) do painel de diluição seriada do padrão comercial OptiQuant Acrometrix HBV obtida pelo PCR quantitativo in house utilizando duas concentrações de HBV DNA (volumes 5 µL e 7,5µL).....	52
<b>Tabela 5.9.</b> Carga viral do HBV (cópias/mL) e cycle threshold (ct) de 8 amostras de fluido oral obtidos pelo PCR quantitativo in house utilizando 7,5µL de DNA e sob duas condições diferentes de reação (40 e 45 ciclos de amplificação).....	53
<b>Tabela 5.10.</b> Comparação entre os resultados da carga viral de HBV DNA em cópias/mL e log cópias/mL de amostras de soro quantificadas pela técnica comercial e de amostras de fluido oral obtidas pela PCR quantitativa “in house”.....	54
<b>Tabela 5.11.</b> Comparação entre os valores de carga viral do HBV (cópias/mL e log cópias/mL) obtidas pelo método de PCR quantitativo “in house” em amostras pareadas de soro e fluido oral.....	55

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

HAV	Vírus da Hepatite A
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HBsAg	Antígeno de Superfície do HBV
Anti-HBs	Anticorpo contra o HBsAg
HBeAg	Antígeno e
Anti-HBe	Anticorpo contra o HBeAg
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do core
Anti-HBc IgM	Anticorpo contra o antígeno do core de classe IgM
Anti-HCV	Anticorpo contra o HCV
ORF	Open Reading Frame
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR em Tempo Real

## LISTA DE SINAIS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

%	Percentual
°C	Graus Celcius
=	Igual
>	Maior
<	Menor
X	Multiplicação
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
µL	Microlitro
±	Mais ou menos

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Histórico .....	1
1.2 Vírus da Hepatite B .....	2
1.2.Estrutura Molecular .....	3
1.3.Replicação do HBV .....	4
1.4.Genótipos do HBV .....	6
1.5.Epidemiologia .....	8
1.6.Transmissão .....	10
1.7.Tratamento .....	10
1.8.Controle e Prevenção .....	11
1.9.História natural da doença .....	12
1.10. Diagnóstico Laboratorial .....	14
1.10.1.Diagnóstico Bioquímico .....	14
1.10.2.Diagnóstico Sorológico .....	14
1.10.3.Diagnóstico Molecular .....	15
1.10.3.1.Deteccção Qualitativa do HBV DNA .....	15
1.10.3.2.Deteccção Quantitativa do HBV DNA .....	16
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
3.1.Objetivo Geral .....	21
3.1.Objetivos Específicos .....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1.Seleção de Amostras .....	23
4.2.Coleta de amostras de soro e fluido oral .....	23
4.3.Deteccção de marcadores sorológicos para hepatite B em amostras de soro .....	24
4.4.Extração do DNA viral das amostras de soro e fluido oral .....	24

4.4.1.Extração com High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostics, EUA).....	25
4.4.2. Extração com RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitex, Alemanha).....	26
4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção qualitativa do HBV DNA. .....	27
4.6. Gel de Eletroforese .....	28
4.7. Quantificação com COBAS® TaqMan® HBV (Roche Diagnostics, EUA) .....	29
4.8. Quantificação do DNA do HBV em amostras de soro e fluido oral pelo método de PCR em Tempo Real “in house” .....	31
4.8.1.Desenho dos oligonucleotídeos .....	31
4.8.2.Construção da Curva Padrão .....	32
4.8.2.1. Obtenção do Amplicon para ligação com o vetor clonagem.....	32
4.8.2.2. Ligação do amplicon ao vetor de clonagem .....	33
4.8.2.3. Transformação bacteriana e purificação do DNA plasmidial contendo o inserto do HBV .....	33
4.8.2.4. Sequenciamento Nucleotídico.....	34
4.8.2.5 Quantificação e obtenção da Curva Padrão.....	34
4.9. Reação de PCR em Tempo Real pela metodologia TaqMan.....	35
4.10. Testes com Fluido oral .....	36
4.11. Cálculo do número de cópias de HBV DNA.....	37
4.12. Padrão de Qualidade da PCR em Tempo Real .....	38
4.13. Análise dos dados .....	39
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
5.1.População de Estudo .....	40
5.2. Frequência de detecção dos marcadores sorológicos e moleculares do HBV obtidos pelos métodos comerciais .....	41
5.3. Análise da sequência para desenho dos oligonucleotídeos .....	42
5.4. Amplificação, clonagem e obtenção de plasmídeos recombinantes para quantificação de vírus da hepatite B.....	43
5.5. Avaliação da curva padrão do HBV na <i>PCR</i> quantitativa.....	44
5.6. Otimização das condições de Reação da <i>PCR</i> quantitativa.....	46

5.7.Avaliação da técnica de PCR em Tempo Real em amostras de soro .....	49
5.8.Avaliação da técnica de PCR em Tempo Real em amostras de fluido oral.....	51
5.9. Avaliação da PCR qualitativa para hepatite B em amostras de soro e fluido oral.....	55
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>8.PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>9.REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>82</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

A hepatite viral é uma doença em populações humanas com múltiplos agentes que foi primeiramente descrita no século V a.C. quando Hipócrates descreveu a icterícia epidêmica, se referindo a pessoas infectadas com o HBV, bem como outros agentes capazes de infectar o fígado. As epidemias de icterícia têm sido descritas ao longo do tempo e foram comuns durante várias guerras nos séculos XIX e XX (Mahoney, 1999).

A existência de uma forma de hepatite de transmissão parenteral foi primeiramente relatada por Lurman em 1885, em Bremen, na Alemanha, durante campanha de vacinação contra a varíola (Hollinger, 2001). Vários casos foram referidos na literatura até que, em 1947, MacCallum definiu o termo hepatite B para esta entidade clínica (MacCallum, 1947).

Blumberg e colaboradores descobriram o antígeno de superfície do HBV no soro de um aborígine australiano, quando pesquisavam proteínas normais do soro, por este reagir especificamente com anticorpos de um paciente hemofílico americano, sendo inicialmente associado com uma série de diferentes doenças (Blumberg & Alter, 1965). Este antígeno foi então denominado antígeno Austrália e posteriormente demonstraram que este antígeno era raro na América do Norte e na Europa, porém frequente na população africana e asiática, como também comum em pacientes com leucemia, hanseníase e com síndrome de Down (Blumberg, 1977).

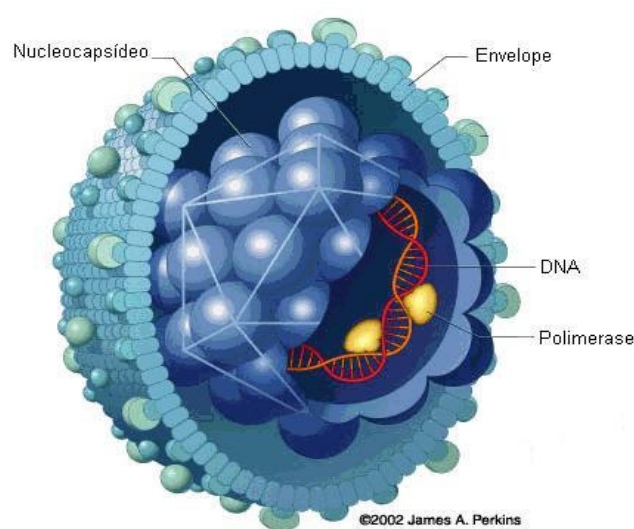
Em 1970, Dane e colaboradores visualizaram pela primeira vez a partícula viral íntegra do HBV através de microscopia eletrônica (Dane et al., 1970). No ano seguinte, após degradação da partícula de Dane com detergentes, foi encontrado um componente interno, o antígeno do Core ou HbcAg, que reagia com anticorpos específicos, descrevendo um novo sistema antígeno-anticorpo (Almeida et al., 1971). Posteriormente, outros sistemas antígeno-anticorpo foram descritos por Magnius & Espmark (1972), os quais detectaram pela primeira vez o antígeno HBeAg.



## 1.2 Vírus da Hepatite B

A Hepatite viral é uma inflamação causada por cinco diferentes agentes etiológicos virais: vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite D (HDV), vírus da hepatite E (HEV) (Ministério da Saúde, 2008).

O vírus da Hepatite B (HBV) pertence à família *Hepadnaviridae* e gênero *Orthohepadnavirus* (ICTV, 2012). O seu genoma viral é constituído de uma molécula de DNA circular, parcialmente dupla fita, com aproximadamente 3200 pares de base (Takahashi et al., 1976). A partícula viral completa e infecciosa (partícula Dane) é esférica e constitui o virion infeccioso de 42nm de diâmetro sendo composta por um envelope constituído pelo antígeno de superfície do vírus (HBsAg) e nucleocapsídeo, o qual é formado pelo antígeno HBcAg. Internamente é constituído pelo HBV DNA e pelo complexo da DNA polimerase (Baumert et al., 2007; Liang, 2009) (Figura 1.1).

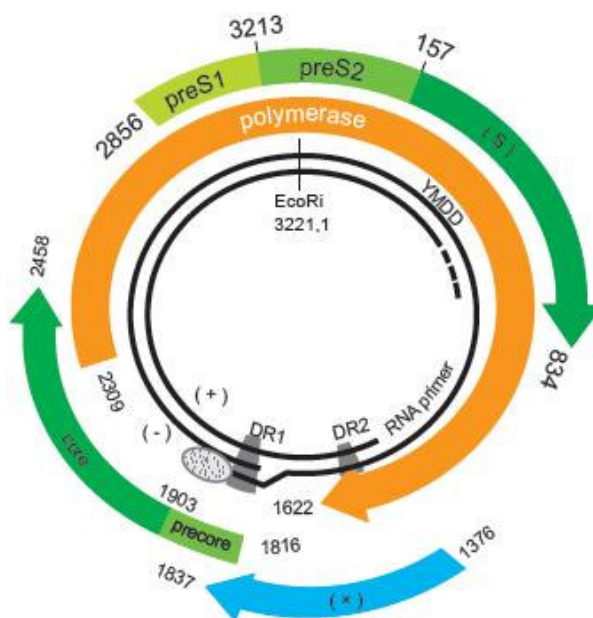


**Figura 1.1** – Estrutura da Partícula Viral Completa do vírus da Hepatite B. Fonte: Adaptado de Perkins JA, 2002

Durante a infecção viral também ocorre a produção de grande quantidade de partículas incompletas, de forma esférica ou tubular, com cerca de 22nm de diâmetro e de comprimento variável, constituídas apenas pelo envoltório viral desprovido de nucleocapsídeo e ácido nucléico, sendo, portanto, não infecciosas (Liang, 2009).

### 1.3 Estrutura Molecular

O material genético do HBV consiste em uma molécula de DNA circular parcialmente dupla-fita, formada por 3200 pares de base. A fita maior é complementar ao RNA mensageiro e por convenção é denominada de negativa. A fita menor é denominada positiva e apresenta a porção terminal 3' de tamanho variável. (Seeger & Zoulim, 2007). O genoma viral codifica quatro regiões de leitura abertas (ORFs: pré-S/S, pré Core/Core, P e X). (Figura 1.2).



**Figura 1.2** – Estrutura Genômica do HBV. Fonte: Kao (2011)

A ORF pré-S/S codifica as proteínas do envelope viral, o HBsAg, e pode ser funcionalmente dividido em pre-S1, pré-S2 e região S. As proteínas sintetizadas nessas regiões são denominadas respectivamente de large, middle e small. A proteína L (large) é codificada pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S, a proteína M (médium) pelas regiões pré-S2 e S, e a proteína S (small) pela região S. Na região S encontra-se o determinante a, que estimula a produção de anticorpos anti-HBs pelo hospedeiro. (Seeger Zoulim, 2007; Dandri & Locarnini, 2012).

O gene C ou Core apresenta dois códons de iniciação na mesma fase de leitura aberta (regiões core e pre-core) que sintetizam duas proteínas: o HBcAg e o HBeAg. O HBcAg é traduzido a partir do RNA pré genômico e é uma proteína estrutural do capsídeo viral. O HBeAg é produzido nas regiões do gene C e pré-C e

é um antígeno solúvel não estrutural. A função do HBeAg está relacionada a imunotolerância, promovendo a persistência da infecção. Esses antígenos induzem a produção de anticorpos, anti-HBc e anti-HBe, os quais podem ser detectados no soro de indivíduos infectados (Locarnini, 2004; Dandri & Locarnini, 2012)

O gene P é o maior gene do HBV sobrepondo-se a todos os outros genes, pois sua fase de leitura inicia-se sobreposta ao gene C e termina sobreposta ao gene X. A polimerase viral, proteína codificada por esta ORF, é dividida funcionalmente em três regiões: domínio terminal, envolvido na encapsidação e síntese da fita menor do DNA; o domínio da transcriptase reversa, o qual catalisa a síntese do genoma; e o domínio ribonuclease H, que degrada o RNA pré-genômico e facilita a replicação viral (Yokosuka & Arai, 2006; Dandri & Locarnini, 2012).

O gene X codifica o HBxAg, que é uma proteína que estimula a transcrição e replicação viral, além de mostrar-se eficiente em ativar as respostas imunes celular e humoral. O HBxAg também está relacionado com a regulação do ciclo celular, ativação das vias de sinalização, modulação da apoptose viral e inibição do reparo do DNA. (Wei et al., 2010). Além disso, foi observado que o HBxAg contribui no potencial oncogênico do HBV.

Outros elementos importantes do genoma do HBV são duas repetições diretas (DR1 e DR2) na porção 5' terminal da fita maior de DNA, os quais são necessários para a síntese específica do DNA viral durante a replicação (Wei et al., 2010).

#### **1.4 Replicação do HBV**

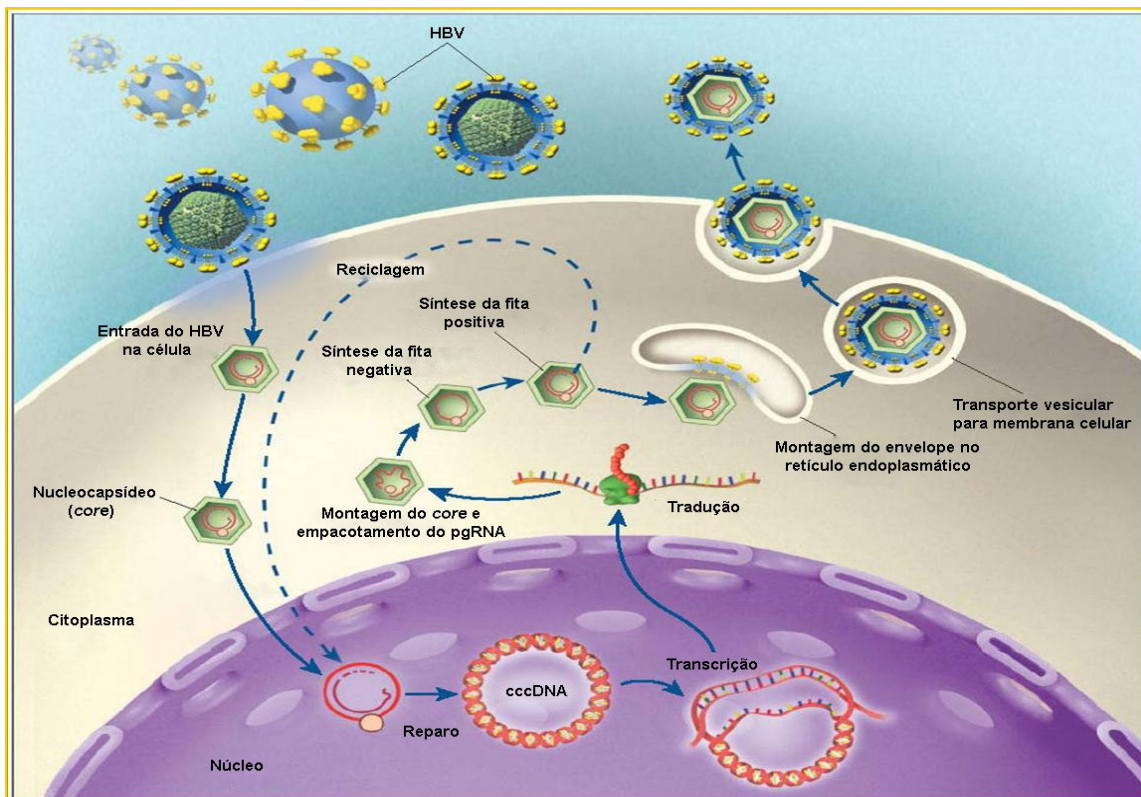
A interação entre a célula hospedeira (hepatócito) e o vírus acontece do contato através da região N-terminal do Pré-S1, e em seguida o vírus é adsorvido, penetrando no hepatócito (Seeger & Zoulim, 2007). A vesícula endocítica é transportada da periferia para o centro celular, onde observa-se uma acidificação do meio com a consequente fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, e liberação do capsídeo. Quando o DNA alcança o núcleo celular, a fita positiva (incompleta) é processada pela DNA polimerase celular do hospedeiro, para que as fitas se unam em um DNA circular covalentemente fechado (cccDNA), o qual é necessário para que o genoma viral esteja numa forma estável, de modo que não seja danificado durante a divisão celular (Sun & Nassal, 2006).

A transcrição de diferentes RNAs é realizada pela enzima RNA polimerase celular, utilizando o cccDNA como modelo. O RNA pré-genômico (pg-RNA) contém o DR1, são poli-adenilados na extremidade 3' e servem como RNA mensageiro para síntese das proteínas do core e como molde para a formação de DNA por transcrição reversa (Nassal et al., 1990; Quasdorff & Protzer, 2010).

A fita negativa do DNA do vírion é transcrita pela ação da RNA polimerase celular, produzindo RNAs mensageiros, que serão transportados para o citoplasma e traduzidos em proteínas (C, P e S) (Seeger & Zoulim, 2007).

Para a transcrição reversa e empacotamento do pgRNA no nucleocapsídeo, alguns elementos são essenciais, como o sinal  $\epsilon$  e a proteína P, os quais se ligam mediando o recrutamento de dímeros da proteína do Core para o empacotamento do pgRNA. Após o empacotamento, a interação entre sinal  $\epsilon$ , proteína P e transcriptase reversa permitem o início da transcrição reversa. Nesse estágio, o primeiro nucleotídeo do RNA está ligado covalentemente a proteína P, o qual será estendido formando a fita completa do DNA (polaridade negativa), seguindo posteriormente com a formação da fita menor (polaridade positiva) para a síntese da nova molécula de DNA (Nassal et al., 1990; Sun & Nassal, 2006), a qual não é completamente sintetizada, pois a partícula viral é liberada da célula antes do término da síntese (Seeger & Zoulim, 2007; Quasdorff & Protzer, 2010)

Uma vez completada a síntese do DNA genômico viral, o nucleocapsídeo é envelopado e os vírions serão transportados para o retículo endoplasmático e depois para o Complexo de Golgi, e finalmente liberados pela célula por exocitose (Seeger & Zoulim, 2007) (Figura 1.3).



**Figura 1.3** – Modelo esquemático do ciclo replicativo do HBV. Fonte: Adaptado de Ganem & Prince, 2004.

### 1.5 Genótipos do HBV

O HBV é classificado em oito genótipos identificados em A-J (Kao, 2011), baseando-se numa divergência mínima do genoma completo de 8%. Da mesma forma, também foi descrita a diversidade em subgenótipos, os quais têm divergência mínima do genoma em 4% (Pujol et al., 2009).

Os genomas dos genótipos do HBV têm diferentes tamanhos. Os genótipos B, C, F e H tem 3215 nucleotídeos ao longo de suas cadeias, enquanto o genótipo D tem 3182 nucleotídeos e uma deleção na posição 33 do Pré-S1. Já os genótipos E e G tem três deleções nucleotídicas na mesma região do gene da Polimerase. O genótipo A varia dos outros por possuir uma inserção de seis nucleotídeos na região terminal do gene da polimerase (Bartholomeusz and Schaefer, 2004).

O curso clínico da infecção pelo vírus da hepatite B depende da idade do paciente, da resposta imune e do genótipo viral pelo qual está infectado (Shi, 2012).

Conforme discutido no estudo de McMahon (2009), indivíduos infectados com os genótipos C, B (subtipos 2 a 5) e F (subtipo 1) do HBV têm maior risco de desenvolverem Hepatite crônica com complicações, enquanto aqueles infectados pelos genótipos B (subtipos 1 e 6) e genótipo A (subtipo 2) têm menor risco de terem complicações em consequência ao vírus HBV.

Em relação à distribuição geográfica dos genótipos do HBV, o genótipo A é altamente prevalente na África subsaariana (subtipo A1), norte da Europa (subtipo A2) e África ocidental (subtipo A3). Já os genótipos B e C são prevalentes na Ásia, sendo o genótipo C mais comum na China, Japão e Coreia, enquanto o genótipo B é mais comum no Taiwan e Vietnã (Lin & Kao, 2011).

O genótipo D (subtipos D1-D5) é prevalente na África, Europa, região Mediterrânea e Índia, enquanto o genótipo E é restrito a África Ocidental. O genótipo F (subtipos F1-F4) é encontrado na América Central e América do Sul, o genótipo G já foi detectado na França, Alemanha e Estados Unidos e o genótipo H é encontrado na América Central (Kao, 2011)(Figura 1.4).

