

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

José Roberto Niemeyer de Castro

**REVALIDAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO REAGENTE PARA O HBsAg,
UTILIZADO NO CONTROLE DA QUALIDADE DE KITS PARA O DIAGNÓSTICO
DO HBV: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 2011 A 2015**

Rio de Janeiro

2020

José Roberto Niemeyer de Castro

REVALIDAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO REAGENTE PARA O HBsAg,
UTILIZADO NO CONTROLE DA QUALIDADE DE KITS PARA O DIAGNÓSTICO
DO HBV: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 2011 A 2015

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Marisa Coelho Adati
Preceptora: Danielle Custódio Deslandes do Passo

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Castro, José Roberto Niemeyer de

Revalidação do painel sorológico reagente para o HBsAg, utilizado no controle da qualidade de kits para o diagnóstico do HBV: estudo retrospectivo de 2011 a 2015. / José Roberto Niemeyer de Castro. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

74 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Tutora: Marisa Coelho Adati.

Preceptora: Danielle Custódio Deslandes do Passo.

1. Controle da Qualidade. 2. Kit de Reagentes para Diagnóstico.
3. Técnicas In Vitro. 4. Testes sorológicos. I. Título.

Revalidation of the reagent serum panel for HBsAg used for the quality control of HBV diagnostic in vitro kits: a retrospective study from 2011 to 2015.

José Roberto Niemeyer de Castro

REVALIDAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO REAGENTE PARA O HBsAg,
UTILIZADO NO CONTROLE DA QUALIDADE DE KITS PARA O DIAGNÓSTICO
DO HBV: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 2011 A 2015

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Renata Faria de Carvalho (Mestre)

Instituto Nacional em Controle de Qualidade

Marli Melo da Silva (Doutora)

Instituto Nacional em Controle de Qualidade

Mirian Noemi Pinto Vidal (Doutora)

Instituto Nacional em Controle de Qualidade

Marisa Coelho Adati (Doutora) – Tutora

Instituto Nacional em Controle de Qualidade

Danielle Custódio Deslandes do Passo (Mestre) – Preceptora

Instituto Nacional em Controle de Qualidade

Dedico este trabalho à Deus, à minha família e aos meus queridos amigos, mestres e companheiros de trabalho que me ajudaram a chegar até aqui e a superar todas as provas. Em especial para minha mãe, irmã e para minha avó, que lá de cima, olhando por nós, saberá o quanto foi importante nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Primeiro gostaria de agradecer a Deus que em sua grandeza e bondade me trouxe até aqui.

Gostaria de agradecer a minha mãe, a “leoa” que encarou o desafio de criar dois filhos sozinha e foi o alicerce dos meus dias até aqui. À minha irmã Rayanne, eterna cúmplice de todos os planos e que atura minhas manias. À minha avó Wilma que Deus a tenha na santa paz do Senhor. Amo muito vocês.

A minha Orientadora Danielle Custódio Deslandes do Passo, por toda a ajuda e boa vontade comigo. Por estar sempre à disposição para me ajudar sempre que precisei.

A doutora Helena Cristina Guedes Borges por toda a ajuda neste trabalho e por tudo o que me ensinou todo esse tempo.

A minha tutora Dra. Marisa Coelho Adati, Chefe do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH/INCQS) por tudo o que me ensinou. Nossa convivência tem sido um privilégio e um aprendizado diário sobre muitos assuntos que me ajudaram a amadurecer como profissional e como ser humano.

Aos amigos e mestres do LSH/DI/INCQS: Álvaro da Silva Ribeiro, Danielle Copello Vigo, Jorge Possas, Margaret Guimarães, Marli Melo Silva, Roberto Machado do Passo, Rogério Soares da Cunha, Gabriella Pires da Silva Macedo, Marlon Issobe, Yasmin Rosa Ribeiro e Valéria Furtado de Mendonça. Obrigado por tudo o que me ensinaram e por tornarem os dias sempre mais agradáveis com o bom astral de todos vocês.

Aos meus colegas Residentes em Vigilância Sanitária do INCQS. Nessa jornada de dois anos de residência passamos por muita coisa e espero que os laços de amizade permaneçam sempre vivos, mesmo que a distância não permita que estejamos sempre juntos. Em especial, gostaria de agradecer a Maria Olívia Adati Francke, Caíque de Assis Cirilo e Livia Vieira Teixeira. Foi um privilégio trabalhar e aprender juntamente com vocês tudo o que o LSH teve para nos oferecer.

Ao Ministério da Saúde, ANVISA, Fiocruz/RJ, INCQS e a todos os professores por todo o conhecimento transmitido na área de Vigilância Sanitária.

RESUMO

A hepatite B é um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 257 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas em todo mundo. A distribuição da doença é altamente heterogênea e o Brasil é considerado um país de baixa endemicidade. Um dos testes laboratoriais mais importantes para o diagnóstico do vírus é a pesquisa dos antígenos de superfície do HBV, o HBsAg. Nesse contexto, cabe ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), através do trabalho realizado pelo laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), a função de analisar os kits para diagnóstico de uso *in vitro*, comercializados em no país, conforme previsto na legislação brasileira. Um dos instrumentos utilizados para a avaliação da qualidade destes produtos é o painel sorológico verdadeiro positivo para a detecção do HBsAg. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi revalidar o painel sorológico verdadeiro positivo para a detecção do HBsAg através da análise retrospectiva das respostas de suas amostras constituintes em kits diagnósticos considerados satisfatórios em análises no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015. Como critérios de revalidação, as amostras de plasma constituintes do painel deveriam apresentar volumes em estoque iguais ou superiores a 10 mililitros e reatividade em no mínimo três Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA), três Ensaio de Quimioluminescência e três Testes rápidos. Inicialmente o painel sorológico verdadeiro positivo, utilizados em análises para a detecção do HBsAg era constituído de 171 de plasmas. Ao final da presente revalidação o painel passou a ser constituído por 91 amostras de plasma que foram aprovadas em todos os critérios de revalidação. O esgotamento do volume e a instabilidade do material biológico parecem ser os principais responsáveis pela não revalidação de algumas amostras. O limite de detecção dos Testes Rápidos nas análises também foi preponderante para os resultados discordantes das amostras não revalidadas.

Palavras-chave: Controle da Qualidade. Kit para diagnóstico de uso *in vitro*. Painel sorológico.

ABSTRACT

Hepatitis B is a serious public health problem, especially in developing countries. It is estimated that approximately 257 million people are chronically infected worldwide. The distribution of the disease is highly heterogeneous and Brazil is considered a low endemic country. One of the most important laboratory tests for diagnosing the virus is the search for HBV surface antigens, HBsAg. In this context, the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) is responsible, through work carried out by the Blood and Blood Products Laboratory (LSH), to analyze diagnostic in vitro kits marketed in the country, as determined by the Brazilian law. One of the instruments used to assess the quality of these products is the HBsAg true positive serological panel. Therefore, the objective of the present study was to revalidate the HBsAg true positive serological panel through retrospective response analysis of its constituent samples in diagnostic kits considered satisfactory in analyzes carried out from January 2011 to December 2015. For the revalidation criteria, panel plasma samples should have stock volumes equal to or greater than 10 milliliters and reactivity in three Immunoenzymatic Assays (ELISA), three Chemiluminescence Assays and three Rapid tests. Initially, the HBsAg true positive serological panel used in the analyzes consisted of 171 plasma samples. At the end of this revalidation, the panel will consist of 91 plasma samples that have gone through all revalidation criteria. Volume depletion and biological material instability seem to be the main responsible factor for the non-revalidation of some samples. Limit of detection of Rapid Tests in the analyzes was also preponderant for samples discordant results and therefore were not revalidated.

Key-words: Diagnostic kit for in vitro use. Quality Control. Serological panel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura esquemática da partícula viral e das subpartículas do vírus HBV.....	15
Figura 2 – Estrutura do vírus da hepatite B.....	16
Figura 3 – Prevalência global da infecção pelo vírus da Hepatite B.....	18
Figura 4 – Taxa de detecção da hepatite B segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2008 a 2018.....	20
Figura 5 – Infecção e estágios do ciclo celular do HBV.....	22
Figura 6 – Evolução sorológica da hepatite B nas fases aguda e crônica.....	23
Quadro 1 - Hepatite B e seus principais marcadores sorológicos.....	26
Figura 7 – Algoritmo para o diagnóstico clínico da Hepatite B.....	27
Figura 8 – Interpretação dos resultados de Testes rápidos.....	28
Figura 9 – Microplaca de Ensaio de Aglutinação.....	29
Figura 10 – Imagem de um Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	31
Figura 11 – Funcionamento da metodologia da reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	32
Figura 12 - Obtenção das unidades de plasma.....	36
Figura 13 – Modelo de capa dos cadernos de registro de kits para diagnóstico do LSH.....	41
Figura 14 – Página do caderno de registro de kits para diagnóstico do LSH.....	42
Gráfico 1 – Distribuição percentual do recebimento de kits para a detecção do HBsAg nos anos de 2011 a 2015.....	46
Gráfico 2 – Distribuição percentual dos produtos diagnósticos com Laudos de Análise satisfatórios de 2011 a 2015 por metodologia.....	47
Gráfico 3 – Distribuição percentual dos produtos diagnósticos com Laudos de Análise insatisfatórios de 2011 a 2015 por metodologia.....	48
Gráfico 4 – Quantitativo de protocolos analisados por metodologia.....	49
Gráfico 5 – Critério de revalidação referente ao volume das amostras.....	50
Gráfico 6 – Resultado das amostras de plasma quanto ao critério de revalidação em relação à reatividade em três ensaios do tipo ELISA.....	51
Gráfico 7 – Resultado das amostras de plasma quanto ao critério de revalidação em relação à reatividade em três ensaios de Quimioluminescência.....	51

Gráfico 8 – Resultado das amostras de plasma quanto ao critério de revalidação em relação à reatividade em três Testes rápidos.....	52
Gráfico 9 – Resultado das amostras de plasma que apresentaram reatividade em três ELISAS, três Quimioluminescências e três Testes rápidos de acordo com os critérios de revalidação.....	53
Gráfico 10 - Distribuição das razões médias de cada amostra revalidada na metodologia de ELISA.....	54
Gráfico 11 – Distribuição percentual dos resultados discordantes em relação aos critérios de reatividade nas metodologias analisadas.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo da tabulação dos dados referentes à metodologia de ELISA.....	43
Tabela 2 – Exemplificação da tabulação utilizada para os dados referentes à metodologia de Quimioluminescência.....	44
Tabela 3 – Exemplo da tabulação dos dados referentes à metodologia de Teste rápido ou Imunocromatográfico.....	44
Tabela 4 – Levantamento de dados referente aos kits diagnósticos para a detecção do HBsAg analisados pelo LSH nos anos de 2011 a 2015.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	alanina aminotransferases
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cccDNA	DNA circular covalentemente fechado
CO	Ponto de corte
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CPDA-1	Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina
DI	Departamento de Imunologia
DO	Densidade Óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsIDNA	DNA de fita dupla linear
EASL	Associação Europeia para Estudos no Fígado
ELISA	<i>Enzime-Linked Immunosorbent Assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HBcAg	Antígeno do capsídeo da Hepatite B
HBeAg	<i>Antígeno e da Hepatite B</i>
HBsAg	Antígeno de superfície da Hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HBxAg	Antígeno X da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV-I/II	Vírus linfotrópico humano tipo I/II
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LA	Laudo de Análise
LSH	Laboratório de Sangue e Hemoderivados
MS	Ministério da Saúde
NAT	Teste de ácido nucleico
NCTP	Proteína cotransportadora de sódio dependente de taurocolato
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Quadros de leitura abertos
PCR	Reação da cadeia da polimerase

pgRNA	Ácidos ribonucleicos mensageiros pré-genômicos
PNI	Programa Nacional de Imunização
POP	Procedimento Operacional Padrão
rcDNA	DNA de cadeia circular relaxada
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RJ	Rio de Janeiro
RLU	Unidade Relativa de Luminescência
RPR	<i>Rapid Test Reagin</i>
TR	Teste rápido
UI	Unidade Internacional
VDRL	<i>Veneral Disease Research Laboratory</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Histórico	14
1.2 A hepatite B	15
1.2.1 Estrutura do vírus da hepatite B	15
1.2.2 Epidemiologia da hepatite B	17
1.2.3 Curso da infecção pelo HBV	21
1.3 Marcadores sorológicos e metodologias diagnósticas	25
1.3.1 Marcadores sorológicos e significado de sua presença	25
1.3.2 Metodologias utilizadas no diagnóstico do HBV	27
1.3.2.1 <i>Teste rápido ou imunocromatográfico</i>	28
1.4 Aspectos regulatórios do diagnóstico da hepatite B	32
1.5 Confecção e validação do painel sorológico reagente para o HBsAg	34
1.6 JUSTIFICATIVA	38
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 METODOLOGIA	39
3.1 Local dos procedimentos e análises	39
3.2 Painel reagente para a detecção do HBsAg	39
3.3 Identificação dos cadernos utilizados na coleta de dados	40
3.4 Seleção dos kits e identificação das metodologias de análise	41
3.5 Seleção e análise dos protocolos	42
3.6 Tabulação e avaliação dos dados	42
3.7 Critérios adotados para a revalidação	44
4 RESULTADOS	44
4.1 Levantamento e análise dos dados	44
4.2 Identificação dos protocolos analíticos	47
4.3 Seleção das amostras a serem revalidadas em relação ao critério de volume em estoque	48
4.4 Análise das amostras mediante os critérios de reatividade em ensaios	48

4.5	Resultado final da revalidação das amostras verdadeiro positivas.....	51
5	DISCUSSÃO.....	53
6	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICE A – AMOSTRAS NÃO REVALIDADAS EM RELAÇÃO AO CRITÉRIO DE VOLUMES EM ESTOQUE IGUAIS OU SUPERIORES A 10ML.....	67
	APÊNDICE B – AMOSTRAS REVALIDADAS EM RELAÇÃO AO CRITÉRIO DE VOLUMES EM ESTOQUE EM ESTOQUE IGUAIS OU SUPERIORES A 10ML.....	68
	APÊNDICE C – AMOSTRAS REVALIDADAS NOS CRITÉRIOS DE REATIVIDADE EM TESTES.....	67

1 INTRODUÇÃO

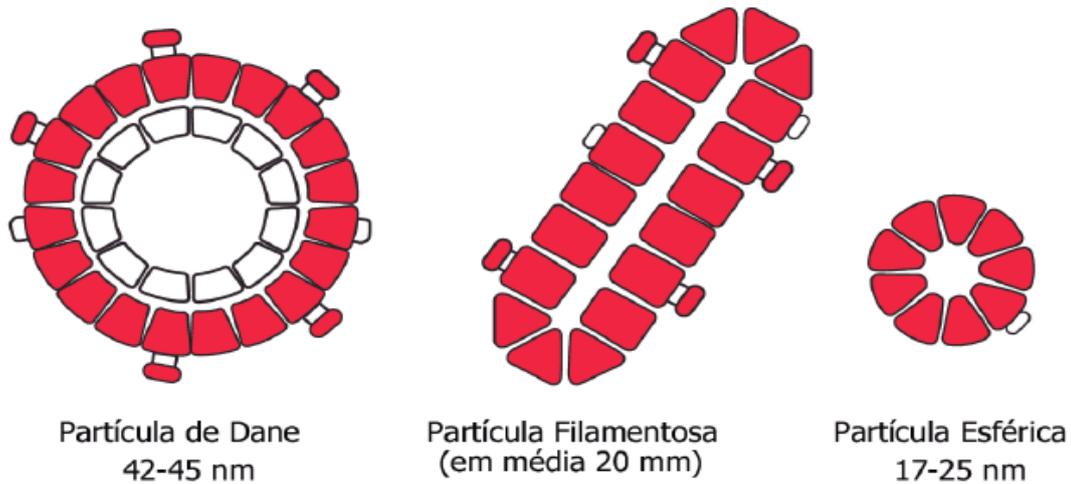
1.1 Histórico

Desde a década de 1940, já se observava casos de hepatite transitória e crônica como consequência de transfusão de sangue ou de plasma em pacientes (SEEGER; MASON, 2015). Embora o agente infeccioso ainda não fosse conhecido, 30 à 40% dos receptores dessas transfusões adquiriam a enfermidade, podendo evoluir para casos de cirrose ou carcinoma hepatocelular (SEEGER; MASON, 2015; VENKATAKRISHNAN; ZLOTNIC, 2016).

Na década de 1960, Blumberg e colaboradores (1967), perceberam que antígenos séricos, descobertos previamente no sangue de pacientes com leucemia, tratados por meio de transfusão sanguínea eram na verdade componentes estruturais de um agente infeccioso. Esses elementos ficaram conhecidos, à princípio, como antígeno Austrália, pois foram identificadas em um aborígine australiano (GERLICH, 2013; SEEGER; MASON, 2015). Posteriormente, essas partículas subvirais foram caracterizadas como as glicoproteínas L (grande), M (média) e S (pequena) do envelope do vírus da hepatite B (HBV) (VENKATAKRISHNAN; ZLOTNIC, 2016). Em conjunto, essas partículas subvirais ficaram conhecidas genericamente como o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (SEEGER; MASON, 2015; VENKATAKRISHNAN; ZLOTNIC, 2016). Nos anos de 1970, Dane e colaboradores (1970), descobriram a estrutura completa do vírion, que passou a ser chamado de partícula de Dane (DANE; CAMERON; BRIGGS, 1970) (Figura 1).

A capacidade de detectar a presença do HBsAg no sangue de doadores provocou, na época, uma redução de duas a três vezes na incidência de hepatite pós-transfusional (SEEGER; MASON, 2015; VENKATAKRISHNAN; ZLOTNIC, 2016). Diante disso, a avaliação e o monitoramento do sangue em hemocentros, assim como, a detecção de possíveis infecções em indivíduos e o acompanhamento da doença em pessoas enfermas, tornou-se de grande relevância para a saúde pública (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; CHANG *et al.*, 2019).

Figura 1 – Estrutura esquemática da partícula viral e das subpartículas do vírus da hepatite B (HBV).



Fonte: (Adaptado de BRASIL, 2018).