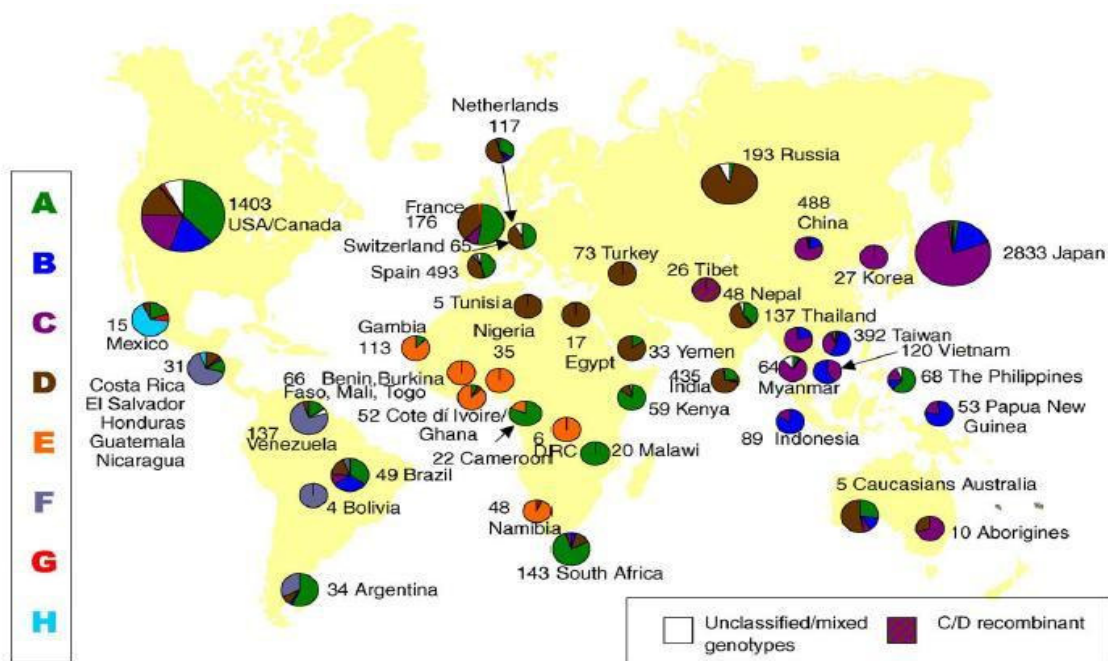


Figura 1.4: Distribuição global dos genótipos do vírus da Hepatite B. Fonte: Kramvis et al. (2005)

Recentemente, foram isolados no Vietnã (Phung et al., 2010) e no Japão (Tatematsu et al., 2009), cepas de HBV que foram classificadas em dois



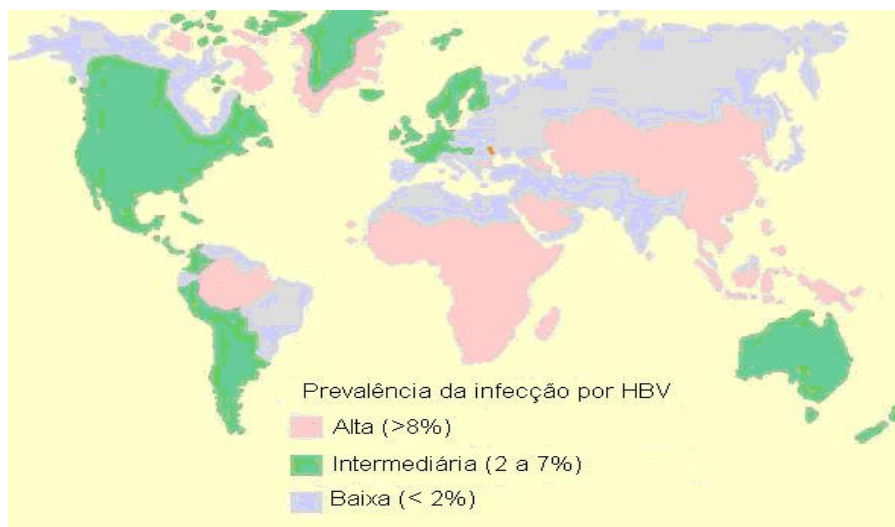
novos genótipos, denominados I e J, respectivamente. Entretanto, estas classificações ainda não estão completamente estabelecidas.

No Brasil, os genótipos A, D e F são os mais frequentes, nesta ordem. O genótipo A é o mais prevalente em vários estados brasileiros, inclusive na região Amazônica onde a prevalência do HBV é a maior do país, seguido pelos genótipos D e F (Mello et al., 2007).

### 1.6 Epidemiologia

A infecção pelo vírus da Hepatite B tem distribuição mundial, sendo estimado que mais de 2 bilhões de pessoas já tenham sido infectadas. Destas, aproximadamente 240 milhões têm a infecção crônica com risco de desenvolverem um quadro grave, com cirrose e carcinoma hepatocelular, as quais causam de 500 a 700 mil mortes por ano no mundo (Franco et al., 2012; WHO, 2012).

Baseado nas taxas de infecção pelo HBV, o mundo pode ser dividido em regiões de alta, média e baixa endemicidade (Figura 1.5). A endemicidade é considerada alta quando pelo menos 8% da população é HBsAg positivo ou 70-90% da população geralmente possui evidências sorológicas de infecção prévia pelo HBV (Lavanchy et al., 2004); intermediária quando de 2 à 7% da população apresenta a doença, e baixa quando a taxa de infecção crônica pelo HBV é menor que 1% (Tengan e Araújo, 2006).



**Figura 1.5:** Distribuição da Hepatite B crônica no mundo. Fonte: Adaptado de Elgouhary et al. (2008)

Entre as regiões de alta endemicidade, destacam-se países da Ásia e África, onde as principais formas de transmissão são: transmissão vertical, de mãe para filho, e horizontal, entre crianças (WHO, 2012). Nessas áreas de alta endemicidade, outras importantes formas de transmissão são o contato sexual (Zago et al., 2007), entre profissionais de saúde (Ganju, 2000) e entre usuários de drogas intravenosas (Nunes et al., 2007).

Em países de baixa endemicidade, a transmissão do HBV acontece principalmente por via sexual, parenteral ou percutânea, a partir do uso de drogas injetáveis e clínicas de tatuagem e piercing (Lin et al., 2010).

Na África subsaariana, o risco de transmissão a partir de transfusão de sangue é alto, devido ao elevado índice de infecção e triagem incompleta em bancos de sangue (Jayaraman et al., 2010). Em alguns países da América Latina e Ásia, a triagem do sangue é regulamentada para o HBsAg, assim como no Brasil, onde tornou-se obrigatória em 1994. Depois da sua implementação, a prevalência do HBsAg diminuiu de 0,36% em 1998 para 0,14% em 2005 (Andrade et al., 2006).

Na maioria dos países da América Latina, onde a endemicidade é baixa ou intermediária, a via sexual é a mais comum para transmissão do HBV. Da mesma forma, o uso de drogas também é uma importante via de transmissão (Tanaka, 2000).

No Brasil, dados do Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais (Ministério da Saúde, 2012) realizado com base nos casos notificados de Hepatite B entre os anos de 1999 e 2011, mostram que no ano de 2011, a taxa de detecção de HBsAg no país foi de 0,07%, havendo maior número de casos entre adultos jovens e entre indivíduos do sexo masculino. As regiões de maior prevalência foram regiões Norte e Sul do país, as quais apresentaram taxas de 0,13% e 0,17% respectivamente. A região Amazônica, a qual está localizada na região Norte do país, é conhecida por apresentar elevada prevalência de infecção por HBV, com taxas que variam entre 0,05 e 0,15% (Braga et al., 2005).

Outro estudo (Tauil et al., 2012) mostrou que no período de 2000 a 2009, foram registradas 5441 mortes por Hepatite B no Brasil, sendo a região Norte a que relatou maior número de casos (0,9 por 100 mil habitantes) em 2008.



### **1.7 Transmissão**

O HBV está presente em diversos fluidos corporais dos indivíduos infectados. Desta forma, suas principais formas de transmissão são por via perinatal, percutânea ou através de sangue, e por relação sexual. (Seeger & Zoulim, 2007).

O risco de ocorrer transmissão perinatal é maior quando a mãe possui infecção crônica por HBV, com sorologia positiva para HBeAg. Estudos realizados com ratos sugerem que o HBeAg pode atravessar a placenta durante a gravidez, gerando tolerância ao HBV (Seeger & Zoulim, 2007). Por este motivo, nestes recém-nascidos, existe um alto risco de desenvolvimento de infecção crônica (Aspinall et al., 2011; Kolawole et al., 2012). Para diminuir este risco, deve-se fazer a administração de imunoglobulina para HBsAg (HBIG) e vacinar os bebês nas primeiras doze horas após o nascimento (Roushan et al., 2012).

O risco de transmissão através de transfusão sanguínea diminuiu consideravelmente desde a introdução dos testes sorológicos para HBsAg e anti-HBc entre doadores de sangue no Brasil (ano de 1994) e no mundo (Stramer et al., 2011). Entretanto, a transmissão percutânea continua sendo uma importante via, principalmente entre usuários de drogas intravenosas e em clínicas de tatuagem e piercing, onde não são realizadas práticas seguras e medidas de biossegurança (Seeger & Zoulim, 2007).

### **1.8 Tratamento**

O objetivo da terapia para Hepatite B é melhorar a qualidade de vida prevenindo a progressão da doença para cirrose, câncer hepático e morte. Este objetivo pode ser alcançado se a replicação do vírus for suprimida de forma sustentada, ou se houver redução histológica da atividade viral diminuindo o risco de cirrose (EASL, 2009).

O resultado ideal desejado após a terapia é a perda sustentada do HBsAg, com ou sem soroconversão para anti-HBs. Isso está associado à completa remissão da atividade da hepatite crônica. Nos pacientes HBeAg reagentes, a soroconversão para anti-HBe é um desfecho satisfatório, por estar associado a um melhor prognóstico. Nos HBeAg reagentes que não obtêm soroconversão e nos HBeAg não reagentes, a manutenção da supressão do HBV-DNA é o desejável

(Portaria nº 2561 de 28/10/2009).

Atualmente, de acordo com a Portaria nº 2561 de 28/10/2009 do Ministério da Saúde, as opções farmacológicas para o tratamento da hepatite B crônica incluem: interferon-alfa e peg-interferon-alfa 2a e 2b, e os análogos de nucleotídeo e nucleosídeo: adefovir, entecavir, telbivudina e tenofovir.

Em indivíduos HBeAg reagentes e não cirróticos, a escolha para o tratamento deve ser o interferon-alfa, sendo que pacientes que não apresentarem soroconversão em 16 semanas deverão ter seu tratamento prolongado até as 24 semanas.

Em pacientes HBeAg não reagentes e não cirróticos, é recomendada administração de tenofovir. Para pacientes intolerantes ou com contraindicação ao uso de tenofovir deve ser indicado o tratamento com entecavir. Durante o período da terapia, o paciente terá a sorologia HBeAg/antiHBe avaliada a cada 24 semanas, e as transaminases, a cada 12 semanas. O HBV-DNA deve ser solicitado na 12ª e na 24ª semana para avaliar resposta viral precoce. Pacientes serão considerados respondedores se apresentarem o desfecho com soroconversão HBsAg para anti-HBs e indetectabilidade do HBV-DNA.

Em pacientes cirróticos, é indicado o uso de entecavir por 12 meses, sendo considerado respondedor se houver soroconversão HBeAg para anti-HBe. Já em pacientes cirróticos HBeAg não reagentes, a soroconversão de HBsAg para Anti-HBs. Para a suspensão do tratamento, é necessário que se tenha alcançado a indetectabilidade do HBV-DNA seis meses após o tratamento.

Para crianças, o tratamento de escolha é com Interferon-alfa, ficando a lamivudina reservada para pacientes que não apresentaram resposta ao interferon-alfa por 6 ou 12 meses (Ministério da Saúde, 2011).

### **1.9 Controle e Prevenção**

A vacinação é a medida mais eficaz para reduzir a incidência de Hepatite B no mundo. Em 1991, a OMS recomendou que todos os países iniciassem uma política de vacinação contra a Hepatite B a fim de prevenir e controlar a infecção. No final de 2008, a administração da vacina foi introduzida em 177 países, sendo que hoje estima-se que sua cobertura global é de 69%, resultando em diminuição do

número de portadores com HBsAg e das taxas de infecção crônica (Chen, 2010).

A vacina contra a Hepatite B é produzida pela tecnologia de DNA recombinante, devendo ser administrada em três doses de 20 mg/mL em via intramuscular. A segunda e terceira dose da vacina são aplicadas em um e seis meses, respectivamente, após a data da dose inicial. (Shepard et al., 2006).

No Brasil, a vacina está disponível pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para indivíduos de até 29 anos de idade (DST-AIDS). A mesma também é oferecida para situações de maior vulnerabilidade à infecção, como vítimas de abuso sexual e de acidentes com material biológico, profissionais de saúde, parceiros sexuais de portadores do HBV, imunodeprimidos, entre outros (Portaria 3.318 de 28 de outubro de 2010).

Outras medidas de prevenção eficiente para a redução da incidência da infecção pelo HBV incluem a testagem de amostras de todas as mulheres grávidas para o marcador HBsAg, a fim de reduzir o risco de transmissão vertical, aplicar normas de biossegurança para prevenção de acidentes ocupacionais entre profissionais de saúde, utilização de preservativos nas relações sexuais e evitar o compartilhamento de materiais em procedimentos hospitalares, assim como em clínicas de tatuagens e piercings, e entre usuários de drogas injetáveis (CDC, 2012).

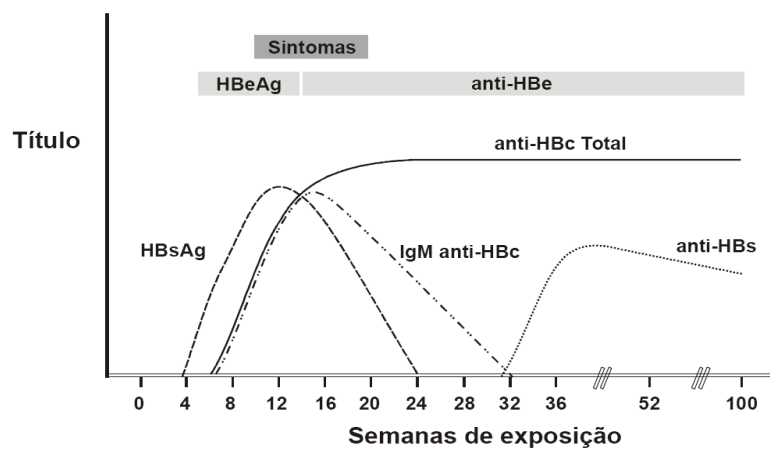
### **1.10 História Natural da doença**

O primeiro marcador sorológico a ser detectado no curso da infecção pelo HBV é o HBsAg, sendo a infecção crônica caracterizada pela presença por mais de 6 meses deste marcador (Kao, 2008). O anti-HBs é um anticorpo neutralizante, e sua presença indica a cura da infecção. O mesmo é detectado isoladamente em indivíduos que foram imunizados contra o vírus da Hepatite B (Weber 2005; Petry e Kubek, 2006).

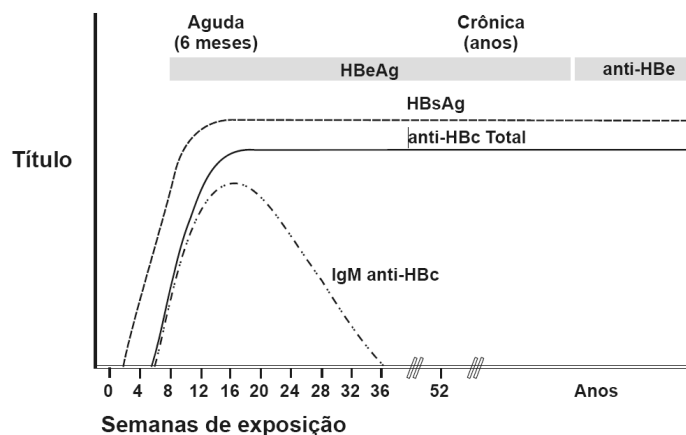
O marcador HBeAg indica replicação viral e risco de transmissão da infecção, e a soroconversão de HBeAg para anti-HBe está associada a remissão da doença hepática (Dény & Zoulim, 2010). Entretanto, alguns indivíduos anti-HBe reagentes continuam tendo replicação viral e doença hepática ativa, por possuírem mutações na região core ou pré-core no genoma do HBV, o que diminui a produção de HBeAg (Kao, 2008).

O antígeno do core do HBV (HBcAg) é intracelular, e por este motivo não é detectado no soro dos indivíduos infectados. Seu anticorpo, o anti-HBc, indica uma exposição prévia ao HBV. O anti-HBc IgM é o primeiro anticorpo detectado durante a infecção aguda, aproximadamente após 1 mês do aparecimento do HBsAg. Quando detectado em altas concentrações, indica infecção recente, desaparecendo após 6 meses. Já o anti-HBc IgG permanece detectável em pacientes curados de Hepatite B aguda e em pacientes com a infecção crônica (Figuras 1.6 e 1.7). Estudos mais recentes sugerem que a presença isolada do anti-HBc IgG caracteriza infecção oculta, quando não há presença de HBsAg circulante no soro mas há a detecção do HBV DNA no soro e/ou fígado (Kao et al., 2002; Weber, 2005).

O significado clínico dos marcadores sorológicos detectados durante o curso da infecção por HBV B estão evidenciados no Quadro 1.1.



**Figura 1.6:** Curso clínico da Hepatite B aguda. Fonte: Gonçalves & Cavalheiro, 2006



**Figura 1.7:** Curso clínico da Hepatite B crônica. Fonte: Gonçalves & Cavalheiro, 2006

**Quadro 1.1.** Significado clínico dos marcadores sorológicos do HBV. Fonte: Ministério da Saúde (2005).

Marcador	Significado Clínico
HBsAg	Primeiro marcador da infecção por HBV. Aparece de uma a três semanas antes dos sintomas. Sua presença junto com o anti-HBc indica infecção. Persistência por mais de seis meses indica infecção crônica. Desaparece nos primeiros seis meses da doença quando a evolução é para a cura.
anti-HBc IgG ou Total anti-HBc IgM*	Marcadores contato prévio com o vírus da hepatite B. Não indica imunidade.  Não é induzido pela vacinação. *Aparece com o início dos sintomas. *Marcador da infecção aguda recente. *Pode persistir por seis meses
HBeAg	Aparece pouco antes dos sintomas. Indica alta infectividade. Sua persistência no soro indica replicação viral independente da fase da doença (aguda ou crônica).
Anti-Hbe	Aparece dentro de poucas semanas após a perda do HbeAg. Indica declínio de infectividade.
Anti-HBs	Aparece um a três meses após a vacinação contra a hepatite B ou após a recuperação de uma infecção aguda. Indica imunidade à hepatite B

## 1.11 Diagnóstico Laboratorial

### 1.11.1 Diagnóstico Bioquímico

Os testes bioquímicos são feitos para determinar a dosagem de enzimas cuja concentração aumenta no soro durante os episódios de lesão ou necrose hepatocelular, em decorrência das infecções virais causadas por qualquer um dos vírus da hepatite. Essas enzimas são a alanina transaminase (ALT), o aspartato transaminase (AST) e a bilirrubina. A ALT indica a gravidade da hepatite B podendo atingir concentrações até 50 vezes maiores que o nível normal (40UI) voltando ao normal em semanas ou meses na hepatite aguda, e os níveis de AST no sangue se correlacionam com o grau de cirrose hepática (Rotman et al., 2009).

### 1.11.2 Diagnóstico Sorológico

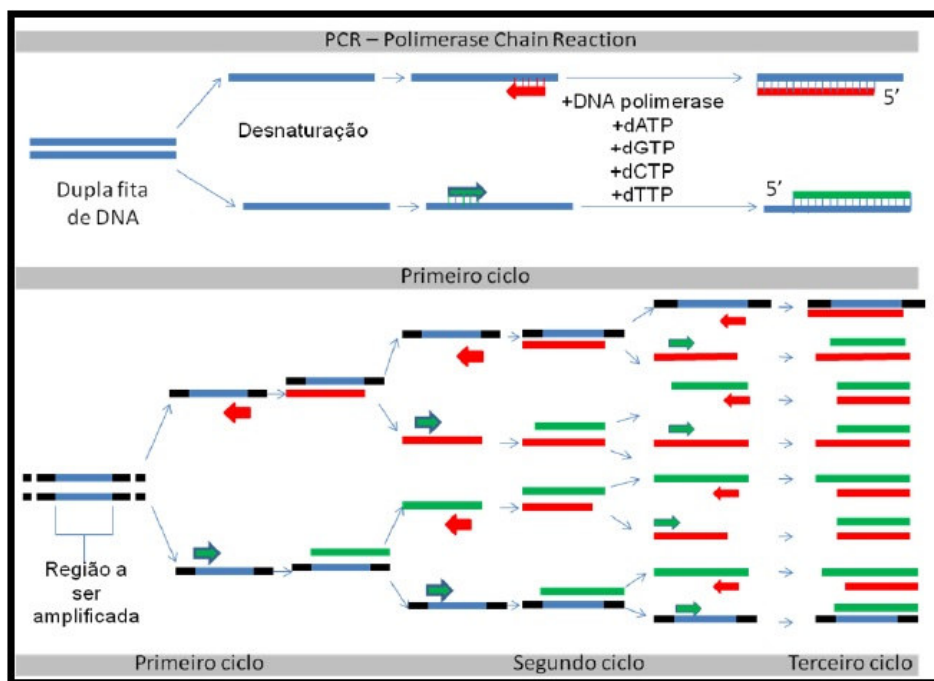
O diagnóstico laboratorial da Hepatite B é realizado, principalmente, através do teste imunoenzimático (ELISA) realizado com amostras de soro, por este detectar os marcadores sorológicos (antígenos e anticorpos) presentes durante o curso da infecção.