1.2 A hepatite B

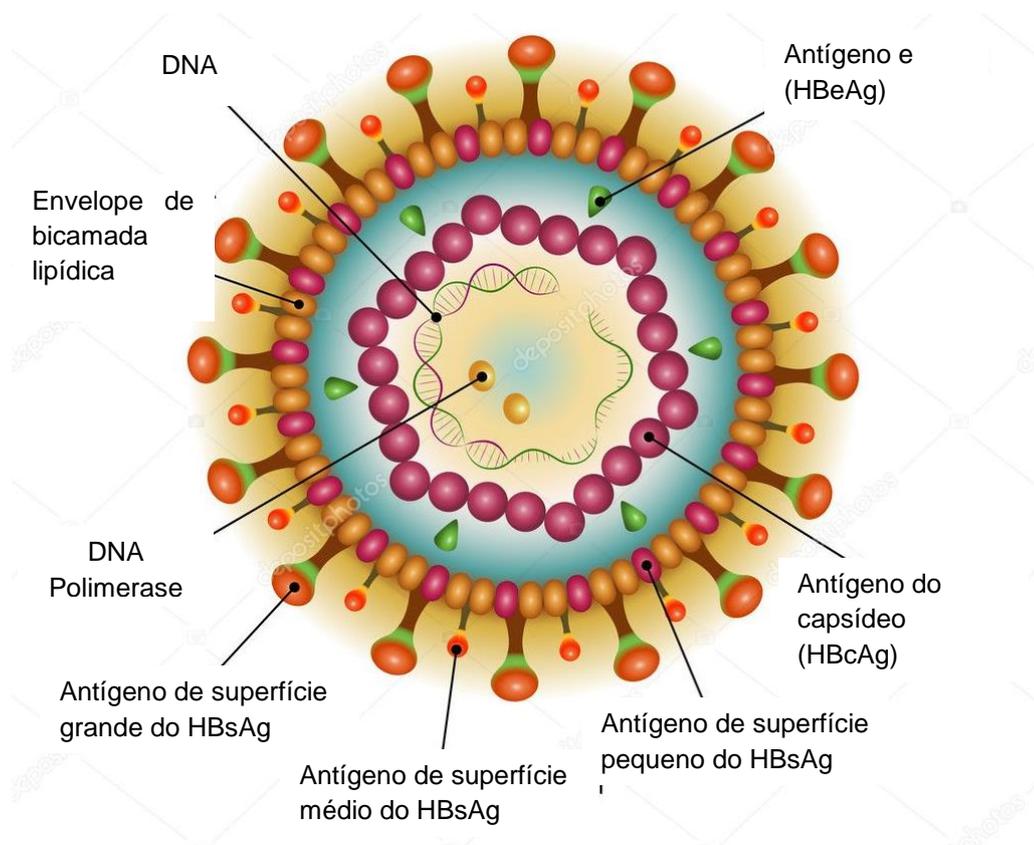
1.2.1 Estrutura do vírus da hepatite B

A infecção pelo HBV é causada por um vírus de 42 a 45 nanômetros de diâmetro, não citolítico, pertencente aos orthohepadnavirus da família *Hepadnaviridae* com tropismo para as células hepáticas (SEEGER; MASON, 2015; GÓMEZ-MORENO; GARAIGORTA, 2017; GUO *et al.*, 2018). Estruturalmente, o HBV é um vírus com envelope formado por glicoproteínas e fosfolipídeos ao redor de um nucleocapsídeo icosaédrico de 34 nm de diâmetro (LOPES; SCHINONI, 2010). Sua estrutura apresenta diferentes componentes antigênicos, que podem ser divididos em dois grupos: antígenos de superfície (HBsAg) e antígenos centrais, localizados na região do capsídeo viral, representados pelo antígeno do capsídeo (HBcAg), antígeno “e” (HBeAg) e antígeno X (HBxAg) (LOPES *et al.*, 2010). Na porção mais interna do nucleocapsídeo, podemos encontrar o DNA viral e a enzima DNA-polimerase (LOPES *et al.*, 2010) (Figura 2).

O genoma do HBV contém uma dupla fita de DNA de cadeia circular relaxada (rcDNA), parcialmente assimétrica, com quatro quadros de leitura abertos (ORF) sobrepostos que sintetizam sete proteínas virais (INOUE; TANAKA, 2016; KUSTYUSHEVA *et al.*, 2018). Essas ORFs codificam quatro genes denominados S,

C, P e X (TSAI; KUO; OU, 2018). O gene S e sua porção Pré-S codificam as glicoproteínas de superfície do envelope viral L, M e S, conhecidas genericamente como HBsAg. O gene C codifica as proteínas do capsídeo e o HBeAg. O gene P codifica a DNA-polimerase viral e o gene X codifica proteínas reguladoras com funções na replicação e no aumento da expressão gênica do vírus (LOPES *et al.*, 2010; TSAI; KUO; OU, 2018).

Figura 2 – Estrutura do vírus da hepatite B.



Fonte: (Adaptado de BALTIMORE GROUP, 2014).

O HBV apresenta cerca de 10 genótipos diferentes nomeados de A-J. Os genótipos de A-D, F, H e I são divididos em 35 subgenótipos, com diferenças estruturais em suas cadeias nucleotídicas variando de 4 a 8% (KRAMVIS *et al.*, 2018). Os genótipos do HBV e seus subgenótipos estão amplamente distribuídos ao redor do planeta, com áreas de maior ou menor prevalência geográfica de cada um deles (KRAMVIS, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). Além disso, diversos estudos sugerem que os genótipos do vírus da hepatite B possam influenciar na gravidade da doença e na resposta do hospedeiro ao tratamento (FONSECA, 2007; KRAMVIS, 2014; ZHANG *et al.*, 2016).

No Brasil, os genótipos de A à G do HBV circulam na população (LAMPE *et al.*, 2017). No entanto, o genótipo A é o mais prevalente, seguido pelos genótipos D e F (LAGO *et al.*, 2014; KRAMVIS *et al.*, 2018).

Além dos genótipos e subgenótipos mencionados, o HBV possui uma diversidade viral ainda mais complexa. As moléculas do HBsAg também apresentam variações genéticas que categorizam as “quasiespécies” virais em nove subtipos sorológicos: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adwq, adrq- (KRAMVIS, 2014; INOUE; TANAKA, 2016; HOSSAIN; UEDA, 2017). Esses nove subtipos do HBsAg são definidos pela presença de um determinante “a” comum e dois pares de determinantes mutuamente exclusivos “d/y” e “w/r” (HOSSAIN; HUEDA, 2017). Ademais, os subtipos adw/r podem ser caracterizados pela presença ou ausência de um determinante q (COUROUCÉ-PAUTY; PLANCON; SAULIER, 1983).

Mutações no gene S, geradas por erros na revisão transcricional da enzima DNA-polimerase também podem ocorrer, causando modificações conformacionais no determinante “a” do HBsAg. Este determinante “a” é o ligante de alta afinidade para os anticorpos neutralizantes anti-HBs e esta mudança conformacional torna esses anticorpos ineficientes em proteger, mesmo indivíduos imunizados de uma infecção pelo vírus mutante (GENCAY *et al.*, 2017).

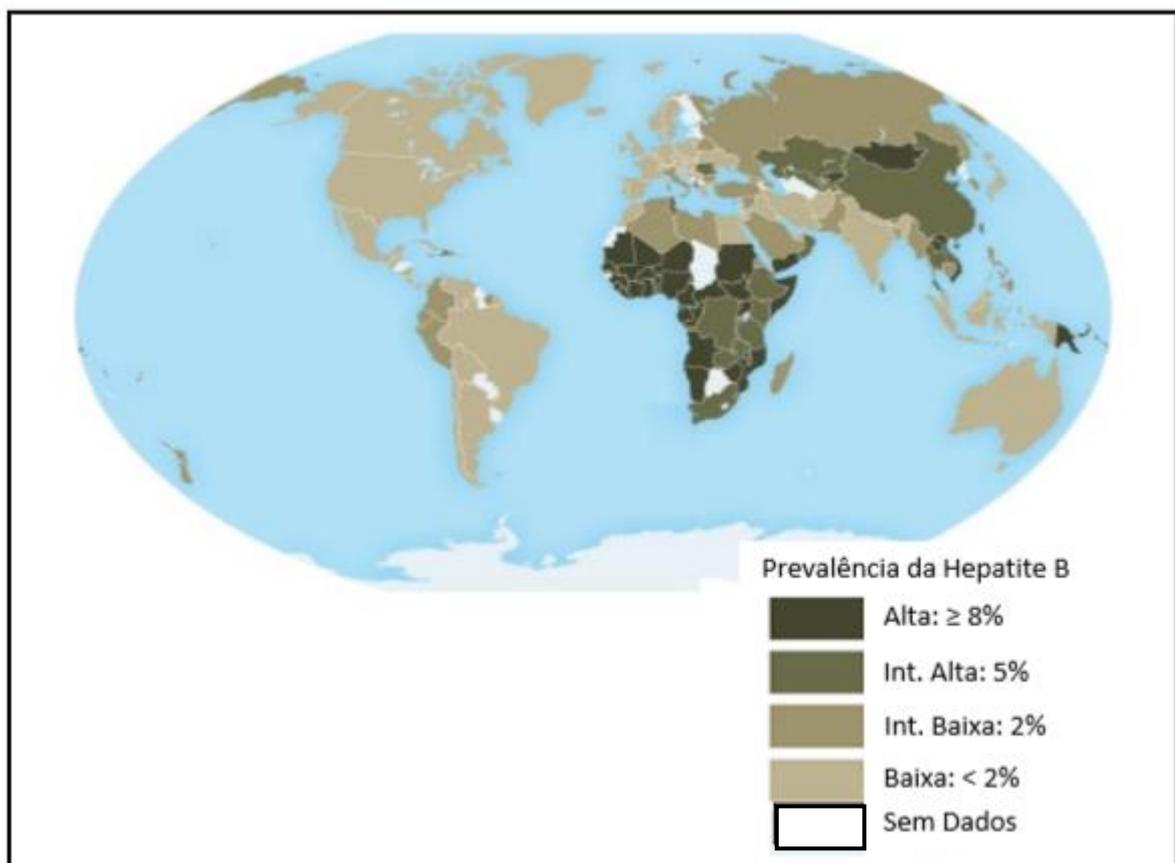
1.2.2 Epidemiologia da hepatite B

A infecção pelo vírus da hepatite B é um grave problema de saúde pública ao redor do mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017a). Estima-se que cerca de 257 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas pelo HBV e um quarto delas poderão desenvolver doenças hepáticas graves, tais como cirrose e carcinoma hepático (JEFFERIES *et al.*, 2018; KIM; KIM, 2018). Todos os anos, cerca de 780.000 mortes são relacionadas ao HBV em todo mundo (JEFFERIES *et al.*, 2018).

A classificação da endemicidade da infecção ao redor do planeta é definida de acordo com a prevalência do marcador sorológico da viremia, o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (SOUTO, 2016). Atualmente, a classificação conta com quatro níveis de endemicidade: baixa, intermediária baixa, intermediária alta e alta (SOUTO, 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017a).

A distribuição global da doença é altamente heterogênea (SOUTO, 2016; JEFFERIES *et al.*, 2018). Entretanto, de acordo com o mapa epidemiológico mundial estimado a partir dos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Figura 3) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017a; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018), as áreas de maior prevalência da infecção pelo HBV estão localizadas nas regiões do Pacífico Ocidental, África Subsaariana e no leste da Ásia (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017a; AL-SADEQ *et al.*, 2019). Em contrapartida, o continente americano apresenta algumas das menores taxas de infecção pelo HBV, com exceção do Haiti (JEFFERIES *et al.*, 2018).

Figura 3 – Prevalência global da infecção pelo vírus da hepatite B.



Fonte: (Adaptado de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018).

O Brasil é classificado como um país de baixa endemicidade da doença, com uma prevalência da infecção estimada em 0,65% da população (PERAZZO *et al.*, 2017). Em nosso país, no período de 1999 a 2018, foram notificados 233.027 casos confirmados de hepatite B (BRASIL, 2019a). A maioria dos casos registrados está

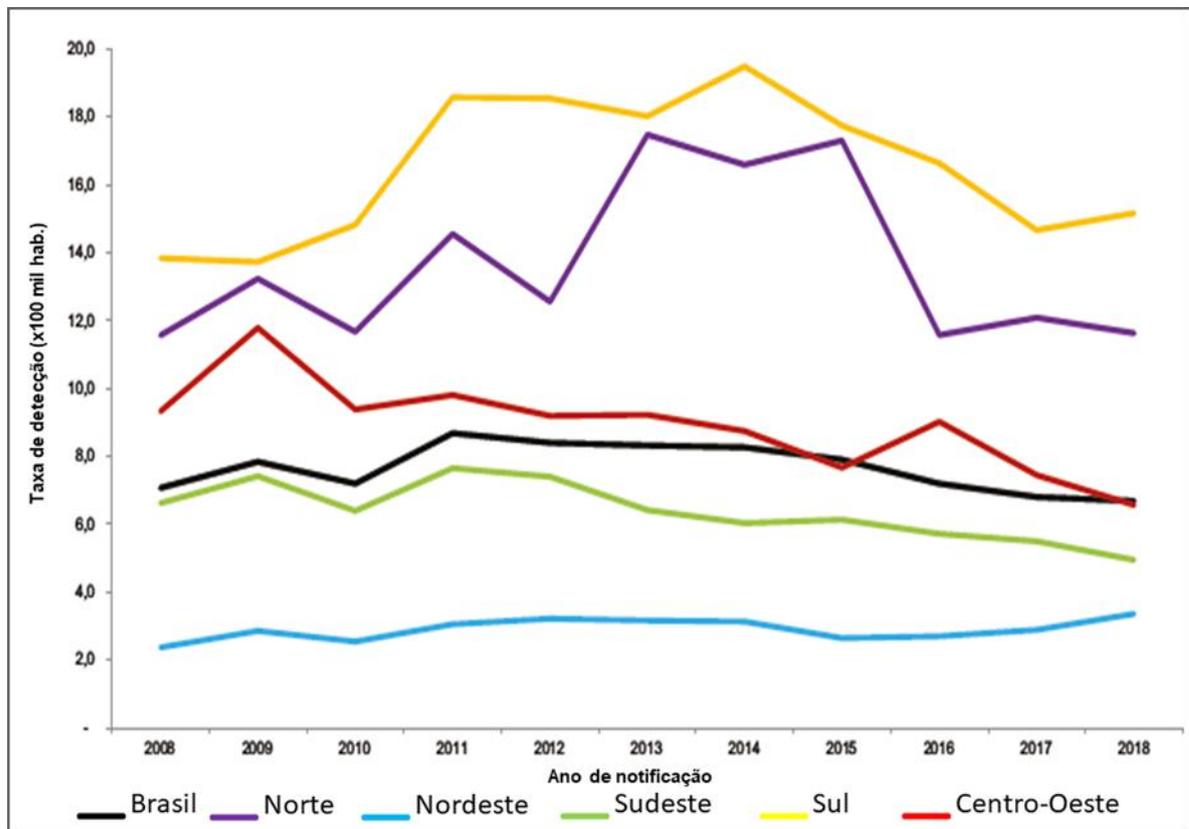
localizada nas regiões Sudeste e Sul com 34,9% e 31,6%, respectivamente. Em seguida, a região Norte apresenta valores de 14,4%, Nordeste com 9,9% e Centro-Oeste com 9,1% das notificações (BRASIL, 2019a).

Entre 2008 e 2018, as taxas de detecção da hepatite B por 100 mil habitantes observadas nas regiões Nordeste e Sudeste foram inferiores às observadas na média nacional. Já as regiões Sul, Norte e Centro-Oeste apresentaram taxas de detecção superiores à nacional. As exceções foram nos anos de 2015 e 2018, quando as taxas de detecção da região Centro-Oeste ficaram levemente abaixo, quando comparada às médias nacionais nos referidos anos (Figura 4). Segundo o Ministério da Saúde (2019), as taxas de detecção da hepatite B na população brasileira, vêm apresentando pouca variabilidade, com uma leve tendência de queda a partir do ano de 2014, alcançando 6,7 casos para cada 100 mil habitantes em 2018 (BRASIL, 2019a).

O vírus da hepatite B é considerado altamente patogênico. Somente uma partícula viral é capaz de causar a infecção produtiva no ser humano (LOPES; SCHINONI, 2010). A transmissão do HBV pode ocorrer através de relações sexuais sem proteção com indivíduos infectados, por meio da transmissão vertical da mãe para o feto, compartilhamento de seringas no uso de drogas injetáveis, acidentes com materiais perfurocortantes, doação de órgãos e também através da transfusão de sangue, hemocomponentes ou por hemoderivados (LOPES; SCHINONI, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017b). Em países com alta endemicidade da doença, a transmissão vertical é a principal causa de infecção. Em contrapartida, em países de baixa endemicidade, a transmissão sexual é a mais prevalente (MARAULO *et al.*, 2018). Infelizmente, em nosso país, cerca de 58,6% dos casos notificados de hepatite B possuem sua provável fonte de transmissão desconhecida. Entretanto, dos casos em que a fonte ou mecanismo da transmissão pôde ser identificado, cerca de 50% das notificações, apresentaram a transmissão sexual como a principal via de infecção (BRASIL, 2019a).

A infecção pelo HBV é a segunda maior causa de óbitos entre hepatites virais em nosso país (SOUTO, 2016; BRASIL, 2019a). Entre os anos de 2000 e 2017, foram identificados 15.033 óbitos ligados à doença (BRASIL, 2019a).

Figura 4 – Taxa de detecção da hepatite B segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2008 a 2018.



Fonte: (BRASIL, 2019a).

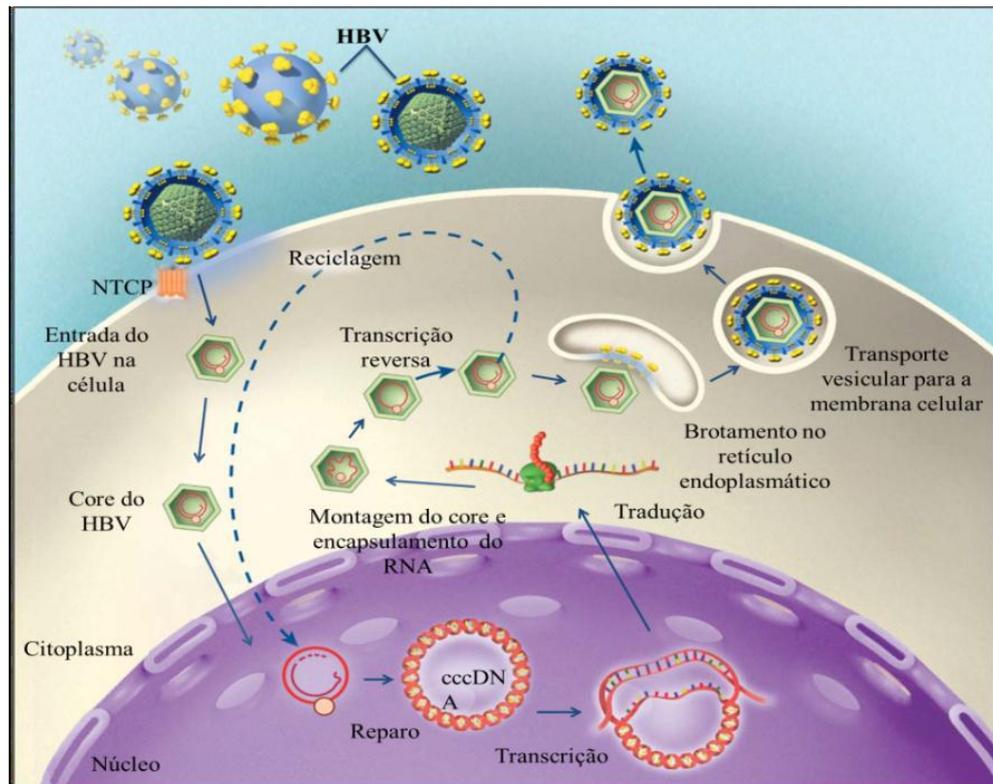
A melhor forma de prevenção contra a hepatite B é a vacinação (SOUTO, 2016). Esta começou em larga escala no Brasil em 1998, quando o Programa Nacional de Imunização (PNI) do Ministério da Saúde, determinou a vacinação universal para crianças menores de um ano (TAUIL *et al.*, 2012; SOUTO, 2016). Atualmente, a vacina contra o HBV está disponível gratuitamente para todos os cidadãos com até 49 anos de idade (SOUTO, 2016). Em crianças, a vacina pentavalente para a imunização contra difteria, tétano, coqueluche, infecções causadas por *Haemophilus influenzae* tipo B e hepatite B faz parte do calendário de vacinação com a primeira dose aos dois meses de idade, a segunda dose aos três meses e a última aos seis meses (BRASIL, 2020a). A partir dos sete anos de idade, sem comprovação vacinal do indivíduo, o esquema de vacinação é composto de três doses, sendo a segunda dose um mês após a primeira e a terceira e última dose, seis meses após o início da vacinação, independentemente da idade do indivíduo imunizado (LOPES; SCHINONI, 2010; TAUIL *et al.*, 2012).

1.2.3 Curso da infecção pelo HBV

A infecção celular começa quando a glicoproteína pequena do antígeno de superfície do vírus da hepatite B interage primariamente e com baixa especificidade com os proteoglicanos heparan sulfato de hepatócitos quiescentes. Em seguida, uma ligação de alta especificidade ocorre entre o domínio pré-S1 do antígeno L do HBsAg, pertencente ao envelope viral e o transportador de sais biliares específico de hepatócitos, a proteína cotransportadora de sódio dependente de taurocolato (NCTP) (TU *et al.*, 2017; LOK, 2019).

Após a entrada do vírion mediada pelo receptor heparan sulfato e NCTP, o nucleocapsídeo contendo o DNA circular relaxado (rcDNA) é liberado no citoplasma. O nucleocapsídeo é transportado para o núcleo, onde o rcDNA é liberado e convertido em uma molécula de DNA covalentemente fechada (cccDNA). O cccDNA é o modelo transcricional epissomal estável, responsável pela transcrição dos ácidos ribonucleicos mensageiros pré-genômicos (pgRNA), que codificam as proteínas estruturais e reguladoras do HBV. Os pgRNAs, juntamente com a DNA-polimerase viral são encapsulados pelo nucleocapsídeo no citoplasma. Dentro deste nucleocapsídeo, ocorre a transcrição reversa desse pgRNA em rcDNA ou a formação de uma fita dupla linear de DNA (dsIDNA) que ao término da montagem do vírion é liberado do hepatócito (Figura 5) (GÓMEZ-MORENO; GARAIGORTA, 2017; TU *et al.*, 2017). Entretanto, outras vias podem ocorrer, durante a formação das novas partículas virais. Os nucleocapsídeos formados podem ser novamente direcionados ao núcleo, formando novas moléculas de cccDNA, sem a necessidade da entrada de novos vírus nos hepatócitos, contribuindo para a manutenção da infecção (LOK, 2019). Adicionalmente, partículas subvirais também podem ser liberadas pelos hepatócitos infectados através da via conhecida como trans-Golgi. Em sua maioria, essas partículas subvirais correspondem a moléculas compostas pelas proteínas do HBsAg em suas membranas, mas também podem ser representadas pelas moléculas do HBeAg (GERLICH, 2013).

Figura 5 – Infecção e estágios do ciclo celular do HBV.



Fonte: (Adaptado de GANEM; PRINCE, 2004).

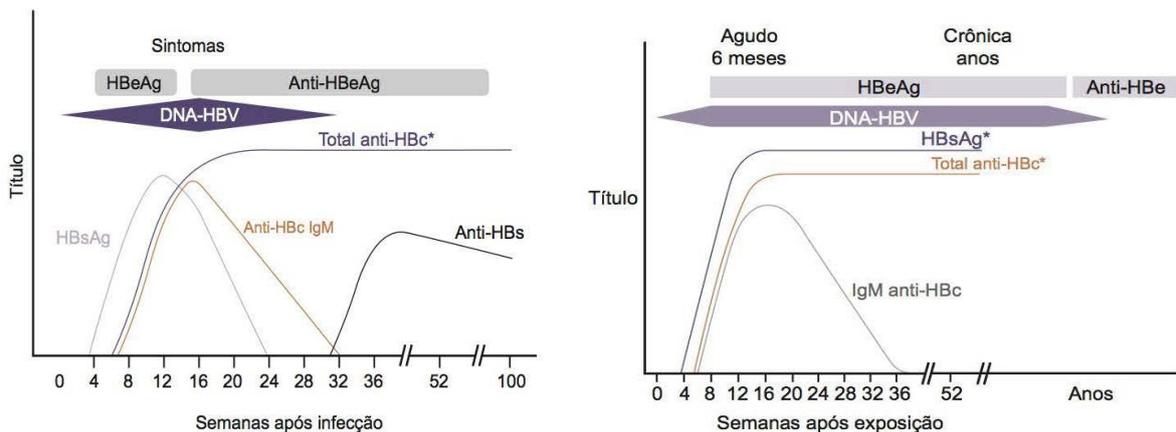
O período de incubação da infecção dura de 60 a 90 dias (INOUE; TANAKA, 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017b). O curso natural da doença pode ser caracterizado por casos assintomáticos ou de hepatite aguda que podem evoluir para hepatite crônica (INOUE; TANAKA, 2016). A hepatite aguda benigna é caracterizada pela presença do vírus na corrente sanguínea com níveis séricos de aminotransferases normais ou pouco elevados com sintomas clínicos de colúria, hipocolia fecal e icterícia (OKAMOTO *et al.*, 2018) (Figura 6). Em cerca de 1% dos casos, a hepatite aguda pode evoluir para quadros de insuficiência hepática fulminante (ASPINALL *et al.*, 2011).

A probabilidade de uma pessoa infectada pelo HBV progredir para uma infecção crônica pelo patógeno é diretamente proporcional à idade em que o indivíduo entrou em contato com o vírus pela primeira vez. Aproximadamente 95% das infecções primárias em indivíduos adultos imunocompetentes são geralmente autolimitadas, resultando em eliminação viral e imunidade adquirida contra HBV (SCHILLIE *et al.*, 2018). Já em crianças abaixo de cinco anos de idade, em 90% dos casos a doença evolui para casos de hepatite crônica. Além da idade do indivíduo, a progressão da infecção é influenciada pelos genótipos e variantes do vírus HBV,

fatores genéticos e estilo de vida do hospedeiro, além de coinfeccções com outros vírus hepatotrópicos ou com vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (INOUE; TANAKA, 2016; SCHILLIE *et al.*, 2018).

O quadro crônico da hepatite B é representado pela presença persistente do HBsAg no sangue de um indivíduo por um período igual ou superior a seis meses (Figura 6). Segundo a Associação Europeia para Estudos no Fígado (EASL), a fase crônica da doença possui cinco etapas, não necessariamente sequenciais, que podem ser caracterizadas pela flutuação dos níveis de DNA do vírus e de alanina aminotransferases (ALT), refletindo a dinâmica entre a replicação do HBV e a resposta imunológica do hospedeiro (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, 2017; FLISIAK *et al.*, 2017; LOK, 2019).

Figura 6 – Evolução sorológica da Hepatite B nas fases aguda e crônica.



Fonte: FERREIRA; MORAES, 2013.

A primeira fase da doença crônica é caracterizada pela alta replicação viral com positividade para o antígeno HBeAg, período conhecido como infecção HBeAg positiva ou período imunotolerante (INOUE; TANAKA, 2016; EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017b). O HBsAg é o primeiro marcador sorológico da infecção que pode ser detectado no sangue do indivíduo infectado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017b). Nesta fase, além do HBsAg, o DNA viral e o HBeAg podem ser detectados no soro de pacientes, com níveis de ALT normais ou ligeiramente elevados (FLISIAK *et al.*, 2017). O indivíduo não apresenta sintomas ou danos hepáticos e a resposta imune é restrita a produção de imunoglobulinas das classes

IgM e IgG contra o HBcAg (INOUE; TANAKA, 2016; EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, 2017).

O segundo estágio da doença crônica é conhecida como fase de hepatite HBeAg positiva. Nesta fase, os níveis de DNA circulante do HBV são inferiores ao da fase anterior, com valores de ALT e graus de fibrose e necrose no tecido hepático variando de moderados a graves (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, 2017). O presente estágio tem duração variável de meses a anos e pode culminar com a perda do HBsAg e do HBeAg, assim como na formação de anticorpos anti-HBe, o que leva ao estágio seguinte da doença (INOUE; TANAKA, 2016; FLISIAK *et al.*, 2017).

O terceiro estágio da doença crônica é denominado de hepatite crônica inativa, anteriormente conhecida como fase de “portador inativo”. Esta fase é caracterizada por valores baixos ou indetectáveis do material genético viral e de HBeAg no soro de pacientes, com níveis séricos de ALT normais (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, 2017). Além disso, o HBsAg ainda pode ser encontrado no soro dos indivíduos infectados, mas sua depuração e a síntese de anticorpos anti-HBs podem ocorrer (INOUE; TANAKA, 2016; EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, 2017).

O quarto estágio da doença crônica é chamado de fase de escape imunológico ou fase de hepatite crônica HBeAg negativa. A principal característica desta fase são períodos de agravamentos intermitentes da resposta imune e dos danos hepáticos, intercalados com períodos de remissão da doença (FLISIAK *et al.*, 2017). Esta fase pode seguir a depuração do HBeAg e a formação de anticorpos anti-HBe, durante o terceiro estágio ou decorrer diretamente do estágio de resposta imunológica exacerbada da segunda fase da doença crônica (INOUE; TANAKA, 2016; EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, 2017). Vale ressaltar que no primeiro caso, quando não ocorre dano hepático severo, o prognóstico da doença é considerado promissor. Já no segundo caso, os pacientes apresentam elevado risco de desenvolverem cirrose e carcinoma hepatocelular (INOUE; TANAKA, 2016; LOK, 2019).

O quinto e último estágio da doença crônica é conhecido como infecção oculta pelo HBV. A presente fase é definida pela persistência do DNA viral no fígado (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, 2017). As concentrações séricas do DNA viral podem ser baixas ou indetectáveis com a

presença de anticorpos anti-HBe e presença ou ausência anticorpos anti-HBs. Ademais, os níveis de HBsAg no sangue destes indivíduos geralmente são indetectáveis (INOUE; TANAKA, 2016; FLISIAK *et al.*, 2017). A reativação da doença pode ocorrer espontaneamente nesta fase ou em decorrência de terapias imunossupressoras (SCHILLIE *et al.*, 2018).

1.3 Marcadores sorológicos e metodologias diagnósticas

1.3.1 Marcadores sorológicos e significado de sua presença

Do ponto de vista clínico, as hepatites virais apresentam-se de forma bastante similares. Portanto, o diagnóstico laboratorial do agente etiológico da doença é de crucial importância (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; CHANG *et al.*, 2019). O HBsAg e os anticorpos anti-HBc são os marcadores detectados por métodos sorológicos presentes em todas as fases da infecção (BRASIL, 2008). Portanto, para fins diagnósticos, juntamente com a detecção de ácidos nucleicos virais representam os marcadores preferencialmente utilizados tanto na triagem, quanto na confirmação da infecção pelo HBV (Quadro 1) (BRASIL, 2017a).

Quadro 1 - Hepatite B e seus principais marcadores sorológicos.

Marcador	Significado
HBV DNA	Marcador mais específico da infecção. Este pode ser detectado em média a partir do 15º dia de infecção.
HBsAg	Primeiro marcador sorológico a surgir na infecção. Sua presença por mais de seis meses é indicativa da cronicidade da doença. Este marcador sorológico está, geralmente, presente durante toda a infecção, tanto aguda, quanto crônica.
HBeAg	Indica replicação viral. Na infecção crônica está presente enquanto ocorrer replicação viral, exceto em cepas com mutação, não produtoras da proteína “e”.
Anti-HBc IgM	Marcador de infecção recente está no soro até seis semanas após a infecção. Na infecção crônica, pode estar presente enquanto ocorrer replicação viral.
Anti-HBc IgG	Marcador de longa duração, presente nas infecções agudas e crônicas. Sua presença também representa contato prévio com o vírus.
Anti-HBe	Surge após o desaparecimento do HBeAg e indica o fim da fase replicativa. Sua presença sugere redução ou ausência de replicação viral, exceto nas cepas com mutação, não produtoras da proteína “e”.
Anti-HBs	É o único anticorpo que confere imunidade ao HBV. Está presente no soro após o desaparecimento do HBsAg, sendo indicador de cura e imunidade. Está isoladamente presente em pessoas vacinadas.

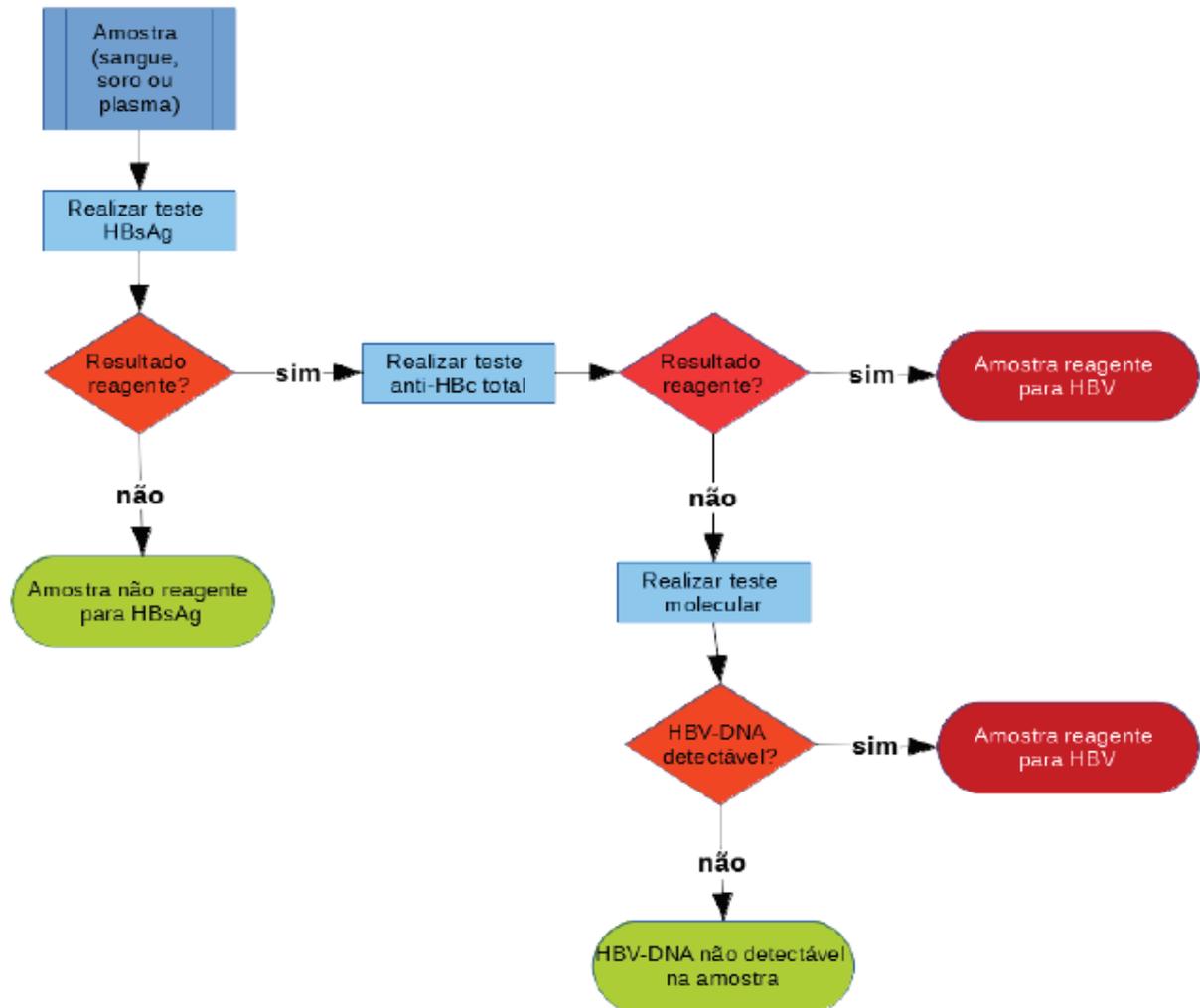
Fonte: (Adaptado de BRASIL, 2008).