### 1.11.3 Diagnóstico Molecular

#### 1.10.3.1 Detecção Qualitativa do HBV DNA

A primeira técnica utilizada para detecção do DNA do HBV foi a hibridização *in situ*. Este método é baseado na detecção de pequenos segmentos do DNA a partir de "sondas" específicas, as quais são seqüências de nucleotídeos complementares do DNA que se deseja identificar. Para permitir a visualização da reação entre as moléculas de DNA e as sondas, estas podem ser associadas a moléculas radioativas, fluorescentes ou biotinizadas (Marshall, 2010).

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) consiste na amplificação de regiões genômicas do HBV-DNA que são escolhidas de acordo com os objetivos da pesquisa. Nesta reação são usados oligonucleotídeos específicos que vão se ligar à seqüência alvo. Em seguida a nova fita de DNA será construída através da adição de nucleotídeos livres na cadeia nascente de DNA na direção 5'→3' através da ação da enzima Taq DNA polimerase, tendo como orientação para incorporação dos nucleotídeos a informação contida na fita molde inicial (Marshall, 2010)(Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Fonte: Adaptado de Marshall, 2010

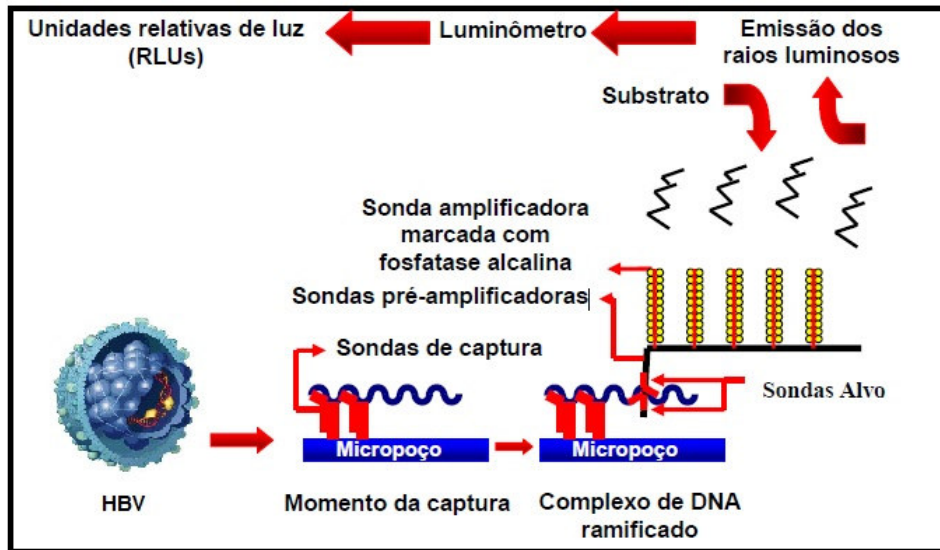
De acordo com a Portaria nº 2561 de 28/10/2009 do Ministério da Saúde, a técnica molecular qualitativa tem papel relevante na avaliação pós-tratamento antiviral, onde o tratamento é suspenso caso não haja detecção qualitativa do DNA do HBV no período de 6 meses após a soroconversão. Outras aplicações do teste qualitativo incluem: i) após 12 meses de tratamento se ocorrer aumento das enzimas hepáticas, o que pode indicar resistência viral, não adesão ou diminuição na absorção do medicamento; ii) na identificação dos casos de mutação na região pré-core, onde não se detecta o HBeAg; iii) e nos casos de Hepatite B oculta, onde o marcador HBsAg não é detectado (Valsamakis, 2007).

#### **1.10.3.2. Detecção Quantitativa do HBV DNA**

Os testes moleculares quantitativos demonstram a carga viral presente no soro ou plasma de indivíduos com hepatite B. O Ministério da Saúde (2008) preconiza o uso de testes comerciais de amplificação do DNA alvo que se baseiam na detecção por quimioluminescência, por ensaio imunoenzimático ou por PCR em Tempo Real.

A técnica do DNA ramificado (branched DNA ou bDNA) permite a quantificação direta de HBV DNA no soro ou plasma humano, sendo a metodologia comercial VERSANT HBV 3.0 Assay (Siemens Healthcare) a mais recente. Nesta técnica, após liberação do DNA do vírion, este é capturado por um conjunto de sondas nucleotídicas de captura fixadas numa cavidade de microtitulação. Um outro conjunto de sondas-alvo então hibridiza tanto com o DNA alvo quanto com as sondas de captura. Quando as sondas de captura e as sondas-alvo se hibridizam formam um complexo de DNA ramificado, múltiplas cópias de uma sonda de fosfatase alcalina são também hibridizadas a este complexo.

A detecção é realizada devido a incubação do complexo contendo fosfatase alcalina com um substrato quimioluminescente, sendo a intensidade de emissão de luz diretamente proporcional com a quantidade de HBV DNA presente em cada amostra. Os resultados são registrados como unidades relativas de luz pelo luminômetro e a quantidade de HBV DNA de cada amostra é determinada por comparação a uma curva padrão. O limite de detecção deste teste é de 2000 cópias de HBV DNA/mL (Yao et al., 2004) (Figura 1.9).



**Figura 1.9.** Representação esquemática da reação de bDNA. Fonte: Adaptado de Martins, 2010

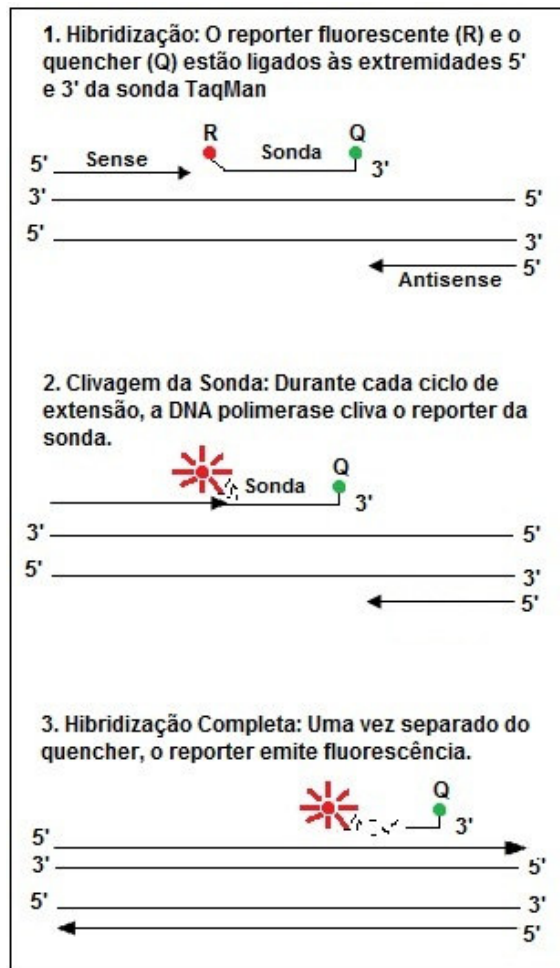
A PCR em Tempo Real permite a quantificação dos produtos de PCR no momento em que estes estão sendo formados a cada ciclo de amplificação, devido a emissão de fluorescência que é captada pelo aparelho, sendo os sistemas de PCR em Tempo Real mais comumente utilizados TaqMan e Syber Green (Vivekanandan & Singh 2010). A PCR em tempo real é uma técnica precisa e reprodutível, porque determina o nível de amplificação durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* ( $C_T$ ). Este ponto permite a quantificação exata baseada na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto amplificado de PCR.

A técnica de PCR em tempo Real apresenta vantagens significativas em relação à técnica convencional de PCR, tais como a possibilidade de quantificação do DNA contido na amostra, a praticidade, a redução no tempo de execução do ensaio e de manipulação de reagentes e produtos de PCR, o que diminui possíveis contaminações com DNA exógeno. Além disso, esta técnica possui uma alta sensibilidade e extensa faixa de detecção quando comparada a testes convencionais (Ronsin et al. 2006).

No sistema Taqman, após a desnaturação do DNA, os iniciadores e a sonda hibridizam com as suas respectivas seqüências-alvo. A sonda contém um



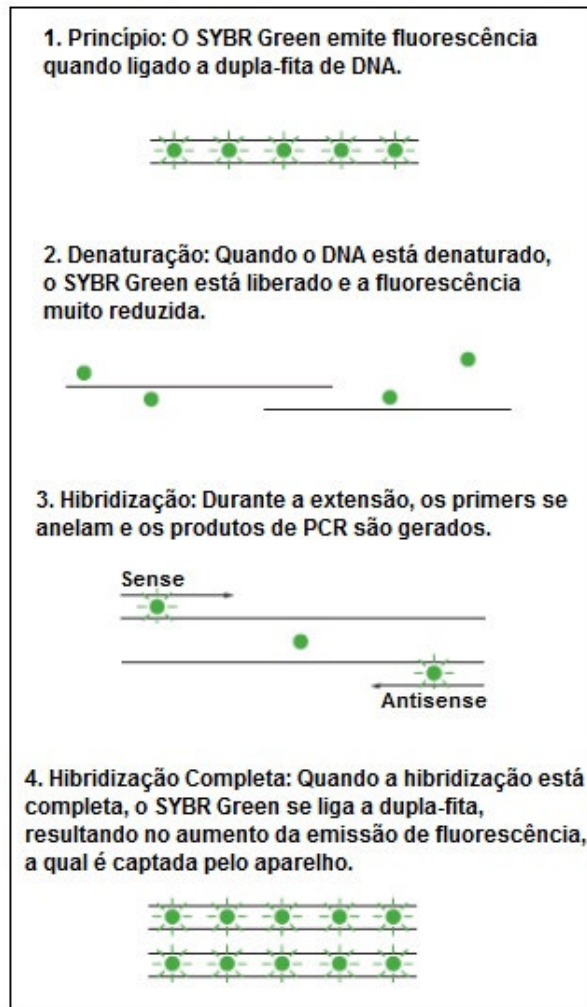
marcador “repórter” na extremidade 5’ terminal e um “quencher” na extremidade 3’ terminal. Durante a etapa de polimerização, a sonda é clivada devido à atividade 5’ nuclease da Taq polimerase. Este processo separa fisicamente o marcador “repórter” do “quencher”, resultando a liberação de fluorescência do “repórter”. O aumento do sinal é diretamente proporcional ao número de moléculas-alvo (Bustin et al., 2005)(Figura 1.10).



**Figura 1.10.** Representação esquemática da reação de PCR em Tempo Real com a metodologia TaqMan. Fonte: site da Life Technologies

No sistema Syber green, ocorre a liberação de fluorescência quando esta molécula fluorogênica se associa com uma molécula de DNA dupla fita e com a excitação da luz emitida pelo sistema do termociclador, emite uma fluorescência verde. Esta técnica não requer a utilização de sondas e, portanto, é comum a

ocorrência de resultados não-específicos, devido à associação deste fluoróforo com dímeros de iniciadores ou a outros produtos de amplificação não específicos (Mackay & Landt 2007)(Figura 1.11).



**Figura 1.11.** Representação esquemática da reação de PCR em Tempo Real com a metodologia SYBR Green<sup>®</sup>. Fonte: Life Technologies, 2013

O diagnóstico molecular quantitativo tem importância antes, durante e após o tratamento antiviral. A carga viral é um dos fatores que deve ser considerado para definição do tratamento, onde foi estabelecido o valor de corte de  $10^4$  cópias/mL para início ou suspensão do tratamento antiviral (Lu et al. 2006; Ministério da Saúde 2008). Além disso, o teste também é empregado para indivíduos com sorologia positiva para o anti-HBe, mas com carga viral alta (mutação do pré-core) (Cacciola et al, 2001).

## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a detecção qualitativa ou quantitativa do DNA do HBV no soro é considerada o método de escolha para definição do tratamento e monitoramento da terapia em determinados perfis de pacientes.

Métodos comerciais de detecção e quantificação do DNA do HBV, tal como o DNA ramificado, não possuem alta sensibilidade e extensa faixa de detecção da carga viral, sendo necessária muitas vezes a diluição de amostras com carga viral alta (Pas et al., 2000). Além disso, estes testes possuem um alto custo por reação (Caliendo et al., 2011), sendo de difícil execução em laboratórios com poucas condições financeiras e infra-estrutura limitada, assim como em laboratórios de saúde pública do país que realizam o diagnóstico molecular da infecção pelo HBV.

Desta forma, o desenvolvimento de métodos “in house” de PCR qualitativo e quantitativo facilitaria o acesso ao diagnóstico molecular em regiões de infraestrutura limitada, diminuindo os custos relacionados ao diagnóstico.

Por outro lado, sabendo-se da dificuldade de aceitação da coleta de amostras de sangue, principalmente em crianças, idosos, pacientes em hemodiálise e usuários de drogas, a coleta de fluido oral seria uma alternativa satisfatória e conveniente nestes casos, facilitando as investigações e monitoramento da resposta ao tratamento. Além disso, a coleta de fluido oral é menos onerosa e de fácil execução, por não necessitar de pessoal treinado e por não ser dolorosa. Por esses motivos, a coleta de fluido oral torna-se também uma importante ferramenta em estudos de campo.

Amostras de fluido oral têm sido cada vez mais utilizadas em estudos epidemiológicos e diagnósticos para diferentes agentes virais (Amado et al., 2008; Sheikhabari et al., 2012; Bilder et al., 2013). A presença de marcadores sorológicos da Hepatite B (HBsAg, HBeAg, anti-HBs e anti-HBc) já foi demonstrada em amostras de fluido oral, com diferentes valores de sensibilidade e especificidade (Thiemme et al., 1992; Zhevachevsky et al., 2000; Hutse et al., 2005; Amado et al., 2008; Cruz et al., 2011; Arora et al., 2012).

Da mesma forma, outros estudos também demonstraram que o HBV DNA pode ser detectado e/ou quantificado neste tipo de amostra (Van Der Eijk et al. 2005;

Kidd-Ljunggren et al. 2006; Heiberg et al., 2010). A carga viral do HBV no fluido oral é proporcional à mesma no soro (Zhang et al., 2008), sendo mais elevada em pacientes HBsAg e HBeAg reagentes (Noppornpanth et al. 2000).

Entretanto, embora já tenha sido evidenciada a utilidade de amostras de fluido oral para detecção do DNA do HBV, torna-se necessário o desenvolvimento e avaliação de testes moleculares para o HBV em fluido oral, permitindo maior acesso ao diagnóstico em áreas com infra-estrutura limitada para coleta de amostras.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Padronizar métodos de diagnóstico molecular para a hepatite B utilizando amostras de soro e fluido oral a fim de reduzir os custos e facilitar o acesso ao diagnóstico, especialmente para laboratórios com recursos limitados ou para indivíduos com acesso venoso precário.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Padronizar uma PCR quantitativa para a detecção e quantificação do DNA do HBV (região do gene pré-S2/S) em amostras de soro e fluido oral utilizando a metodologia TaqMan;
- Determinar os parâmetros de qualidade do teste quantitativo: concordância, reprodutibilidade e correlação em comparação a técnica comercial disponível no mercado (Cobas Taqman HBV, Roche).
- Avaliar a aplicabilidade de técnica de PCR qualitativo para detecção do DNA do HBV em amostras de soro e fluido oral utilizando iniciadores para a região do core.

## **4.MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Seleção de Amostras**

Para este estudo, foram obtidas amostras pareadas de soro e fluido oral de 66 voluntários com evidência sorológica atual de hepatite B (HBsAg reagente) e 50 voluntários que não possuíam nenhum marcador sorológico para a infecção. Estes indivíduos foram previamente informados sobre o estudo e após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foram incluídos no estudo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz Protocolo nº 433/07. (anexo I)

Todas as amostras biológicas foram coletadas de pacientes e acompanhantes dos mesmos que são atendidos no Grupo de Atendimento do Laboratório de Hepatites Virais (IOC – Fiocruz) no período de julho de 2010 a novembro de 2012.

### **4.2 Coleta de amostras de soro e fluido oral**

As amostras de soro foram coletadas por punção venosa periférica, utilizando-se agulhas hipodérmicas e tubos tipo vacutainer estéril com gel de 8,5 mL (SST™ II Advance, BD Vacutainer®, EUA) por técnicos especializados de cada instituição. Após a coleta as amostras foram transportadas para o laboratório, onde foram centrifugadas à velocidade de 1972 x g à temperatura de 25°C durante 5 minutos na centrífuga RDEi (RDE Equipamentos Científicos Ltda). O sobrenadante (soro) obtido foi acondicionado em dois criotubos tipo poliestireno previamente identificados com o número de registro.

As amostras de fluido oral foram coletadas com auxílio do coletor comercial Salivette® (Sarstedt, Alemanha) que consiste em um algodão absorvente tratado, o qual fica no interior de um frasco de plástico. O algodão foi colocado por cerca de 2 minutos na boca do paciente, entre a gengiva e a bochecha, para que houvesse absorção do fluido oral pelo algodão. Em seguida, o coletor foi retirado da cavidade oral e inserido novamente no frasco de plástico. Após coleta, foi adicionado 1mL de tampão PBS (Tampão Fosfato-Salino) ao algodão para eluição da amostra (Figura 4.1). Para eluição da amostra, o coletor foi centrifugado em centrífuga RDEi (RDE Equipamentos Científicos Ltda) por 10 minutos a 1972 x g.



**Figura 4.1.** Procedimento para coleta de fluido oral utilizando o coletor Salivette®. Fonte: Sarstedt, 2012

#### **4.3 Detecção de marcadores sorológicos para hepatite B em amostras de soro**

As amostras de soro foram submetidas a testes imunoenzimáticos (ELISA) comerciais para detecção dos marcadores HBsAg (ETI-MAK-4, Diasorin, Itália), anti-HBc (ETI AB COREK PLUS, Diasorin, Itália), anti-HBc IgM (ETI CORE IgMK Plus, Diasorin, Itália), anti-HBs (ETI-AB-AUK-3, Diasorin, Itália), anti-HCV (Murex anti-HCV versão 4.0), HBeAg e anti-HBe (Cobas e411, Roche Diagnostics, EUA), conforme as instruções de cada fabricante.

#### **4.4 Extração do DNA viral das amostras de soro e fluido oral**

Para extração do DNA do HBV em amostras de soro foi utilizado o kit “High Pure Viral Nucleic Acid kit” (Roche Diagnostics), enquanto para as amostras de fluido oral foi utilizado o kit RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitex, Alemanha), com mudanças no protocolo a fim de aumentar a sensibilidade do método conforme descrito por Portilho et al., 2012.

#### **4.4.1 Extração com “High Pure Viral Nucleic Acid kit” (Roche Diagnostics, EUA)**

O DNA das amostras de soro foi extraído utilizando-se este conjunto de diagnóstico comercial High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A cada tubo devidamente identificado, foram adicionados 200 µL da amostra de soro correspondente. Em seguida, foi adicionado 200 µL do tampão “Binding Buffer” enriquecido com o “RNA Carrier” (preparado anteriormente) e 40 µL de proteinase K à cada amostra, as quais foram misturadas imediatamente com um agitador automático (Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA) e incubadas a 72°C por 10 minutos em termobloco (modelo IT 2002, Bioplus, Brasil).

Em seguida, 100 µL de tampão “Binding Buffer” foi adicionado a cada amostra, as quais foram novamente homogeneizadas com auxílio de agitador automatizado (Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA). Cada amostra foi transferida para coluna de sílica e submetidas a uma centrifugação de 8000 x g por 1 min em minicentrífuga (modelo 1-14ED, Sigma Aldrich, Inglaterra). Os tubos coletores das colunas foram descartados e novos tubos foram recolocados. Após a adição de 500 µL do tampão “Inhibitor Removal Buffer”, as amostras foram submetidas à centrifugação por 1 minuto a 8,000 x g. Os tubos coletores foram descartados e novos foram recolocados, e em seguida, foram adicionados 450 µL tampão “Wash buffer” para lavagem da coluna, seguido por outra centrifugação de 8,000 x g por 1 min. Esta etapa de lavagem foi realizada novamente. Os tubos coletores foram descartados e novos tubos foram recolocados. Nova centrifugação foi realizada à máxima velocidade (16.163 x g) por 10 segundos a fim de eliminar resíduos do tampão de lavagem.

Cada coluna foi colocada em tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 mL e foram adicionados 50 µL do tampão “Elution buffer” para eluir o DNA. Após centrifugação a 8,000 x g por 1 minuto, os tubos cônicos estéreis contendo o DNA viral foram estocados a -70° C até o momento de sua utilização.

Como controle positivo nas extrações do DNA viral, foi utilizada uma amostra de soro definida como controle de qualidade interno (CQI) do HBV no Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais (Miguel et al., 2009) a qual apresenta valor de DO/CO de HBsAg de 1,3 a 3,2 em testes imunoenzimáticos.



#### **4.4.2 Extração com “RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit” (Invitex, Alemanha)**

Este conjunto de reagentes permite a extração de DNA ou RNA viral proveniente de soro, plasma, fluido cerebrospinal, cultura de células, e outros fluidos corporais tais como, swabs ou biópsias teciduais. Este conjunto possui um diferencial no tubo inicial de teste, que já contém uma mistura de Proteinase K, carreadores de ácidos nucleicos e um controle interno da extração, o que ajuda a reduzir as etapas de preparação de reagentes e a interação com o material infeccioso.

O DNA viral das amostras de fluido oral foi extraído utilizando este conjunto de reagentes, onde em cada tubo inicial foram adicionados 400 µL da amostra de fluido oral correspondente, as quais foram homogeneizadas vigorosamente com o auxílio de um agitador automático (Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA) e em seguida, as amostras foram incubadas a 65°C por 15 minutos em termobloco (modelo IT 2002, Bioplus, Brasil) com homogeneização da amostra a cada 5 minutos utilizando o agitador automático (Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA). Em seguida, as amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos em termobloco (Multi Block Heater, LabLine, Brasil) com homogeneização da amostra a cada 5 minutos utilizando o agitador automático (Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA).

Em seguida, foram adicionados 400 µL de “Binding Solution” a cada tubo contendo a amostra e a solução foi homogeneizada vigorosamente com o agitador automático (Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA). A solução foi transferida para cada coluna e acoplada ao tubo cônico que foi então submetido a centrifugação (minicentrífuga modelo 1-14ED, Sigma Aldrich, Inglaterra) a 9,300 x g por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado e um novo foi acoplado a coluna, em seguida, foram adicionados 500 µL da solução “Washer buffer R1” em cada coluna para lavagem da mesma. Foi realizada nova centrifugação à 9,300 x g durante 30 segundos e mais uma vez o tubo coletor foi removido. Após colocar novos tubos às colunas, foram adicionados 700 µL do “Wash Buffer R2” em cada tubo, e as amostras foram centrifugadas a 9,300 x g por 30 segundos. A fim de eliminar todo o resíduo de etanol, foi realizada nova centrifugação por 4 minutos à velocidade máxima (16,163 x g).

Após colocar tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 mL na parte inferior da coluna, foram adicionados 60 µL do tampão “Elution Buffer”, previamente aquecido a 80°C, em cada coluna para eluir o DNA. A solução foi incubada a temperatura ambiente (20° C) por 3 minutos e depois submetida à centrifugação de 9,300 x g por 1 minuto. Posteriormente, as colunas foram descartadas e os tubos cônicos estéreis contendo o DNA viral foram estocados a -70° C até o momento de sua utilização na amplificação.

#### 4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção qualitativa do HBV DNA

Para detecção qualitativa do HBV DNA nas amostras de soro e fluido oral, utilizamos a PCR com iniciadores para a região do core do genoma viral (Olioso et al, 2007), o qual já foi previamente utilizado em amostras de fluido oral (Portilho et al., 2012). Os iniciadores utilizados na PCR qualitativa estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR qualitativa.

<i>Oligonucleotídeos</i>	Orientação	Sequencia	Região do genoma do HBV
HBV A	Senso	5' TTG CCT TCT GAC TTC TTT CC 3'	1955 a 1974
HBV S	Antisenso	5' TCT GCG AGG CGA GGG AGT TCT 3'	2401 a 2381

#### *Materiais:*

- Água RNA/DNAse free (GIBCO, NI, EUA)
- 10pmol/µL de oligonucleotídeos específicos senso (HBV A) e anti-senso (HBV S)
- dNTP's - 1,25mM (GIBCO, NI, EUA)
- MgCl<sub>2</sub> - 50 mM
- 10 x tampão de PCR (Invitrogen, CA, EUA)
- Enzima Platinum Taq DNA polimerase - 5U/µL (Invitrogen, CA, EUA)

*Método:*

Aos tubos de poliestireno de 0,5 mL foram acrescentados 10,7 µL de água RNA/DNase free; 2,5 µL de tampão da *Taq* polimerase (10X); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub>; 4 µL dNTP's; 0,5 µL de cada oligonucleotídeo, 0,3 µL *Taq* polimerase e 5 µL do DNA. Em seguida as amostras foram submetidas a PCR em termociclador (T3 Thermocycler, Biometra), onde após a desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, foram submetidas a 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistia de: 95°C por 30 segundos para desnaturação, 59°C por 30 segundos para hibridização dos oligonucleotídeos, 72°C por 30 segundos para síntese do DNA. Após o último ciclo, uma etapa de 72°C por 7 minutos foi acrescida para alongamento final das cadeias de DNA.

#### **4.6 Gel de eletroforese**

*Materiais:*

- Tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) (50x: 242g Tris base/ 57,1 mL ácido acético glacial/ 100 mL de EDTA 0,05M; pH 8,0)
- Tampão da amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol)
- Brometo de etídeo
- Agarose 1,0% em tampão TBE
- Padrão de peso molecular (φX174 DNA/Hae III) (Invitrogen, CA, EUA)

*Método:*

Foram submetidos à eletroforese, 8 µL do produto da PCR em géis de agarose à 1,0% em tampão TBE a 95 volts/30 minutos. O marcador φX174 DNA/HaeIII foi colocado em um orifício em cada gel para determinação do tamanho da banda obtida na reação de PCR. Após a corrida eletroforética, o gel é examinado em luz ultravioleta no transiluminador (TMW-20, UVP Imagestore, CA, EUA) para a visualização das bandas de DNA de 441 pares de bases.

#### **4.7 Quantificação com COBAS® TaqMan® HBV test (Roche Diagnostics, EUA)**

Todas as amostras de soro HBsAg reagentes deste estudo foram analisadas e quantificadas para o HBV DNA utilizando o teste comercial COBAS® TaqMan® HBV (Roche Diagnostics), a fim de determinar parâmetros como sensibilidade e especificidade dos testes desenvolvidos no laboratório. O teste COBAS® TaqMan® HBV (Roche Diagnostics) é um teste comercial que utiliza a metodologia TaqMan para quantificação do gene pré-S/S do HBV DNA. O teste é baseado nos processos de preparação manual da amostra para extração do DNA viral, amplificação por PCR automatizada, e detecção por sondas de detecção oligonucleotídicas marcadas com corante fluorescente duplo clivado. O analisador COBAS® TaqMan® 48 calcula o título de DNA do HBV presente nas amostras do teste, comparando o sinal do HBV com o sinal do Padrão de Quantificação do HBV em cada amostra e controles.

*Materiais fornecidos pelo conjunto de reagentes:*

- LYS (Tampão de Ligação/lise)
- CAR (Carreador de RNA)
- PK (Proteinase K)
- IRB (Tampão de eliminação de inibidor)
- WASH (Tampão de lavagem)
- ELB (Tampão de Eluição)
- RS (Conjunto de suporte de ácido nucleico viral do Sistema High Pure), no qual estão incluídos Suporte de Lise, Suporte de tubos de Filtragem com suporte de resíduo afixado, Suporte de Eluição, Suporte de Tampa.
- WR (Suporte de Resíduos de Ácido Nucleico Viral do Sistema High Pure)
- HBV QS (Reagente do Padrão de Quantificação do HBV COBAS® TaqMan®)
- HBV H(+ )C (Controle Positivo alto do HBV)
- HBV L(+ )C (Controle Positivo baixo do HBV)
- CTM (-)C (Controle Negativo COBAS® TaqMan®)

- HBV MMX (Mistura Principal COBAS® TaqMan® HBV)
- CTM Mn<sup>2+</sup> (Solução de Manganês COBAS® TaqMan®)

*Materiais não fornecidos pelo conjunto de reagentes:*

- Isopropanol (>99%)
- Etanol (96-100%)

*Métodos:*

Inicialmente, foram adicionados 625 µL de Solução de Trabalho de Ligação/Lise (contendo Tampão de Ligação/Lise, RNA portador, Cobas® TaqMan® HBV QS e Proteinase K) em cada reservatório do Suporte de Lise. Em seguida, foram adicionados 500 µL de amostra e controles aos reservatórios correspondentes, seguidos de agitação forte em agitador automático (Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA) por 10 segundos e incubação em banho-maria pré-aquecido a 50°C por 10 minutos (modelo 102R, Fanem, Brasil). Após a incubação, o Suporte de Lise foi colocado em centrífuga (Rotanta 460 Rotor, Hettick Zentrifugen, Alemanha) por 20 segundos a 4600 x g. A seguir, foram adicionados 250 µL de isopropanol a cada reservatório, e as amostras foram misturadas por inversão e em seguida por agitação forte em vortex (Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA) por 10 segundos. Posteriormente, o Suporte de Lise foi submetido a centrifugação por 20 segundos a 4600 x g.

Em seguida, 750 µL de cada amostra e controle foram transferidos para seu reservatório correspondente do Suporte de Tubos de Filtragem, e submetidas a centrifugação por 2 minutos a 4600 x g. Em seguida, o volume de amostra remanescente no Suporte de Lise também foi transferido e centrifugado sob as mesmas condições. O Suporte de Resíduos foi substituído por um novo. A seguir, foram adicionados 400 µL do Tampão de Eliminação do Inibidor (IRB) a cada reservatório, e o Suporte de Filtragem foi centrifugado a 4600 x g por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 700 µL do Tampão de Lavagem (WASH) a cada reservatório, seguido de centrifugação por 2 minutos a 4600 x g. Novamente, o Suporte de Resíduos foi substituído por um novo, e mais 700 µL de Tampão de

Lavagem (WASH) foram adicionados, seguido por centrifugação por 3 minutos a 4600 x g.

Em seguida, o Suporte de Resíduos foi retirado do Suporte de Tubos de Filtragem, e o Suporte de Eluição foi colocado em seu lugar. Foram adicionados 75 µL do Tampão de Eluição (ELB) pré-aquecido a 70 °C. As amostras foram incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) e centrifugadas por 3 minutos a 4600 x g. A seguir, o Suporte de Tubos de Filtragem foi substituído pelo Suporte de Tampas.

Para a etapa de amplificação e detecção, foi preparada a Mistura Principal de Trabalho, para a qual foram adicionados 191 µL de CTM Mn<sup>2+</sup> a um frasco contendo o HBV MMX. Em seguida foram adicionados 50 µL de Mistura Principal de Trabalho e 50 µL de cada amostra e controle ao tubo K correspondente. Em seguida, o portador K foi colocado no analisador COBAS® TaqMan® para amplificação das amostras.

#### **4.8 Quantificação do DNA do HBV em amostras de soro e fluido oral pelo método de PCR em Tempo Real “in house”**

Para a quantificação viral foi utilizada a técnica de PCR em tempo real para amplificação do gene pré-S2/S do HBV. Para o desenvolvimento dos iniciadores desta técnica, foi construído um conjunto de sonda e iniciadores (Assay by design) pela Applied Biosystems.

##### **4.8.1 Desenho dos oligonucleotídeos**

A fim de otimizar o desempenho do teste para as variantes do HBV encontradas no Brasil foi realizada busca de seqüências de referência de cepas internacionais, bem como, de cepas de diferentes regiões do Brasil, de diferentes genótipos de HBV depositadas no *GenBank*, para desenhar os oligonucleotídeos.

Através do *software* CLUSTAL X (Thompson et al., 1997), as seqüências da região pré-S2/S do genoma do HBV foram alinhadas para definir o segmento ideal para desenho de nossos oligonucleotídeos. A seguir foi utilizado o *software*

Primer Express (Applied Biosystems, EUA) para gerar um assay contendo oligonucleotídeos e a sonda específicas para detecção e quantificação da região pré-S2/S comuns a todos os genótipos (Tabela 4.2). Esta sonda foi marcada com um fluoróforo específico na extremidade 5'(FAM) e um quencher na extremidade 3' (Tamra).

Tabela 4.2. Oligonucleotídeos e sonda utilizados nas reações de PCR quantitativa.

Sonda e oligonucleotídeos	Orientação	Sequencia	Região do genoma do HBV
Oligonucleotídeo 1	Senso	5' GAATCCTCACAATACCGCAGAGT 3'	71 a 93
Oligonucleotídeo 2	Antisenso	5' GCCAAGACACACGGGTGAT 3'	150 a 132
Sonda	-	5' AAGTCCACCACGAGTCTAG 3'	99 a 81

#### 4.8.2 Construção da Curva Padrão

Neste estudo, o PCR em tempo real foi padronizado para a detecção e quantificação da região do gene pré-S2/S do HBV. A quantificação absoluta das amostras foi determinada utilizando-se uma curva padrão interna que foi construída a partir de uma amostra Painel comercial de quantificação do HBV, OptiQuant Acrometrix (Life Technologies, EUA) que possuía  $5,6 \times 10^5$  cópias de HBV DNA/mL.

O painel de Quantificação do HBV (OptiQuant HBV DNA Panel, OptiQuant, Life Technologies, EUA) foi desenvolvido para padronização e controle de testes de diagnóstico “in house”. Este é constituído por sete tubos, sendo um deles o controle negativo, e os outros possuem concentração de HBV DNA variando de  $2 \times 10^2$  a  $2 \times 10^7$  cópias/mL.

##### 4.8.2.1 Obtenção do Amplicon para ligação com o vetor clonagem

A amostra do padrão comercial (OptiQuant Acrometrix (Life Technologies, EUA) teve seu DNA extraído utilizando um conjunto de reagentes comercial QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, EUA) como descrito pelo fabricante. Este conjunto é

constituído por colunas de sílica, e para sua realização são necessários 200 µL de amostra, e o DNA é eluído em 100 µL de tampão. Em seguida, o DNA foi submetido a uma PCR semi-nested com a utilização de iniciadores específicos para a região pré-S2/S do HBV de acordo com o descrito por Naito et al. (2001), gerando um produto de 1100 pares de base.

#### **4.8.2.2 Ligação do amplicon ao vetor de clonagem**

A ligação dos amplicons foi realizada utilizando o kit pCR™4-TOPO® (Invitrogen, EUA) como descrito pelo fabricante. Resumidamente, 5 µL do amplicon obtido, 1 µL do vetor de clonagem, 1 mL de Salt Solution foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente.

#### **4.8.2.3 Transformação bacteriana e purificação do DNA plasmidial contendo o inserto do HBV**

Células bacterianas competentes (*E. coli* cepa TOP10F), previamente preparadas pelo método de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) (Sambrook et al, 2001), foram descongeladas em banho de gelo. A estas células, foram acrescidos 2 µL do produto da ligação do amplicon ao vetor de clonagem descrito no item 4.2.8.2. e em seguida incubadas durante 20 minutos em banho de gelo.

Essa reação foi submetida a um choque térmico por 30 segundos a 42°C e uma nova incubação de banho de gelo foi realizada por um período de 10 minutos. A recuperação das células bacterianas, após choque térmico, foi realizada pela adição de 2500 µL de meio Luria Bertani líquido (LB: 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,0) sem antibióticos, e incubação a 37°C sob agitação (150 rpm) por 1 hora (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, EUA) (Sambrook et al, 2001).

Após esta etapa, foi realizado o plaqueamento em uma única placa contendo meio LB sólido (LB líquido contendo 1,5% (p/v) de ágar suplementado contendo 100 µg/mL de ampicilina, 0,1 mM de IPTG e 40 µg/mL de X-Gal). Após incubação a 37°C por 16 horas, 10 colônias bacterianas correspondentes a 10 clones plasmidiais foram transferidos para tubos contendo 5 mL de meio LB líquido



suplementado com ampicilina 50 µg/mL. Os tubos foram incubados por 16 horas sob agitação constante de 150 rpm a 37°C (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, EUA).

Os clones bacterianos que continham o inserto do HBV diferenciaram-se dos demais por não apresentar coloração azulada. Uma destas colônias bacterianas foi semeada em 400 mL de meio LB, para obtenção de maior massa plasmidial. Após a purificação com o kit *Maxiprep Purification System*® (Promega Corporation, Madison, Wiconsin, EUA), e digestão com a endonuclease de restrição *Eco* RI, o inserto foi submetido a eletroforese em gel de agarose.

Após confirmação pela digestão, o inserto de HBV foi clonado e seqüenciado para análise por alinhamento com outras sequencias de HBV utilizando o programa Blast.

#### **4.8.2.4 Sequenciamento nucleotidico**

Após extração, o *DNA* plasmidial foi submetido a uma reação de semi-nested PCR com respectivos iniciadores para a caracterização do inserto. Os “amplicons” obtidos pela *PCR* foram purificados utilizando o kit comercial *QIAquick*® *PCR Purification kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e quantificados em gel de agarose a 1,5% utilizando o marcador de massa molecular  $\phi$ x *DNA* Ladder (Invitrogen™, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada pela Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz (PDTIS/FIOCRUZ – RPT01A) conforme protocolo desenvolvido por Otto et al. (2008), utilizando o kit comercial Big Dye Terminator® v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, EUA) e iniciadores para o HBV, gerando um volume final de 7,5 µL.

#### **4.8.2.5 Quantificação e obtenção da curva padrão**

A concentração dos plasmídios recombinantes contendo o inserto de HBV foi determinada pela leitura do produto em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260nm de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Biophotometer,

Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A quantificação medida é fornecida em ng/ $\mu$ L, sendo transformada em número de cópias/ $\mu$ L (nº cópias/ $\mu$ L) de acordo com a fórmula:

$$\text{Número de cópias}/\mu\text{L} = \frac{\text{Concentração (g}/\mu\text{L)}}{(\text{Número de pares de base do plasmídeo recombinante}) \times 660} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Após determinação do número de cópias do genoma viral, realizou-se diluições seriadas na base 10 dos plasmídios com concentrações variando de  $10^9$  até 10 cópias/ $\mu$ L para obtenção da curva padrão. Estas diluições foram alíquotadas e armazenadas a  $-70^\circ\text{C}$  para posterior utilização.

#### 4.9 Reação de PCR em Tempo Real pela metodologia TaqMan

Em uma microplaca óptica de 96 cavidades (MicroAmp®, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) são adicionados em cada duplicata, 5  $\mu$ L de cada amostra e a diluição da curva padrão (1  $\mu$ L de curva padrão e 4  $\mu$ L de água) e 20  $\mu$ L da mistura de reagentes (Quadro 4.1). Para cada corrida, foi preparada uma mistura contendo 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (tampão, dNTPs com UTP, AmpERASE UNG e AmpliTaq Gold DNA polimerase) (Roche, Nova Jersey, EUA) e 1,25  $\mu$ L de assay by design (300 nM de cada oligo e 150 nM de sonda) (Gentec, Applied Biosystems assay, CA, EUA). O tampão de PCR contém 5-carboxy-X-rodamine (5-ROX) (500nM), como referência passiva para normalização das reações.

A reação do qPCR foi realizada em plataforma Line-Gene 9600 (Bioer Serves Life, Canada) com uma etapa de desnaturação inicial a  $95^\circ\text{C}$  por 10 minutos, e depois as amostras foram submetidas a  $50^\circ\text{C}$  por 2 minutos, e 40 ciclos de  $95^\circ\text{C}$  por 15 segundos e  $60^\circ\text{C}$  por 1 minuto. Todas as amostras foram testadas em duplicata. A fluorescência foi detectada ao final da etapa de hibridização da sonda. O valor de  $C_T$  (*threshold cycle*) foi fornecido automaticamente, em cada corrida. Este ponto permite a quantificação exata baseada na fluorescência. A emissão dos

compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto amplificado de PCR.

Alguns pontos foram avaliados nas reações de qPCR, tais como: temperatura de hibridização (60°C e 62°C), e concentração de DNA (5 µL e 7,5 µL) obtido das amostras de soro e fluido oral.

Após a padronização da técnica, as amostras que tivessem resultados discordantes na duplicata foram retestadas em triplicata e o valor obtido nesta nova reação foi incluído.

Quadro 4.1. Reagentes utilizados na qPCR para HBV.

Reagentes	Volume (µL)
H <sub>2</sub> O <i>DNase/RNase</i> livre <sup>1</sup>	6,25
TaqMan® Universal <i>PCR</i> Master Mix <sup>2</sup>	12,5
Assay by Design <sup>3</sup>	1,25
DNA da amostra	5,0
DNA da curva padrão	1,0 (+ 4,0 de H <sub>2</sub> O)
Total	25,0

<sup>1</sup> Gibco®, Califórnia, EUA

<sup>2</sup> Applied Biosystems, Branchburg, Nova Jersey, EUA

<sup>3</sup> Applied Biosystems, Foster city, Califórnia, EUA0

#### 4.10 Testes com fluido oral

Após o desenvolvimento do método de qPCR em amostras de soro, a detecção e quantificação do DNA do HBV em amostras de fluido oral foram realizadas. Para otimização do teste com amostras de fluido oral, as amostras foram obtidas de indivíduos HBsAg não reagentes (com sorologia não reagente para Hepatite B), misturadas umas com as outras e alíquotadas em 90 µL em 9 tubos. Após esta etapa, o primeiro tubo foi inoculado com um padrão comercial para hepatite B que contém  $5,6 \times 10^7$  cópias de HBV/mL (Optiquant HBV, Acrometrix, Life Technologies, USA) (Paraskevis et al., 2010). Esta amostra foi diluída serialmente nos outros tubos de 1:10. Portanto, as concentrações de HBV DNA variavam de  $5,6 \times 10^6$  a  $5,6 \times 10^2$  cópias de HBV DNA/mL e tiveram seu DNA extraído conforme

descrito no ítem 4.4.7.2. Esta diluição foi realizada a fim de definir as condições iniciais da reação, tal como concentração de DNA (5 µL e 7,5 µL de DNA) e número de ciclos da reação (40 e 45 ciclos).

#### 4.11 Cálculo do número de cópias de HBV DNA

Os resultados gerados pelo aparelho estão em número de equivalentes de genomas na reação de PCR. A transformação para número de cópias se dá conforme a fórmula:

$$N = \frac{n}{k' \times k''}$$

Onde:

N= Cálculo do número de equivalentes genômicos esperado em 1000 µL de plasma

n= número de equivalente de genomas na reação de PCR

K'= fração esperada de recuperação do DNA extraído

K''= fração do DNA usada na reação de PCR em tempo real

Dado que a eficiência de cada extração comercial é cerca de 50% (Tian et al., 2000), e que é utilizado 10% do DNA das amostras de soro e 12,5% de DNA das amostras de fluido oral para a reação de PCR em tempo real; a partir do número de equivalentes de cópias encontrado por reação pode-se estimar o número de cópias que estariam presentes em cada mililitro de soro ou fluido oral ao início da extração. Desta forma, o cálculo para soro e fluido oral ficaram como mostrado abaixo:

$$N \text{ em amostras de soro} = \frac{n}{0,5 \times 0,10}$$

$$N \text{ em amostras de fluido oral} = \frac{n}{0,5 \times 0,125}$$

#### 4.12 Padrão de Qualidade da PCR em Tempo Real

Experimentos foram conduzidos para determinar o limite de detecção, a eficiência, a concordância, reprodutibilidade, correlação, sensibilidade e especificidade.