Dentre os ensaios laboratoriais para a detecção sorológica de marcadores da hepatite B, existem aqueles que podem ser realizados estritamente em laboratórios e os que podem ser realizados em ambiente ambulatorial (BRASIL, 2008; COFFIN; ZHOU; TERRAULT, 2019). O algoritmo para o diagnóstico clínico da hepatite B fornecido pelo Ministério da Saúde em seu Manual Técnico para o diagnóstico das Hepatites Virais pode ser verificado na Figura 7 (BRASIL, 2018a).

Segundo a Portaria de Consolidação nº 5/2017 do Ministério da Saúde, quando os ensaios para a detecção da presença do HBsAg em amostras de soro ou plasma testadas apresentam resultados reativos ou inconclusivos para a presença do antígeno em diagnósticos individuais no serviço de atendimento à saúde da população, testes confirmatórios para a infecção são necessários (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2018a). De acordo com a legislação, a confirmação diagnóstica de amostras suspeitas da presença do vírus HBV pode ser realizada por meio de ensaios de neutralização, por pesquisa de ácidos nucleicos ou por meio de um segundo teste de outra metodologia, fabricante ou outro antígeno, além da pesquisa de anticorpos anti-HBc totais (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2018a).

No que diz respeito aos Serviços de Hemoterapia, a Portaria de Consolidação nº 5/2017 do Ministério da Saúde, determina a obrigatoriedade da realização de exames laboratoriais de alta sensibilidade para a liberação de bolsas de sangue e hemocomponentes. Estes exames visam à detecção de possíveis marcadores sorológicos para agentes infecciosos de enfermidades que podem ser transmitidas pelo sangue, tais como o HBV, previstos na resolução (BRASIL, 2017a). A Portaria ainda determina que os Serviços de Hemoterapia devem, obrigatoriamente, realizar testes simultâneos para a detecção do HBsAg, anticorpos anti-HBc totais e para a detecção do material genético do vírus HBV antes da liberação da bolsa de sangue (BRASIL, 2017a).

Figura 7 – Algoritmo para o diagnóstico clínico da hepatite B.



Fonte: (BRASIL, 2018).

1.3.2 Metodologias utilizadas no diagnóstico do HBV

1.3.2.1 Teste rápido ou imunocromatográfico

Os Testes rápidos são imunoenaios cromatográficos de execução simples e realizados em até trinta minutos, que utilizam amostras de soro, plasma ou sangue total (BRASIL, 2018a). O teste pode ser utilizado para triagem, sendo estruturalmente composto por uma membrana de nitrocelulose e, durante sua execução, as amostras analisadas migram por capilaridade até a ponta oposta da membrana. No percurso da amostra, as moléculas de HBsAg ligam-se a anticorpos anti-HBs conjugados com um cromógeno na superfície de conjugado situada no

local onde a amostra foi dispensada. Posteriormente, as partículas de HBsAg ligadas a anticorpos anti-HBs, conjugados com cromógenos, interagem com moléculas de anticorpos anti-HBs adsorvidas na linha teste da membrana de nitrocelulose produzindo uma linha colorida. O resultado válido do teste está vinculado ao aparecimento de uma linha colorida em uma área controle localizada após a área teste (BRASIL, 2018a; COFFIN; ZHOU; TERRAULT, 2019) (Figura 8).

Os Testes rápidos apresentam como característica o fato de apresentarem baixo custo, não necessitarem de aparatos laboratoriais e maquinário para sua execução e apresentarem a possibilidade de serem realizados em ambientes ambulatoriais (COFFIN; ZHOU; TERRAULT, 2019).

Figura 8 – Interpretação dos resultados de Testes rápidos.



Fonte: (Adaptado de BRASIL, 2020b).

1.3.2.2 Quimioluminescência

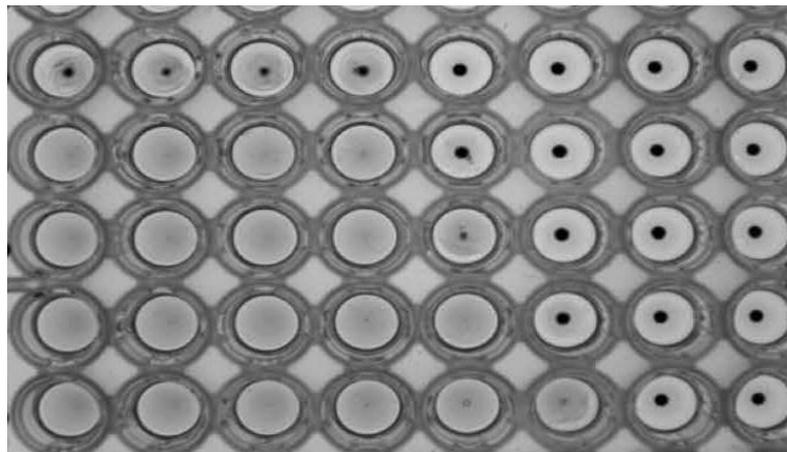
Os testes de Quimioluminescência são imunoenaios que seguem o princípio da reação antígeno-anticorpo de maneira automatizada. Neste ensaio, anticorpos anti-HBs interagem com a amostra dentro de um equipamento específico e, em seguida, é acrescentado um anticorpo anti-HBs secundário conjugado com um composto fluorescente (FERREIRA; MORAIS, 2013). A presença ou a ausência do HBsAg é evidenciada através da intensidade da fluorescência captada pelo aparelho. A fluorescência emitida pela amostra é comparada ao ponto de corte (cut-off) obtido através dos valores encontrados nos controles negativos, positivos e dos calibradores do fabricante da metodologia. A partir disso, o aparelho quantifica os

resultados obtidos para as amostras e, por fim, as classifica como reagentes, não reagentes ou indeterminadas (CIARLINI; CIARLINI; FEITOSA, 2002; BRASIL, 2018a).

1.3.2.3 *Ensaio de Aglutinação*

O Ensaio de Aglutinação é outra metodologia aplicável à triagem sorológica de pacientes (Figura 9). Neste ensaio, partículas adsorvidas com determinantes antigênicos em sua superfície interagem com anticorpos específicos, formando agregados visíveis, sem a necessidade de equipamento próprio para sua leitura. Essas partículas podem ser hemácias, bactérias e protozoários ou partículas inertes constituídas de látex, poliestireno entre outras (FERREIRA; MORAIS, 2013).

Figura 9 – Microplaca de Ensaio de Aglutinação.



Fonte: (FERREIRA; MORAIS, 2013).

1.3.2.4 *Ensaio Imunoenzimático (ELISA)*

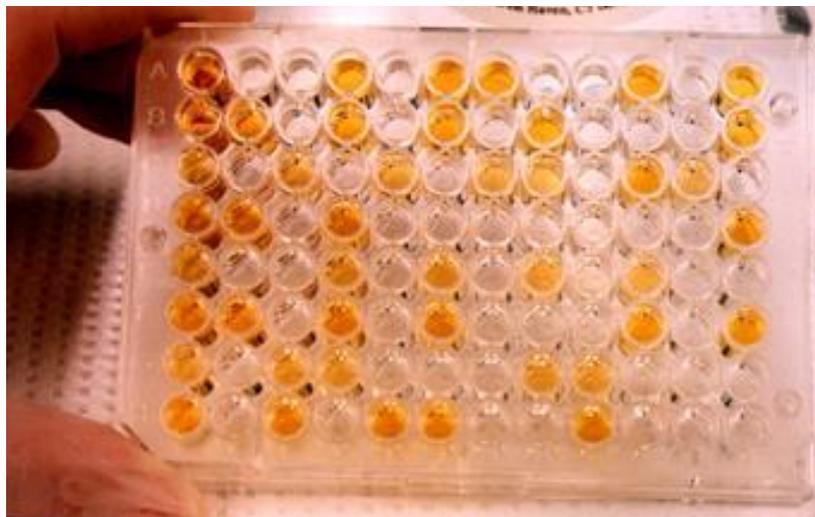
Os ensaios imunoenzimáticos do tipo *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) são utilizados para a detecção de antígenos e anticorpos, podendo ser do tipo sanduíche de um ou dois passos ou competitivos (FERREIRA; MORAIS, 2013).

Os ensaios imunoenzimáticos utilizados para a detecção dos anticorpos anti-HBc, são realizados através da interação entre anticorpos anti-HBc contidos nas amostras teste de soro ou plasma analisados e os antígenos do capsídeo viral imobilizados em uma microplaca. Em seguida é acrescentado um anticorpo anti-HBc secundário conjugado a uma enzima fornecida juntamente com o kit diagnóstico. Os

anticorpos da amostra teste e os anticorpos fornecidos pelo fabricante da metodologia acrescentados durante a análise irão competir pelo sítio de ligação dos antígenos imobilizados na microplaca. Após a incubação e as etapas de lavagem, os reagentes não ligados são removidos. Depois, é acrescentado um substrato cromógeno que reage com a enzima conjugada ao anticorpo secundário, fazendo com que a reação desenvolva uma coloração específica. Nesta metodologia de ELISA do tipo competitiva a densidade óptica das amostras contendo anticorpos anti-HBc é inversamente proporcional à coloração obtida na reação (WAMA, 2016; O’KENNEDY; MURPHY, 2017).

O Ensaio de neutralização é um imunoensaio confirmatório realizado através de metodologia semelhante ao ELISA do tipo sanduíche, utilizando o princípio da neutralização por anticorpos anti-HBs. A amostra biológica de soro ou plasma interage com anticorpos anti-HBs imobilizados na microplaca do kit diagnóstico e, posteriormente, com um segundo anticorpo anti-HBs conjugado com uma enzima. Em seguida é acrescentado um substrato cromógeno que reage com a enzima conjugada ao anticorpo secundário da reação, desenvolvendo uma coloração (Figura 10). O resultado desta reação pode ser observado através redução da densidade óptica, quando comparada a amostra sorológica tratada com o reagente controle fornecido pelo fabricante que não contém anticorpos anti-HBs (ROCHE, 2005; O’KENNEDY; MURPHY, 2017).

Figura 10 – Imagem de um Ensaio Imunoenzimático (ELISA).



Fonte: (Adaptado de EUROIMMUN, 2020).

Os ensaios do tipo ELISA apresentam baixo custo financeiro, alto rendimento de amostras analisadas em período de tempo reduzido, aparato maquinário mínimo para sua execução e elevada sensibilidade e especificidade com alta precisão, caso os reagentes e parâmetros utilizados no ensaio estejam bem padronizados (O'KENNEDY; MURPHY, 2017; BRASIL, 2018a).

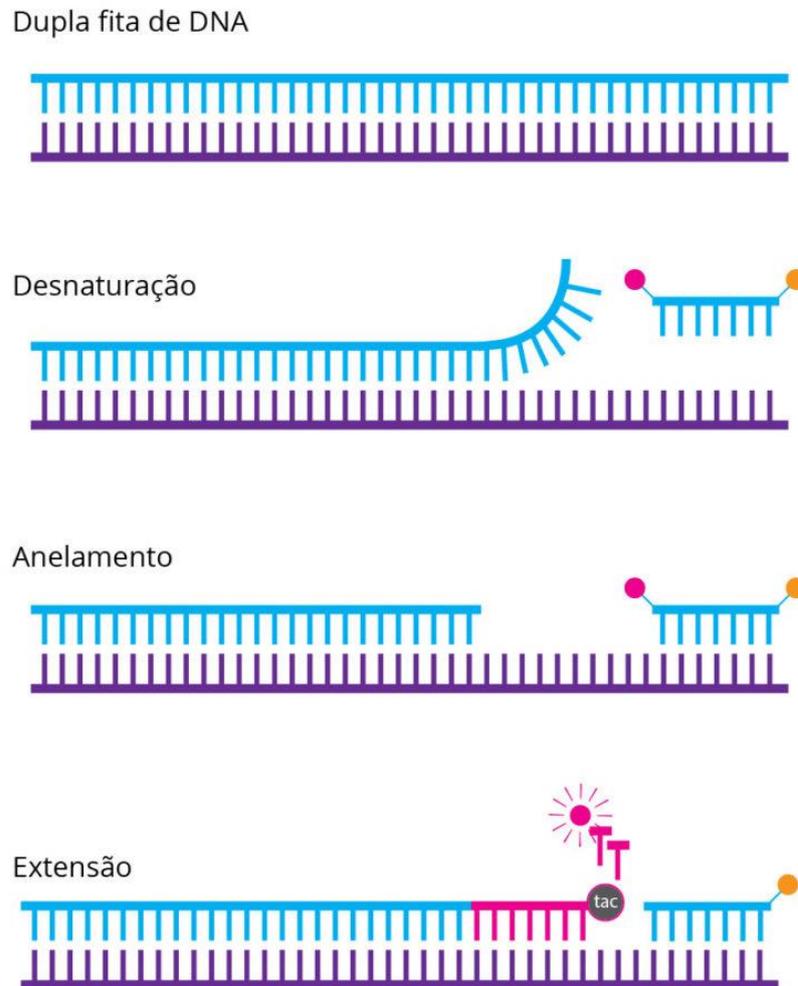
1.3.2.5 Testes para a detecção de ácidos nucleicos do HBV

Os testes para a detecção de ácidos nucleicos do HBV utilizam a metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real. O material genético do vírus pode ser detectado em média após quinze dias da infecção em plena janela imunológica em que outros marcadores da infecção não podem ser identificados (COFFIN; ZHOU; TERRAULT, 2019).

Esta técnica permite a quantificação dos ácidos nucleicos do HBV presentes na amostra de soro ou plasma analisados. Para isso, o material genético presente na amostra é desnaturado e em seguida entra em contato com *primers* marcados com fluoróforos, que se ligam à sequência que se quer amplificar. Em seguida a enzima Taq DNA-polimerase acrescenta novos pares de base, formando o amplicon. Por meio de sua atividade de 5' exonuclease da Taq DNA-polimerase, o fluoróforo é liberado durante os ciclos de replicação e a emissão de fluorescência da amostra é detectada pelo equipamento que acompanha o kit diagnóstico. A fluorescência captada pelo aparelho é diretamente proporcional ao número final de amplicons na amostra (Figura 11). Esta metodologia permite saber a quantidade inicial de material genético viral presente na amostra analisada (CHEVALIEZ; RODRIGUEZ; PAWLOTSKY, 2012).

A metodologia também chamada de *Nucleic Acid Test* (NAT) pode ser considerada tanto um teste de triagem, quando realizada em *pool* de no máximo seis amostras ou confirmatória se realizada em amostras individuais (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2018a).

Figura 11 – Funcionamento da metodologia da reação em cadeia da polimerase em tempo real.



Fonte: (Adaptado de KASVI, 2020).

1.4 Aspectos regulatórios do diagnóstico da hepatite B

De acordo com o Departamento de Segurança do Sangue e Tecnologia Clínica da OMS, as características operacionais dos ensaios para detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B devem visar seu melhor desempenho, enfocando tanto na facilidade de sua execução, quanto em alta sensibilidade e especificidade diagnósticas. Entende-se por sensibilidade diagnóstica, o percentual

de resultados verdadeiros positivos obtidos, quando o antígeno objeto da análise está presente na amostra de indivíduos sabidamente portadores da enfermidade. Já a especificidade diagnóstica é descrita como o percentual de resultados verdadeiros negativos obtidos em amostras de indivíduos não portadores da enfermidade em questão (BRASIL, 2015). Ademais, os ensaios de qualidade desses produtos, devem conter amostras bem caracterizadas de diferentes regiões geográficas e avaliadas quanto à soroconversão e espécies de títulos baixos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001).

Desde 1988, a Organização Mundial da Saúde recomenda a avaliação da qualidade dos kits para diagnósticos de uso *in vitro* comercializados para hepatite B e outras doenças de interesse à saúde pública (BRASIL, 2018a). Tanto os testes que detectam anticorpos, quanto os que identificam antígenos em amostras biológicas de indivíduos, suspeitos de estarem infectados pelo HBV, devem apresentar alta sensibilidade (100%) e especificidade ($\geq 99\%$), a fim de evitar resultados falso-negativos e falso-positivos, respectivamente (BRASIL, 2018a). Os resultados falso-negativos representam um grave risco à saúde pública, enquanto que, os resultados falso-positivos, significam prejuízo individual ao paciente ou ao potencial doador de sangue em Serviços de Hemoterapia (BRASIL, 2010a).

Diante disso, buscando aprimorar os sistemas de controle da qualidade desses produtos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia federal, vinculada ao Ministério da Saúde, através da atribuição concedida pela Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, atualmente regulamentada pelo Decreto nº 8.077, de 14 de agosto de 2013, institui que quaisquer produtos, sejam nacionais ou estrangeiros, abordados na Lei nº 6.360/1976, não poderão ser produzidos em nosso país ou comercializados em território nacional sem a devida autorização prévia da ANVISA (BRASIL, 1976; BRASIL, 1999; BRASIL, 2013).

Para fins de regularização junto à ANVISA, os produtos para diagnóstico *in vitro* são enquadrados em classes de risco que variam de I à IV (BRASIL, 2015). Essa classificação é baseada em critérios, tais como: a indicação especificada pelo fabricante, nível de conhecimento técnico do usuário destinado, relevância/impacto individuais e para a saúde coletiva do resultado obtido, além de sua relevância epidemiológica. Os produtos de classe III e IV merecem potencial destaque nesta classificação. Os impactos de seus resultados são classificados como de altos riscos

individuais e de médios a altos riscos à saúde pública, respectivamente (BRASIL, 2015).

Segundo a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 36 de 26 de agosto de 2015, em conformidade com o previsto no inciso IV do artigo 16 da Lei nº 6.360/76, produtos de classe IV, destinados ao diagnóstico de uso *in vitro* e testes de triagem em bancos de sangue, são passíveis de análise prévia em uma unidade da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (BRASIL, 1976; BRASIL, 2015). Tais produtos compreendem, desde reagentes imunohematológicos de sistemas de tipagem sanguínea, até testes diagnósticos destinados à detecção das hepatites virais B e C, HIV, HTLV, Sífilis, Doença de Chagas e, mais recentemente Dengue. Vale ressaltar que o monitoramento de tais produtos pós-mercado, a Tecnovigilância, também é de competência dos órgãos de Vigilância Sanitária, conforme preconizado pela legislação (BRASIL, 1976; BRASIL, 2009; BRASIL, 2018b).