*Limite de Detecção:* O limite de detecção da PCR quantitativa “in house” foi determinado com base na amostra com menor carga viral da curva padrão detectada pelo aparelho.

*Eficiência:* Para cálculo da eficiência da curva padrão foi utilizada a seguinte fórmula:  
 $10^{(-1/\text{slope})} - 1$ .

*Concordância:* A concordância da PCR em tempo real desenvolvida neste estudo e da PCR qualitativa foi avaliada com base no número de amostras com resultados positivos e negativos por estas técnicas e pela técnica comercial.

*Reprodutibilidade:* Foi avaliada a partir da análise das diluições da curva padrão realizada em cinco corridas em cinco dias distintos.

*Correlação:* Duplicatas das amostras de soro foram examinadas e os valores médios de carga viral em cópias/ $\mu\text{L}$ , log de cópias/ $\mu\text{L}$  e de cycle threshold (ct) foram comparadas com os resultados do teste comercial Cobas TaqMan HBV Test (Roche Diagnostics).

*Sensibilidade:* A sensibilidade da PCR em tempo real para detecção e quantificação do DNA do HBV desenvolvida neste estudo foi investigada através de diluições seriadas da curva padrão desenvolvida neste estudo e pela comparação dos resultados obtidos com aqueles resultados obtidos da técnica comercial.

*Especificidade:* A especificidade da técnica de PCR desenvolvida neste estudo foi

determinada analisando um painel de 50 amostras HBsAg não reagentes.

#### **4.13 Análise dos dados**

Os dados obtidos dos resultados dos testes foram codificados e digitados em um banco de dados criado no programa Excell. Análise estatística descritiva foi realizada com cálculo de médias, medianas, freqüências e intervalos de confiança. Para analisar os parâmetros iniciais dos testes quantitativos “in house”, foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon. Foi feita a correlação entre os valores das concentrações de HBV nas amostras de soro e fluido oral obtidas pelo PCR em tempo real com aqueles obtidos pelo teste comercial Cobas Taqman HBV. Para isto foi utilizado o teste de correlação de Spearman, considerados significativos quando o valor de  $p < 0,05$  utilizando o programa GraphPad InStat. Os gráficos de correlação entre os testes quantitativos foram realizados com o programa GraphPad Prism v5.0.

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 População de Estudo

Neste estudo, foram obtidas amostras pareadas de soro e fluido oral de 116 indivíduos, onde 50 deles eram considerados HBsAg não reagentes (sem a presença de marcadores da infecção pelo HBV) e 66 indivíduos apresentavam sorologia reagente para HBV. A maioria da população pertencia ao sexo feminino (62/116) e a média de idade da população foi igual a  $40 \pm 13,71$  anos. A distribuição da população HBsAg reagente e não reagente quanto ao sexo e faixa etária estão evidenciadas nas Tabelas 5.1 e 5.2.

**Tabela 5.1.** Distribuição da população estudada de indivíduos HBsAg reagentes de acordo com sexo e faixa etária

Faixa etária	Sexo		Total n (%)
	Feminino n (%)	Masculino n (%)	
0-20	3 (60)	2 (40)	5 (7,57)
21-30	3 (30)	7 (70)	10 (15,15)
31-40	8 (57,14)	6 (42,86)	14 (21,21)
41-50	5 (31,25)	11 (68,75)	16 (24,25)
51-60	6 (46,15)	7 (53,85)	13 (19,7)
61-	3 (37,5)	5 (62,5)	8 (12,12)
Total	28 (42,42)	38 (57,58)	66 (100)

**Tabela 5.2.** Distribuição da população estudada de indivíduos HBsAg não reagentes de acordo com sexo e faixa etária.

Faixa etária	Sexo		Total n (%)
	Feminino n (%)	Masculino n (%)	
0-20	2 (50)	2 (50)	4 (8)
21-30	11 (78,57)	3 (21,43)	14 (28)
31-40	10 (71,42)	4 (28,58)	14 (28)
41-50	7 (53,85)	4 (46,15)	11 (22)
51-60	4 (66,67)	2 (33,33)	6 (12)
61-	1 (100)	0 (0)	1 (2)
Total	35 (70)	15 (30)	50

## 5.2 Frequência de detecção dos marcadores sorológicos e moleculares do HBV obtidos pelos métodos comerciais

Após realização dos testes sorológicos, foi possível verificar a frequência de detecção dos diferentes marcadores da Hepatite B na população em estudo (Tabela 5.3)

**Tabela 5.3.** Frequência de marcadores sorológicos de hepatite B em amostras de soro do painel de estudo.

Marcadores Sorológicos	N	%
HBsAg isolado	1	0,86
HBsAg reagente/Anti-HBc reagente	65	56,03
Anti-HBs reagente	0	0
Nenhum marcador	50	43,10

As amostras que apresentaram volume suficiente também foram testadas pelos marcadores anti-HBc IgM, anti-HBe e HBeAg. Entre as 66 amostras HBsAg reagentes, 59 foram testadas para detecção do marcador anti-HBc IgM, onde 11 foram reagentes. Quanto ao HBeAg, 51 amostras HBsAg reagentes foram avaliadas, e destas, 12 apresentaram este marcador. Já para o anti-HBe, foram avaliadas 58 amostras HBsAg reagentes, onde 49 foram reagentes. Cinco amostras foram HBeAg e anti-HBe reagentes (Tabela 5.4).

**Tabela 5.4.** Frequência dos marcadores sorológicos anti-HBc IgM, HBeAg e anti-HBe em amostras de soro do painel de estudo.

Marcadores sorológicos	HBsAg reagentes	
	N	%
Anti-HBc IgM	11/59	18,6
HBeAg	12/51	23,5
Anti-HBe	49/58	84,4

As 66 amostras de soro HBsAg reagentes tiveram seu DNA quantificado pelo método comercial Cobas TaqMan HBV Test 2.0 (Roche Diagnostics, EUA), onde apenas 2 não apresentaram o HBV DNA. Os valores de carga viral entre as amostras quantificadas variaram de <35 a >640.200.000 cópias de HBV DNA/mL, apresentando carga viral média de 50.480.073±171.684.876 cópias de HBV DNA/mL.



### 5.3 Análise da sequência para desenho dos oligonucleotídeos

Após realização da busca de seqüências do HBV encontradas no mundo e no Brasil depositadas no *GenBank*, estas foram alinhadas através dos *softwares* CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) e MEGA v5.03 para definir o segmento ideal do Gene pré-S2 para desenho de nossos oligonucleotídeos e sonda.

A seqüência consenso utilizada para desenho dos oligonucleotídeos e sonda utilizados na técnica de PCR quantitativa “in house” apresentaram mais de 95% de homologia (Kimura, 1980; Tamura et al., 2007) com seqüências do HBV dos genótipos A, D e F encontradas no Brasil e em diferentes países, como Índia, Itália, Colômbia e Argentina (Figura 5.1).

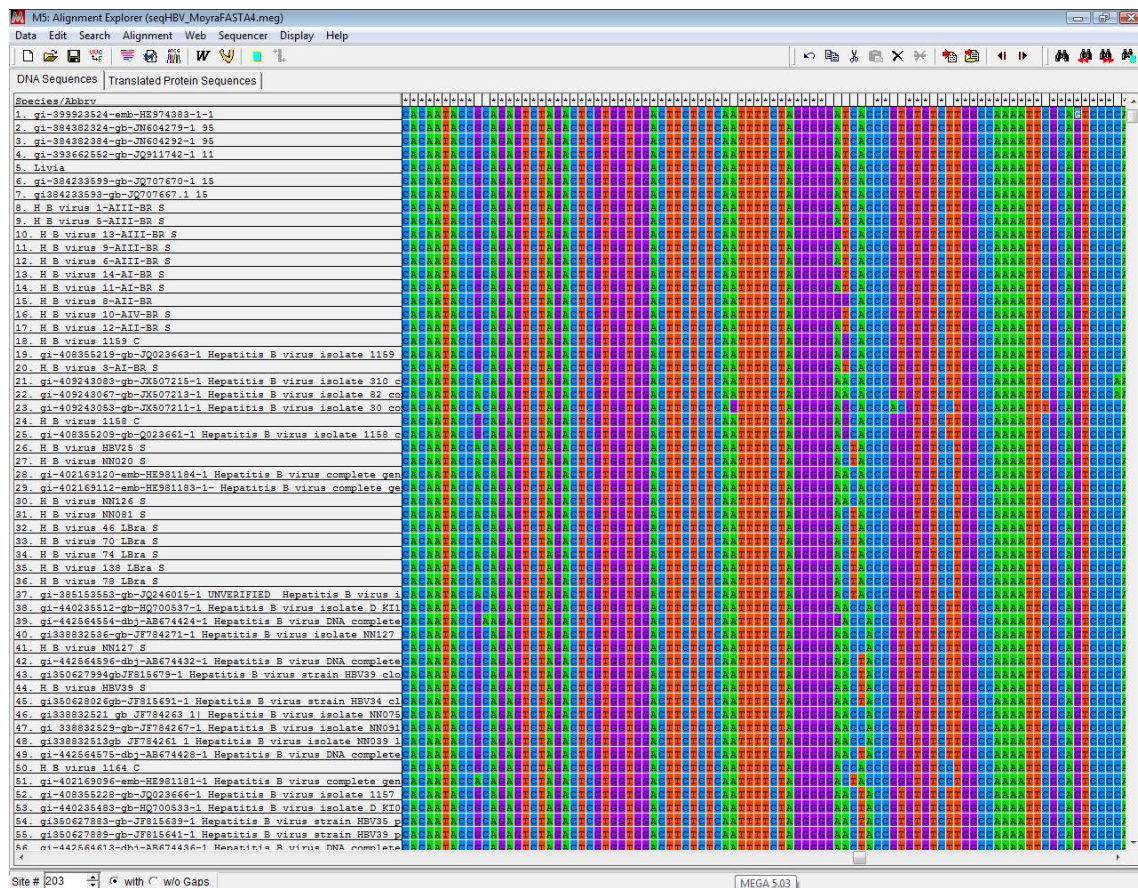
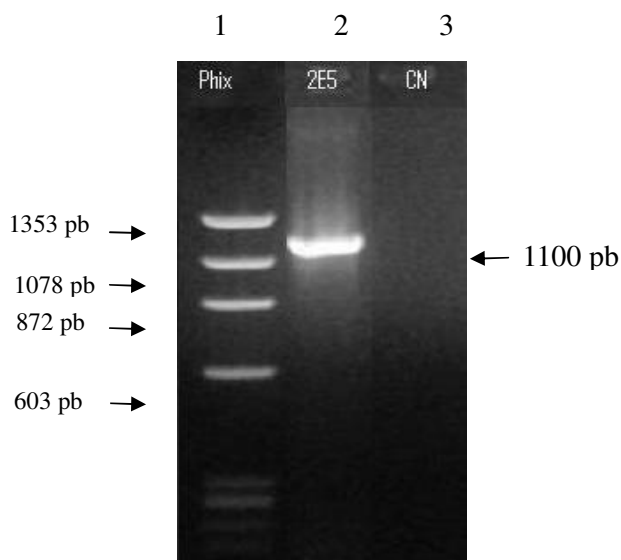


Figura 5.1. Alinhamento das seqüências do HBV encontradas no GenBank

#### 5.4 Amplificação, clonagem e obtenção de plasmídeos recombinantes para quantificação de vírus da hepatite B.

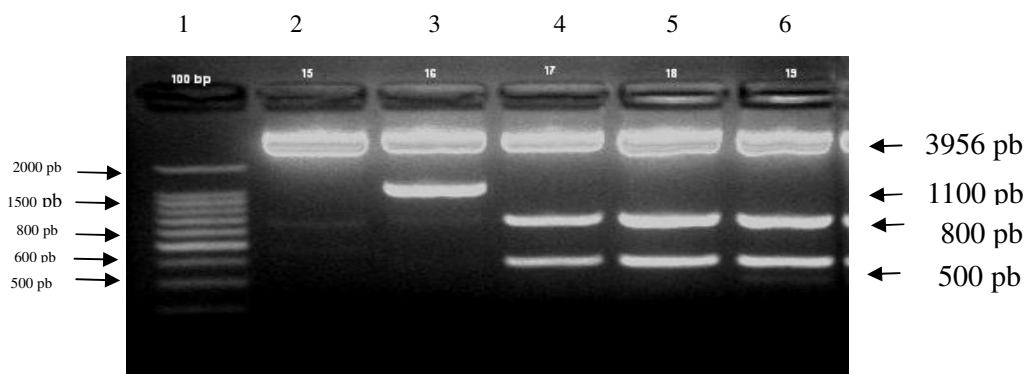
A construção da curva padrão interna do PCR em Tempo Real foi realizada utilizando-se uma amostra do painel comercial de quantificação do HBV (OptiQuant Acrometrix) que contém  $5,6 \times 10^5$  cópias de HBV/mL. A figura 5.2 mostra o resultado da semi-nested PCR para a amostra protótipo de HBV, utilizando iniciadores específicos para a região do gene pré S/S do HBV. Observa-se uma banda com tamanho molecular de aproximadamente 1100pb a qual foi visualizada no gel de agarose conforme o esperado.



**Figura 5.2.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0% do produto de PCR da amostra de soro contendo  $5,6 \times 10^5$  cópias de HBV DNA/mL. Coluna 1: Marcador de peso molecular  $\phi$ X 174. Coluna 2: Amostra do painel de quantificação contendo  $5,6 \times 10^5$  cópias HBV DNA/mL. Coluna 3: Controle Negativo.

Após a ligação de cada fragmento amplificado ao vetor plasmidial pCR<sup>TM</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>), seguida de transformação de células Top 10 e plaqueamento bacteriano, as colônias foram selecionadas para crescimento pela inabilidade de degradar a lactose do meio, possivelmente, contendo o inserto de interesse. A purificação dos DNAs plasmidiais das colônias selecionadas, contendo o inserto de HBV foram realizados com o kit comercial Miniprep Purification System<sup>®</sup> (Promega Corporation, Madison, Winsconsin, EUA). A presença do inserto foi confirmada pela

reação de digestão do DNA plasmidial com a endonuclease de restrição *Eco* RI. Após a digestão, os insertos de HBV foram visualizados em gel de agarose, sendo observadas as bandas cujos fragmentos são de aproximadamente 800 pb e 500pb respectivamente (Figura 5.3).



**Figura 5.3.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% apresentando o inserto do vírus da hepatite B após a reação do DNA plasmidial com a enzima de restrição *Eco* RI. Linha 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Linhas 2: DNA plasmidial sem a presença do inserto do HBV. Linha 3: DNA plasmidial contendo o inserto do HBV não digerido. Linhas 4-6: DNA plasmidial contendo o inserto de HBV após digestão.

Uma colônia bacteriana que apresentou plasmídeo recombinante com o inserto de HBV foi semeada em 400 mL de meio LB, para obtenção de maior massa plasmidial. Após a purificação com o kit *Maxiprep Purification System*® (Promega Corporation, Madison, Winsconsin, EUA), e digestão com a endonuclease de restrição *Eco* RI, o inserto foi visualizado em gel de agarose com uma banda de DNA na altura de 1100pb quando não digerido, e com bandas nas alturas de 500 e 800 pb quando ocorreu digestão pela *Eco* R1.

O inserto de HBV foi clonado e amplificado por *PCR*, foram seqüenciados e por alinhamento utilizando o programa Blast, apresentaram 98% de similaridade com HBV.

### 5.5. Avaliação da curva padrão do HBV na *PCR* quantitativa

Após obtenção dos plasmídeos recombinantes contendo o inserto do HBV, foi feita a quantificação dos plasmídeos recombinantes pela leitura de 7  $\mu$ L do

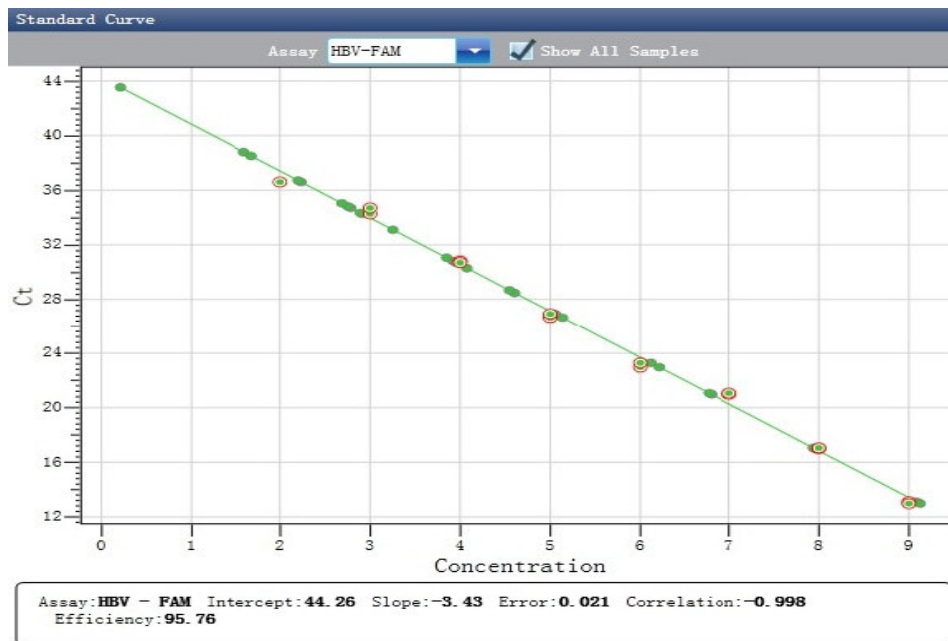
produto em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260nm de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A quantificação medida é fornecida em ng/μL, sendo transformada em número de cópias/μL (nº cópias/μL) de acordo com a fórmula:

$$\text{Número de cópias/}\mu\text{L} = \frac{\text{Concentração (g/}\mu\text{L)} \times 6,022 \times 10^{23}}{(\text{Número de pares de base do plasmídeo recombinante}) \times 660}$$

A quantificação do plasmídeo recombinante foi de aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  cópias/μL, o qual foi diluído para obtenção da curva padrão.

O qPCR apresentou limite de detecção de 10 cópias de genoma viral por microlitro utilizando a curva padrão obtida. A curva padrão obtida apresentou eficiência de 95,76%, coeficiente de regressão linear (R2) de 0,998 e “slope” de -3,22. Para cada reação foi utilizada uma nova curva com os padrões variando de  $1 \times 10^9$  a 10 cópias/μL, aliquotados e estocados a temperatura de -70°C para aferição de cada teste realizado (Figura 5.4).

**Figura 5.4** Gráfico ilustrativo da curva padrão utilizada na reação de PCR quantitativa obtida de diluições seriadas do plasmídeo recombinante com o inserto do vírus da Hepatite B.



Eixo X: Log da concentração do plasmídeo ( $10^9$  a  $1 \times 10^0$  cópias/μL) Eixo Y: Ct (ciclo inicial de detecção da amostra)

Foram realizadas ao todo cinco corridas para avaliação da curva padrão externa, utilizando oito diluições em cada curva ( $10^2$  a  $10^9$  cópias/ $\mu\text{L}$ ), num total de 40 reações. Podemos observar boa reprodutibilidade através do coeficiente de variação (CV), visto que os valores de CV foram abaixo de 15% para cada ponto da curva. Além disto, o teste apresentou excelente especificidade, pois não houve sinal em nenhum dos controles negativos adicionados em cada corrida (Quadro 5.1).

**Quadro 5.1.** Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão

Curva padrão (cópias/ $\mu\text{L}$ )	Ct (curva 1)	Ct (curva 2)	Ct (curva 3)	Ct (curva 4)	Ct (curva 5)	Media	DP	CV (%)
$10^9$	8,87	8,86	10,67	8,7	10,71	9,56	1,03	10,79
$10^8$	13,88	13,85	14,06	11,87	14,56	13,64	1,03	7,56
$10^7$	17,44	17,54	16,93	14,65	16,92	16,69	1,17	7,05
$10^6$	20,40	20,67	20,46	17,74	20,41	19,93	1,23	6,18
$10^5$	23,83	24,44	23,97	20,74	22,36	23,06	1,51	6,57
$10^4$	27,69	28,06	26,76	23,27	26,79	26,51	1,89	7,16
$10^3$	30,70	31,08	31,02	28,10	32	30,58	1,46	4,80
$10^2$	34,81	35,38	33,14	29,74	33,64	33,34	2,2	6,60

Ct= *threshold cycle*, DP=Desvio Padrão e CV= Coeficiente de Variação

### 5.6. Otimização das condições de Reação da PCR quantitativa

Inicialmente, amostras do painel de quantificação do HBV (OptiQuant, Acrometrix) contendo  $5,6 \times 10^2$  a  $5,6 \times 10^7$  cópias de HBV DNA/mL foram avaliadas, onde um volume de DNA de 5  $\mu\text{L}$  foi utilizado em cada reação sob as seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Todas as amostras foram quantificadas com exceção da amostra contendo  $5,6 \times 10^2$  cópias de HBV DNA/mL e os valores de ct das amostras quantificadas variaram de 22,08 a 35,74.

Em seguida, a concentração da amostra em cada reação foi avaliada, onde o volume de DNA extraído para cada amostra foi aumentado para 7,5 µL, entretanto não houve aumento do limite de detecção ou sensibilidade da técnica (Tabela 5.5).

**Tabela 5.5.** Carga viral do HBV (cópias/mL) e cycle threshold (ct) do painel de quantificação do HBV (OptiQuant Acrometrix), obtida pela PCR quantitativa “in house” utilizando duas concentrações de HBV DNA (volumes 5 µL e 7,5µL).

<b>Amostra</b>	<b>Real time (cópias/mL)</b>	<b>Ct</b>	<b>Real time (cópias/mL) 7,5 µL</b>	<b>Ct</b>
<b>5,6 x 10<sup>2</sup></b>	ND	-	ND	-
<b>5,6 x 10<sup>3</sup></b>	690	35,74	ND	-
<b>5,6 x 10<sup>4</sup></b>	14670	31,21	536	33,31
<b>5,6 x 10<sup>5</sup></b>	146800	28,05	ND	-
<b>5,6 x 10<sup>6</sup></b>	1612000	24,84	ND	-
<b>5,6 x 10<sup>7</sup></b>	8960000	22,08	ND	-
<b>CN</b>	ND	-	ND	-

CN: Controle Negativo

ND: Não detectado

Logo após, 7 amostras de soro HBV DNA reagentes previamente quantificadas pelo método comercial (Cobas TaqMan HBV Test, (Roche Diagnostics), com cargas virais variando entre 477 a 34.163 cópias HBV DNA/mL, foram testadas onde 5µL de DNA foi utilizado e as condições restantes do protocolo foram seguidas. Neste teste, 3 amostras amplificaram apresentando carga viral entre 1,64 a 298 cópias HBV DNA/mL com média de  $44,09 \pm 112,01$  cópias HBV DNA/mL e Cts variando de 29,41 a 36,79 (Tabela 5.6).

Em seguida, a temperatura de hibridização da reação foi avaliada (60°C e 62°C), onde foi possível obter 6 amostras reagentes entre as 7 amostras testadas, cuja carga viral média foi igual a  $1484,45 \pm 3818,7$  variando de 15,66 a 10.114 cópias HBV DNA/mL (Tabela 5.3). O aumento da temperatura de hibridização foi estatisticamente significativa ( $r=-0,500$ ;  $p=0,03$ ), logo a temperatura de 62°C foi selecionada para a análise seguinte.

**Tabela 5.6.** Carga viral (cópias/mL) de amostras HBV DNA reagentes obtidas pelo método comercial (Cobas TaqMan HBV) e o método desenvolvido neste estudo (PCR quantitativo) onde dois valores de temperatura de hibridização (TH) foram avaliados (60°C e 62°C).

Amostra	Cobas TaqMan (cópias/mL)	Real Time (cópias/mL) TH 60°C	Ct	Real Time (cópias/mL) TH 62°C	Ct
1	2.433	1,64	36,79	34,93	33,58
2	4.313	ND	-	29,87	33,98
3	34.163	9	34,37	134,93	31,77
4	9.661	ND	-	ND	-
5	477	ND	-	15,66	34,61
6	1.007	ND	-	31,80	33,7
7	8.905	298	29,41	10.144	26,02

ND: Não detectado

Utilizando como temperatura de hibridização 62°C, realizamos o aumento da concentração de DNA na reação (utilizando 7,5 µL de DNA), porém não observamos aumento na sensibilidade da técnica e nem diferença estatística entre as duas variações ( $p=0,81$ ), sendo a carga viral média igual a  $1.261,57 \pm 3.154,2$ , variando de 23 a 8.413 cópias de HBV DNA/mL (Tabela 5.7).

**Tabela 5.7.** Carga viral (cópias/mL) de amostras HBV DNA reagentes obtidas pelo método comercial (Cobas TaqMan HBV) e o método desenvolvido neste estudo (PCR quantitativo) onde aumentamos a temperatura de hibridização (de 60°C para 62°C) com duas diferentes concentrações de DNA (volume de 5 µL para 7,5 µL de DNA).

Amostra	Cobas TaqMan (cópias/mL)	Real Time (cópias/mL) TA 62°C/ vol. 5 µL	Ct	Real Time (cópias/mL) TA 62°C/ vol. 7,5 µL	Ct
1	2.433	34,93	33,58	111	35,07
2	4.313	29,87	33,98	23	37,36
3	34.163	134,93	31,77	193	34,27
4	9.661	ND	-	55	36,23
5	477	15,66	34,61	ND	-
6	1.007	31,80	33,70	36	36,68
7	8.905	10.144	26,02	8.413	28,87

ND: não detectado

Deste modo estabelecemos que a reação da PCR quantitativa teria 5 µL de DNA da amostra, com temperatura de hibridização de 62°C e uma etapa inicial de 50°C.

## 5.7. Avaliação da técnica de PCR em Tempo Real em amostras de soro

Utilizando o protocolo otimizado, as 116 amostras de soro foram avaliadas. Entre as 50 amostras HBsAg não reagentes, 2 tiveram o HBV DNA detectado com média da carga viral de  $15.390 \pm 2190$  cópias de HBV DNA/mL no método “in house”. Entre as 66 amostras de soro obtidas de indivíduos HBsAg reagentes, o HBV DNA foi detectado em 64 amostras pelo método comercial (COBAS® TaqMan® HBV Test) e 28 pelo teste quantitativo “in house”. As amostras HBsAg reagentes tiveram média de carga viral de  $50.480.073 \pm 171.684.876$  cópias de HBV DNA por mL no teste COBAS® TaqMan® HBV Test e de  $57.311.889 \pm 294.972.832$  cópias de HBV DNA/mL no teste quantitativo “in house”. No quadro 5.2 estão apresentados os valores de carga viral do HBV (cópias/mL e log) obtidos em todas as amostras de soro avaliadas pelo método comercial e pelo método desenvolvido neste estudo.

**Quadro 5.2.** Carga viral do HBV em cópias/mL e log cópias/mL das 66 amostras de soro HBsAg reagentes avaliadas pelo método comercial (Cobas Taqman HBV) e pelo método desenvolvido neste estudo (PCR quantitativa).

	Cobas TaqMan (cópias/mL)	Cobas taqMan (log cópias/mL)	qPCR “in house” (cópias/mL)	qPCR “in house” (log cópias/mL)		Cobas TaqMan (cópias/mL)	Cobas TaqMan (log cópias/mL)	qPCR “in house” (cópias/mL)	qPCR “in house” (log cópias/mL)
1	8.090	3,908	2.030	3,307	34	3.314	3,520	432	2,635
2	35	1,544	ND	ND	35	3.024	3,481	ND	ND
3	35	1,544	ND	ND	36	640.200.000	8,806	1.590.000.000	9,201
4	205.446	5,313	8.090	3,908	37	1.546	3,189	ND	ND
5	74	1,869	ND	ND	38	135.182	5,131	286.000	5,456
6	84	1,924	ND	ND	39	49.181	4,692	41.000	4,613
7	5.168	3,713	398	2,600	40	282	2,450	ND	ND
8	37	1,568	ND	ND	41	640.200.000	8.806	100.600	5,003
9	9.777	3,99	2.186	3,340	42	15.727	4,197	ND	ND
10	3.015	3,479	352	2,547	43	3.413	3,533	ND	ND

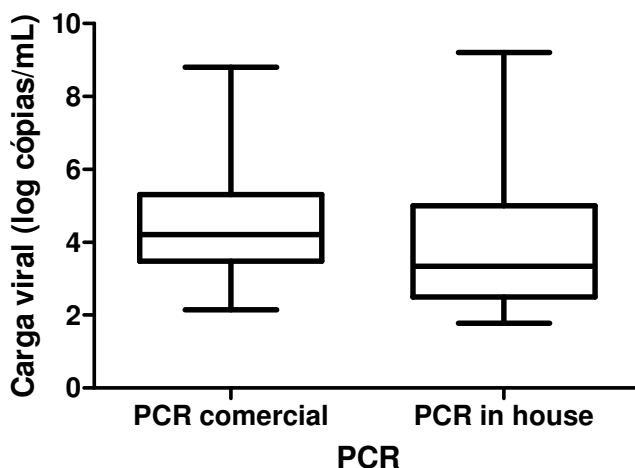


11	10.825	4,034	133	2,124	44	17.868	4,252	ND	ND
12	139	2,143	77,4	1,889	45	1.215	3,085	ND	ND
13	9.487	3,977	ND	ND	46	26.510	4,423	ND	ND
14	1.944	3,289	ND	ND	47	640.20 0.000	8,806	ND	ND
15	2.549	3,406	314	2,497	48	3.392	3,530	20.060	4,302
16	497	2,696	143,6	2,157	49	96.784	4,986	25.200	4,401
17	99	1,996	ND	ND	50	4.797	3,681	ND	ND
18	640.200.0 00	8,806	10.540.0 00	7,023	51	90.024	4,954	15.700	4,196
19	155.976	5,193	528	2,723	52	49.581	4,695	6.060	3,782
20	180	2,255	ND	ND	53	2.059.6 40	6,314	300.000	5,477
21	56.105	4,749	ND	ND	54	5.265	3,721	ND	ND
22	280	2,447	99,6	1,998	55	11.253	4,051	ND	ND
23	9.137	3,961	ND	ND	56	13.844	4,141	ND	ND
24	205	2,312	ND	ND	57	246	2,391	ND	ND
25	6.576.600	6,818	3.190.00 0	6,504	58	97	1,987	ND	ND
26	8.439.000	6,926	192.400	5,284	59	35	1,544	ND	ND
27	2.974	3,473	916	2,962	60	995	2,998	ND	ND
28	1.368	3,136	64,4	1,809	61	571	2,757	ND	ND
29	11.523.60 0	7,062	ND	ND	62	72	1,857	ND	ND
30	640.200.0 00	8,806	ND	ND	63	205	2,312	ND	ND
31	89.628	4,952	ND	ND	64	1.718	3,235	ND	ND
32	385	2,585	ND	ND	65	16.163	4,209	59,8	1,777
33	ND	ND	ND	ND	66	ND	ND	63	1,799

ND: não detectado

Foi possível observar a correlação entre os valores carga viral em log de cópias/mL obtidos entre as 28 amostras HBsAg reagentes pelos dois testes quantitativos. O teste comercial apresentou média de  $3,993 \pm 1,922$  log cópias/mL e mediana de 3,607 log cópias/mL. Já o teste “in house” apresentou média de  $3,761 \pm 1,829$  log cópias/mL e mediana de 3,324 ( $r=0,7643$ ;  $p<0,0001$ ) (Figura 5.5).

**Figura 5.5.** Correlação entre valores de log cópias/mL obtidos a partir de amostras de soro HBsAg reagentes no teste Cobas TaqMan e PCR Quantitativo “in house”.



O teste quantitativo “in house” em amostras de soro apresentou 37,87% de concordância quando comparado ao teste comercial.

### 5.8. Avaliação da técnica de PCR em Tempo Real em amostras de fluido oral

Para definir os parâmetros a serem utilizados no teste quantitativo em amostras de fluido oral, inicialmente realizamos uma diluição seriada em 1:10 da amostra do painel de quantificação do HBV (OptiQuant, Acrometrix) que contém  $5,5 \times 10^7$  cópias de HBV DNA/mL em amostras de fluido oral doadas por indivíduos HBsAg não reagentes. Desta forma, os tubos de fluido oral testados possuem concentrações estimadas de HBV DNA variando de  $5,6 \times 10^6$  a  $5,6 \times 10^0$  cópias de

## HBV DNA/mL.

Em um primeiro teste, avaliamos a concentração de DNA utilizado na reação (volumes de 5  $\mu$ L e 7,5  $\mu$ L) sob as seguintes condições de reação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 62°C por 60 segundos. Ao utilizarmos 5  $\mu$ L de DNA, não foi possível detectar o HBV DNA em nenhuma amostra do painel. Entretanto, quando aumentamos o volume de DNA para 7,5  $\mu$ L, foi possível detectar o HBV nas amostras contendo a concentração estimada de  $5,6 \times 10^6$  a  $5,6 \times 10^3$  cópias de HBV DNA/mL, apresentando valores de ct de 20,08 a 30,50, respectivamente (Tabela 5.8).

**Tabela 5.8.** Carga viral do HBV (cópias/mL) e cycle threshold (ct) do painel de diluição seriada do padrão comercial OptiQuant Acrometrix HBV obtida pelo PCR quantitativo in house utilizando duas concentrações de HBV DNA (volumes 5  $\mu$ L e 7,5 $\mu$ L).

Amostra	Concentração	Carga viral (cópias/mL) 5 $\mu$ L de DNA	Ct (5 $\mu$ L de DNA)	Carga viral (cópias/mL) 7,5 $\mu$ L de DNA	Ct (7,5 $\mu$ L de DNA)
1	$5,6 \times 10^6$	ND	-	$4,78 \times 10^{10}$	20.08
2	$5,6 \times 10^5$	ND	-	$3.16 \times 10^9$	24.15
3	$5,6 \times 10^4$	ND	-	$3.76 \times 10^8$	27.34
4	$5,6 \times 10^3$	ND	-	$4.54 \times 10^7$	30.50
5	$5,6 \times 10^2$	ND	-	ND	-
6	$5,6 \times 10^1$	ND	-	ND	-
7	$5,6 \times 10^0$	ND	-	ND	-

A fim de avaliar a aplicabilidade deste método em amostras obtidas de indivíduos com ou sem hepatite B, testamos 8 amostras de fluido oral provenientes de 6 indivíduos com HBsAg e HBV DNA detectado e 2 indivíduos sem estes marcadores no soro, entretanto nenhuma amostra teve o HBV DNA detectado. Logo, utilizamos a mesma concentração de DNA (7,5  $\mu$ L) com aumento do número de ciclos da reação (40 para 45), onde foi possível detectar o HBV DNA em uma amostra cujo soro apresentava  $>64.020.000$  cópias de HBV DNA/mL. Este fluido oral apresentou carga viral de 26.880 cópias de HBV DNA/mL e ct de 31,34 (Tabela 5.9).

**Tabela 5.9.** Carga viral do HBV (cópias/mL) e cycle threshold (ct) de 8 amostras de fluido oral obtidos pelo PCR quantitativo in house utilizando 7,5 µL de DNA e sob duas condições diferentes de reação (40 e 45 ciclos de amplificação).

Amostra	HBV DNA obtida pelo método comercial no soro	HBV DNA obtido pela PCR Quantitativa “in house” em fluido oral			
	Carga viral (cópias/mL)	Carga viral (cópias/mL) e 40 ciclos	Ct	Carga viral (cópias/mL) e 45 ciclos	Ct
1	8.090	ND	-	ND	-
2	>64.020.000	ND	-	26.880	31,34
3	>64.020.000	ND	-	ND	-
4	96.784	ND	-	ND	-
5	11.253	ND	-	ND	-
6	13.844	ND	-	ND	-
7	ND	ND	-	ND	-
8	ND	ND	-	ND	-

ND: não detectado

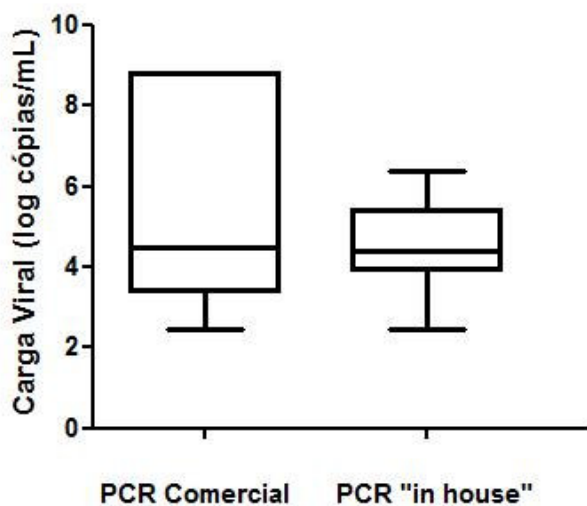
A partir dos dados obtidos, estabelecemos o uso de 7,5 µL de DNA e 45 ciclos de amplificação para realização da PCR quantitativa in house nas amostras de fluido oral obtidas dos 116 indivíduos incluídos neste estudo. Foi possível detectar o HBV DNA em fluido oral em 8 amostras dentre os 66 indivíduos HBsAg reagentes, onde a carga viral média no fluido oral foi igual a  $1051850,5 \pm 2107440$  cópias de HBV DNA/mL. Todas estas amostras também tiveram o HBV DNA amplificado em seus respectivos soros com carga viral média igual a  $160060400 \pm 296348600$  cópias de HBV DNA/mL pela PCR comercial. Não foi possível observar correlação entre os métodos ( $r=-0,2994$ ;  $p= 0,9453$ ) (Tabela 5.10).

Também obtivemos uma amostra de fluido oral contendo HBV DNA entre os indivíduos sem HBsAg no soro. Esta amostra apresentou carga viral de 77,08 cópias de HBV DNA/mL e ct igual a 36,84.

**Tabela 5.10.** Comparação entre os resultados da carga viral de HBV DNA em cópias/mL e log cópias/mL de amostras de soro quantificadas pela técnica comercial e de amostras de fluido oral obtidas pela PCR quantitativa “in house”.

Amostra	Cobas TaqMan		qPCR “in house” em fluido oral	
	cópias/mL	log cópias/mL	cópias/mL	log cópias/mL
1	640200000	8,806	26880	4,429
2	56105	4,749	28176	4,450
3	9137	3,961	2528000	6,403
4	640200000	8,806	7536	3,877
5	1546	3,189	22880	4,359
6	282	2,450	9059	3,957
7	640200000	8,806	273	2,436
8	15727	4,197	5792000	5,763

**Figura 5.6.** Correlação entre valores de log cópias/mL obtidos a partir de amostras de soro HBsAg reagentes no teste Cobas TaqMan e PCR Quantitativo “in house” com amostras de fluido oral.



O teste quantitativo “in house” em amostras de fluido oral apresentou concordância de 50% em comparação ao teste comercial com amostras de soro e 72,8% em relação ao teste quantitativo in house no soro.

Ao comparar os resultados do PCR em Tempo Real “in house” de fluido oral com a técnica “in house” padronizada em amostras de soro, foi possível observar que cinco amostras de fluido oral quantificadas pela técnica in house não tiveram resultado detectável em suas respectivas amostras de soro (Tabela 5.11). Foi possível observar correlação positiva entre os métodos ( $r=0,5000$ ;  $p=0,2500$ ). As amostras de fluido oral apresentaram carga viral média de HBV DNA igual a  $1051850,5 \pm 2107440$  cópias de HBV DNA/mL e suas respectivas amostras de soro apresentaram carga viral média de HBV DNA igual a  $530384900 \pm 917653700$  cópias de HBV DNA/mL.

**Tabela 5.11.** Comparação entre os valores de carga viral do HBV (cópias/mL e log cópias/mL) obtidas pelo método de PCR quantitativo “in house” em amostras pareadas de soro e fluido oral.

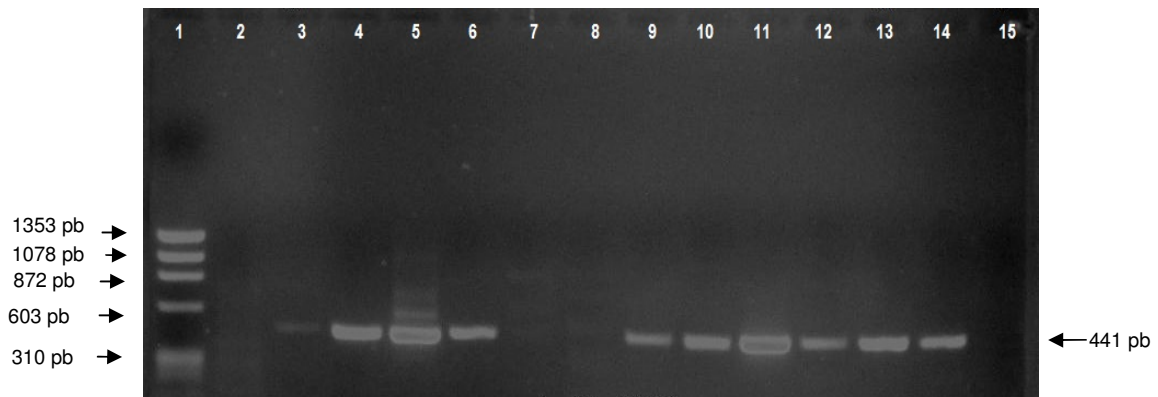
Amostra	qPCR “in house” em soro		qPCR “in house” em fluido oral	
	cópias/mL	log cópias/mL	cópias/mL	log cópias/mL
1	1054000	7,023	26880	4,429
2	ND	ND	28176	4,450
3	ND	ND	2528000	6,403
4	1590000000	9,201	7536	3,877
5	ND	ND	22880	4,359
6	ND	ND	9059	3,957
7	100600	5,003	273	2,436
8	ND	ND	5792000	5,763

*ND: Não detectado*

### 5.9. Avaliação da PCR qualitativa para hepatite B em amostras de soro e fluido oral

Para avaliar o desempenho do PCR qualitativo em amostras pareadas de soro e fluido oral, testamos as amostras dos 116 indivíduos participantes do estudo. Não foi possível detectar o HBV DNA em nenhuma das amostras provenientes dos 50 indivíduos HBsAg não reagentes. Entre as 66 amostras HBsAg reagentes, foi possível detectar o HBV DNA em 50 delas (Figura 5.7). Estas mesmas amostras tiveram o HBV DNA detectável pela PCR quantitativa comercial em suas amostras

pareadas de soro apresentando carga viral média de HBV igual a  $64.614.450 \pm 193.821.900$  cópias de HBV DNA/mL e de  $57.311.889 \pm 294972832,6$  cópias de HBV DNA/mL pelo PCR quantitativo “in house”. Foi possível detectar o HBV DNA pelo método qualitativo em amostras de soro que apresentavam até 72 cópias de HBV DNA/mL pelo teste comercial.