Para essa finalidade, foi fundado em 1981, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Trata-se de uma unidade de referência para questões científicas e tecnológicas relativas ao controle de qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária que visa contribuir para a promoção e recuperação da saúde, além da prevenção de doenças em função do bem estar da população brasileira (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019). Neste contexto, cabe ao INCQS, como uma unidade federal ligada a Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, a responsabilidade de analisar os kits para diagnóstico *in vitro* comercializados em nosso país, através das modalidades prévia, fiscal e controle, conforme previsto na legislação brasileira (BRASIL, 1976; BRASIL, 2015).

1.5 Confecção e validação do painel sorológico reagente para o HBsAg

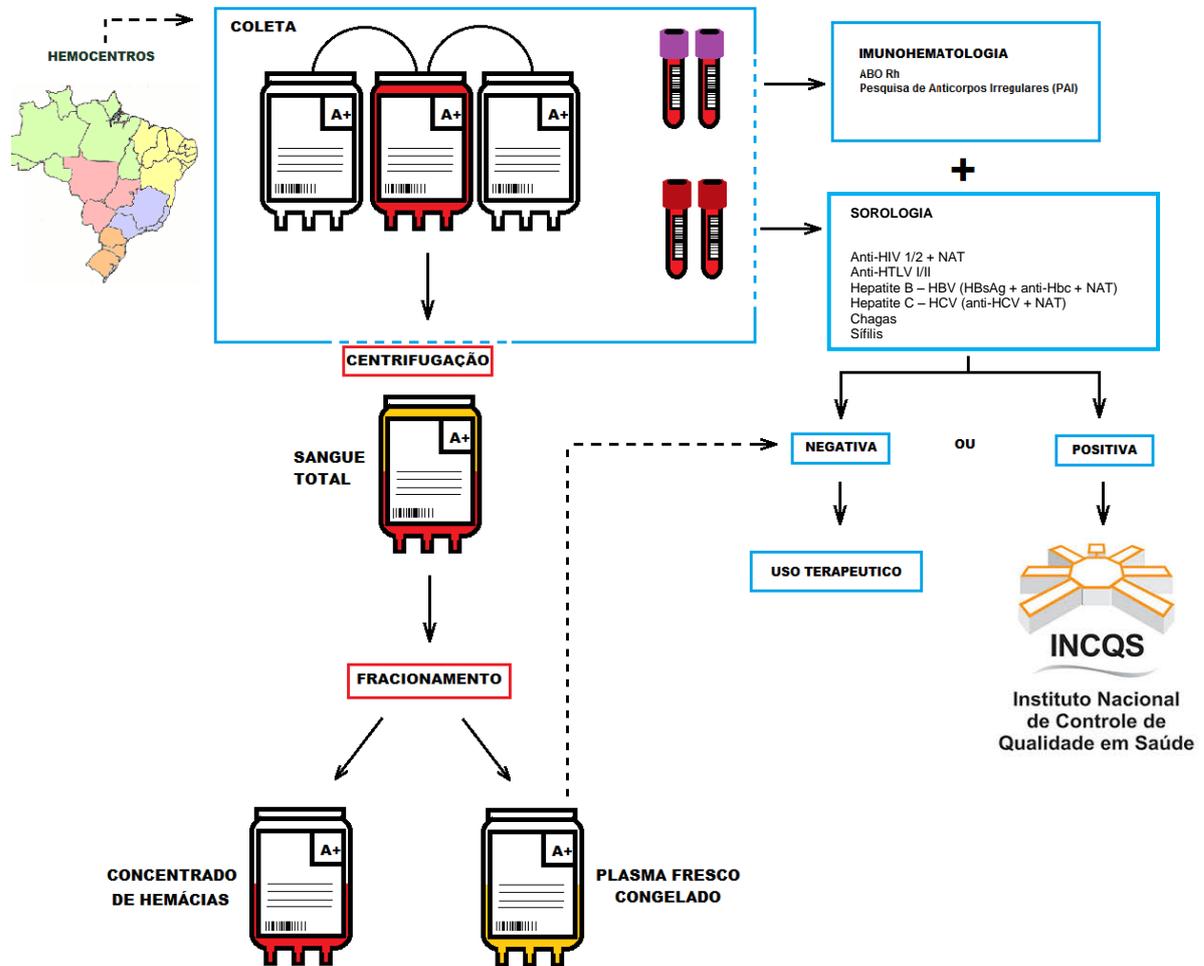
Com a finalidade de auxiliar nas análises de sensibilidade de kits para diagnóstico de uso *in vitro*, foi confeccionado no Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), um painel sorológico constituído de amostras reagentes, verdadeiro positivas para a detecção do HBsAg (DE BRITTO, 2008).

A confecção do painel sorológico reagente para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B ocorreu a partir de unidades de plasma consideradas impróprias para uso terapêutico, segundo as diretrizes, na época, da RDC nº 153/2004 (BRASIL, 2004), atualmente regulada pela Portaria de Consolidação nº 5/2017 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017a). As unidades de plasma foram fracionadas à partir do sangue total de doadores de Serviços de Hemoterapia, colhidos com anticoagulante CPDA-1 (Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina) (Figura 12). A solicitação formal para o envio dessas unidades de plasma ao Laboratório de Sangue e Hemoderivados é realizada junto à Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017a).

As unidades de plasma foram encaminhadas ao LSH/INCQS congeladas e acondicionadas em caixas térmicas, acompanhadas pela documentação pertinente, conforme previsto pela RDC nº 153/2004 (BRASIL, 2004). Dentre as informações fornecidas juntamente com a entrega da unidade de plasma podemos citar: o nome da instituição que coletou a amostra de plasma, data da coleta, iniciais do doador, volume aproximado de plasma coletado e resultado da sorologia, quando aplicável (BRASIL, 2004).

No ato do recebimento, as unidades de plasma foram cadastradas em caderno de ata, conforme previsto pelo POP nº 65.3420.013 do LSH/INCQS (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2012a). Após o cadastro, as unidades receberam uma identificação alfanumérica exclusiva criada para o LSH até a sua caracterização como parte integrante de um painel sorológico validado do laboratório (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2012a).

Figura 12 - Obtenção das unidades de plasma.



Fonte: Do autor, 2020.

ABO Rh: Sistema ABO e Fator Rh; anti HIV 1/2: Anticorpos anti-Vírus da Imunodeficiência Humana tipos 1 e 2; anti HTLV I/II: Anticorpos anti-Vírus Linfotrófico de Células T Humana; HBV: Vírus da Hepatite B; HBsAg: Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B; Hbc: Antígeno do core do vírus da Hepatite B; HCV: Vírus da Hepatite C; anti-HCV: Anticorpos anti-Vírus da Hepatite C; NAT: Teste de Ácido Nucleico.

Todo procedimento de validação de processos é parte integrante da política de Garantia da Qualidade de uma instituição (BRASIL, 2001). Segundo a Norma ABNT/NBR ISO/IEC 17025:2017, os laboratórios de ensaio devem validar métodos não normalizados ou desenvolvidos no próprio local (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017). O ato de validar atesta que os procedimentos ou processos executados em laboratórios de ensaios realmente conduzam aos resultados esperados (BRASIL, 2019b).

A caracterização do painel sorológico reagente para o HBsAg ocorreu através das regras da legislação vigente no período da validação para triagem sorológica de doadores em Serviços de Hemoterapia (BRASIL, 2004; DE BRITTO, 2008). Para

isso, as unidades de plasma foram testadas frente às patologias: HBV, HIV-1/2, HCV, HTLV-I/II, Doença de Chagas e Sífilis (DE BRITTO, 2008).

Para a caracterização inicial das amostras de plasma foram realizados os seguintes testes:

- a) Um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos contra HTLV-I/II, HCV, *T. cruzi* (Doença de Chagas), Sífilis, além da detecção de anticorpos anti-HBc e do HBsAg do vírus da hepatite B;
- b) Dois ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos contra o HIV-1/2;
- c) Um teste da metodologia *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL) e/ou *Rapid Test Reagin* (RPR) para a Sífilis.

Após a verificação dos resultados de triagem dos plasmas recebidos, cada amostra positiva para a presença do HBsAg do vírus da hepatite B e negativa para as demais patologias pesquisadas seguiram para a próxima etapa da validação (DE BRITTO, 2008). Nesta etapa, as unidades de plasma foram analisadas frente a diferentes metodologias buscando a confirmação dos resultados obtidos na etapa de triagem. Para isso, foram utilizados três ensaios imunoenzimáticos com princípios metodológicos distintos, um ensaio de Quimioluminescência e um ensaio para a detecção de ácidos nucleicos (NAT) (DE BRITTO, 2008).

Depois da validação do painel sorológico, as amostras de plasma constituintes do painel verdadeiro positivo para a detecção do HBsAg tiveram parte de seus volumes aliquoteados em criotubos de dois mililitros e mantidas em caixas Criobox. Outra parte dessas amostras de plasma foram armazenadas em tubos falcon de 50 mL ou em garrafas do tipo Nalgene de volumes diversos. Para a utilização na rotina de trabalho do laboratório foi montada uma caixa Criobox contendo um criotubo de cada amostra de plasma validado na confecção do painel sorológico. Estas amostras de uso em rotina são mantidas refrigeradas a 4°C. Os volumes restantes de cada amostra identificada foram congelados à -30°C (DE BRITTO, 2008).

1.6 JUSTIFICATIVA

O painel sorológico reagente para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), objeto do presente trabalho, é uma ferramenta imprescindível para a aferição da sensibilidade diagnóstica dos kits de uso *in vitro*, utilizados na detecção do vírus da Hepatite B. Trata-se do instrumento através do qual o Laboratório de Sangue e Hemoderivados atua em análises prévias, fiscais e controles para a verificação da qualidade e conformidade dos produtos comercializados com fins diagnósticos em nosso país.

A revalidação tornou-se necessária uma vez que a validação do referido painel ocorreu em 2008 (DE BRITTO, 2008), sendo importante a reavaliação das características das amostras verdadeiro positivas, constituintes deste painel para a manutenção da confiabilidade e segurança das análises efetuadas no LSH.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Revalidar o painel sorológico composto por amostras de plasma verdadeiro positivas reagentes para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), mediante análise retrospectiva das respostas de suas amostras de plasma constituintes em kits diagnósticos considerados satisfatórios em análises prévias no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar os kits diagnóstico de uso *in vitro* destinados à detecção HBsAg, registrados nos cadernos de registro de análises anuais, referentes aos anos de 2011 a 2015;
- b) Selecionar os produtos que receberam laudo de análise satisfatório no período mencionado;
- c) Identificar os protocolos de análise contendo as amostras verdadeiro positivas para a detecção do HBsAg;

- d) Determinar os critérios para a revalidação do painel sorológico visando a detecção do HBsAg;
- e) Tabular e avaliar os resultados referentes às amostras do painel reagente para a detecção HBsAg obtidos nas análises dos kits diagnóstico com laudos de análise (LA) aprovados para as seguintes metodologias: Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Testes rápidos ou Imunocromatográficos e Quimioluminescências;
- f) Identificar as amostras que atendem aos critérios de revalidação para compor o painel revalidado.

3 METODOLOGIA

3.1 Local dos procedimentos e análises

O painel sorológico reagente para o HBsAg pertence ao Laboratório de Sangue e Hemoderivados, localizado no Departamento de Imunologia (DI) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), uma unidade pertencente ao campus da Fundação Oswaldo Cruz na cidade do Rio de Janeiro (FIOCRUZ/RJ). O LSH é a unidade laboratorial responsável pela análise prévia, fiscal e controle, na forma da lei, de kits diagnósticos de uso *in vitro* de classes III e IV, hemoderivados e reagentes imunohematológicos comercializados no mercado nacional.

3.2 Painel reagente para a detecção do HBsAg

Atualmente, o painel sorológico reagente para a detecção do HBsAg é composto por 171 amostras de plasma verdadeiro positivas validadas e utilizadas na rotina do laboratório.

O painel sorológico objeto do presente estudo foi anteriormente validado no ano de 2008, como resultado de um trabalho de conclusão de curso de especialização em Vigilância Sanitária no INCQS (DE BRITTO, 2008).

3.3 Identificação dos cadernos utilizados na coleta de dados

Assim como para o recebimento de unidades de plasma, o Laboratório de Sangue e Hemoderivados possui cadernos de registro para o recebimento de kits para o diagnóstico de uso *in vitro* analisados anualmente (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2012b). Estes cadernos recebem uma numeração sequencial e são identificados de acordo com o ano a que se destina. Na Figura 13, pode ser visualizada a imagem do modelo de capa dos cadernos de registros de recebimentos de kits para diagnósticos, segundo POP n° 65.3420.016 do LSH/INCQS (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2012b).

Para o presente estudo, os dados requeridos na revalidação foram determinados do período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015. Ao total são representados por cinco cadernos: 16/2011, 17/2012, 18/2013, 19/2014 e 20/2015.

Figura 13 – Modelo de capa dos cadernos de registro de kits para diagnóstico do LSH.

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INCQS

CADERNO Nº XX

KITS PARA DIAGNÓSTICO DE USO "IN VITRO"

Procedimento para seu preenchimento:

- Preencher as lacunas de identificação do produto cuidadosamente.
- No lado esquerdo fora da planilha, registrar o nº da corrida em algarismo romano.
- Caso seja análise fiscal/perícia de contraprova, registrar também o nº da ata correspondente.
- Na coluna P. Censur: Proceder ao registro de nº total de amostras e o quantitativo de amostras positivas e negativas. **NÃO USAR LUMICOLOR.**
- Caso o ensaio seja invalidado, favor registrar **INVALIDADO** e o motivo do problema.
- TODO TÉCNICO QUE REALIZAR O ENSAIO DEVERÁ REGISTRAR NO RESPECTIVO CADERNO O RESUMO DE SEUS RESULTADOS INDIVIDUAIS.**
- No caso de ensaios com resultados discordantes, registrar na coluna Repetir nº, o nº das amostras e o nº do protocolo correspondente.
- Observar atentamente a sequência e o nº dos protocolos utilizados.

ano **XXXX**

lsh/di/incqs/fiocruz

POP 65.3420.016 – Anexo C – E-1 – Rev. 04
CLASSIFICAÇÃO: 542

Fonte: (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2012b).

Nesses cadernos são registradas as informações sobre o recebimento do produto diagnóstico analisado. Informações estas que abrangem o nome do produto, o fabricante legal, o lote de fabricação, a validade do produto, a metodologia

3.5 Seleção e análise dos protocolos

Durante os ensaios de avaliação dos kits são gerados números de protocolos analíticos contendo os resultados de cada amostra do painel utilizada na análise do produto. Estes números são sequenciais e constam nos referidos cadernos de registro. Para o presente estudo, houve o levantamento e posterior desarquivamento dos números de protocolos analíticos pertencentes aos kits diagnósticos com laudos satisfatórios para a detecção do HBsAg em suas diferentes metodologias analisadas no LSH.

3.6 Tabulação e avaliação dos dados

Com os dados referentes aos seus protocolos analíticos dos testes considerados satisfatórios, foi verificado o comportamento de cada amostra do painel sorológico perante os produtos analisados de diferentes metodologias. Com esses dados foi elaborada uma planilha no programa Excel®, com o registro dos resultados de cada amostra que compõe o painel sorológico frente às metodologias aplicadas a cada kit diagnóstico analisado. As informações contidas em cada planilha foram as seguintes:

- a) Identificação da amostra;
- b) Número do Laudo de Análise de cada produto;
- c) Identificação da metodologia de cada kit analisado;
- d) Número dos protocolos analíticos em que cada amostra foi analisada;
- e) Resultado obtido das amostras em cada teste.

A planilha foi elaborada respeitando as particularidades de cada metodologia analisada de forma que permitisse a maior confiabilidade dos resultados obtidos. Na Tabela 1, em ensaios do tipo ELISA, a padronização dos resultados respeitou rigorosamente a orientação dos respectivos fabricantes quanto à validação dos testes e para os cálculos da densidade óptica (DO), valor do ponto de corte (CO) e para a determinação da razão da amostra, que é a medida da densidade ótica sobre o ponto de corte (DO/CO).

Tabela 1 - Exemplo da tabulação dos dados referentes à metodologia de ELISA.

ELISA					
LA:XXXX/Ano					
Amostra	#N° do protocolo	DO	CO	Razão DO/CO	Resposta
1	1503	4,00	0,462	8,65	POS
2	1503	0,221	0,462	0,478	NEG
3	1503	0,750	0,462	1,62	POS

Fonte: (Do autor, 2020).

Para a metodologia de Quimioluminescência, os resultados são obtidos de maneira automática, através de equipamento específico para o ensaio, por meio da razão entre a Unidade Relativa de Luminescência (RLU) obtida de cada amostra analisada em relação ao ponto de corte do teste (CO). Na Tabela 2, podemos observar o exemplo da tabulação desta metodologia.

Tabela 2 – Exemplificação da tabulação utilizada para os dados referentes à metodologia de Quimioluminescência.

Quimioluminescência				
LA: XXXX/Ano				
Amostra	#N° do protocolo	Resultado	Resposta	
1	2109	8,1	POS	
2	2109	0,4	NEG	
3	2109	5,9	POS	

Fonte: (Do autor, 2020).

Em relação aos testes rápidos ou imunocromatográficos, a tabulação de seus resultados também obedeceu regras similares às anteriores. Como se trata de uma metodologia com menos complexidade em relação aos critérios para a interpretação de seus resultados, foi acrescentada a tabela somente os valores de reatividade das amostras referentes às suas análises, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Exemplo da tabulação dos dados referentes à metodologia de Teste rápido ou Imunocromatográfico.

Teste rápido		
LA:XXXX/Ano		
Amostra	#N° do protocolo	Resposta
1	2316	POS
2	2316	NEG
3	2316	POS

Fonte: (Do autor, 2020).

3.7 Critérios adotados para a revalidação

Os critérios para a presente revalidação foram baseados parcialmente nos critérios utilizados para a validação do painel sorológico que ocorreu em 2008. Dessa forma, foram estabelecidos os seguintes critérios para a revalidação do painel sorológico visando a detecção do HBsAg:

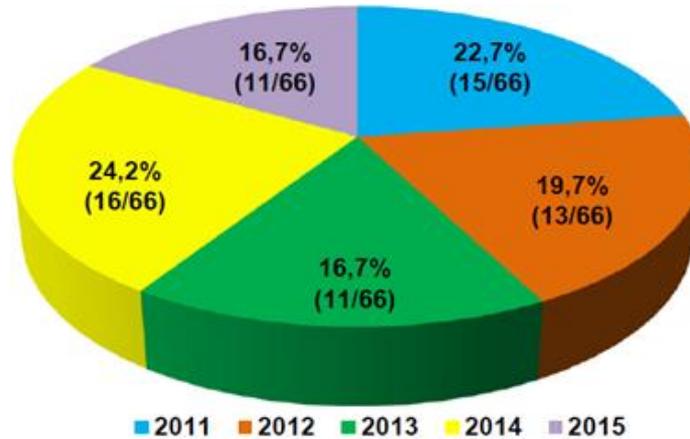
- a) Volumes em estoque iguais ou superiores a 10 mililitros;
- b) Reatividade em três ensaios de Quimioluminescência com razão (RLU/CO) acima de 1,5;
- c) Reatividade em pelo menos três ensaios do tipo ELISA com razão (DO/CO) acima de 1,5;
- d) Reatividade em três Testes rápidos.

4 RESULTADOS

4.1 Levantamento e análise dos dados

No período de 2011 a 2015, o Laboratório de Sangue e Hemoderivados recebeu um total de 66 kits diagnósticos para uso *in vitro* destinados à detecção do HBsAg do vírus da Hepatite B. Destes 66 kits diagnósticos, 22,7% (15/66) foram analisados no ano de 2011, 19,7% (13/66) deles no ano de 2012, 16,7% (11/66) em 2013, 24,2% (16/66) em 2014 e novamente 16,7% (11/66) dos produtos em 2015, como demonstrado no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Distribuição percentual do recebimento de kits para a detecção do HBsAg nos anos de 2011 a 2015.



Fonte: (Do autor, 2020).

Do ano de 2011 a 2015, 77,3% (51/66) dos kits analisados apresentaram laudos de análise satisfatórios e 22,7% (15/66) foram insatisfatórios. No ano de 2011, 66,7% (10/15) dos kits analisados foram satisfatórios. Já no ano de 2012, 76,9% (10/13) apresentaram LA satisfatória. No ano de 2013, 90,9% (10/11) dos produtos analisados foram satisfatórios. Por fim, nos anos de 2014 e 2015, o percentual de kits diagnósticos com laudos de análise satisfatórios foram 75% (12/16) e 81,8% (09/11), respectivamente (Tabela 4).

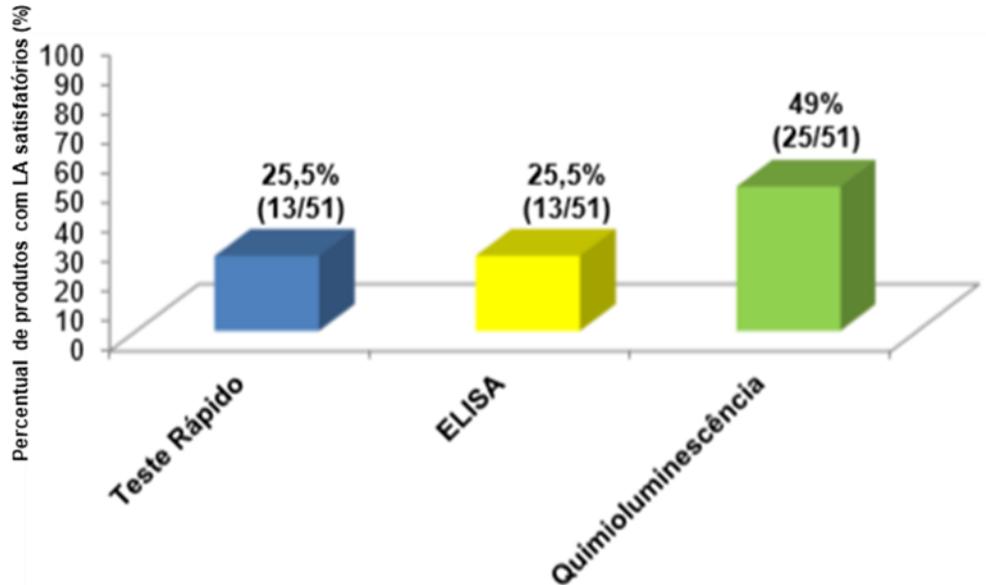
Tabela 4 – Levantamento de dados referente aos kits diagnósticos para a detecção do HBsAg analisados pelo LSH nos anos de 2011 a 2015.

Nº do caderno/Ano da análise	LA Satisfatório	LA Insatisfatório	Kits recebidos
2011	66,7% (10/15)	33,3% (5/15)	15
2012	76,9% (10/13)	23,1% (3/13)	13
2013	90,9% (10/11)	9,1% (1/11)	11
2014	75% (12/16)	25% (04/16)	16
2015	81,8% (09/11)	18,2% (02/11)	11
Total	77,3% (51/66)	22,7% (15/66)	66

Fonte: (Do autor, 2020).

Dos kits diagnósticos considerados satisfatórios, 25,5% (13/51) representavam Testes rápidos, 25,5% (13/51) ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA e 49% (13/51) ensaios de Quimioluminescência (Gráfico 2).

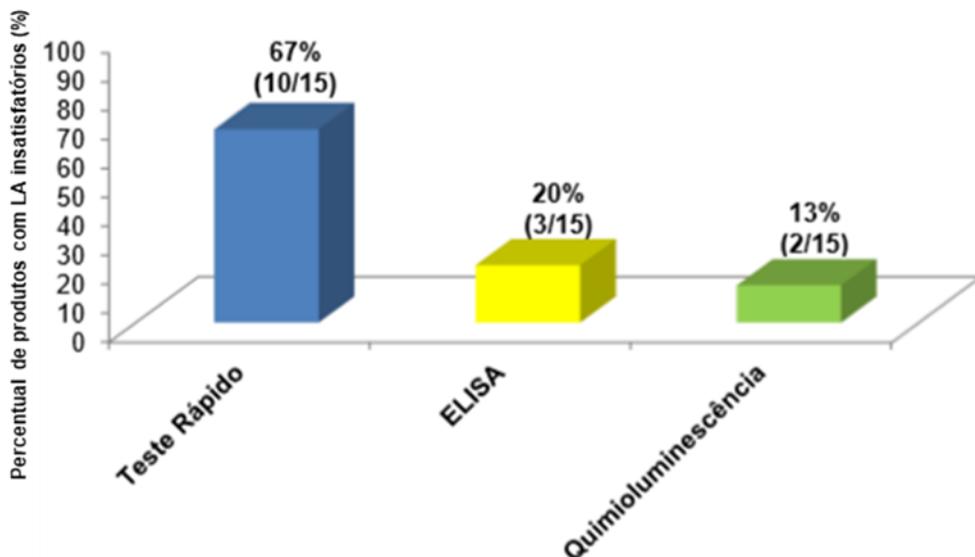
Gráfico 2 – Distribuição percentual dos produtos diagnósticos com Laudos de Análise satisfatórios de 2011 a 2015 por metodologia.



Fonte: (Do autor, 2020).

Em relação aos produtos insatisfatórios, 67% (10/15) representavam Testes rápidos, 20% (3/15) ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA e 13% (2/15) foram ensaios de Quimioluminescência (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Distribuição percentual dos produtos diagnósticos com Laudos de Análise insatisfatórios de 2011 a 2015 por metodologia.



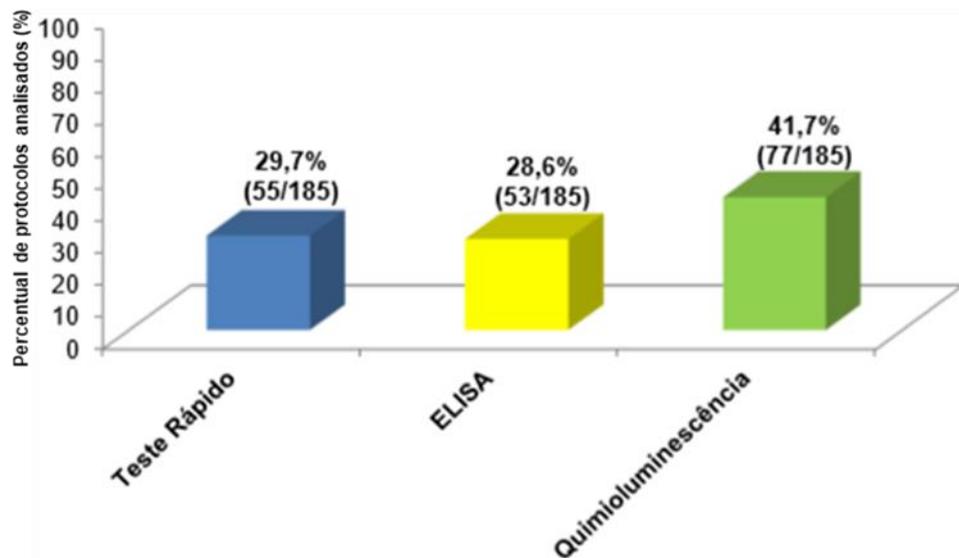
Fonte: (Do autor, 2020).

4.2 Identificação dos protocolos analíticos

Posteriormente a identificação dos kits diagnósticos considerados satisfatórios no período de 2011 a 2015, houve o levantamento dos protocolos analíticos referentes às análises de cada produto. Os protocolos analíticos do Laboratório de Sangue e Hemoderivados são arquivados em caixas devidamente identificadas nas dependências do LSH. Isso permite a rastreabilidade dos protocolos analíticos e beneficiou o levantamento de dados para o presente estudo.

Como podemos verificar no Gráfico 4, foram desarquivados 185 protocolos analíticos para o presente trabalho. Destes, 29,7% (55/185) representavam documentos referentes a Testes rápidos. Além disso, 28,6% (53/185) representavam documentos relacionados à metodologia de ELISA e 41,7% (77/185) pertenciam a ensaios de Quimioluminescência.

Gráfico 4 – Distribuição percentual de protocolos analisados por metodologia.



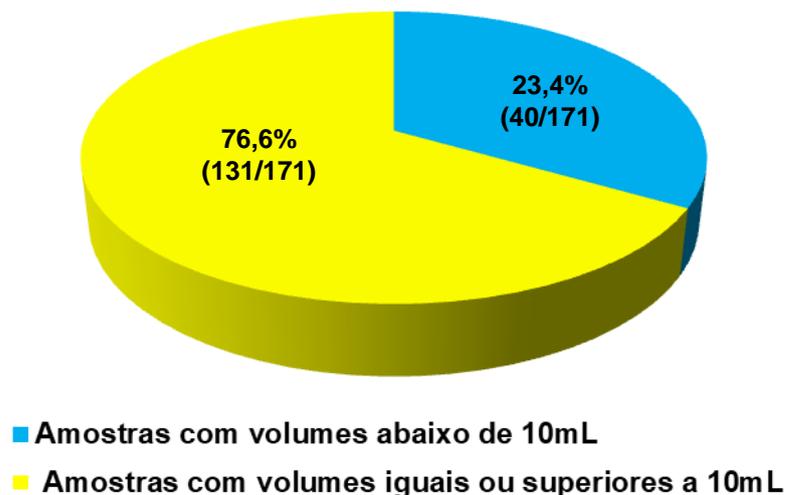
Fonte: (Do autor, 2020).

4.3 Seleção das amostras a serem revalidadas em relação ao critério de volume em estoque

De acordo com o Gráfico 5, podemos verificar que das 171 amostras constituintes do painel sorológico verdadeiro positivo para a detecção do HBsAg, 76,6% (131/171) apresentavam volumes em estoque iguais ou superiores a 10mL. O restante, cerca de 23,4% (40/171) das amostras não apresentavam volume suficiente para cumprir o presente critério de revalidação.

Para o presente estudo, prosseguiram na revalidação somente as 131 amostras que foram aprovadas no critério de volume. As amostras não revalidadas e aquelas que cumpriram o critério de revalidação em relação aos volumes em estoque encontram-se no APÊNDICE A e no APÊNDICE B, respectivamente.

Gráfico 5 – Critério de revalidação referente ao volume das amostras.



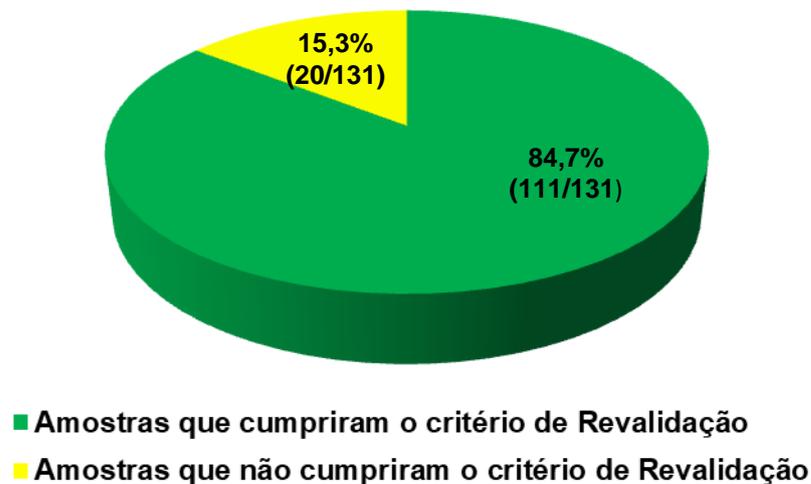
Fonte: (Do autor, 2020).

4.4 Análise das amostras mediante os critérios de reatividade em ensaios

Após a análise dos 185 protocolos, os produtos foram tabelados levando em consideração suas diferentes metodologias. Como podemos observar no Gráfico 6, 84,7% (111/131) das amostras sorológicas apresentaram reatividade em pelo menos três ensaios de ELISA com razão acima de 1,5. As demais amostras, cerca de 15,3% (20/131), não conseguiram atingir o critério de revalidação.

Das 20 amostras não revalidadas nesta metodologia, 30% (6/20) não apresentaram quantitativo de resultados suficiente para a inclusão neste estudo. Destas, uma amostra apresentou somente dois resultados em análises, três amostras foram testadas somente em uma análise e duas amostras não foram testadas em nenhuma análise.

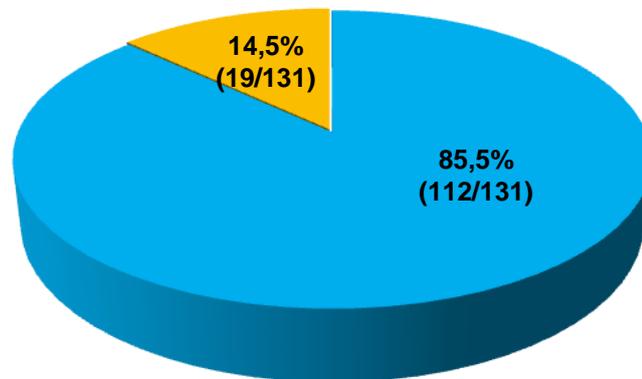
Gráfico 6 – Resultado das amostras de plasma quanto ao critério de revalidação em relação à reatividade em três ensaios do tipo ELISA.



Fonte: (Do autor, 2020).

De acordo com os resultados observados no Gráfico 7, 85,5% (112/131) das amostras sorológicas apresentaram reatividade em pelo menos três ensaios de Quimioluminescência com razão acima de 1,5. O restante, cerca de 14,5% (19/131) não conseguiram atingir este critério de revalidação. Das 19 amostras não revalidadas, 15,8% (3/19) não apresentaram quantitativo de resultados suficiente para a inclusão neste estudo. Destas, duas não foram testadas nenhuma vez e uma delas foi testada apenas duas vezes no período de tempo analisado.

Gráfico 7 – Resultado das amostras de plasma quanto ao critério de revalidação em relação à reatividade em três ensaios de Quimioluminescência.

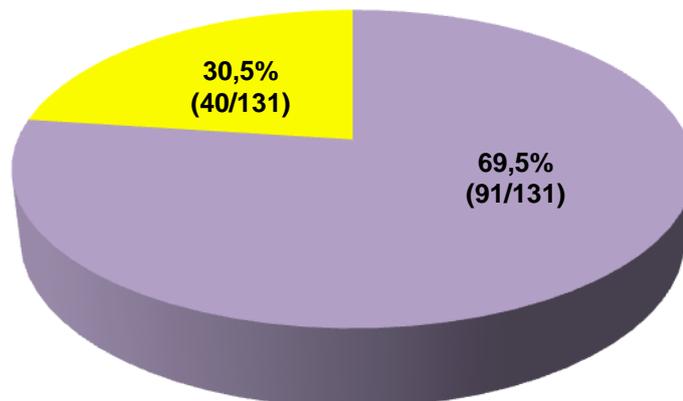


- Amostras que cumpriram o critério de Revalidação
- Amostras que não cumpriram o critério de Revalidação

Fonte: (Do autor, 2020).

Em relação aos Testes rápidos, podemos verificar que 69,5% (91/131) das amostras sorológicas cumpriram o critério de revalidação. O restante, cerca de 30,5% (40/131), não conseguiram atender o presente critério de revalidação (Gráfico 8). Destas, 2,29% (3/131) não apresentaram nenhum resultado para a metodologia no período de tempo analisado.

Gráfico 8 – Resultado das amostras de plasma quanto ao critério de revalidação em relação à reatividade em três testes rápidos.



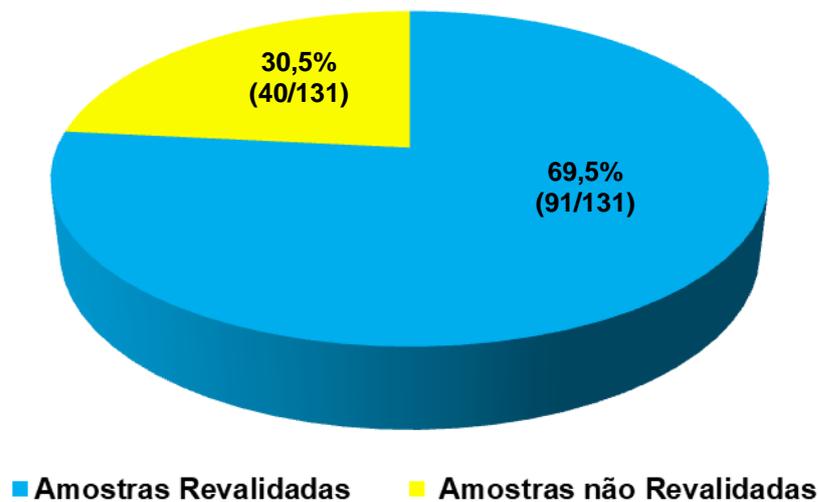
- Amostras que cumpriram o critério de Revalidação
- Amostras que não cumpriram o critério de Revalidação

Fonte: (Do autor, 2020).

4.5 Resultado final da revalidação das amostras verdadeiro positivas

Em relação à reatividade em análises, 69,5% (91/131) das amostras sorológicas atingiram os três critérios de revalidação. Entretanto, 30,5% (40/131) não conseguiram cumprir os critérios estabelecidos estudo (Gráfico 9).

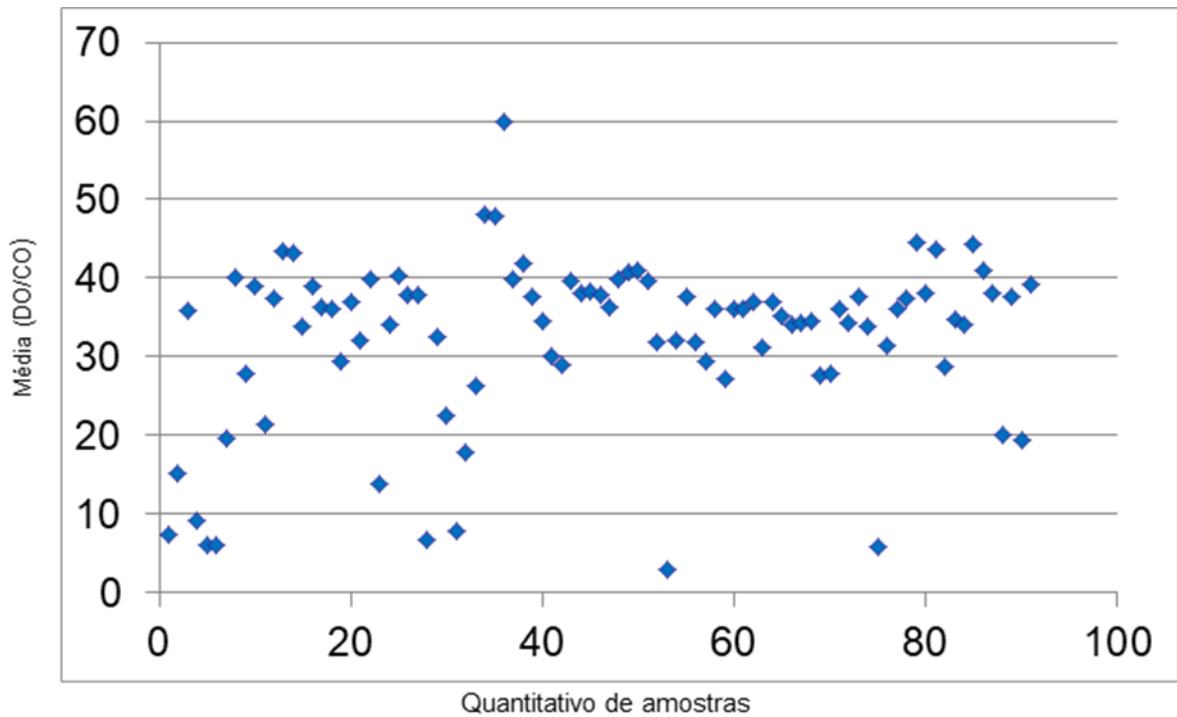
Gráfico 9 – Resultado das amostras de plasma que apresentaram reatividade em três ELISAS, três Quimioluminescências e três Testes rápidos de acordo com os critérios de revalidação.



Fonte: (Do autor, 2020).

No Gráfico 10, podemos verificar a distribuição das razões médias de cada amostra analisada na metodologia de ELISA que cumpriram o presente critério de revalidação. Os valores variaram de 3,03 até 59,87. Deste resultado, 8,8% (8/91) das amostras apresentaram razões médias que variavam de 3,03 a 9,10. Outros 18,7% (17/91) apresentavam razões médias que variavam de 13,92 a 29,28, 57,1% (52/91) variaram de 30,20 a 39,96. Por fim, cerca de 15,4% (14/91), apresentavam razões médias que variavam de 40,00 a 59,87.

Gráfico 10 – Distribuição das razões médias de cada amostra revalidada na metodologia de ELISA.

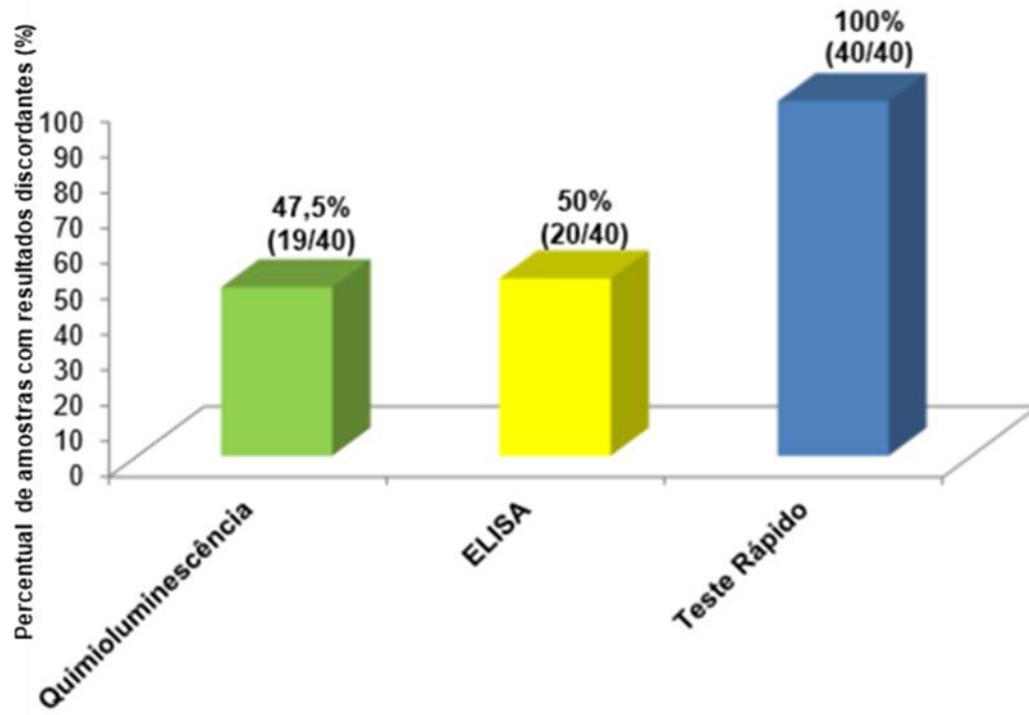


Fonte: (Do autor, 2020).

No que se refere aos 30,5% (40/131) das amostras não revalidadas, 100% foram reprovadas em Testes rápidos, 50% (20/40) nos ensaios de ELISA e 47,5% (19/40) na metodologia Quimioluminescência (Gráfico 11).

As amostras revalidadas que cumpriram os três critérios de reatividade em análises são apresentadas no APÊNDICE C.

Gráfico 11 – Distribuição percentual dos resultados discordantes em relação aos critérios de reatividade nas metodologias analisadas.



Fonte: (Do autor, 2020).

5 DISCUSSÃO

A revalidação de um produto ou processo é a repetição total ou parcial do procedimento de validação (BRASIL, 2010b; BRASIL, 2017b). Segundo as Boas Práticas de Fabricação, procedimentos de revalidação críticas e periódicas são sempre recomendáveis de forma que garantam as características do processo ou a qualidade de seu produto final (BRASIL, 2019b).

A análise retrospectiva de dados é um dos processos de validação aplicáveis a produtos, baseados na revisão e análise de registros históricos, atestando que os objetos dessa revalidação satisfaçam as especificações funcionais e expectativas de desempenho (BRASIL, 2010b).

Desde o ano 2000 o INCQS, através do trabalho realizado pelo laboratório de Sangue e Hemoderivados, atua em análises, prévias, fiscais e controles, na forma da lei, para atender a demanda da Agência Nacional de Vigilância Sanitária quanto à qualidade de kits diagnósticos de uso *in vitro*. A confecção e validação interna de um painel sorológico pelo laboratório de Sangue e Hemoderivados se faz necessária,

pois trata-se de uma ferramenta importante nas análises de sensibilidade realizadas para o registro de kits diagnósticos visando sua comercialização em nosso país ou de produtos que estejam sob investigação técnica. Garantindo, portanto, que após as análises os kits diagnósticos comercializados em nosso país apresentem a maior qualidade e segurança disponíveis no mercado.

A importância de tal medida se dá pelo fato de que certas variações genéticas que categorizam as “quasiespécies” virais do HBV, assim como algumas mutações no determinante “a”, ligante de alta afinidade para os anticorpos neutralizantes anti-HBs, apresentem correlações com alguns genótipos específicos do vírus da hepatite B (KRAMVIS, 2014). Logo, um painel sorológico confeccionado com amostras nacionais representaria de forma mais fidedigna a realidade antigênica do nosso país e minimizaria os riscos de resultados falso negativos em nossa população, tanto nas análises diagnósticas clínicas, quanto na triagem de doadores em Serviços de Hemoterapia. Após aproximadamente onze anos sendo utilizadas em análises no LSH, fez-se necessária a reavaliação das características das amostras constituintes do painel sorológico verdadeiro positivo para a detecção do HBsAg. Essa reavaliação ocorreu através da presente revalidação do painel sorológico.

O painel sorológico objeto desse estudo, inicialmente contava com 171 amostras de plasma. Destas, 40 amostras não apresentaram o volume de trabalho considerado mínimo pelo laboratório para a manutenção dessas amostras no painel sorológico. À princípio, essas amostras sorológicas serão retiradas do painel e utilizadas na confecção de pools para amostras de referência.

Algumas amostras não alcançaram o critério de revalidação em relação à reatividade em análises, por não terem sido quantitativamente testadas no mínimo de três vezes nas metodologias de Teste rápido, ELISA e Quimioluminescência no período de tempo do presente estudo. Essas amostras (6/40) continuarão sua caracterização, até que possam ser, futuramente, incluídas no painel sorológico.

Em virtude da concentração do HbsAg nas amostras e do limite de detecção do kit diagnóstico analisado, resultados não reativos também podem ocorrer nas análises. Das amostras não revalidadas, 50% (20/40) foram reprovadas somente no critério de revalidação em relação à reatividade em Testes rápidos. Uma análise das instruções de uso dos fabricantes dos Testes rápidos aprovados, empregados neste estudo, mostrou que a média dos limites de detecção destes kits diagnósticos foi de 20UI/mL. Esses valores são considerados elevados para amostras sorológicas, pois

em algumas fases da infecção pela hepatite B, as concentrações plasmáticas do HbsAg podem variar de valores abaixo de 2UI/mL a 10 UI/mL (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, 2017). As amostras não revalidadas apresentaram valores entre 0,22 UI/mL e 2,13 UI/mL. Este parece ter sido o fator preponderante para a não reatividade das amostras em análise e, conseqüentemente, a não revalidação das mesmas. As amostras sorológicas não revalidadas apenas em função dos Testes rápidos (20/40) irão compor um painel indeterminado para o marcador. As demais amostras não revalidadas nos critérios de reatividade, cerca de (20/40) serão retiradas do painel sorológico reagente para a detecção do HBsAg.

Outra possibilidade para o comportamento das amostras reprovadas nos critérios de reatividade da presente revalidação, podem ser explicados devido aos seus onze anos em análises ou na temperatura de estocagem do material biológico, que resultaria na queda das concentrações do HbsAg nas amostras (FUNG *et al.*, 2011).

Segundo Ferreira-Vera e colaboradores (2011), produtos de origem biológica não podem sofrer ciclos de congelamento e descongelamento constantes. Após 2 a 3 ciclos de congelamento e descongelamento pode ocorrer significativa perda de analitos do soro de pacientes, o que pode impactar, principalmente, na reatividade de amostras utilizadas em controles de qualidade. Para minimizar este efeito, o LSH mantém alíquotas prontas para uso em criotubos de 2 mL de forma que suas amostras sorológicas em estoque permaneçam a temperaturas constantes de -30°C, evitando assim, ciclos de congelamento e descongelamento frequentes.

Em um estudo de estabilidade com soros controles de um painel sorológico, utilizado em ensaios de proficiência, visando a detecção do HbsAg para avaliação de produtos diagnósticos de uso *in vitro*, publicado por Wang e colaboradores (2012), verificou-se que as melhores temperaturas de acondicionamento para amostras sorológicas correspondem a -20°C ou -80°C. Desta forma, o painel manteria suas características quanto à sensibilidade e especificidade diagnósticas em análises no intervalo de 2 anos.

Já Fung e colaboradores (2011), demonstraram que amostras de soro congeladas a -20°C por um ano contendo moléculas de HbsAg mantiveram suas características antigênicas. Além disso, em amostras de soro, a depleção do antígeno HbsAg foi estatisticamente não significativa a temperaturas de 4°C, quando

comparadas a temperatura de -20°C, no mesmo período de tempo analisado (FUNG *et al.*, 2011).

Até o presente momento, não foram encontradas referências sobre estudos de estabilidade em amostras de plasma que discorressem sobre a conservação de antígenos virais, principalmente em relação ao HbsAg, que seria de relevante importância para o presente trabalho.

6 CONCLUSÃO

A identificação e utilização dos kits de diagnóstico de uso *in vitro* que obtiveram Laudos de Análises satisfatórios para a detecção do HbsAg entre janeiro de 2011 e dezembro de 2015 possibilitou confiabilidade nos resultados obtidos e, conseqüentemente a revalidação do painel sorológico.

A tabulação dos resultados foi de crucial importância para o acompanhamento individual das amostras constituintes do painel sorológico frente a cada um dos critérios de revalidação em relação às metodologias analisadas.

As amostras de plasma constituintes de um painel sorológico são matérias-primas esgotáveis e de volumes limitados, havendo a frequente necessidade de renovação das suas amostras constituintes.

Devido a escassez de bibliografia especializada, não se sabe muito sobre o efeito do tempo na estabilidade das amostras de plasma contendo antígenos virais, dentre os quais o HbsAg faz parte. A instabilidade do material biológico parece ser um dos principais responsáveis pelo resultado discordante de algumas amostras.

O limite de detecção dos Testes rápidos nas análises também foi preponderante para os resultados discordantes de algumas amostras não revalidadas.

Como resultado da presente revalidação, o painel sorológico verdadeiro positivo para a detecção do HbsAg passou a ser composto de 91 amostras de plasma. Essas amostras serão utilizadas no controle da qualidade dos produtos diagnósticos utilizados em Serviços de Hemoterapia e no diagnóstico clínico de uma doença tão relevante para a saúde pública quanto é a hepatite B, contribuindo para a confiabilidade dos laudos liberados pelo Laboratório de Sangue e Hemoderivados.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, ABNT, 2017.

AL-SADEQ, D.W. *et al.* Hepatitis B Virus Epidemiology, Host-Virus Interaction, Coinfection, and Laboratory Diagnosis in the MENA Region: An Update. **Pathogens**, Basel, v. 8, n. 2, p. 63, 2019.

ASPINALL, E.J. *et al.* Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. **Society of Occupational Medicine**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 531-540, 2011.

BALTIMORE GROUP. **Structure of Hepatitis B Virus**. Disponível em: <https://br.depositphotos.com/39584263/stock-illustration-diagram-of-hepatitis-b-virus.html>. Acesso em: 22 jun. de 2019.

BLUMBERG, B.S. *et al.* A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. **Annals of Internal Medicine**, Filadélfia, v. 66, n. 5, p.924-931, 1967.

BRASIL. Lei Federal nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil** [on line]. Brasília, 1976. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br>. Acesso em: 08 jun. 2019.

BRASIL. Lei Federal nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil** [on line]. Brasília, 1999. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br>. Acesso em: 08 jun. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº4**, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico: boas práticas para a produção de medicamentos. Brasília, 2001. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[2962-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[2962-1-0].PDF). Acesso em: 01 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria nº 153, de 14 de junho de 2004**. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. Brasília, 2004. Disponível em: file:///C:/Users/rayny/Downloads/resolu_o_153_2004_anvisa_27943.pdf. Acesso em: 27 nov. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 17, de 16 de abril de 2010 (b). Dispõe sobre as Boas Práticas de

Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** [on line]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br> . Acesso em: 01 jul. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso para diagnóstico in vitro, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** [on line]. Disponível em: <http://www.anvisa.com.br>. Acessado em: 08 jun. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 67, de 21 de dezembro de 2009. Dispõe sobre normas de tecnovigilância aplicáveis aos detentores de registro de produtos para saúde no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** [on line]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br>. Acessado em: 08 jun. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (b). Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** [on line]. Disponível em: Disponível em: <http://www.planalto.gov.br> . Acesso em: 29 nov. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 255, de 10 de dezembro de 2018 (b). Aprova e promulga o Regimento Interno da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa e dá outras providências . **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** [on line]. Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br>. Acesso em: 29 nov. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 301, de 21 de agosto de 2019** (b). Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br> . Acesso em: 29 nov. 2019.

BRASIL. Lei Federal nº 8.077, de 14 de agosto de 2013. Regulamenta as condições para o funcionamento de empresas sujeitas ao licenciamento sanitário, e o registro, controle e monitoramento, no âmbito da vigilância sanitária, dos produtos de que trata a Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. **Coleção de Leis [da] República Federativa do Brasil** [on line]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br>. Acessado em: 08 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v. 50, n. 17, 2019(a).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Blog da Saúde 2020 (b)**. Disponível em: www.pfarma.com.br/noticia-setor-farmaceutico/saude. Acesso em: 23 fev.2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Caderno de atenção primária: rastreamento**. Brasília: Ministério da Saúde 2010(a). (Normas e Manuais Técnicos, n. 29).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Calendário Anual de Vacinação 2020 (a)**. Disponível em: <https://saude.es.gov.br/Media/sesa/Vacina%C3%A7%C3%A3o/Calendario%20acional%20de%20Vacinao>. Acesso em: 23 fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hepatites Virais: o Brasil está atento**. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2008. (Série B. Textos Básicos em Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018(a).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017(a)**. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** [online]. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br>. Acesso em: 21 nov. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Infectious Diseases Related to Travel. **Travelers' Health Disease Directory Hepatitis B**. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov>. Acesso em: 20 jun. 2019.

CHANG, L. *et al.* Demographic characteristics of transfusion-transmitted infections among blood donors in China. **BMC Infectious Diseases**, Londres, v. 19, p. 514, 2019.

CHEVALIEZ, S.; RODRIGUEZ, C.; PAWLOTSKY, J.M. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. **Gastroenterology**, Filadélfia, v. 142, n. 6, p. 1303-1313, 2012.

COFFIN, C.S.; ZHOU, K.; TERRAULT, N. A. New and old Biomarkers for Diagnosis and Management of Hepatitis B Virus Infection. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 156, n. 2, p. 355-368, 2019.

COUROUCÉ-PAUTY, A.M.; PLANCON, A.; SAULIER, J.P. Distribution of HbsAg subtypes in the world. **Vox Sanguinis**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 197-211, 1983.

CIARLINI, L. R. P.; CIARLINI, P. C.; FEITOSA, F. L. F. Quimiluminescência: princípio e aplicações. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**. São Paulo, v. 5, n. 2, p. 181-187, 2002.

DANE, D.S. *et al.* Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis, **Lancet**. Londres, v. 10, n. 7649, p. 695-698, 1970.

DE BRITTO, E.B. **Confecção de painel sorológico para controle da qualidade de conjuntos de diagnóstico para detecção do HBs (HbsAg)**. 2008. 73 f. Tese. (Especialização em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2008.

EUROIMMUN. **Técnica de ELISA**. Disponível em: <https://www.euroimmun.com.br/tecnicas/2/elisa#conteudo>. Acesso: 23 fev. 2020.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 67, p. 370-398, 2017.

FERREIRA, A.W.; MORAES, S.L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guabanara Koogan, 2013, p. 76-82.

FERREIRO-VERA, C. *et al.* Standart operation protocols for analisys of lipid hydroperoxides in human in human serum using a fully automated method based on solid-phase extration and liquid chromatography-mass spectrometry in selected reaction monitoring. **Journal of Chromatology**, Amsterdã, v. 1218, n. 38, p. 6720-6726, 2011.

FLISIAK, L. *et al.* Recommendations for the treatment of hepatitis B in 2017. **Clinical and Experimental Hepatology**, Poznan, v. 3, n. 2, p. 35-46, 2017.

FONSECA, J.C.F. História Natural da Hepatite crônica B. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 6, p. 672-677, 2007.

FUNG, J. Stability of Hepatitis B surface antigen over time: implications for studies using stored 60iru. **Journal of Medical Virology**. Nova Yorque, v. 83, n. 11, p. 1900-1904, 2011.

GANEM, D.; PRINCE, A.F. Hepatitis B Virus Infection – Natural History and Clinical Consequences. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 350, n. 11, p. 1118-1129, 2004.

GENCAY, M. *et al.* Ultra-deep sequencing reveals high prevalence and broad structural diversity of hepatitis B surface antigen mutations in a global population. **PlosOne**, São Francisco, v. 12, n. 5, e0172101, 2017.

GERLICH, W. H. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. **Virology Journal**, Londres, v. 10, p. 239, 2013.

GÓMEZ-MORENO, A.; GARAIGORTA, U. Hepatitis B Virus and DNA Damage Response: Interactions and Consequences for the Infection. **Viruses**, Basel, v. 9, n. 10, p. 304, 2017.

GUO, L. *et al.* Recent Advances in HBV Reactivation Research. **BioMed Research International**, Nova Iorque, ID. 2931402, 2018.

HOSSAIN, G.; HUEDA, K. Investigation of a Novel Hepatitis B Virus Surface (HbsAg) Escape Mutant Affecting Immunogenicity. **PlosOne**, São Francisco, v. 12, n. 1, e0167871, 2017.

INOUE, T.; TANAKA, Y. Hepatitis B 60irus and its sexually transmitted infection – na update. **Microbial Cell**, Graz, v. 5, n. 9, p. 420-437, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3420.013**: Cadastro, Distribuição e Armazenamento de plasma para confecção de painéis sorológicos. Ver. 4. Rio de Janeiro: INCQS, p. 2-4, 2012a.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3420.016**: Registros dos ensaios realizados pelo Laboratório de Sangue e Hemoderivados. Ver. 5. Rio de Janeiro: INCQS, p. 5-14, 2012b.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.1000.001**: Manual da Qualidade. Ver. 26. Rio de Janeiro: INCQS, p. 1, 2019.

JEFFERIES, M. *et al.* Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. **World Journal of Clinical Cases**, Pleasanton, v. 6, n. 13, p. 589-599, 2018.

KASVI. **PCR em tempo real no diagnóstico de doenças 2020** (c). Disponível em: <https://kasvi.com.br/pcr-em-tempo-real-qpcr-diagnostico-doencas/>. Acesso em: 24 fev. 2020.

KIM, B. H.; KIM, W. R. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection in the United States. **Clinical Liver Disease**, Hoboken, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2018.

KRAMVIS, A. Genotypes and Genetic Variability of Hepatite B Virus. **Intervirolgy**, Basel, v. 57, p. 141-150, 2014.

KRAMVIS, A. *et al.* Immunomodulatory Function of HbeAg Related to Short-Sighted Evolution, Transmissibility, and Clinical Manifestation of Hepatitis B Virus. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, 2018.

KUSTYUSHEVA, A. *et al.* Clinical Implications of Hepatitis B Virus RNA and Covalently Closed Circular DNA in Monitoring Patients with Chronic Hepatitis B Today with a Gaze into the Future: The Field is Unprepared for a Sterelizing Cure. **Genes**, Basel, v. 9, n. 10, p. 483, 2018.

LAGO, B.V. *et al.* Hepatitis B Virus Subgenotype A1: Evolutionary Relationships Between Brazilian, African and Asian Isolates. **PlosOne**, São Francisco, v. 9, n. 8, e105317, 2014.

LAMPE, E. *et al.* Nationwide overview of the distribution of hepatitis B virus genotypes in Brazil: a 1000-sample multicentre study. **Journal of General Virology**, Londres, v. 98, n. 6, p. 1389-1398, 2017.

LOK, A.S.F. Hepatitis B treatment: What we know now and what remains to be researched. **Hepatology Communications**, Hoboken, v. 3, n. 1, p. 8-19, 2019.

LOPES, T.G.S.L.; SCHINONI, M.I. Aspectos gerais da hepatite B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 337-344, 2010.

MARAOLO, A.E. *et al.* Current evidence on the management of hepatitis B in pregnancy. **World Journal of Hepatology**, Pequim, v. 10, n. 9, p. 585-594, 2018.

OKAMOTO, S. *et al.* Dynamics of hepatitis B virus serum markers in an acute hepatitis B patient in the incubation phase. **Clinical Journal of Gastroenterology**, Tóquio, v. 12, n. 3, p. 218-222, 2018.

O'KENNEDY, R.; MURPHY, C. **Immunoassays**: development, applications and future trends. Singapore: Jenny Stanford Publishing, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Hepatitis B surface antigen assays**: operational characteristics – report 1. Genebra: OMS, p. 2, 2001. Disponível em: [irus://apps.who.int](http://apps.who.int). Acesso em: 08 jun. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global status report on blood safety and availability**. Genebra: OMS, p. 27-28, 2016. Disponível em: [irus://apps.who.int](http://apps.who.int). Acesso em: 20 jun. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global hepatitis report**. Genebra: OMS, p. 7, 2017a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines on hepatitis B and C testing**. Genebra: OMS, 2017b.

PERAZZO, H. *et al.* Age-Standardized mortality rates related to viral hepatitis in Brasil. **BMC Infectious Diseases**, Londres, v. 17, p. 527, 2017.

PUDELCO, P.; KOEHLER, A.E.; BISETTO, L.H.L. Impacto da vacinação na redução da hepatite B no Paraná. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, Porto Alegre, v. 35, n. 1, 2014.

ROCHE. Cobas. **Elecsys HbsAg Confirmatory Test**. Instrução de Uso. Roche Diagnostic GmbH. Mannheim, 2010.

SCHILLIE, S. *et al.* Prevention of Hepatitis B Virus INFECTION IN THE United States: Recommendations of the Advisory Committee Immunization Practices. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 67, n. 1, p. 1-31, 2018.

SEEGER, C.; MASON, W.S. Molecular Biology of Hepatitis B Virus Infection. **Virology**, Nova Iorque, v. 480, p. 672-686, 2015.

SOUTO, F.J. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21st century. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 1, p. 11-23, 2016.

TAUIL, M.C. *et al.* Mortalidade por Hepatite Viral no Brasil, 2000-2009. **Escola Nacional de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 472-478, 2012.

TAI, K.N.; KUO, C.F.; OU, J.H.J. Mechanisms of Hepatitis B Virus Persistence. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 33-42, 2018.

TU, T. *et al.* HBV DNA Integration: Molecular Mechanism and Clinical Implications. **Viruses**, Basel, v. 9, n. 4, p. 75, 2017.

VENKATAKRISHNAN, B.; ZLOTNIC, A. The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. **Annual Review of Virology**, Palo Alto, v. 3, n. 1, p. 429-451, 2016.

WAMA. **Imuno-ELISA Anti HBcAg Total**. Instrução de Uso. WAMA Diagnóstica, 1ª Ed., 2016.

WANG, K.T. *et al.* Collaborative study to establish a proficiency panel of Hepatitis B surface antigens for evaluating in vitro diagnosis. **Biologicals: Journal of International Association of Biological Standardization**. Londres, v. 40, n. 5, p. 445-450, 2012.

WU, C. *et al.* Amino Acid Substitutions at Positions 122 and 145 of Hepatitis B Surface Antigen (HbsAg) Determine Antigenicity and Immunogenicity of HbsAg and Influence In Vivo HbsAg Clearance. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 86, n. 8, p. 4658-4659, 2012.

ZHANG, Z.H. *et al.* Genetic variation of hepatitis B 63irus it's significance for pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v. 22, n. 1, p. 126-144, 2016.

APÊNDICE A – AMOSTRAS NÃO REVALIDADAS EM RELAÇÃO AO CRITÉRIO DE VOLUMES EM ESTOQUE IGUAIS OU SUPERIORES A 10ML

AMOSTRAS	Volume total	AMOSTRAS	Volume total
B10	9 mL	3426	Volume esgotado
2146	7,2 mL	3436	Volume esgotado
2204	9 mL	3532	Volume esgotado
2210	5,4 mL	4310	Volume esgotado
2215	Volume esgotado	4313	Volume esgotado
2266	Volume esgotado	4336	Volume esgotado
2434	Volume esgotado	4680	7,2 mL
2436	Volume esgotado	5177	5,4 mL
2437	Volume esgotado	5183	7,2 mL
2439	Volume esgotado	5191	9 mL
2440	Volume esgotado	5421	Volume esgotado
2441	1,8 mL	BC 10	3,6 mL
2446	1,8 mL	BC 14	1,8 mL
2461	Volume esgotado	BC 33	1,8 mL
2533	Volume esgotado	BC 38	5,4 mL
2547	1,8 mL	BC 2909	9 mL
2830	Volume esgotado	BC 4302	Volume esgotado
3235	1,8 mL	BC 4318	9 mL
3242	3,6 mL	BC 4322	3,6 mL
3320	7,2 mL	BC 4335	9 mL

Fonte: (Do autor, 2020).

**APÊNDICE B – AMOSTRAS REVALIDADAS EM RELAÇÃO AO CRITÉRIO DE VOLUMES EM ESTOQUE EM ESTOQUE IGUAIS OU SUPERIORES A 10ML
(continua)**

AMOSTRAS	Volume total	AMOSTRAS	Volume total
B19	89 mL	4312	23 mL
B21	10,8 mL	4314	51 mL
2144	86 mL	4317	31,2 mL
2188	43 mL	4340	33 mL
2221	16,2 mL	4380	59,8 mL
2243	41 mL	4382	14,4 mL
2380	28 mL	4435	41 mL
2438	27 mL	4528	105 mL
2442	38 mL	4530	160 mL
2443	28 mL	4542	80 mL
2686	16,2 mL	4584	25,5 mL
3008	65 mL	4627	88 mL
3009	61 mL	4630	45 mL
3125	29,8 mL	4729	70 mL
3126	35 mL	4757	73 mL
3127	39 mL	5178	12,6 mL
3171	110 mL	5179	12,6 mL
3178	92 mL	5184	32 mL
3257	77 mL	5185	12,6 mL
3362	40 mL	5188	10,8 mL
3385	107,3 mL	5189	93 mL
3420	137 mL	5193	16,2 mL
3427	60 mL	5195	12,6 mL
3434	68 mL	5197	12,6 mL
3479	68 mL	5198	14,4 mL
3482	23 mL	5719	60 mL
3527	28 mL	5726	58 mL
3528	98 mL	5738	113 mL
3574	110 mL	5739	115 mL
3575	130 mL	5741	153,8 mL
3576	118 mL	5933	127 mL
3718	178 mL	BC 01	21 mL
3847	23 mL	BC 11	53 mL
3976	115 mL	BC 13	43 mL
4273	33 mL	BC 16	55 mL

Fonte: (Do autor, 2020).

APÊNDICE B – AMOSTRAS REVALIDADAS EM RELAÇÃO AO CRITÉRIO DE VOLUMES EM ESTOQUE EM ESTOQUE IGUAIS OU SUPERIORES A 10ML (conclusão)

AMOSTRAS	Volume total	AMOSTRAS	Volume total
BC 26	37 mL	BC 4510	75 mL
BC 28	85 mL	BC 4511	101 mL
BC 31	18 mL	BC 4512	18 mL
BC 34	100 mL	BC 4513	27 mL
BC 36	10,8 mL	BC 4582	46 mL
BC 37	38 mL	BC 4618	43 mL
BC 39	14,4 mL	BC 4647	55 mL
BC 2435	58 mL	BC 4657	93 mL
BC 2906	66,2 mL	BC 4688	97 mL
BC 3153	153 mL	BC 4742	85 mL
BC 3229	95 mL	BC 4749	99 mL
BC 3378	183 mL	BC 4754	98 mL
BC 3583	173 mL	BC 4768	85 mL
BC 3830	143 mL	BC 4780	128 mL
BC 3955	105 mL	BC 4864	73 mL
BC 4300	30 mL	BC 4876	232 mL
BC 4301	14,4 mL	BC 4943	57 mL
BC 4316	18 mL	BC 5030	30 mL
BC 4320	93 mL	BC 5182	175,2 mL
BC 4321	27 mL	BC 5194	48 mL
BC 4347	41 mL	BC 5306	65 mL
BC 4383	28 mL	BC 5324	70 mL
BC 4384	135 mL	BC 5326	59,2 mL
BC 4392	145 mL	BC 5349	34,2 mL
BC 4437	21 mL	BC 5365	102 mL
BC 4438	54 mL	BC 5372	55 mL
BC 4441	53 mL	BC 5376	100,6 mL
BC 4447	20 mL	BC 5421	58,2 mL
BC 4448	55 mL	BC 5485	100 mL
BC 4496	78 mL	BC 5486	98 mL
BC 4509	65 mL		

Fonte: (Do autor, 2020).

APÊNDICE C – AMOSTRAS REVALIDADAS NOS CRITÉRIOS DE REATIVIDADE EM TESTES (continua)

AMOSTRAS	Status da Revalidação	AMOSTRAS	Status da Revalidação
B21	Revalidada	5726	Revalidada
2188	Revalidada	5738	Revalidada
2221	Revalidada	5739	Revalidada
2243	Revalidada	5933	Revalidada
2438	Revalidada	BC 01	Revalidada
2442	Revalidada	BC 11	Revalidada
2443	Revalidada	BC 13	Revalidada
2686	Revalidada	BC 16	Revalidada
3008	Revalidada	BC 26	Revalidada
3009	Revalidada	BC 28	Revalidada
3125	Revalidada	BC 31	Revalidada
3126	Revalidada	BC 34	Revalidada
3127	Revalidada	BC 36	Revalidada
3171	Revalidada	BC 37	Revalidada
3178	Revalidada	BC 39	Revalidada
3257	Revalidada	BC 2435	Revalidada
3362	Revalidada	BC 3153	Revalidada
3385	Revalidada	BC 3378	Revalidada
3420	Revalidada	BC 3830	Revalidada
3427	Revalidada	BC 3955	Revalidada
3479	Revalidada	BC 4300	Revalidada
3482	Revalidada	BC 4301	Revalidada
3574	Revalidada	BC 4316	Revalidada
3718	Revalidada	BC 4320	Revalidada
3847	Revalidada	BC 4321	Revalidada
3976	Revalidada	BC 4347	Revalidada
4273	Revalidada	BC 4383	Revalidada
4312	Revalidada	BC 4392	Revalidada
4382	Revalidada	BC 4437	Revalidada
4435	Revalidada	BC 4438	Revalidada
4542	Revalidada	BC 4441	Revalidada
4729	Revalidada	BC 4447	Revalidada

Fonte: (Do autor, 2020).

APÊNDICE C – AMOSTRAS REVALIDADAS NOS CRITÉRIOS DE REATIVIDADE EM TESTES (conclusão)

AMOSTRAS	Status da Revalidação
BC 4448	Revalidada
BC 4496	Revalidada
BC 4509	Revalidada
BC 4510	Revalidada
BC 4511	Revalidada
BC 4512	Revalidada
BC 4513	Revalidada
BC 4582	Revalidada
BC 4618	Revalidada
BC 4647	Revalidada
BC 4657	Revalidada
BC 4688	Revalidada
BC 4749	Revalidada
BC 4754	Revalidada
BC 4768	Revalidada
BC 4780	Revalidada
BC 4864	Revalidada
BC 4876	Revalidada
BC 4943	Revalidada
BC 5030	Revalidada
BC 5182	Revalidada
BC 5194	Revalidada
BC 5306	Revalidada
BC 5326	Revalidada
BC 5365	Revalidada
BC 5372	Revalidada
BC 5376	Revalidada

Fonte: (Do autor, 2020).