**Figura 5.7.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0% dos produtos do PCR qualitativo em amostras de soro de indivíduos HBsAg reagentes e não reagentes. Linha 1: Peso molecular  $\phi X$ . Linhas 2 a 6 e 9 a 13: amostras de soro de indivíduos HBsAg reagentes. Linhas 7 e 8: amostras de soro de indivíduos HBsAg não reagentes. Linha 14: Amostra de soro correspondente ao controle de qualidade interno (CQI) HBsAg reagente. Linha 15: Amostra de soro CQI HBsAg não reagente.

Ao compararmos a detecção do HBV DNA pela PCR qualitativa e pela PCR comercial quantitativa em amostras de soro, observamos 50 resultados verdadeiro-positivos e 14 falso negativos pela técnica “in house” conferindo concordância de 75% entre os resultados ( $p=1,000$ ) (Quadro 5.3).

**Quadro 5.3.** Comparação dos resultados obtidos para detecção do HBV DNA em amostras de soro utilizando a PCR qualitativa “in house” e o PCR quantitativo em comercial (Cobas TaqMan HBV).

		PCR quantitativa comercial		Total
		+	-	
PCR Qualitativo em soro	+	50	0	50
	-	14	2	16
Total		64	2	66

Ao compararmos a detecção do HBV DNA pela PCR qualitativa e quantitativa “in house”, verificamos que 50 amostras foram detectadas pela primeira e 28 amostras pela segunda técnica. As amostras de soro que tiveram o HBV DNA detectado pelo teste qualitativo apresentaram carga viral média de HBV igual a  $64.189.304 \pm 317.884.600$  cópias de HBV DNA/mL pelo teste quantitativo “in house”.

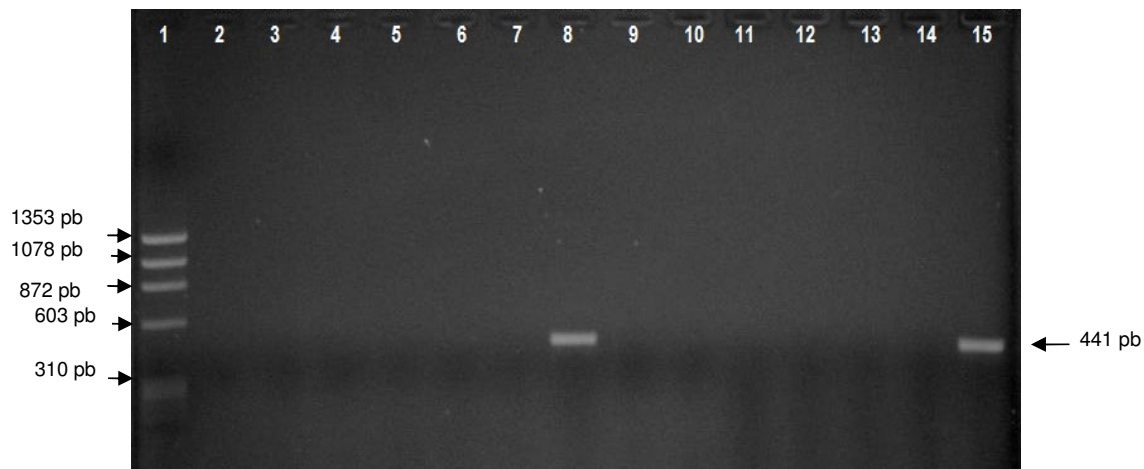
Ao compararmos as duas técnicas para detecção do HBV DNA em amostras de soro, foi possível observar que 25 amostras foram positivas por ambos os métodos, 5 apenas pelo método quantitativo “in house” e 25 apenas pelo método qualitativo. Entre as amostras, 61 foram indetectáveis por ambos os métodos. A relação entre os métodos foi considerada extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) com concordância de 74,13% entre os dois métodos (Quadro 5.4).

**Quadro 5.4.** Comparação dos resultados obtidos para detecção do HBV DNA em amostras de soro utilizando a PCR qualitativa “in house” e o PCR quantitativo “in house”.

		PCR Quantitativo “in house” em soro		Total
		+	-	
PCR Qualitativo em soro	+	25	25	<b>50</b>
	-	5	61	<b>66</b>
<b>Total</b>		<b>30</b>	<b>86</b>	<b>116</b>

A PCR qualitativa para detecção do HBV DNA também foi empregada em amostras de fluido oral provenientes dos 116 indivíduos do painel de estudo, onde somente 1 amostra foi detectada (Figura 5.8). Esta amostra apresentava HBsAg no seu respectivo soro e carga viral de HBV DNA igual a  $6 \times 10^7$  cópias de HBV DNA/mL pelo teste comercial.





**Figura 5.8.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0% dos produtos da PCR qualitativa em amostras de soro de indivíduos HBsAg reagentes e não reagentes. Linha 1: Peso molecular  $\phi$ X. Linhas 2 a 4 e 8 a 10: amostras de fluido oral de indivíduos HBsAg reagentes. Linhas 5 a 7, 12 e 13: amostras de fluido oral de indivíduos HBsAg não reagentes. Linha 14: Amostra de soro CQI HBsAg não reagente. Linha 15: Amostra de soro correspondente ao controle de qualidade interno (CQI) HBsAg reagente.

## 6.0 Discussão

O diagnóstico da infecção pelo HBV é feito através da detecção de antígenos, anticorpos e do genoma viral em amostras de soro. Os testes moleculares qualitativos detectam o DNA do HBV, sendo importantes após o tratamento antiviral, na identificação de casos de Hepatite B oculta e de resistência viral ao medicamento (Valsamakis, 2007). Os testes moleculares quantitativos determinam a carga viral do HBV presente em cada amostra, sendo essencial para definição e monitoramento do tratamento antiviral (Ministério da Saúde, 2011). O presente estudo teve como objetivo principal desenvolver métodos moleculares para detecção e quantificação do HBV DNA em soro e fluido oral a fim de reduzir os custos para o diagnóstico e monitoramento do tratamento e do curso da infecção pelo HBV.

Para o desenvolvimento do teste quantitativo para o HBV em amostras de soro e fluido oral, foi necessária a construção de uma curva padrão. Esta curva padrão foi produzida a partir da diluição de um plasmídeo recombinante gerado a partir de uma amostra do painel de quantificação do HBV (OptiQuant Acrometrix, Life Technologies, EUA). Esta amostra foi escolhida para a construção da curva plasmidial, pois é um padrão comercial comumente utilizado em testes “in house” desenvolvidos para quantificação do HBV (Shyamala et al., 2004; Takkenberg et al., 2009; Paraskevis et al., 2010) e recomendada pela OMS. Neste estudo, empregamos uma curva plasmidial devido à facilidade na obtenção de grande quantidade de DNA, maior reprodutibilidade e menor custo quando comparada ao uso da curva comercial. Esta curva plasmidial apresentou boa reprodutibilidade possibilitando a detecção do HBV DNA na faixa de detecção de 100 a  $1 \times 10^9$  cópias/ $\mu$ L assim como demonstrado por Paraskevis et al. (2002).

No desenvolvimento do teste molecular quantitativo para o HBV DNA em amostras de soro foi preciso otimizar as condições da reação, com aumento da temperatura de hibridização sem necessidade de aumento da concentração de DNA. A temperatura de hibridização influencia na ligação da sonda e oligonucleotídeos à fita de DNA e pode alterar o funcionamento da enzima polimerase, sendo a qualidade e especificidade da ligação favorecida com o aumento da temperatura (Hecker & Roux, 1996). Nesta técnica não foi necessário o aumento da concentração de DNA, ao contrário do que foi descrito por Paraskevis et al (2010)

para detecção do HBV DNA em casos de hepatite B oculta utilizando a metodologia de “molecular beadings”.

A PCR quantitativa para o HBV em amostras de soro apresentou concordância de 37,87% com os resultados obtidos pela técnica comercial. Além disto, foi observada boa correlação entre as cargas virais detectadas pelos dois métodos (teste comercial apresentou média de carga viral de  $3,993 \pm 1,922$  log cópias/mL e o teste “in house” apresentou média de  $3,761 \pm 1,829$  log cópias/mL), demonstrando a utilidade da técnica desenvolvida neste estudo em amostras de soro. Outro estudo demonstrou valores de concordância de 59% e 93% para a quantificação do HBV utilizando a metodologia TaqMan em amostras de soro em comparação com os testes comercial Cobas Amplicor Monitor (Roche Diagnostics) e bDNA, respectivamente (Paraskevis et al., 2002).

Apesar destes resultados, algumas amostras de soro quantificadas pelo método comercial não foram detectadas na metodologia “in house”, o que pode ter ocorrido devido à fase da infecção em que estas amostras foram coletadas ou a terapia prévia para o HBV, informações que não estiveram disponíveis neste estudo (Brunetto et al., 2009; Chen et al., 2012; Matsumoto et al., 2012). O incremento do volume inicial de amostra poderia aumentar a sensibilidade da técnica, tal como descrito por Paraskevis et al. (2010), entretanto a utilização de grande volume de soro é inviável na rotina laboratorial e por isto não foi avaliada neste estudo.

O método de extração de DNA também pode ter interferido na sensibilidade da técnica de PCR quantitativa desenvolvida neste estudo. A escolha do método de extração de DNA é um ponto crítico para o sucesso da técnica de PCR (Gequelin, 2012), sendo necessária a extração de quantidade suficiente de ácido nucléico combinado com a remoção de substâncias inibitórias à amplificação (McOrist et al., 2002). Para a extração do DNA do HBV no soro, utilizamos o conjunto de reagentes “High Pure Viral Nucleic Acid kit” (Roche Diagnostics, EUA) que apresenta a vantagem de extrair simultaneamente o DNA e RNA. Além disto, este conjunto de reagentes já foi utilizada para detecção do HBV DNA em outros estudos com boa eficiência (Pas et al., 2000; Read, 2001).

Utilizando a PCR quantitativa “in house” foi possível detectar o HBV DNA em duas amostras de soro HBsAg não reagentes e uma amostra de soro HBsAg reagente que não havia sido detectada pelo método comercial. Em relação à

amostra HBsAg reagente, a mesma pode ter sido obtida de um indivíduo ainda na fase de incubação, ou com alguma mutação na região do genoma do HBV que não foi detectada pelo iniciador do método comercial, impedindo a detecção do HBV por este método. Outra possibilidade seria a presença de resultados falso-positivos devido a alguma contaminação do material, porém todas as etapas deste estudo foram executadas em salas separadas e não observamos contaminação dos controles negativos (água DNase free) empregados na reação.

Para o emprego da PCR quantitativa em amostras de fluido oral, foi necessário o aumento da concentração de DNA e do número de ciclos da reação, provavelmente devido à menor quantidade de DNA presente no fluido oral em comparação com soro (Jenison et al., 1987). Para a extração do DNA em fluido oral foi empregado o conjunto de reagentes RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitek, Alemanha), seguindo o protocolo para swabs bucais, onde 400 µL foram utilizados para extração do DNA viral. Este protocolo foi empregado em estudo anterior para detecção DNA do HBV com boa eficiência (Portilho et al., 2012). Além disto, o aumento do volume de fluido oral empregado na técnica de extração é uma boa alternativa para obtenção de resultados mais sensíveis, tal como descrito por Krause et al. (2006) para detecção do vírus sarampo.

Ao avaliar as 116 amostras de fluido oral do painel de quantificação com o teste quantitativo “in house”, oito amostras HBsAg reagentes amplificaram, o que difere do protocolo utilizado por van der Eijk et al (2005), onde 47% das amostras de fluido oral foram detectadas pela PCR em Tempo Real. A baixa detecção de DNA do HBV no fluido oral pode ter ocorrido devido à presença de inibidores neste tipo de amostra (Amado et al., 2008).

Outra hipótese para esta baixa detecção poderia ser o coletor de fluido oral utilizado neste estudo (Salivette®, Sarstedt, Alemanha). O coletor Salivette® já foi empregado para detecção de marcadores de hepatite B e C (Cruz et al., 2011; 2012) utilizando ensaio imunoenzimático comercial com boa eficiência, assim como para a detecção do DNA do HBV em amostras de saliva artificialmente contaminadas (Portilho et al., 2012) com bons resultados. Entretanto, coletores com fricção mecânica, tal como o Oracol ou Orasure, podem ser mais úteis para detecção de marcadores moleculares das hepatites virais A e B como observado em estudos prévios (Amado et al., 2008; Heiberg et al., 2010).

No presente estudo, observamos que a carga viral média em log cópias/mL das amostras de fluido oral detectadas pelo método quantitativo “in house” foi igual a 4,459, e as amostras de soro pareadas apresentaram média de carga viral igual 3,993 log cópias/mL pelo método comercial. Esta diferença pode ter ocorrido devido a uma superestimação da técnica desenvolvida neste estudo, em especial no fluido oral, devido a algum componente presente no mesmo. Ou pode ter ocorrido devido à subestimação da técnica comercial para quantificação do DNA do HBV. Estudos anteriores em amostras pareadas de soro e saliva demonstraram que a carga viral obtida em amostras de fluido oral geralmente é menor do que aquela observada no soro (van der Eijk et al 2005, Kidd-Ljunggren et al 2006, Heiberg et al 2010).

A carga viral mais alta observada no fluido oral em comparação com o soro assim como para a presença de HBV DNA na amostra de fluido oral HBsAg não reagente podem ter ocorrido devido à contaminação do fluido oral com sangue, presença de células mononucleares periféricas (PBMCs) (van der Eijk et al., 2005), ou presença de um possível sítio de replicação do HBV DNA nas glândulas salivares (Chen et al., 2009).

Alguns estudos conseguiram demonstrar que a carga viral do HBV encontrada em soro e fluido oral é maior em indivíduos HBeAg reagentes (Kidd-Ljunggren et al., 2006; Heiberg et al., 2010). No presente estudo, entre as 8 amostras de fluido oral detectadas pelo método quantitativo “in house”, 4 são HBeAg reagentes, e destas, duas apresentaram maior carga viral no fluido oral em comparação com o soro. No presente estudo, não foi possível correlacionar os parâmetros de carga viral apresentada por cada método “in house” e frequência dos marcadores HBeAg e anti-HBe, uma vez que nem todas as amostras tinham volume suficiente para serem testadas por estes marcadores.

Neste estudo também avaliamos a detecção qualitativa do DNA do HBV pela técnica de PCR utilizando iniciadores para o gene core do HBV (Oliosio et al., 2007). Este protocolo apresentou limite de detecção de 70 cópias de HBV DNA/mL em amostras de soro e já foi empregado anteriormente em amostras de fluido oral (Portilho et al., 2012).

Observamos mais de 70% de concordância entre os resultados obtidos pelo método qualitativo em soro e os métodos quantitativos comerciais e “in house”,

porém esta taxa foi inferior a descrita por Oliosio e colaboradores (2007) que utilizaram os mesmos iniciadores em conjunto com a metodologia de PCR em tempo real Sybr green e obtiveram 94% de concordância com um protocolo de nested PCR. Possivelmente esta diferença se deve ao fato das metodologias distintas empregadas.

A PCR qualitativa “in house” apresentou boa concordância com o teste comercial COBAS TaqMan HBV em amostras de soro, visto que foi capaz de detectar o HBV DNA em amostras de soro que apresentaram carga viral de até 72 cópias de HBV DNA/mL no teste comercial. Esta técnica é uma boa alternativa para detecção do HBV DNA devido ao baixo custo comparado aos métodos comerciais, e apresentou boa sensibilidade em uma única reação, diminuindo as etapas de manipulação do DNA e possível contaminação das amostras.

Entretanto, apesar dos bons resultados, observamos diferença na detecção de algumas amostras entre a PCR qualitativa “in house” e a técnica comercial (Cobas Taqman) o que pode ter ocorrido devido às diferentes regiões alvo amplificadas, visto que a PCR comercial utiliza iniciadores para a região do gene de superfície do HBV enquanto a PCR qualitativa “in house” utiliza iniciadores para a região do gene Core do HBV. Kidd-Lunggren et al. (2006) empregaram um protocolo de PCR qualitativo para região do Core com 100% de sensibilidade em amostras de soro em comparação com um teste quantitativo “in house” desenvolvido no mesmo estudo, entretanto somente 25 amostras foram incluídas e todas tinham carga viral maior que log de 3 cópias de HBV DNA/mL.

A PCR qualitativa apresentou baixa detecção do HBV em amostras de fluido oral, pois somente uma amostra de fluido oral foi detectada, a qual possuía carga viral bastante alta em sua respectiva amostra de soro (log de 8,806 cópias de HBV DNA/mL pela técnica comercial). Possíveis causas para este baixo desempenho podem ser atribuídas à baixa concentração de DNA viral nas amostras de fluido oral, ao coletor utilizado ou presença de inibidores da PCR neste tipo de amostra tal como foi descrito em outros estudos (Jenison et al., 1987; Oschert et al., 1998; Amado et al., 2008).

A utilização de técnicas moleculares de alta sensibilidade para detecção e quantificação do HBV é fundamental para identificação de indivíduos infectados, principalmente em casos de infecção oculta, assim como para monitoramento do

tratamento antiviral. Atualmente, somente testes comerciais são recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico qualitativo e quantitativo do HBV, porém estes apresentam custo elevado (Caliendo et al., 2011). Logo, o desenvolvimento de técnicas “in house” como descrito neste estudo pode diminuir os custos do diagnóstico molecular do HBV permitindo a implementação do mesmo em laboratórios pequenos e com recursos financeiros limitados. Além disso, o uso de amostras alternativas, tal como o fluido oral pode ser bastante vantajoso para aumento do acesso ao diagnóstico em diversos grupos, tal como, hemodialisados, crianças, obesos, idosos e usuários de drogas intravenosas.

## 7. Conclusões

- Foi possível desenvolver uma PCR quantitativa para a detecção e quantificação do DNA do HBV utilizando iniciadores para a região do gene pré-S2/S do HBV utilizando a metodologia TaqMan com boa reprodutibilidade, como observado pela análise da curva padrão plasmidial;
- Obtivemos mais de 50% de concordância entre os resultados obtidos pela PCR quantitativa “in house” em amostras de soro em comparação com o teste comercial (COBAS Taqman HBV). Além disso, foi observada correlação positiva entre os resultados obtidos pelas duas metodologias, demonstrando que a PCR quantitativa “in house” desenvolvida neste estudo pode ser utilizada para detecção e quantificação do DNA do HBV.
- Não observamos boa correlação entre os resultados da PCR quantitativa “in house” para o HBV em amostras de fluido oral em comparação com as amostras pareadas de soro avaliadas pelo método quantitativo comercial, assim como pelo método quantitativo “in house”, indicando que amostras de fluido oral não podem ser empregadas para quantificação do HBV utilizando a metodologia desenvolvida.
- A técnica de PCR qualitativa “in house” que utiliza iniciadores para a região do Core do HBV em amostras de soro apresentou concordância de 75% em comparação com os resultados obtidos pela técnica quantitativa comercial, demonstrando boa eficiência para detecção do DNA do HBV neste tipo de amostra.
- A PCR qualitativa “in house” para o Gene C não se mostrou satisfatória para detecção do DNA do HBV em amostras de fluido oral, uma vez que foi capaz de detectar somente uma amostra, a qual possuía carga viral alta pelo teste comercial em soro.



## 8. Perspectivas futuras

- Avaliar a interferência de determinados fatores na detecção quantitativa e qualitativa do HBV DNA em amostras de soro e fluido oral, tal como: fase da infecção em que a amostra é coletada, terapia prévia, fatores de risco para a infecção pelo HBV e genótipo infectante.
- Avaliar a interferência de determinados fatores na detecção do HBV por PCR quantitativa e qualitativa em amostras de fluido oral, tais como: o coletor utilizado, higiene bucal e consumo de alimentos antes da coleta.
- Avaliar a presença de inibidores da reação de PCR em amostras de fluido oral, comparando a detecção do HBV em água ou em amostras de fluido oral artificialmente contaminadas, ou através da inclusão de controle interno como o GAPDH em amostras de fluido oral;
- Desenvolver um controle interno para o HBV que será utilizado desde a etapa de extração até a amplificação do HBV DNA em soro e fluido oral

## 9. Referências

Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ 1971. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* 2: 1225–1227.

Amado LA, Villar LM, de Paula VS, Gaspar AM 2008. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *Journal of Virological Methods* 148: 74-80.

Andrade AF, Oliveira-Silva M, Silva SG, Motta IJ, Bonvicino CR 2006. Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 673-676.

Aspinall EJ, Hawkins G, Fraser A, Hutchinson SJ, Goldberg D 2011. Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. *Occupational Medicine* 61: 531–540.

Bartholomeusz A, Schaefer S 2004. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Reviews in Medical Virology* 14:3-16.

Baumert TF, Thimme R, Weisäcker FV 2007. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology* 13: 82-90.

Bhat M, Ghali P, Deschenes M, Wong P 2012. Hepatitis B and the infected health care worker: public safety at what cost? *Canadian Journal of Gastroenterology* 26: 257-260.

Beck J, Nassal M 2007. Hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology* 13: 48-64.

Blumberg BS, Alter HJ 1965. A “new” antigen in leukemic serum. *The Journal of the*

*American Medical Association*, 191: 541-546.

Blumberg BS 1977. Australia antigen and the biology of Hepatitis B. *Science* 197- 17-25.

Braga WS, Silva EB, Souza RA, Tosta CE 2005. Seroprevalence of hepatitis B and malaria infection in Lábrea, Brazilian western Amazon: estimates of coinfection rates. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 218-223.

Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F, Lau GK, Farci P, Yurdaydin C, Piratvisuth T, Luo K, Wang Y, Hadziyannis S, Wolf E, McCloud P, Batrla R, Marcellin P 2009. Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 49:1141–1150.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective 2005. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 597-601.

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Villari D, Franchis R, Santantonio T, Brancatelli S, Colucci G, Raimondo G 2001. Quantification of intrahepatic hepatitis B virus (HBV) DNA in patients with chronic HBV infection. *Hepatology* 31: 507-512.

Caliendo AM, Valsamakis A, Bremer JW, Ferreira-Gonzalez A, Granger S, Sabatini L, Tsongalis GJ, Wang YF, Yen-Lieberman B, Lurain NS 2011. Multilaboratory evaluation of Real Time PCR Tests for Hepatitis B virus DNA quantification. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 2854-2858.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis B FAQs for the Public, 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hepatitis/B/bFAQ.htm#>.

Chen DS 2010. Toward elimination and eradication of hepatitis B. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25: 19-25.

Chen L, Liu F, Fan X, Gao J, Chen N, Wong T, Wu J, Wen SW 2009. Detection of hepatitis B surface antigen, hepatitis B core antigen, and hepatitis B virus DNA in parotid tissues. *International Journal of Infectious Diseases* 13: 20-23.

Chen YC, Huang SF, Chu CM, Liaw YF 2012. Serial HBV DNA levels in patients with persistently normal transaminase over 10 years following spontaneous HBeAg seroconversion. *Journal of Viral Hepatology* 19: 138-146.

Cruz HM, Silva, EF, Villela-Nogueira CA, Nabuco LC, do Ó KMR, Lewis-Ximenez LL, Yoshida CFT, Lampe E, Villar LM 2011. Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect Hepatitis B surface antigen. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 25: 134-141.

Cruz HM, Marques VA, Villela-Nogueira CA, do Ó KM, Lewis-Ximenez LL, Lampe E, Villar LM 2012. Na evaluation of different saliva collection methods for detection of antibodies against hepatitis C virus (anti-HCV). *Journal of Oral Pathological Medicine* 41: 793-800.

Dandri M, Locarnini S 2012. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *British Medical Journal* 61: 6-17.

Dény P, Zoulim F 2010. Hepatitis B virus: From diagnosis to treatment *Virus. Pathologie Biologie* 58: 245–253.

DST-AIDS. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais 2012. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-b>.

EASL - European Association for the Study of the Liver 2009. Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 57: 167–185.

Elgouhary HM, Tamimi TIA, Carey WD 2008. Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, course, and diagnosis. *Cleveland Clinical Journal of Medicine* 75: 881-889.

Franco E, Bagnato B, Marino MG, Meleleo C, Serino L, Zaratti L 2012. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. *World Journal of Hepatology* 27: 74-80.

Ganem D, Prince AM. 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *New England Journal of Medicine* 350: 1118-1129.

Ganju SA, Goel A 2000. Prevalence of HBV and HCV infection among health care workers (HCWs). *Journal of Community Diseases* 32: 228-230.

Hecker KH, Roux KH 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biological Techniques* 20:478-485.

Heiberg IL, Hoegh M, Ladelund S, Niesters HGM, Høgh B 2010. Hepatitis B virus DNA in saliva from children with chronic hepatitis B infection: implications for saliva as a potential mode of horizontal transmission. *The Pediatrics Infections Disease Journal* 29: 465-467.

Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B virus. In: Knipe DM, Holey PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology* ed. 4. Lippincott-Williams & Wilkins, 2001. cap 87.

Hutse V, Verhaegen E, De Cock L, Quolin S, Vandenberghe H, Horsmans Y, Michiels P, Vlierbeghe DVP, Claeys F, Vranckx R, Van Oyen H 2005. Oral Fluid as

a Medium for the Detection of Hepatitis B Surface Antigen. *Journal of Medical Virology* 77: 53–56.

ICTV – International Committee on taxonomy of viruses 2012. Disponível em: <http://ictvonline.org/>

Jayaraman S, Chalabi Z, Perel P, Guerriero C, Roberts I 2010. The risk of transfusion-transmitted infections in sub-Saharan Africa. *Transfusion* 50: 433-442.

Jenison SA, Lemon SM, Baker LN, Newbold JE. Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in saliva and semen of chronically infected homosexual men. *Journal of Infectious Diseases* 1987; 156:299–307.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS 2002. Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 4068-4071.

Kao JH 2002. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17: 643–650.

Kao JH 2008. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 4: 553-562.

Kao JH 2011. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. *Korean Journal of Internal Medicine* 26: 255-261.

Kidd-Ljunggren K, Myhre E, Blackberg J 2004. Clinical and serological variation between patients infected with different Hepatitis B virus genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 5837-5841.

Kidd-Ljunggren K, Holmberg A, Lindqvist BB 2006. High levels of hepatitis B virus

DNA in body fluids from chronic carriers. *Journal of Hospital Infection* 64: 352-357.

Kimura M 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

Kolawole OM, Wahab AA, Adenkale DA, Sibanda T, Okoh AL 2012. Seroprevalence of hepatitis B surface antigenemia and its effects on hematological parameters in pregnant women in Osogbo, Nigeria. *Journal of Virology* 27: 317.

Kramvis A, Kew M, François G 2005. Hepatitis B virus Genotypes. *Vaccine* 23: 2409-2423.

Krause CH, Eastick K, Ogilvie MM 2006. Real-time PCR for mumps diagnosis on clinical specimens—Comparison with results of conventional methods of virus detection and nested PCR. *Journal of Clinical Virology* 37: 184-189.

Lavanchy D 2004. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis* 11: 97-107.

Liang TJ 2009. Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology* 49: 13-21.

Lin CF, Twu SJ, Chen PH, Cheng JS, Wang JD 2010. Prevalence and determinants of hepatitis B antigenemia in 15,007 inmates in Taiwan. *Journal of Epidemiology* 20: 231-236.

Lin CL, Kao JH 2011. The clinical implications of Hepatitis B virus genotypes: recent advances. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26: 123-130.

Locarnini S 2004. Molecular virology of hepatitis B virus. *Seminars in Liver Diseases* 1: 3-10.

Lu Y, Han J, Qi P, Xu W, Zu Y, Zhu, B 2006. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using efficient TaqMan probe and extraction of virus DNA. *World Journal of Gastroenterology* 12: 7365-7370.

Mackay J, Landt O 2007. Real Time PCR Fluorescent chemistries. *Methods in Molecular Biology* 353: 237-261.

Magnius LO, Espmark JA 1972. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *Journal of Immunology* 109: 1017–1021.

Mahoney FJ 1999. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 351-366.

Marshall W. Manipulação de Proteínas, DNA e RNA. In: ALBERTS, B.; JOHNSON, A. *Biologia Molecular da Célula*. 5. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010. p.501-580.

Matsumoto A, Tanaka E, Morita S, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S 2012. Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection. *Journal of Gastroenterology* 47: 1006-1013.

McMahon BJ 2009. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatology International* 3: 334-342.

McOrist AL, Jackson M, Bird AR 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 50: 131–139.



Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, Saraiva JC, Virgolino HÁ, Motta-Castro AR, Melo MM, Martins RM, Gomes AS 2007. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiology* 23: 107.

Miguel JC, Silva EF, Oliveira SAN, Lampe E, Villar LM 2009. Padronização e Avaliação de controles de qualidade interno (CQI) para detecção de marcadores sorológicos das Hepatites Virais. Artigo em preparação.

Ministério da Saúde. Hepatites Virais: o Brasil está atento, 2008. 3ª edição. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/brasil\\_atento\\_3web.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/brasil_atento_3web.pdf)

Ministério da Saúde 2011. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

Ministério da Saúde 2012. Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais. Ano III, nº 1.

Naito H, Hayashi S, Abe K 2001. Rapid and Specific Genotyping System for Hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *Journal of Clinical Microbiology* v.39: 362-364.

Nassal M, Junker-Niepmann M, Schaller H 1990. Translational activation of RNA function: discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid assembly. *Cell* 63: 1357-1363.

Nie JJ, Sun KX, Li J, Wang J, Jin H, Wang L, Lu FM, Li T, Yan L, Yang JX, Sun MS, Zhuang H 2012. A type-specific nested PCR assay established and applied for investigation of HBV genotype and subgenotype in Chinese patients with chronic HBV infection. *Journal of Virology* 9: 121.

Noppornpanth S, Sathirapongsasuti N, Chongrisawat V, Poovorawan 2000. Detection

of HbsAg and HBV DNA in serum and saliva of HBV carriers. *Journal of Medical Public Health* 31: 419-421.

Nunes CL, Andrade T, Galvão-Castro B, Bastos FI, Reingold A 2007. Assessing risk behaviors and prevalence of sexually transmitted and blood-borne infections among female crack cocaine users in Salvador-Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11: 561-566.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *Journal of General Virology* 69: 2575-2583.

Oliosio D, Boaretti M, Ligozzi M, Lo Cascio L, Fontana R. 2007. Detection and quantification of hepatitis B virus DNA by SYBR green real-time polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiological Infectious Diseases* 26: 43–50.

Oschert AS, Boulter AW, Birnbaum W, Johnson NW, Teo CG 1994. Inhibitory effect of salivary fluids on PCR: Potency and removal. *PCR Method Application* 3: 365-368.

Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degrave WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M 2008. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genetic and Molecular Research* 7: 861-871.

Paraskevis D, Haida C, Tassopoulos N, Raptopoulou M, Tsantoulas D, Papachristou H 2002. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of HBV DNA. *Journal of Virological Methods*: 103: 201–212.

Paraskevis D, Beloukas A, Haida C, Katsoulidou A, Moschidis Z, Hatzitheodorou H, Varaklioti A, Sypsa V, Hatzakis A 2010. Development of a new ultra sensitive real-time PCR assay (ultra sensitive RTQ-PCR) for the quantification of HBV-DNA. *Virology Journal* 7: 57.

Pas SD, Fries E, Man R, Osterhaus ADME 2000. Development of a Quantitative Real-Time Detection Assay for Hepatitis B Virus DNA and Comparison with Two Commercial Assays. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2897-2901.

Perkins JA 2002. Disponível em: < [http:// www.rit.edu/~japfaa/infectious.html](http://www.rit.edu/~japfaa/infectious.html).

Petry A, Kupek EJ 2006. Effectiveness of recombinant DNA vaccines against hepatitis B in blood donors in an endemic region of South Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 462-466.

Phung TB, Alestig E, Nguyen TL, Hannoun C, Lindh M 2010. Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of Hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam – genotypes B4 and C1 predominate. *Journal of Medical Virology* 82: 1327-1333.

Portilho MM, Martins PP, Lampe E, Villar LM 2012. A comparison of molecular methods for Hepatitis B virus (HBV) DNA detection from oral fluid samples. *Journal of Medical Microbiology* 61: 844-851.

Pujol FH, Navas MC, Hainaut P, Chemin I 2009. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 286: 80-88.

Quasdorff M, Protzer U 2010. Control of Hepatitis B virus at the level of transcription. *Journal of Viral Hepatitis* 17: 527-536.

Read SJ 2001. Recovery efficiencies on nucleic acid extraction kits as measured by quantitative LightCycler PCR. *Molecular Pathology* 54: 86–90.

Ronsin C, Pillet A, Bali C, Denoyel GA 2006. Evaluation of the COBAS AmpliPrep-Total Nucleic Acid Isolation-COBAS TaqMan Hepatitis B Virus (HBV) Quantitative Test and Comparison to the VERSANT HBV DNA 3.0 Assay. *Journal of Clinical*

*Microbiology* 44: 1390-1399.

Rotman Y, Brown TA, Hoofnagle JH 2009. Evaluation of the patient with Hepatitis B. *Hepatology* 49: 22-27.

Roushan MR, Bijani A, Ramzaninijad S, Roushan MH, Amiri MJ, Baiani M 2012. HBeAg seroconversion in children infected during early childhood with hepatitis B virus. *Journal of Clinical Virology* 55: 30-33.

Sambrook, J. Russel, D. W. 2001. *Molecular Cloning*. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schaefer S 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes, *World Journal of Gastroenterology* 13: 14–21.

Seeger C, Zoulim F. Hepadnaviruses. In: FIELDS, N. B. **Virology**, 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lincott Williams & Wilkins, 2007. p.2977-3029.

Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP 2006. Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination. *Epidemiologic Reviews* 28: 112-125.

Shyamala V, Arcangel P, Cottrell J, Coit D, Medina-Selby A, McCoin C, Madriaga D, Chien D, Phelps B 2004. Assessment of the Target-Capture PCR Hepatitis B Virus (HBV)DNA Quantitative Assay and Comparison with Commercial HBV DNA Quantitative Assays. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5199-5204.

Stramer SL, Wend U, Candotti D, Foster GA, Hollinger FB, Doody RY, Allain JP, Gerlich W 2011. Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors. *New England Journal of Medicine* 20: 236-247.

Sun D, Nassal M 2006. Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *Journal of Hepatology*

45: 636-645.

Takahashi T, Nakagawa S, Hashimoto T, Takahashi K, Imai M 1976. Large-scale isolation of Dane particles from plasma containing hepatitis B antigen and demonstration of circular double-stranded DNA molecule extruding directly from their core. *Journal of Immunology* 117: 1392-1397.

Takkenberg RB, Zaaijer HL, Molenkamp R, Menting S, Terpstra V, Weegink CJ, Dijkgraaf MGW, Jansen PLM, Reesink HW, Beld MGHM 2009. Validation of a Sensitive and Specific Real-Time PCR for Detection and Quantitation of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA in Plasma of Chronic Hepatitis B Patients. *Journal of Medical Virology* 81: 988-995.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Tanaka J 2000. Hepatitis B epidemiology in Latin America. *Vaccine* 18: 17-19.

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M 2009. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *Journal of Virology* 83: 10538-10547.

Tauil MC, Amorim TR, Pereira GFM, Araújo WN 2012. Hepatitis B mortality in Brazil, 2000-2009. *Cadernos de Saúde Pública* 28: 472-478.

Tengan FM, de Araújo ESA 2006. Epidemiologia da Hepatite B e D e seu Impacto no Sistema de Saúde. *The Brazilian Journal Of Infectious Diseases* 10: 6-9.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-82.

Tian H, Hümmer AFR, Landers JP 2000. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. *Analytical Biochemistry* 283: 175–191.

Tonetto PA, Goncalkes NS, Fais VC, Vigani AG, Gonçalves ES, Feltrin A, Gonçalves FL 2009. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. *BMC Infectious Diseases* 9: 149.

Valsamakis A 2007. Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 426-439.

Van Der Eijk AA, Niesters HGM, Hansen BE, Pas SD, Richardus JH, Mostert M, Janssen HLA, Schalm SW, Man RA 2005. Paired, quantitative measurements hepatitis B virus DNA in saliva, urine and serum of Chronic hepatitis B virus patients. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17: 117-1179.

Vivekanandan P, Singh OV 2010. Molecular Methods in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Expert Review in Molecular Diagnosis* 7: 921-935.

Vos D, Götz HM, Richardus JH 2006. Needlestick injury and accidental exposure to blood: the need for improving the hepatitis B vaccination grade among health care workers outside the hospital. *American Journal of Infection Control* 34: 610-612.

Weber B 2005. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene. *Expert Review of Molecular Diagnosis* 5: 75-91.

Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA 2010. Molecular biology of Hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathologie Biologie* 2885: 1010-1016.

WHO – World Health Organization 2012. Prevention & Control of viral Hepatitis infection. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Framework/en>.

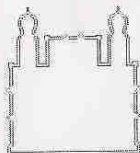
Yao JDC, Beld MGHM, Oon LLE, Sherlock CH, Germer J, Menting S, Thoe SYS, Merrick L, Ziermann R, Surtihadi J, Hnatyszyn J 2004. Multicenter Evaluation of the VERSANT Hepatitis B Virus DNA 3.0 Assay. *American Society of Microbiology* 42: 800-806.

Yokosuka O, Arai M 2006. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Medical Molecular Morphology* 39: 113-120.

Zago AM, Machado TF, Cazarim FL, Miranda AE 2007. Prevalence and risk factors for chronic hepatitis B in HIV patients attended at a sexually-transmitted disease clinic in Vitória, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11: 475-478.

Zhang YL, Pan HY, Chen CR, Lou GQ, Ye RX, Lu DR 2008. The roles of saliva testing for preventing hepatitis B virus spreading. *Chinese Journal of Preventive Medicine* 42: 696-598.

## Anexo I – Aceite do Projeto pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 15 de julho de 2008.

Carta: 062/08

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Livia Melo Villar e  
- Dr. Christian M. Gabriel Niel

Prezados Senhores,

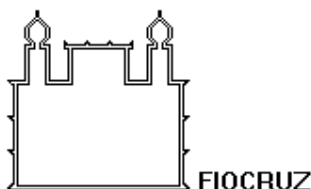
Estamos encaminhando o parecer do protocolo **433/07** intitulado **“Padronização de testes de diagnóstico da infecção pelo vírus das Hepatites B e C em amostras de saliva ”** que foi **APROVADO**.

Atenciosamente

  
Christian M. Gabriel Niel  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
Fundação Oswaldo Cruz



## Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Laboratório de Hepatites Virais

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz  
Projeto de Pesquisa: Padronização De Testes De Diagnóstico Da Infecção Pelos Vírus Das Hepatites B e C Em Amostras De Saliva  
Pesquisador: Dra. Lívia Melo Villar

Como voluntário, o (a) Sr. (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa realizada pelo Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz sob a coordenação da Dra. Lívia Melo Villar. O objetivo da pesquisa é padronizar o diagnóstico da infecção pelos vírus das hepatites B e C através de testes realizados em saliva.

Este documento pretende fornecer a (o) Sr. (a) informações sobre o problema de saúde em estudo, detalhando os procedimentos, exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais. O (a) Sr.(a) possui a liberdade de recusar a participar da pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização e sem prejuízo ao seu cuidado.

Os investigadores se obrigam a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante de informações obtidas durante o estudo. Os exames e procedimentos aplicados são gratuitos. O (a) Sr. (a) receberá todos os cuidados médicos adequados para o controle dos efeitos colaterais que possam ocorrer em consequência de sua participação na pesquisa.

Antes de assinar este termo, o Sr.(a) será informado plenamente sobre a pesquisa, não hesitando em formular perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes condições:

1. **Exames e procedimentos que serão realizados:** o voluntário será submetido à coleta de sangue e saliva. Serão coletados 6 ml de sangue por punção venosa periférica e 1 ml de saliva utilizando um coletor comercial pelos técnicos especializados do Grupo de Atendimento para Hepatites Virais (IOC/FIOCRUZ).
2. **Benefícios:** Obter resultado de exames laboratoriais para Hepatite B e C que serão entregues acompanhados de esclarecimentos sobre o significado dos resultados de maneira confidencial. O (a) Sr. (a) também será encaminhado para unidades de saúde do Estado do Rio de Janeiro, nos casos em que o tratamento da hepatite se fizer necessário.
3. **Inconvenientes:** Caso seja necessário, o (a) Sr. (a) será contatado por um dos membros da pesquisa que irá perguntar se o (a) Sr. (a) está disposto a doar nova amostra de sangue. O (a) Sr. (a) estará livre para recusar esta solicitação.
4. **Riscos potenciais conhecidos até o dia de hoje:** Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou rouidão no local que serão controladas por uma coleta de sangue realizada dentro das normas de biossegurança.
5. **Garantia de esclarecimentos:** Todos os esclarecimentos sobre a metodologia da pesquisa antes e durante o desenvolvimento da mesma serão realizados pela equipe da Pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_

(nome do(a) paciente), abaixo identificado(a) e firmado(a), declaro ter sido informado(a) claramente sobre todas as indicações e riscos relacionados à coleta de sangue e saliva.

Os termos médicos foram explicados e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas pelo pesquisador \_\_\_\_\_ (nome do pesquisador).

Expresso também minha concordância e espontânea vontade em submeter-me ao referido procedimento (coleta de sangue e saliva).

Entendi que minhas informações pessoais poderão ser revistas por pessoas devidamente autorizadas para conduzir a pesquisa, porém serão estritamente **CONFIDENCIAIS** e, de forma alguma, poderão tornar-se públicas.

Assim, declaro que:

- Fui claramente informado a respeito dos benefícios que a pesquisa pode trazer na avaliação dos resultados dos exames usados no diagnóstico das hepatites virais.

- Fui também claramente informado a respeito dos potenciais riscos relacionados a coleta de sangue para a realização desses exames.

Paciente: \_\_\_\_\_ RG do paciente: \_\_\_\_\_

Sexo do paciente: ( ) Masculino Idade: \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_  
( ) Feminino

Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_  
Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

Responsável legal (quando for o caso): \_\_\_\_\_

RG do responsável legal: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente ou do responsável legal: \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável: Livia Melo Villar

RG:11403613-0/IFP

Caso tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento sobre o estudo você pode entrar em contato com o pesquisador relacionados acima:

Laboratório de Hepatites Virais, fone 2562-1918.

\_\_\_\_\_  
(local e data)

Testemunha: \_\_\_\_\_ (nome completo)

\_\_\_\_\_  
(assinatura)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável.