



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA  
E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA**



**HEPATITE B OCULTA EM SUBGRUPO DE DOADORES DE SANGUE DA  
FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS  
(HEMOAM) E EM GRUPO DE MORADORES DO MUNICÍPIO DE  
EIRUNEPÉ/AM**

**RAISA CLAREANA SILVA RAULINO**

**MANAUS  
2015**

**RAISA CLAREANA SILVA RAULINO**

**HEPATITE B OCULTA EM SUBGRUPO DE DOADORES DE SANGUE DA  
FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS  
(FHEMOAM) E EM GRUPO DE MORADORES DO MUNICÍPIO DE  
EIRUNEPÉ/AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para Defesa no curso de *Mestrado em Ciências Aplicada à Hematologia*.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.Dagmar Kiesslich

**MANAUS  
2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

R235h Raulino, Raisia Clareana Silva

**Hepatite B oculta em subgrupo de doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM) e em grupo de moradores do município de Eirunepé/Am.** /Raisia Clareana Silva Raulino

Manaus: UEA/FHEMOAM. 2015.

70 f.; ilustr. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas em Hematologia) –  
Universidade do Estado do Amazonas e Fundação Hospitalar de  
Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Escola de Ciências da Saúde  
(ESA)

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Dagmar Kiesslich

1. Hepatite B oculta; 2. DNA-HBV; 3. Prevalência; 4. doadores de sangue; 5. Amazônia Brasileira

CDU: 615.18:616.36-002(811.3)



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
APLICADAS À HEMATOLOGIA



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 07/2015

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO (A) ALUNO (A) AO TÍTULO DE MESTRE

TURMA 01/2013

No dia sete do mês de Outubro de 2015, as 9h00, realizou-se a sessão pública da defesa de Dissertação “**Hepatite B oculta em subgrupo de Doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM) e em grupo de moradores do Município de Eirunepé/Am.**”

Apresentada por **Raísa Clareana Silva Raulino** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Hematologia.

A banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

Prof. (a) Dr. (a) **Dagmar Kiesslich** (Presidente)  
Prof. (a) Dr. (a) **Mariane Martins de Araújo Stefani** (Membro interno)  
Prof. (a) Dr. (a) **Márcia da Costa Castilho** (Membro externo)

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dra. Dagmar Kiesslich	Conceito: <u>Aprovada</u>
Prof. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani	Conceito: <u>Aprovado</u>
Prof. Dra. Márcia da Costa Castilho	Conceito: <u>Aprovado</u>

O projeto foi considerado:

Aprovado

Não Aprovado

Manaus, 07 de Outubro de 2015.

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca e pelo aluno (a):

Prof. (a) Dr. (a) **Dagmar Kiesslich** (Presidente) \_\_\_\_\_  
Prof. (a) Dr. (a) **Mariane Martins de Araújo Stefani** (Membro interno) \_\_\_\_\_  
Prof. (a) Dr. (a) **Márcia da Costa Castilho** (Membro externo) \_\_\_\_\_  
Aluno (a) \_\_\_\_\_  
Raísa Clareana Silva Raulino

**DEDICATÓRIA**

A minha mãe Ana Luiza Silva.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a minha mãe Ana Luiza Silva que com muito sacrifício, força e amor se dedicou a mim e ao meu irmão para nos dar o necessário para seguirmos em frente e caminharmos da melhor forma possível.

Ao meu pai Antônio Carlos de Arruda Raulino.

Aos meus familiares que, mesmo tão distantes, sempre se mostraram presentes, mandando força e palavras de carinho.

Uma vez que se sai da sua terra natal e opta por morar sozinha em outro estado, com sonhos e planos, sem saber se tal escolha valeria a pena e quais seriam as dificuldades, sendo assim digo que tal experiência não seria tão valiosa se não fosse pelas amizades que fiz e a solidariedade destes para comigo desde de minha chegada à Manaus.

A minha orientadora Dra. Dagmar Kiesslich pela oportunidade de fazer esse trabalho, ensinamentos, respeito e paciência na elaboração deste trabalho.

A Myuki Alfaia Esashika Crispim, pela dedicação, carinho, força nas atividades laboratoriais, juntamente com a Sônia Cordeiro Campello que sempre estava ao meu lado, me falando palavras de carinho e força, assim como Alessandra Ferreira de Araújo se mostrando sempre preocupada comigo, com meu aprendizado me apoiando e dando força.

Ao Dr. Nelson Abrahim Fraiji pela oportunidade de fazer parte dessa primeira turma de mestrado da FHEMOAM, pela estrutura que me foi concedida.

Aos amigos da FHEMOAM que direta e indiretamente contribuíram na realização deste trabalho, onde em todos os setores ao qual eu passei fui sempre muito bem recebida.

Aos meus amigos de mestrado pelo carinho, amizade e companheirismo.

A Dra. Cíntia Mara Costa Oliveira que abriu suas portas assim que eu cheguei em Manaus, me dando a oportunidade de trabalhar com pesquisa, conhecer um pouco do HBV, e sempre com muito carinho e humildade me passava seus conhecimentos.

A Dra. Mariane M. de Araújo Stefani por sua dedicação a realização desse trabalho, sempre solícita.

A Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Hematologia pelos auxílios e incentivos oferecidos no decorrer desse trabalho.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ pela estrutura concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pela bolsa de estudo.

## RESUMO

**Introdução/Objetivos:** A hepatite B é uma das principais patologias mundiais, sendo um desafio a saúde tanto na Amazônia quanto globalmente, afetando cerca de 2 bilhões de pessoas incluindo milhares de casos de infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV). O diagnóstico da infecção pelo HBV é baseado na positividade do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). Contudo existem relatos de persistência viral identificada por DNA-HBV em pacientes HBsAg negativos, o que caracteriza a hepatite B oculta (HBO). Estes casos apresentam baixa replicação viral que pode estar associada a positividade para anti-HBc e ou anti-HBs. A HBO hepatite B pode significar importante problema de saúde pública em áreas endêmicas uma vez que tem sido evolvida na transmissão transfusional do HBV, ou transmissão por transplante de fígado por doadores de sangue/órgãos assintomáticos e aparentemente saudáveis. Políticas de segurança transfusional, como a implementação do NAT (nucleic acid test) para HIV e HCV E HBV, vem sendo adotadas nos hemocentros em todo o mundo, principalmente em regiões de alta endemicidade como na região da Amazônia Brasileira. O presente estudo teve como objetivo determinar a frequência de HBO em um subgrupo de doadores de sangue HBsAg negativos do hemocentro (Fundacao de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas/ FHEMOAM) e em subgrupo de indivíduos HBsAg negativos que participaram de estudo de prevalência para HBV em moradores de Eirunepe, área de alta prevalência para HBV no Amazonas. **Métodos/Resultados:** Foram investigados 294 doadores de sangue (HBsAg negativo e anti-HBc +) da FHEMOAM e 288 indivíduos (HBsAg negativo e anti-HBc + associado a anti-HBs ou não) do município de Eirunepé/AM. Todas as amostras foram submetidas a métodos moleculares para detecção e quantificação do DNA-HBV testando-se inicialmente pools de amostras por PCR em tempo real para pelo menos duas regiões do genoma (gene X e gene S). Os pools positivos (9 pools no grupo FHEMOAM e 25 no grupo de Eirunepé/AM) foram desmembrados e as amostras do pool foram retestadas individualmente por qRT-PCR. No grupo de doadores de sangue da FHEMOAM 1,0% (3/294) foi considerado DNA-HBV positivo, sendo 2 indivíduos do gênero feminino e 1 do gênero masculino com 21, 42 e 31 anos de idade respectivamente. Quanto a classificação do tipo de doadores 83,3% eram doadores de primeira vez e 16,7% eram doadores de repetição. A presença de DNA-HBV nos indivíduos de Eirunepé/AM foi de 3,1% (9/288) sendo 6 indivíduos do gênero feminino e 3 do gênero masculino com idades entre 27 e 64 anos. Dentre os 9 casos de HBO, 2 eram anti-HBc isolado e 7 tinham anti-HBs associado (acima de 100 mUI/ml). **Conclusão:** Este estudo evidenciou baixa prevalência de HBO em subgrupo de doadores de sangue da FHEMOAM e em um grupo de moradores de Eirunepé/Amazonas com HBsAg negativo. Embora baixa, esta prevalência indica que transmissão por HBO pode ocorrer na FHEMOAM. Estes resultados destacam a importância da implementação de métodos mais sensíveis para detecção da infecção pelo HBV, como a triagem molecular (NAT), implantado em 2014, representando uma ferramenta importante para ampliar a segurança transfusional na FHEMOAM, tanto na triagem de doadores de áreas endêmicas da capital e do interior do estado do Amazonas.

**Palavras-Chave:** Hepatite B oculta, DNA-HBV, prevalência, doadores de sangue, Amazônia Brasileira

## ABSTRACT

Hepatitis B is considered one of the main infectious diseases worldwide representing an important public health challenge affecting around 2 billion people, many of them with chronic infection with hepatitis B virus (HBV). The diagnosis of HBV is based on the positivity to the surface antigen of HBV (HBsAg). However, viral persistence identified by HBV-DNA has been described in HBsAg negative individuals, defining the occult hepatitis B infection (OHB). Occult hepatitis B is almost always associated with anti-HBc and or anti-HBs positivity, as well as low-level viral replication. OHB can represent an important public health problem in endemic areas as it can be involved in HBV transmission by blood or organ transplants by asymptomatic, apparently healthy donors. Improved tests such as the implementation of NAT (nucleic acid tests) for HIV and HCV have been adopted by hemocenters worldwide, especially in highly endemic areas as the Brazilian Amazon region. This study evaluated the prevalence of OHB in subgroups of HBsAg negative donors from a reference public health blood bank in the Amazon (Fundacao de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas/FHEMOAM) and among a group of HBsAg negative individuals that participated in a HBV prevalence study in a highly endemic municipality in the Amazonas State/Eirunepé city. **Methods/Results:** Among 1.494 HBsAg negative blood donors from FHEMOAM and among 288 individuals from Eirunepe HBsAg negative and anti-HBc/anti-HBs positive or negative, pools were tested for the presence of DNA-HBV by real time PCR (qRT PCR) using primers for two genomic regions (gene X and gene S). For the pools which were positive for HBV-DNA (9 in the FHEMAOM group and 25 among Eirunepe participants), individual samples were re-tested for the presence of HBV-DNA by RT-PCR. Among the subgroup of donors from FHEMOAM 1,0% (3/294) was considered DNA-HBV positive, including 2 females and 1 male, 21, 42 and 31 years old respectively. Among these 83,3 were a first time donor and 16,7 were repeat donor. The rate of OHB in participants from Eirunepe was 3,1% (9/288): six females, 3 males, ages ranging from 27 to 64. Among these 9 OHB cases from Eirunepe, 2 were anti-HBc positives, 7 were associated with anti-HBs (above 100 mUI/ml). **Conclusion:** This study showed low prevalence of OHB in groups of HBsAg negative donors from FHEMOAM and moderate prevalence in participants from Eirunepe/Amazonas. Despite low rates of OHB infection identified, this study indicates that transmission by OHB can occur. These results highlight the importance of more sensitive tests to detect HBV infection, such as NAT which was implemented in 2014 representing an important tool to improve transfusional safety at FHEMOAM among donors from highly endemic areas including the capital and from inland Amazonas State.

**Keywords:** occult Hepatitis B, HBV-DNA, prevalence, blood donors, Amazon,



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição Mundial do HBV. ....	15
FIGURA 2: Estrutura do HBV .....	17
FIGURA 3: Víriões completos e partículas filamentosas e esféricas .....	18
FIGURA 4: Modelo da organização do genoma do HBV .....	19
FIGURA 5: Ciclo replicativo do HBV.....	21
FIGURA 6: Curva de amplificação da PCR em tempo real .....	26
FIGURA 7: Representação esquemática do perfil da HBO .....	27
FIGURA 8: (a) Curva de fluorescência referente a estimativa do limite de detecção da PCR em tempo real para HBV/ (b) Gráfico da curva padrão com painel de quantificação do HBV e diluições.....	44 e 45
FIGURA 9 : qRT-PCR “in house” para DNA-HBV: (a) pools de DNA de doadores da FHEMOAM; (b) pools de DNA indivíduos de Eirunepé/Am.....	46
FIGURA 10: qRT-PCR “in house” para DNA-HBV: curva de fluorescência das amostras de doadores da FHEMOAM com hepatite B oculta.....	49
FIGURA 11: qRT-PCR “in house” para DNA-HBV: curva de fluorescência das amostras de indivíduos de Eirunepé/Am com hepatite B oculta. ....	50

**LISTA DE TABELA**

TABELA 1: Principais dados sócio-demográficas dos grupos do estudo para pesquisa de hepatite B oculta pelo HBV no Amazonas.....	43
TABELA 2: Características dos pools positivos para DNA-HBV em participantes do grupo I-doadores FHEMOAM e do grupo II-Eirunepé/Am.....	47
TABELA 3: Dados de pacientes com HBO entre doadores da FHEMOAM. ....	51
TABELA 4: Dados individuais dos moradores de Eirunepé/Am identificados com hepatite B oculta.....	51

**LISTA DE QUADRO**

QUADRO 1: Sequências dos iniciadores para a amplificação do gene S e gene X..... 41

QUADRO 2: Concentração, volume dos reagentes e programa para amplificação do gene X  
..... 41

QUADRO 3: Concentração, volume dos reagentes e programa para amplificação do gene S.  
..... 41

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ALT</b>	Alaninoaminotransferase
<b>Anti-HBc</b>	Anticorpo contra o antígeno do <i>core</i> da Hepatite B
<b>Anti-HBe</b>	Anticorpo contra o antígeno “ <i>e</i> ” da Hepatite B
<b>Anti-HBs</b>	Anticorpo contra o antígeno de superfície da Hepatite B
<b>AST</b>	Aspartatoaminotransferase
<b>cccDNA</b>	DNA circular covalente fechado ( do inglês: <i>Covalently closed circular DNA</i> )
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>FHEMOAM</b>	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
<b>HBcAg</b>	Antígeno do <i>core</i> do vírus da Hepatite B
<b>HBeAg</b>	Antígeno “ <i>e</i> ” do vírus da Hepatite B
<b>HBO</b>	Hepatite B Oculta
<b>HBsAg</b>	Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>CHC</b>	Carcinoma Hepatocelular

<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>mUI/mL</b>	mili unidade internacional por mililitro
<b>NAT</b>	Técnica de Amplificação de Ácidos Nucléicos ( do inglês: Nucleic Acid Amplification Technique)
<b>OBI</b>	Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B ( do inglês: <i>Occult Hepatitis B virus Infection</i> )
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ORFs</b>	Regiões de leituras abertas ( do inglês: <i>Open Reading Frames</i> )
<b>qRT-PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real ( do inglês: <i>Real Time – Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido Ribonucléico Mensageiro
<b>TMA</b>	Amplificação Mediada por Transcrição (do inglês: <i>Transcription Mediated Amplification</i> )
<b>HBV</b>	Vírus da hepatite B
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>UI/mL</b>	Unidade internacional por mililitro

## Sumário

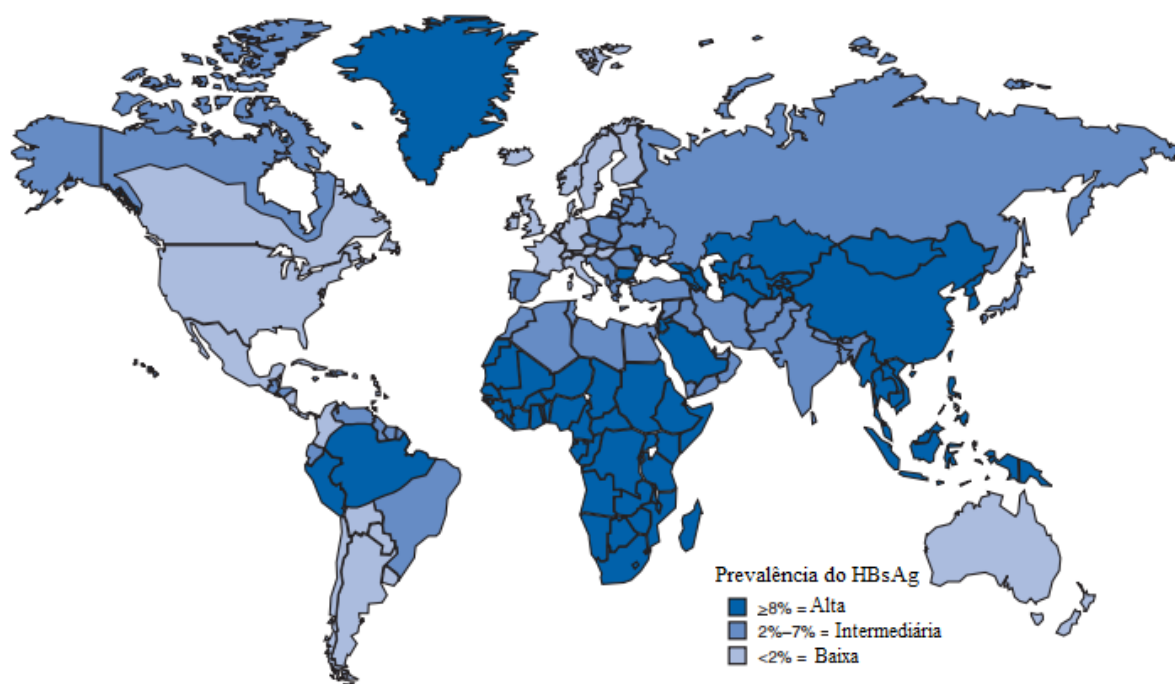
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1. Hepatite B</b> .....	15
<b>1.2. O Vírus da Hepatite B</b> .....	17
<b>1.3. Replicação do HBV</b> .....	20
<b>1.4. Genótipos, Subgenótipos e Subtipos</b> .....	21
<b>1.5. Diagnóstico Laboratorial</b> .....	22
<b>1.6. Hepatite B Oculta</b> .....	26
1.6.1. Possíveis mecanismos envolvendo a Hepatite B Oculta .....	28
1.6.3. Transmissão por Transfusão .....	30
1.6.4. prevalência e detecção da hepatite b oculta .....	31
<b>1.7. Justificativa</b> .....	35
<b>2. OBJETIVO</b> .....	36
<b>2.1. Objetivo geral:</b> .....	36
<b>2.2. Objetivos específicos:</b> .....	36
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	37
<b>3.1. Modelo de Estudo</b> .....	37
<b>3.2. Grupos de Estudo</b> .....	37
<b>3.3. Aspéctos Éticos</b> .....	38
<b>3.4. Procedimentos Laboratoriais</b> .....	39
3.4.1. Extração do DNA-HBV em pools de amostras .....	39
3.4.2. PCR em tempo real (qRT-PCR) “in house” para amplificação do DNA-HBV.....	39
3.4.3. Pools positivos para DNA-HBV, extração de DNA em amostras individuais e ensaio de qRT-PCR “in house” para DNA-HBV .....	42
<b>4. RESULTADOS</b> .....	43
<b>4.1. Características das populações estudadas</b> .....	43
<b>4.2. Curva padrão e painel de quantificação do ensaio de qrt-pcr “in house” para DNA-HBV</b> .....	44
<b>4.3. PCR em tempo real qRT-PCR “in house” para DNA-HBV em pools de amostras dos dois grupos populacionais - Fhemoam e Eirunepé/amazonas</b> .....	45
<b>4.4. PCR em tempo real para DNA-HBV das amostras individuais que constituíam os pools positivos</b> .....	49
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Hepatite B

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) é um grave problema de saúde global, sendo a décima causa de óbito no mundo <sup>(1)</sup>. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 2 bilhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo e 350 milhões sofrem de infecção crônica pelo HBV. Dentre estes, em torno de 65 milhões vivem na África <sup>(2)</sup> e cerca de 20-30 milhões na Ásia <sup>(3, 4)</sup> estimando-se ser causa de morte de cerca de 600 mil pessoas <sup>(5)</sup>.

A distribuição mundial de infecção pelo HBV é bastante heterogênea, apresentando diferentes taxas de prevalência em todo o mundo. Taxas de prevalência do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) superiores a 8% são consideradas altas enquanto taxas entre 2 a 7% são consideradas média ou intermediária e taxas abaixo de 2% indicam baixa endemicidade (Figura 1) <sup>(6)</sup>.



**Figura 1:** Distribuição Mundial do HBV, adaptado.

Fonte: [http://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/pdfs/hbv\\_figure3map\\_08-27-08.pdf](http://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/pdfs/hbv_figure3map_08-27-08.pdf)

Altas taxas de prevalência têm sido descritas no Sudeste da Ásia, África, Ilhas do Pacífico, na região Amazônica, e no Alaska. Nessas áreas, o vírus é transmitido principalmente por via perinatal, da mãe para o feto, na gravidez, durante ou após o parto. Taxas de prevalência intermediárias são observadas no Leste Europeu, Ásia Central, Japão, Israel e na América do Sul, e a via de transmissão predominante nestas áreas é a horizontal. A América do Norte, Europa Ocidental, Austrália e Sul da América Latina são áreas de baixa endemicidade e as rotas de transmissão do HBV são por via sexual e parenteral entre usuários de drogas injetáveis <sup>(7, 8)</sup>.

No Brasil observam-se três padrões de distribuição da hepatite B: áreas de alta endemicidade como na região Amazônica <sup>(9, 10)</sup>, Sul do Espírito Santo, oeste do Estado do Paraná e Santa Catarina; endemicidade intermediária na região Nordeste, Centro-Oeste e Suldeste; baixa endemicidade na região Sul do País <sup>(11)</sup>.

O HBV pode induzir alterações hepáticas variando de infecções agudas e crônicas, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC). Embora a maioria dos pacientes com infecção pelo HBV não apresentem complicações hepáticas, existe a possibilidade da infecção evoluir para uma doença grave <sup>(12)</sup>.

A história natural da infecção pelo HBV depende da idade em que ela se instala e principalmente da interação hospedeiro-vírus. A infecção perinatal tem curso silencioso e raramente induz doença aguda, assim neonatos e crianças apresentam maior risco de desenvolver hepatite B crônica quando comparados com adultos, bem como maior risco de evoluir para cirrose e CHC <sup>(13, 14)</sup>.

A infecção pelo HBV após a vida adulta, em indivíduos com sistema imune íntegro está associada na maioria dos casos ao desenvolvimento de uma hepatite aguda assintomática leve, que evolui para cura espontânea e eliminação do HBsAg. A intensidade da resposta imune tanto humoral e celular é crucial para eliminar o vírus e para a cura da infecção aguda, mas isto pode causar dano hepático <sup>(15)</sup>. A história natural da infecção crônica é altamente heterogênea e o sistema imunológico tem um papel fundamental no seu curso e prognóstico.

Estima-se que mais de um terço da população mundial já foi exposta ao vírus e é possível que esses indivíduos carregiem o vírus sem saber. No curso da infecção crônica pode

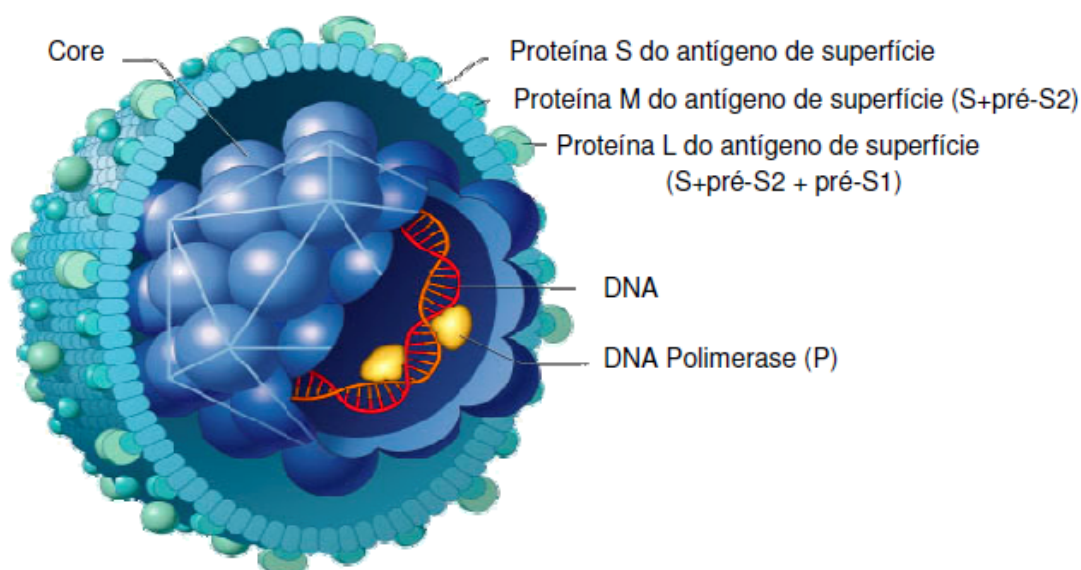


ocorrer a perda do HBsAg e persistência do DNA do HBV, o qual caracteriza uma “ infecção oculta pelo vírus da hepatite B” ou OBI (Occult Hepatitis B vírus Infection)<sup>(16)</sup>.

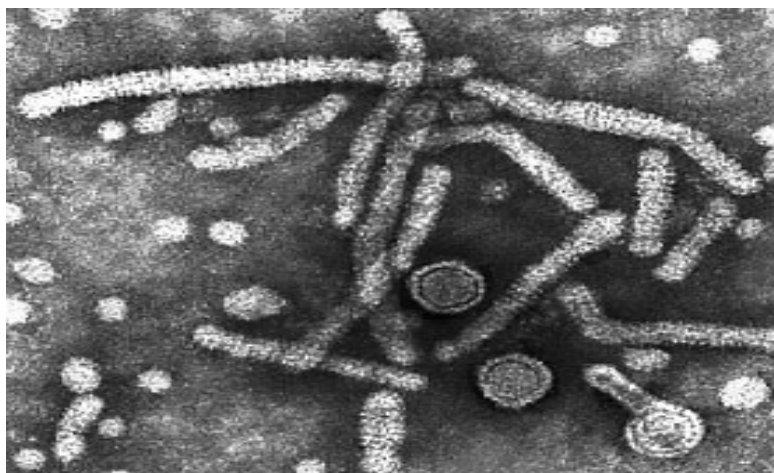
## 1.2. O Vírus da Hepatite B

O vírus da hepatite B pertence a família Hepadnaviridae, gênero *Orthohepadnavirus* e os vírus desta família compartilham características comuns, tais como, tropismo pelas células hepáticas, tamanho, ultraestrutura do vírion, organização da molécula de DNA e um mecanismo exclusivo de replicação por transcrição reversa. Os outros membros do gênero, *Orthohepadnavirus* infectam mamíferos e *Avihepadnavirus* infectam aves<sup>(17,18)</sup>.

O HBV produz diferentes tipos de partículas virais apresentando um mecanismo único entre os vírus que infectam o homem. No soro de indivíduos infectados podem ser visualizados três tipos de partículas morfológicamente diferentes: uma partícula infecciosa esférica, chamada de partícula de Dane, com 42nm a 47nm de diâmetro (*vírion*), formada por moléculas lipídicas e proteínas, derivadas do hospedeiro. No interior do envelope encontra-se uma partícula central, o *core* (HBc) e a DNA polimerase responsável pela replicação do vírus (Figura 2). O HBV também gera partículas subvirais esféricas e filamentosas (Figura 3), de aproximadamente 22nm, não infecciosas, sendo compostas apenas por proteínas de superfície<sup>(19)</sup>.



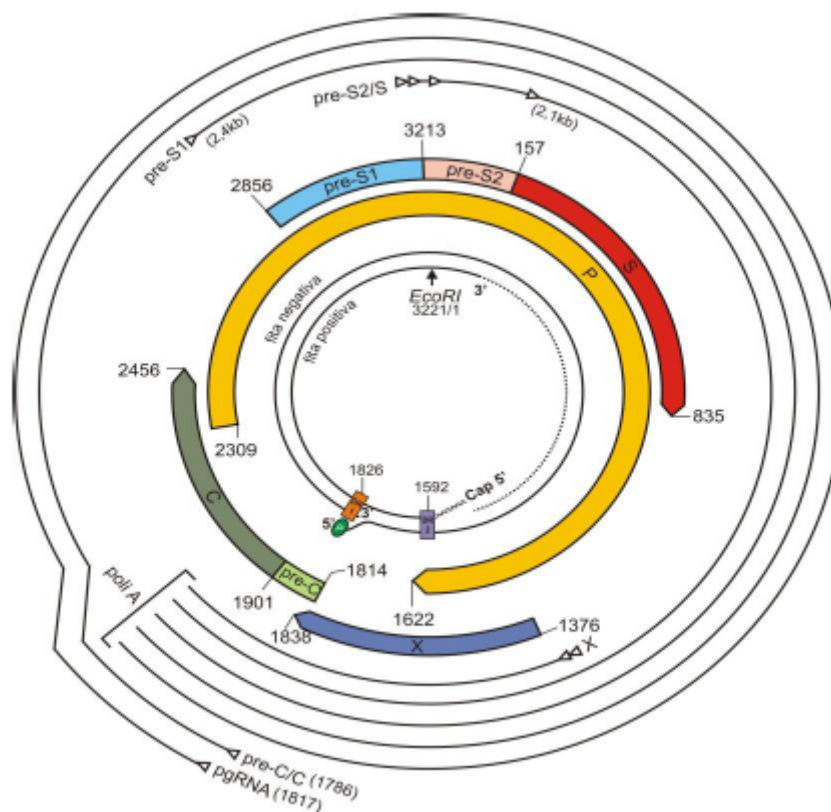
**Figura 2:** Estrutura do HBV, adaptado James A.Perkin,2002.  
Fonte: <http://people.rit.edu/japfaa>



**Figura 3:** Vírions completos e partículas filamentosas e esféricas .  
Fonte: Moreno D. et al., 2004<sup>(19)</sup>.

O genoma do HBV é composto por uma molécula de DNA circular, parcialmente dupla fita, com aproximadamente 3.200 nucleotídeos, caracterizando um dos menores genomas virais que infecta o homem. Apresenta uma fita longa ou (negativa) e uma fita curta ou (positiva). A fita negativa é complementar aos RNAs virais, apresentando uma única e pequena região aberta na extremidade 5' da fita positiva. Já na fita positiva, a posição da extremidade 5' terminal é fixa, enquanto a posição da extremidade 3' terminal é variável. Desta forma, o comprimento da fita positiva é variável, correspondendo entre 50 % a 90% do comprimento da fita negativa. Quando as duas cadeias se sobrepõem, a molécula adquire uma forma circular. Próxima às extremidades 5' de ambas as fitas, há duas pequenas seqüências de 11 nucleotídeos, que são diretamente repetidas e chamadas “direct repeats” (DR1 e DR2) sendo importantes para a inicialização da replicação do HBV <sup>(18,20,21)</sup>.

O genoma do HBV é totalmente codificado pela fita longa, que apresenta quatro regiões de leitura aberta designadas (ORFs) de pré-S/S, pré-C/C, P e X. Todos os genes do vírus estão intimamente ligados, através de um engenhoso sistema que sobrepõe as regiões de leitura aberta, fazendo com que o HBV possa produzir aproximadamente 50% mais proteínas do que o esperado para o tamanho do seu genoma <sup>(22)</sup>. O gene pré-S/S codifica as proteínas do envelope viral do antígeno HBsAg; o gene C (pré-C/C) é responsável pela síntese do antígeno HBcAg e do antígeno e (HBeAg), o gene P codifica a polimerase viral; a região X sintetiza uma proteína regulatória, chamada de proteína X (HBxAg) (Figura 4) <sup>(18)</sup>.



**Figura 4:** Modelo da organização do genoma do HBV

Fonte: Gomes S.A., 2002 <sup>(20)</sup>.

A primeira região de leitura aberta é a região pré-S/S que inclui as regiões pré-S1, pré-S2 e S que codificam glicoproteínas do envelope viral. Esse envelope é composto por três proteínas do HBsAg, onde a proteína de maior tamanho, L “large” (400 aa) é codificada no início da região pré-S1 sendo composta pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S. A proteína M “middle” (281 aa) é codificada pelas regiões pré-S2 e S, enquanto que a proteína de menor tamanho, S “small” (226 aa) é sintetizada na região S <sup>(17, 18, 23)</sup>. A proteína S, conhecida como HBsAg, é a mais abundante, com 24 kD, sendo capaz de induzir resposta imunológica protetora (anti-HBs) contra o HBV e é o antígeno utilizado na formulação de vacinas <sup>(18, 19, 24)</sup>. A proteína L em contraste a proteína M, é essencial para a ligação do HBV aos receptores específicos dos hepatócitos. A proteína M também atua como elemento de ligação para a adsorção do HBV <sup>(24)</sup>.

A segunda fase de leitura aberta é a região pré-C/C (pré-core e core), que codifica os antígenos do nucleocapsídeo viral que dão origem a duas proteínas com especificidades distintas: o antígeno e (HBeAg) e a proteína do core (HBcAg) traduzidos na região pré-C. O HBeAg é secretado na circulação sanguínea, ligado a proteínas do soro e o HBcAg é celular

<sup>(24)</sup>. Quando ocorre infecção natural pelo HBV essas duas proteínas induzem a produção de anticorpos anti-HBe e anti-HBc, mas parecem ser reguladas de forma independente <sup>(25)</sup>. De acordo com Milich et al. (1986) o HBcAg pode comportar-se como um antígeno independente de células T enquanto que o HBeAg é estritamente dependente de células T <sup>(26)</sup>. O HBcAg induz preferencialmente respostas de células T Helper 1 (Th1) e o HBeAg induz ativação de células Th<sub>0</sub>/Th<sub>2</sub> <sup>(27)</sup>, e ambos diferem quanto a células apresentadoras de antígeno <sup>(28)</sup>.

O gene P representa a terceira região de leitura aberta compondo 80% do genoma do HBV por sobrepor todos os outros genes. O gene P codifica uma enzima com atividade de DNA polimerase/transcriptase reversa e RNase H. Do ponto de vista estrutural, a proteína P apresenta 4 domínios: o domínio aminoterminal, que atua como uma primase (é necessário para a síntese da fita negativa do DNA a partir do RNA pré-genômico (pg-RNA), uma região chamada de “espaçadora” sem função aparente, o domínio polimerase e o domínio C-terminal que exibe atividade de RNase H (responsável pela degradação do RNA durante a transcrição reversa) <sup>(29, 30)</sup>.

O gene X representa a quarta região aberta de leitura, responsável pela síntese da proteína HBxAg de 154 aminoácidos. Acredita-se que a proteína HBx desempenhe um papel central na regulação do HBV, atuando na patogênese e apresentando várias funções virais e celulares, embora o seu papel na replicação do vírus e na patogênese em indivíduos infectados ainda não tenha sido esclarecido <sup>(31, 32)</sup>.

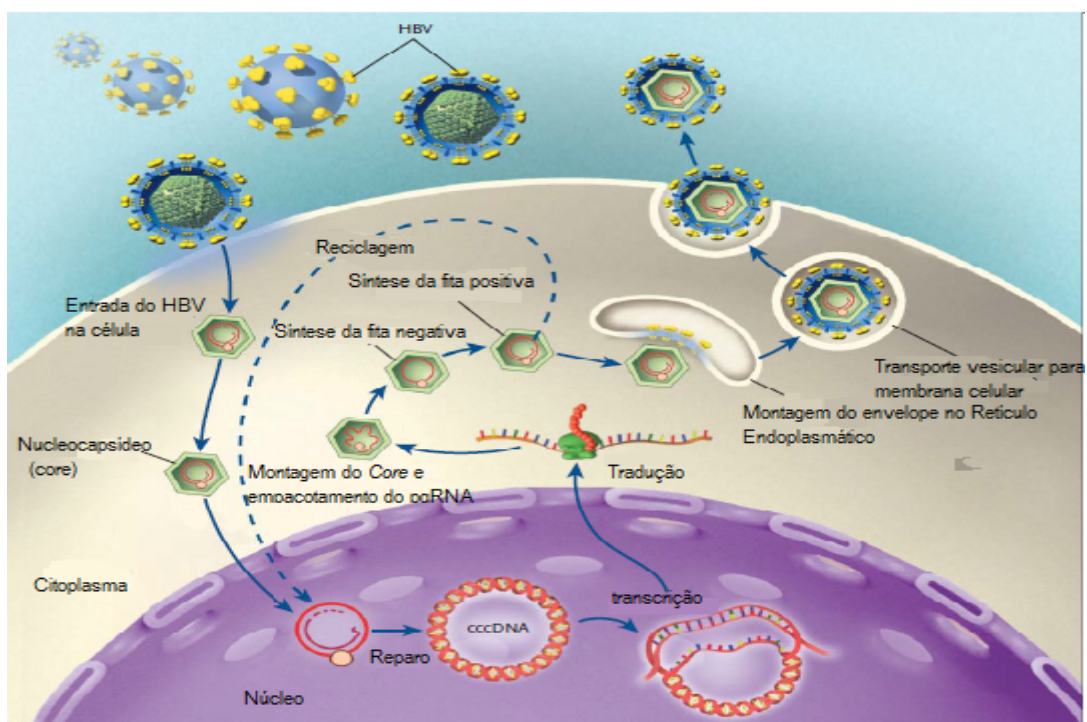
### **1.3. Replicação do HBV**

O ciclo de replicação do HBV inicia-se com a adsorção do vírus mediante a ligação deste com o hepatócito do hospedeiro, interação esta mediada pela glicoproteína de superfície pré-S1. Dentro do hepatócito, ocorre a fusão da partícula viral com a membrana celular e no citoplasma o genoma é liberado, dirigindo-se até o núcleo. Dentro do núcleo o DNA é reparado e se completa. O DNA viral é convertido numa fita circular fechada de DNA com ligações covalentes (cccDNA) pela DNA polimerase, havendo a remoção da proteína terminal e do oligorribonucleotídeo das extremidades 5' de ambas as fitas.

O genoma do HBV é transcrito pela RNA polimerase II a partir da forma cccDNA em RNA genômicos e subgenômicos. O RNA mensageiro (mRNA) tem o papel de ir ao citoplasma onde será traduzido para gerar a DNA polimerase, o HBcAg e o HBeAg. O RNA pré-genômico tem a função de sintetizar o genoma viral. Este por sua vez será encapsidado

dentro das partículas do core, que é desencadeado pela ligação da polimerase viral à estrutura da extremidade 5'. A polimerase do HBV inicia a transcrição reversa para conversão em fita negativa do DNA <sup>(33)</sup>.

Após a conversão, forma-se um RNA intermediário, que fica no interior do vírus imaturo, representando o molde para a síntese da fita negativa do DNA. A polimerase viral então estende a fita positiva do DNA, onde a RNase H degrada o RNA mas não por completo deixando uma pequena sequência de RNA na extremidade 5'. O oligorribonucleotídeo terminal (que inclui a sequência DR1) anela-se a região DR2 da extremidade 5' do DNA de fita negativa. Este oligômero é então utilizado como um iniciador da fita positiva do DNA. A síntese da fita positiva é então iniciada e as partículas do core, contendo DNA viral, são então envolvidas por HBsAg e secretadas para fora do hepatócito ou transportadas para o núcleo, completando a síntese da cadeia positiva e se forma novamente o cccDNA (Figura 5) <sup>(33-35)</sup>.



**Figura 5:** Ciclo replicativo do HBV

Fonte: Ganem & Prince, 2004 <sup>(13)</sup> - Figura adaptada para o português.

#### 1.4. Genótipos, Subgenótipos e Subtipos

A heterogeneidade dos genótipos do vírus da hepatite B parece estar relacionada com diferenças na evolução clínica da infecção e na resposta ao tratamento antiviral. A descoberta de variantes do HBV mediante o uso de técnicas de biologia molecular levou ao

conhecimento da variabilidade do HBV que foi relacionada ao HBsAg possibilitando a classificação das variantes antigênicas do HBV<sup>(36, 37)</sup>.

O antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) apresenta um epítipo neutralizante, chamado de “determinante” *a*, localizado entre os aminoácidos 124-147 da região S, contra o qual a maioria dos anticorpos neutralizantes são dirigidos<sup>(38)</sup>. Existem ainda mais dois HBsAg determinantes que são *d/Y* e *w/r*, formando assim quatro subtipos principais: *adw*, *adr*, *ayw*, *ayr*<sup>(39)</sup>.

Em 1988, Okamoto e colaboradores analisaram uma sequência nucleotídica de 18 cepas do HBV que foram agrupadas em quatro grupos de A – D e apresentaram uma divergência de 8% no genoma completo<sup>(40)</sup>. Este grau de divergência se tornou critério de definição para os genótipos. Atualmente o HBV é classificado em 10 genótipos (A – J) de acordo com a diferença na sequência nucleotídica<sup>(39, 41)</sup>. Os genótipos ainda podem ser separados em subgenótipos se a divergência na sequência nucleotídica estiver entre 4% e 8%<sup>(42-44)</sup>.

No Brasil, devido a miscigenação de sua população são encontrados diferentes genótipos em diferentes regiões do país e os genótipos A, B, C, D e F são os mais prevalentes entre os portadores de HBV<sup>(21, 45)</sup> e o genótipo A é o mais comum em todo o território nacional<sup>(46)</sup>.

Em um estudo realizado por Nabuco e colaboradores (2012) no Rio de Janeiro em portadores crônicos do HBV foram encontrados os genótipos A (68%), seguidos pelos genótipos F, D, B e C<sup>(47)</sup>. Na cidade de São Paulo o genótipo mais frequente segundo Haddad et al. (2010) é o D, seguido dos genótipos A e F<sup>(48)</sup>.

Na Amazônia Brasileira, estudos de genotipagem indicam que o genótipo A é o mais frequente na região, seguido dos genótipos D e F<sup>(46, 49, 50)</sup>. Porém, estudos realizados em comunidades ribeirinhas, encontraram uma prevalência maior do genótipo F<sup>(51, 52)</sup>. Em pacientes HBV co-infectados com o vírus da hepatite D/VHD observou-se maior prevalência do genótipo F quando comparados com os mono-infectados HBV como relatado por Kiesslich et al. (2009)<sup>(53)</sup>.

## 1.5. Diagnóstico Laboratorial

Os métodos laboratoriais para detecção do HBV incluem testes bioquímicos, imunológicos e moleculares.

O diagnóstico bioquímico inclui as dosagens das aminotransferases (ALT - Alanina aminotransferase/AST – Aspartato aminotransferase) para avaliar a função dos hepatócitos. Os níveis de AST e ALT aumentam no soro durante os episódios de lesão e necrose hepatocelular em decorrência da infecção viral <sup>(54)</sup>.

Os testes sorológicos são utilizados para distinguir, infecções auto-limitadas agudas de infecções crônicas por HBV e monitorar a imunidade induzida pela vacina. Os antígenos e anticorpos aparecem e desaparecem do soro, de acordo com a fase evolutiva da infecção e podem ser correlacionados, com a ocorrência de icterícia e com as elevações e decréscimos das dosagens de ALT e AST <sup>(19, 54-56)</sup>.

O HBsAg é o primeiro marcador sorológico que aparece no curso da infecção pelo HBV é o principal marcador utilizado em testes de triagem de doadores de sangue, sendo detectado em média 60 dias após a infecção. HBsAg geralmente torna-se indetectável após quatro a seis meses em pacientes que se recuperam de hepatite B. A persistência do HBsAg por mais de seis meses indica infecção crônica. Quando a concentração HBsAg se apresenta em níveis circulantes abaixo de  $10^8$  partículas/ml os testes imunológicos podem não detectá-la. O desaparecimento do HBsAg é frequente, mas não é sempre seguido pelo aparecimento do anti-HBs. O intervalo entre a eliminação do vírus e o aparecimento do anticorpo pode levar de semanas a alguns anos <sup>(56, 57)</sup>.

O anticorpo contra o antígeno de superfície do HBV (anti-HBs) é o único anticorpo que confere imunidade ao HBV, estando presente isoladamente em pessoas vacinadas. Persiste em cerca de 80% dos casos resolvidos espontaneamente e se dirige principalmente contra o determinante “a” do antígeno, conferindo imunidade duradoura contra os diversos subtipos por ser um anticorpo neutralizante <sup>(55, 57)</sup>.

O antígeno “e” do HBV (HBeAg) é uma proteína secretora que se apresenta em concomitância com o HBsAg sendo considerado como um marcador de replicação e infecciosidade viral. Pode ser encontrado em uma pequena parcela dos doadores de sangue. A soroconversão do HBeAg para anti-HBe ocorre no início da infecção aguda, antes da soroconversão do HBsAg para anti-HBs, estando associada a uma diminuição do DNA-HBV

no soro e remissão da doença hepática. No entanto, a soroconversão do HBeAg pode ser adiada por anos a décadas em indivíduos com infecção crônica pelo HBV, estando associada a detecção de níveis elevados de DNA-HBV no soro e a doença hepática <sup>(55, 58)</sup>.

O anticorpo contra o antígeno “e” do HBV (anti-HBe) indica evolução para cura, com interrupção da replicação viral nas infecções por vírus selvagens <sup>(58)</sup>.

O antígeno “core” do HBV (HBcAg) é um antígeno intracelular, insolúvel, que não pode ser detectado no soro e se apresenta no núcleo dos hepatócitos cronicamente infectados, sendo um indicador de replicação viral <sup>(58)</sup>.

O anticorpo contra o antígeno “core” do HBV (anti-HBc), surge após três a cinco semanas do aparecimento do HBsAg e pode ser o único anticorpo detectável na fase aguda da infecção sendo predominantemente IgM e anticorpos da classe IgG persistem por toda a vida <sup>(56)</sup>.

Em alguns indivíduos infectados pelo HBV o anti-HBc pode ser o único marcador presente e estes casos são designados de anti-HBc “isolados”. A detecção isolada do anti-HBc pode ser caracterizada por três circunstâncias: durante o período de janela imunológica de hepatite B aguda, quando o anti-HBc é predominantemente IgM; muitos anos após a recuperação da hepatite B aguda, quando o anti-HBs baixa para níveis indetectáveis e depois de muitos anos de infecção crônica pelo HBV, quando o título do HBsAg diminui para valores inferiores aos níveis de detecção <sup>(56, 59)</sup>.

Os testes moleculares permitem a pesquisa quantitativa e qualitativa do DNA-HBV no soro ou no plasma, possibilitam a amplificação do genoma viral e contribuem significamente para o diagnóstico quando associado as análises sorológicas e imunológicas tradicionais <sup>(56)</sup>.

Atualmente os ensaios disponíveis para a detecção de DNA do HBV estão baseados principalmente na metodologia da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qRT-PCR), apresentando uma notável sensibilidade para quantificação viral em diferentes formas evolutivas da doença e podem identificar mutações no genoma viral e ser usados para genotipagem viral <sup>(60)</sup>. A verificação da carga viral é importante na avaliação da resposta ao tratamento em portadores crônicos e na identificação de resistência viral <sup>(61-63)</sup>. Os testes de carga viral utilizam o parâmetro quantitativo para determinar a quantidade de partículas virais em pacientes infectados e os resultados podem ser relatados em números absolutos, log 10,

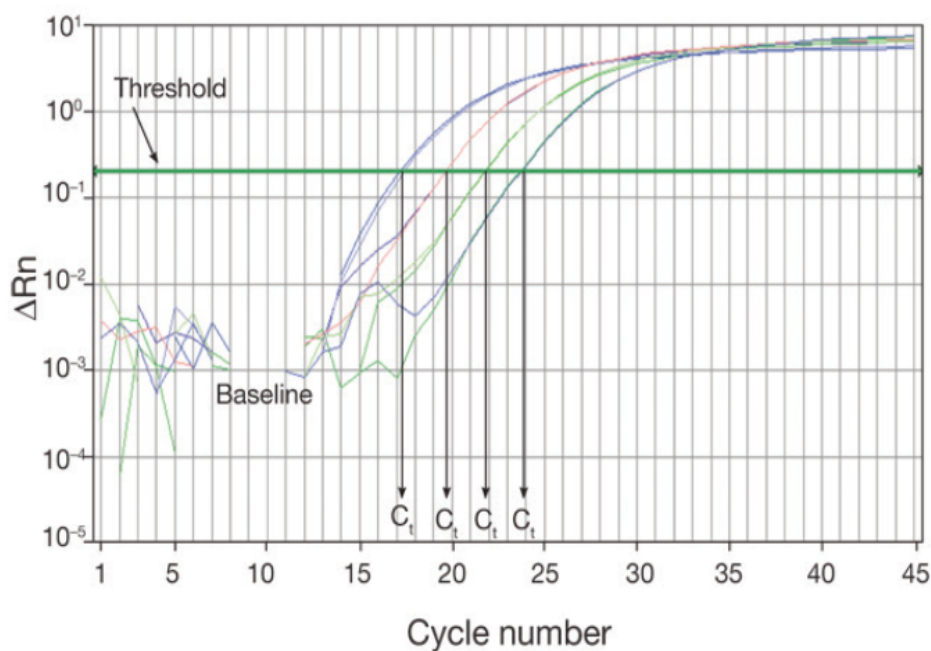


em cópias ou em unidades internacionais (UI) por mL, este último, um padrão internacional para a normalização da expressão de concentrações <sup>(56)</sup>.

A reação de PCR em tempo real permite simultaneamente a amplificação e detecção do genoma, utilizando fluorescência como método de detecção. A fluorescência aumenta proporcionalmente com a quantidade do produto de amplificação gerado. Logo durante os primeiros ciclos da reação, o sinal de fluorescência é percebido, devido ao acúmulo dos corantes ou das sondas, aumentando exponencialmente. Durante o processo de amplificação um software específico constrói um gráfico em tempo real, ciclo a ciclo, no qual relaciona os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA das amostras. Neste gráfico é traçada uma linha paralela ao eixo das abscissas/número de ciclos, na altura em que se inicia a fase exponencial da amplificação do gene alvo (início da elevação exponencial na emissão da fluorescência).

O “threshold” representa o limiar de detecção indicando o número mínimo de ciclos para amplificação do gene-alvo e o cruzamento do “threshold” com a linha de amplificação da amostra, permite determinar o número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo no DNA de cada amostra. Este valor denominado Ct (“Cycle Threshold”) permite a quantificação relativa do DNA de cada amostra, após ser corrigido pelos Ct dos genes-controle endógenos e das amostras-controle (Figura 6). O Ct é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene-alvo em uma amostra de forma que, quanto menor for o número inicial do Ct obtido do gene-alvo da amostra, comparativamente com outro gene, maior a amplificação do gene-alvo.

Os sistemas de detecção por fluorescência através da PCR em tempo real mais utilizados são: SYBR Green que utiliza corante que se intercala ao DNA e liga-se a qualquer DNA de cadeia dupla, incluindo produtos inespecíficos e “primer-dimer”, e o sistema TaqMan® que utiliza sondas duplamente marcadas contendo um fluoróforo “repórter” e um fluoróforo “quencher”, onde a fluorescência é gerada através da estimulação do fluoróforo “reporter” transferindo energia assim para a molécula “quencher” <sup>(62)</sup>. As sondas TaqMan® podem ser marcadas com moléculas “quencher” não fluorescentes como “Minor Groove Binder” (MGB) o que contribui para uma melhor captação do sinal específico do “reporter”. A MGB ligada na extremidade 3’ do DNA aumenta a temperatura de “melting” das sondas hibridizadas e sua afinidade pelo DNA <sup>(64)</sup>.



**Figura 6:** Curva de Amplificação da PCR em Tempo Real.

Fonte: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/real-time-pcr-handbook.html>

### 1.6. Hepatite B Oculta

O HBsAg foi considerado o marcador sorológico mais importante e eficaz de imunoensaio para o diagnóstico de infecção pelo HBV e para a triagem de doadores de sangue contribuindo para segurança transfusional bem como o anti-HBc <sup>(65)</sup>. No entanto, foi relatado pela primeira vez em 1970 o desenvolvimento de infecção pelo HBV em pacientes que receberam transfusão sanguínea com amostras HBsAg e anti-HBs-negativas, com positividade para o anti-HBc <sup>(66-68)</sup>.

Várias definições de “infecção oculta pelo vírus da hepatite B” (OBI) tem sido propostas. Entre elas Allain et al. (2004) definiram infecção oculta como sendo a presença de DNA do HBV, sem a presença do HBsAg com ou sem a presença de anticorpos anti-HBc ou anti-HBs fora do período de janela imunológica <sup>(69)</sup>.

No período de janela imunológica o DNA do HBV está presente, mas o sistema imune ainda não teve tempo de gerar anticorpos anti-HBV como o anti-HBc e o anti-HBs <sup>(70)</sup>. O consenso da conferência de Taormina (Itália) em 2008 definiu infecção oculta pelo vírus da hepatite B como a presença do DNA do vírus no tecido hepático (com ou sem detecção no soro), na ausência de antígeno de superfície (HBsAg), e estipularam um ponto de corte

(*cutoff*) para a detecção do DNA-HBV em  $< 200$  UI/mL. Assim valores acima do ponto de corte seriam decorrentes de mutantes de escape <sup>(66)</sup>. Segundo Hollinger et al. (2010) o termo “infecção” (OBI) deve ser usado com cautela, pois a presença de DNA-HBV nem sempre corresponde a infectividade ou ao número de vírus na população de HBV liberados dos hepatócitos, assim sendo sugerido o termo “hepatite B oculta” (HBO) ao invés de infecção oculta pelo HBV <sup>(68)</sup>.

Na prática clínica, a obtenção de DNA-HBV por biópsia hepática é inviável pois não existem ensaios padronizados. Assim ensaios em soro ou plasma para a detecção do DNA HBV são utilizados e apresentam boa sensibilidade <sup>(68)</sup>. Segundo o consenso da Taormina o perfil da infecção oculta pelo HBV ou HBO pode ser distinguida baseados nos resultados sorológicos em soropositivos (anti-HBc e ou anti-HBs) e soronegativos (sem anti-HBc e sem anti-HBs) <sup>(66)</sup>. A representação esquemática da HBO pode ser visualizada na Figura 7.

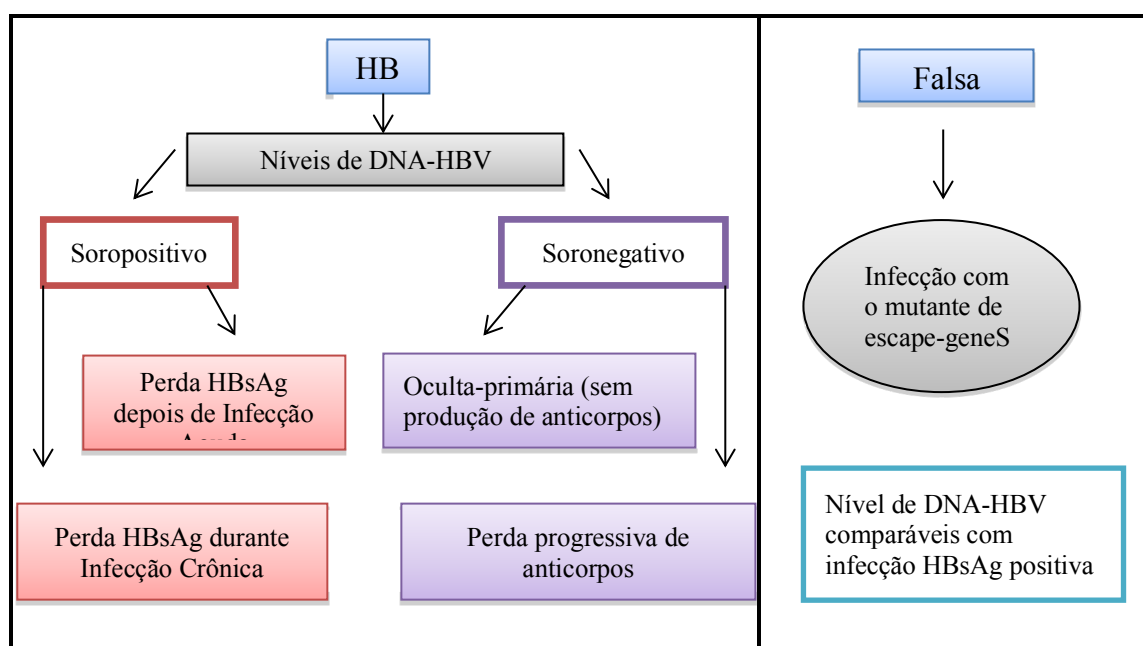


Figura 7: Representação esquemática do perfil da HBO. Adaptado <sup>(66)</sup>.

Na HBO o DNA está presente ao longo de todo curso da infecção em indivíduos HBsAg-negativos <sup>(71)</sup>. A ausência do HBsAg pode ser decorrente de dois fatores: resolução da hepatite B aguda, anos após a infecção crônica com baixa replicação viral e persistência do genoma o HBV <sup>(72)</sup>. Esta persistência viral indica conversão do DNA circular que se liga a proteínas formando um mini-cromossomo em um cccDNA no núcleo dos hepatócitos, infectados. Este cccDNA é a base molecular da HBO devido à sua estabilidade, resistência a

digestão enzimática e persistência no núcleo dos hepatócitos <sup>(68)</sup>. Assim, a hepatite B oculta pode se apresentar nos seguintes contextos clínicos: quando há a recuperação de uma infecção passada indicada pela presença de anticorpo de superfície da hepatite B (anti-HBs); na hepatite crônica quando surgem mutantes de escape do gene S que não são reconhecidos por ensaios atuais; no portador crônico sem qualquer marcador de infecção do HBV que não seja o DNA do HBV, pois estes não produzem anticorpos específicos para o HBV desde o início da infecção ou houve perda progressiva dos anticorpos ao longo do tempo; e no estágio de portador crônico, com HBsAg muito baixo para ser detectado e pela presença de anticorpos anti-HBc como o único marcador sorológico (conhecido como "anti-HBc isolado") <sup>(69)</sup>.

### 1.6.1. Possíveis Mecanismos Envolvendo a Hepatite B Oculta

Muitas hipóteses foram formuladas para explicar os possíveis mecanismos responsáveis pela hepatite B oculta, entretanto, sabe-se que esta provavelmente é multifatorial envolvendo tanto fatores virais como do hospedeiro que são importantes na supressão da replicação viral, e na manutenção da infecção sob controle <sup>(71, 73)</sup>. O estado de persistência do DNA do HBV, não é restrito a pacientes com doenças hepáticas, podendo ser observado em indivíduos com parâmetros hepáticos normais, incluindo doadores de sangue e doadores de órgãos <sup>(73)</sup>. Dentre os principais fatores discutidos para explicar HBO estão: ocorrência de mutações e deleções no genoma do HBV, fatores relacionados ao hospedeiro, fatores imunológicos, fatores epigenéticos, ocorrência de co-infecções.

#### 1.6.1.1. Mutações e Deleções no Genoma do HBV

Mutações no determinante "a" do HBsAg pode acarretar alterações nas proteínas tornando-as indetectáveis em ensaios comerciais. Indivíduos que apresentam anti-HBc isolado, com cargas virais maiores que  $10^4$  cópias/ml frequentemente apresentam mutantes do HBsAg. Mutações no determinante "a" em outras regiões com afinidade de ligação reduzida ao anti-HBs monoclonal foram descritas <sup>(66, 74-76)</sup>.

Mutações em bases nitrogenadas alteram o mRNA do gene S e podem levar a perda de expressão do HBsAg e baixa replicação viral levando assim a hepatite B oculta <sup>(77)</sup>.

As mutações na região pré-S1, especialmente as deleções, tem sido associadas também com a falta de detecção do HBsAg no soro. As mutações tanto na região pré-S1/S2 são

frequentemente observadas na hepatite B oculta em indivíduos com doença hepática crônica<sup>(78)</sup>.

#### 1.6.1.2. Fatores Relacionados ao Hospedeiro

Diversas evidências indicam que os fatores do hospedeiro estão fortemente implicados na indução e manutenção da hepatite B oculta. Pollicino e colaboradores (2007) mostraram que a replicação, transcrição e a capacidade e síntese de proteínas de vírus ocultos isolados, pode ser totalmente restabelecida uma vez que os vírus são levados para fora do microambiente do fígado do hospedeiro<sup>(79)</sup>.

#### 1.6.1.3. Fatores Imunológicos

Numerosos estudos clínicos têm demonstrado desde os anos 70 que todas as condições de indução de imunossupressão associadas a doenças hematológicas malignas, quimioterapia ou imunoterapia podem provocar a reativação da hepatite B oculta com o reaparecimento do perfil sorológico típico de infecção ativa. O envolvimento do sistema imune do hospedeiro com a hepatite B oculta é confirmado pelos dados que mostram uma longa duração na resposta das células T de memória CD4 e CD8 contra os antígenos do HBV que são detectáveis vários anos após a recuperação da hepatite B aguda. Possivelmente durante a fase oculta da infecção, o HBV seja capaz de sintetizar pequenas quantidades de antígenos, que não são detectáveis pelos testes sorológicos, mas que são suficientes para manter uma resposta das células T específicas do HBV<sup>(80, 81)</sup>.

Um estudo recente investigou as respostas imuno-específicas do HBV em doadores de sangue com hepatite B oculta mostrando, que as respostas Th1 específicas do HBV foram quantitativamente mais fortes em portadores de hepatite B oculta do que em indivíduos HBsAg positivos, levando os autores a concluir que o sistema imunológico do hospedeiro tem a capacidade de suprimir a replicação do HBV<sup>(82, 83)</sup>.

#### 1.6.1.4. Fatores epigenéticos

Os mecanismos epigenéticos tem um papel importante na regulação e transcrição do HBV. As moléculas de cccDNA do HBV, parecem estar sujeitas as mesmas atividades enzimáticas envolvidas na remodelação da cromatina. A supressão do HBV é o resultado de modificações funcionais e potencialmente reversíveis do meio intracelular, que pode ser

devido a co-infecção por outros agentes patogênicos ou induzida por agentes químicos ou por fatores imunológicos, como citocinas. Assim, a supressão da atividade do HBV pode ser responsável não só pela negatividade do HBsAg, mas também por níveis de DNA muito baixos ou indetectáveis<sup>(81)</sup>.

#### 1.6.1.5. Co-infecções

Vários estudos relataram a alta prevalência de hepatite B oculta em pacientes portadores dos vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e principalmente, portadores do vírus da hepatite C (HCV), até mesmo *Schistosoma mansoni*. Estudos in vitro mostraram que a proteína do *core* do HCV pode inibir a replicação do HBV, explicando assim uma maior prevalência de hepatite B oculta em pacientes infectados com HCV<sup>(80, 81)</sup>. A prevalência da hepatite B oculta entre os pacientes HIV-positivos varia de acordo com os métodos utilizados para a detecção do DNA do HBV e a endemicidade do HBV na região geográfica estudada. Os mecanismos específicos responsáveis pela infecção por hepatite B oculta em indivíduos infectados pelo HIV são desconhecidos<sup>(74)</sup>.

#### 1.6.1.6. Imuno-complexos na Hepatite B Oculta

A soroconversão do HBsAg para anti-HBs pode levar a formação de imuno-complexos com o DNA do HBV e a associação do HBsAg com anti-HBs em imuno-complexos pode prejudicar a detecção do HBsAg por ensaios sorológicos convencionais, assim havendo desta forma a possibilidade de provocar uma situação que poderia ser considerada como hepatite B oculta<sup>(74)</sup>. O DNA do HBV foi detectado em 19/50 dos doadores de sangue HBsAg negativos e anti-HBc positivos, dos quais 11 apresentavam imunocomplexos e segundo o autor do estudo (Yotsuyanagi et al., 2001) esses doadores deveriam ser excluídos da transfusão.<sup>(84)</sup>

### 1.6.3. Transmissão por Transfusão

As implicações clínicas na hepatite B oculta envolvem diferentes aspectos, tais como o risco de transmitir hepatite B por doações de sangue ou hemoderivados, transplante hepático, hemodiálise ou transplante de células tronco hematopoiéticas<sup>(85)</sup>.

A infecção pelo vírus da hepatite B por transfusões é bem documentada e o risco residual de transmissão do HBV por transfusões é significativamente maior do que o risco

residual por outros vírus como o HIV e o HCV <sup>(85)</sup>. Sabe-se que portadores de hepatite B oculta podem representar risco de transmissão do HBV em transfusões sanguíneas <sup>(68, 69, 85)</sup>.

Segundo Raimondo (2013) três condições podem ser responsáveis pela transmissão transfusional do HBV:

1) O doador em período de janela imunológica caracterizado pela negatificação do HBsAg, estado virêmico e infecção aguda pelo HBV;

2) O doador é um típico “portador de hepatite B oculta” com o vírus do tipo selvagem que suprime a atividade replicativa e a expressão dos genes. Este caso é caracterizado por períodos de viremia transitória alternados com períodos em que o DNA não é detectado no soro, indicando ser um portador de hepatite B oculta com um perfil de infectividade sanguínea variado ao longo do tempo, apresentando baixa quantidade de DNA no soro ou no plasma, podendo causar hepatite B aguda no receptor;

3) O doador é infectado com cepas mutantes do HBV (S de escape) que são competentes para a replicação, mas que produzem proteínas de superfície anormais <sup>(82)</sup>.

Pouco se sabe sobre a clara relação entre a infectividade e carga viral em componentes do sangue, que podem estar relacionadas a fatores imunes afetando a suscetibilidade à infecção em receptores. Além disso, a infectividade do HBV está diretamente relacionada com a quantidade de plasma transfundido e a carga viral no produto <sup>(85)</sup>.

Existem casos relatados de transmissão de HBV aos receptores de doadores com hepatite B oculta que carregavam apenas anti-HBc, e um portador com anti-HBs positivo que transmitiu HBV por transfusão a dois receptores imunocomponentes <sup>(86, 87)</sup>.

#### **1.6.4. Prevalência e detecção da Hepatite B Oculta**

A prevalência da hepatite B oculta é amplamente variável nas diferentes populações estudadas, com taxas variando a menor que 1% a 90%. Esta variabilidade pode ser decorrente de alguns fatores como: os diferentes níveis de endemicidade nas populações de estudo, maior risco de se infectar pelo HBV nessas populações e as diferenças na sensibilidade e especificidade dos métodos usados para detecção da hepatite B oculta <sup>(88, 89)</sup>.

A prevalência da hepatite B oculta foi investigada em áreas de alta endemicidade de HBV, em usuários de drogas intravenosas, em pacientes que receberam transplantes de órgãos, pacientes em hemodiálise e doentes com HIV e / ou HCV sendo que a prevalência se

aplica a cada grupo específico <sup>(82, 88, 90)</sup>. Em se tratando de HBO em portadores com HCV a prevalência se mostra elevada, com DNA-HBV em cerca de 33% dos pacientes HCV e HBsAg negativos na Itália e acima de 50% no Leste Asiático <sup>(80, 91)</sup>. Em um estudo mais recente realizado por Mandour MF et al. (2015) em uma população do Egito a prevalência de DNA-HBV foi de 8,5% nos 210 pacientes com infecção crônica pelo HCV <sup>(92)</sup>.

Em revisão (Maldonado-Rodriguez et al.) realizada durante o período de 2003 a 2014 em paciente HIV positivos a prevalência de hepatite B oculta nesses pacientes variou de 0,63% a 88,4% <sup>(90)</sup>. Na Tailândia, estudo realizado em 1682 mulheres grávidas HBsAg negativas infectadas com HIV, observou-se uma prevalência de 24% de hepatite B oculta <sup>(93)</sup>.

Revisão sobre hepatite B oculta em diferentes populações estudadas no Egito mostrou prevalências variáveis. A prevalência de hepatite B oculta entre adultos egípcios variou de 0,48% a 58,3%. Em crianças HCV positivas, a HBO foi de 32%, em crianças talassêmicas a prevalência foi de 32,5% e 21% de crianças com neoplasias e distúrbios hematológicos apresentaram HBO <sup>(94)</sup>. Estudo realizado em uma população de alto risco na Austrália mostrou taxa de prevalência de hepatite B oculta de 0,69% <sup>(95)</sup>. A hepatite B oculta também foi descrita entre um grupo de 80 famílias da Índia dentre as quais 149 membros dessas famílias foram testados por sorologia e nested-PCR para HBV e cerca de 72/149 apresentaram anti-HBc positivo e a prevalência de infecção oculta foi de 10,1% entre os membros das famílias testadas <sup>(96)</sup>. Na Indonésia, um estudo realizado em 195 adultos jovens aparentemente saudáveis mostrou uma prevalência de HBO de 15,8% entre indivíduos anti-HBc positivos e/ou anti-HBs positivos. Entre os casos de HBV oculto, níveis de anti-HBs >100UI/l foram observados, indicando que o sangue com anticorpos anti-HBs e anti-HBc não podem ser considerados não infecciosos nem seguros para uso em transfusão <sup>(97)</sup>.

A prevalência de hepatite B oculta em doadores de sangue também é muito variável refletindo a endemicidade da região e a sensibilidade dos testes usados para o diagnóstico dos marcadores sorológicos e os testes moleculares. Em muitos casos, os testes de diagnóstico molecular são realizados em pool de amostras, incluindo muitas vezes amostras de doadores de repetição, primodoadores, doação de depósito e voluntária, até mesmo, amostras HBsAg positivas levando a resultados falso positivos <sup>(71)</sup>.

No Iran, um estudo realizado em 2006 com 270 doadores de sangue saudáveis, 14/270 (5.18%) amostras foram HBsAg negativas/ anti-HBc positivas, e o DNA HBV foi encontrado



em 4/14 dentre as quais 2/4 eram anti-HBs positivos <sup>(98)</sup>. Em um estudo realizado em 3.167 doadores de sangue do Egito (Said et al .2013) a prevalência global de anti-HBc positivo foi 14.2% (451/ 3167), positividade de anti-HBs foi 64% e a prevalência de hepatite B oculta foi 17,2% (52/303) em doadores de sangue anti-HBc positivos <sup>(99)</sup>.

Estudos realizados em países da Ásia Ocidental, na Africa (Nigéria) e na Índia detectaram DNA-HBV em doadores de sangue: o DNA-HBV foi detectado em 1 amostra de (78/2.041) daqueles que foram HBsAg negativo e anti-HBc-positivo <sup>(100)</sup>; Na Nigéria o DNA-HBV foi detectado em 72/429 (17%) das quais 48 (67%) foram positivos para anti-HBc, 25 (35%) positivos para anti-HBs <sup>(101)</sup>; Na Índia um total de 28.134 HBsAg doadores não reativos no ELISA foram testados para NAT individual (NAT-ID), o DNA-HBV foi detectado em 18 amostras das quais 0,66% (12/18) eram anti-HBc e 25% (3/12) de anti-HBs. Dos 12 doadores anti-HBc positivos 12 foram considerados HBV oculto, o restante estavam em período de janela de infecção por HBV <sup>(102)</sup>.

Estudos realizados na América Latina relatam casos de HBO em doadores de sangue: 4,3% de 258 doadores HBsAg negativos / anti-HBc positivos da Venezuela e 6,4% de HBO em 372 doadores HBsAg - / anti-HBc + do México <sup>(103, 104)</sup>.

No Brasil, existem poucos estudos de prevalência de hepatite B oculta. Em um estudo realizado por Motta-Castro et al (2008). no estado do Mato Grosso do Sul (MS) em uma comunidade afro-brasileira, altamente exposta ao HBV, 40 indivíduos apresentam o DNA-HBV em 219 amostras HBsAg negativas, apresentando uma taxa de HBV oculto global de 18,3% <sup>(105)</sup>. Em Recife, um estudo com 752 pacientes hemodialisados, todos HBsAg negativas, o anti-HBc foi positivo em 26,7% (201/752), o anti-HBs foi detectado em 67,2% (135/201), e o anti-HBc isolado foi 5,7% . A prevalência de HBV oculto neste grupo foi 1,5% <sup>(106)</sup> . No estado do Amazonas, área de endemicidade alta para o HBV, Barros et al. (2008) não observaram associação significativa entre HBV oculto e os fatores de risco para infecção pelo HBV entre os 51 pacientes anti-HBc positivos, dos quais 17% foram DNA-HBV positivos <sup>(107)</sup>.

Um dos fatores que influenciam na prevalência é o método de diagnóstico empregado nas populações estudadas. Assim o diagnóstico de HBO requer testes de alta sensibilidade, entretanto vários fatores podem influenciar os resultados. Ensaio moleculares baseados em PCR em tempo real ou *nested* -PCR em soro ou plasma são utilizados para detecção de HBV,

e os testes de ácidos nucleicos (NAT) são usados em bancos de sangue para triagem de doadores de sangue <sup>(85, 108)</sup>.

Raimondo et al. (2008) discutem vários fatores metodológicos que podem influenciar a pesquisa de HBO, considerado o DNA único marcador confiável de detecção da HBO. Neste sentido a etapa da extração do DNA é muito importante, pois a carga viral é baixa. Outro fator importante é o volume de amostra usado para extração do DNA genômico sendo necessário pelo menos 1 mL de plasma ou soro para assegurar a sensibilidade do ensaio. Além disso é recomendado o uso de iniciadores/primers que se estendam por, pelo menos três regiões do genoma do HBV, tais como os genes S, X e os genes do *core*, bem como o uso de controles positivos e negativos, e a validação deve exigir a detecção de pelo menos duas regiões do genoma <sup>(66, 71)</sup>. Segundo Hollinger et al. (2010) o limite inferior preferido de detecção de DNA-HBV está entre 5 UI/ml-10UI/ml e < 0,1 ng/ml (2UI/ml) para o HBsAg. Por conseguinte, os testes sorológicos de detecção do HBsAg, anti-HBc, anti-HBs juntamente com a pesquisa de DNA-HBV são fundamentais para o diagnóstico da infecção por HBV e HBO contribuindo para a segurança transfusional <sup>(68)</sup>

### 1.7. Justificativa

A hepatite B oculta é definida como a detecção do DNA-HVB no sangue e/ou fígado de indivíduos negativos para o HBsAg geralmente assintomáticos, como os doadores de sangue. A hepatite B oculta é um tema muito pesquisado no mundo inteiro, sendo debatido desde década de 70 e apresenta uma prevalência muito diversificada, nas diferentes populações de estudos. A HBO em bancos de sangue apresenta grande importância clínica devido a possibilidade de transmissão do HBV por doações de sangue ou hemoderivados, células tronco e transplante de órgãos.

A fim de evitar a transmissão de agentes infecciosos, tais como o HBV, políticas de segurança transfusional vêm sendo adotadas nos bancos de sangue do mundo inteiro, como a melhoria nos testes de detecção de agentes infecciosos. No Brasil a política de segurança transfusional adotada pelos bancos de sangue inclui o descarte das unidades de hemocomponentes que apresentem reatividade aos marcadores HBsAg e/ou antiHBc. O Ministério da Saúde implementou plataformas para detecção do material genético do HCV, HIV, e recentemente para o HBV, através de testes de ácidos nucleicos (NAT), representando importante avanço para assegurar segurança transfusional dos serviços de hematologia e hemoterapia, em especial na Amazônia Brasileira.

Considerando a Amazônia Brasileira um lugar de alta prevalência de infecção do HBV e frequência do marcador anti-HBc, existe pouca informação sobre a prevalência de hepatite B oculta, e este estudo pretende contribuir para o conhecimento sobre HBO em doadores de sangue e outras populações desta região.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral:**

- Pesquisar a existência da hepatite B oculta em doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM) e em um grupo de indivíduos moradores do município de Eirunepé/AM.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Pesquisar a presença de hepatite B oculta em doadores de sangue da FHMOAM utilizando amostras com o seguinte perfil sorológico: negativas para os marcadores do antígeno de superfície do HBV/HBsAg, Sífilis, HIV, Doença de Chagas e HTLV.
- Pesquisar a presença de hepatite B oculta em subgrupo de doadores da FHMOAM utilizando amostras com o seguinte perfil sorológico: negativas para o antígeno de superfície do HBV/HBsAg e Anti-HBc-positivos.
- Pesquisar a presença de Hepatite B oculta em moradores do município de Eirunepé/AM que participaram de inquérito sorológico para HBV e que apresentaram o seguinte perfil sorológico: negativo para o antígeno de superfície do HBV/HBsAg, Anti-HBc-positivo e/ou Anti-HBs positivo.
- Estimar a prevalência da Hepatite B oculta nas populações de estudo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Modelo de Estudo

Estudo descritivo.

#### 3.2. Grupos de Estudo

O estudo foi realizado em três grupos populacionais distintos compreendendo dois grupos de doadores da FHEMOAM e o segundo grupo compreendeu indivíduos voluntários recrutados no município de Eirunepé/AM

##### ➤ Grupo I FHEMOAM

Entre os doadores de sangue da FHEMOAM dois grupos foram testados: o primeiro grupo incluiu 1200 amostras de bolsas de plasma de doadores da FHEMOAM negativos para os marcadores sorológicos HBsAg, Sífilis, HIV, Doença de Chagas e HTLV . As amostras foram coletadas no período entre Julho/2013 a Janeiro de 2014 . A confirmação do perfil sorológico destes doadores foi realizada através de busca ativa no Sistema de Acompanhamento a Doação de Sangue (SAD). As amostras foram alicotadas em triplicata em microtubos esféricos de 2.0 mL (Axygen) e armazenadas em freezer -80°C no laboratório de ensino da FHEMOAM para posterior análise molecular.

O segundo grupo incluiu doadores anti-HBc positivos, e com sorologia negativa para HBsAg, Sífilis, HIV, Doença de Chagas e HTLV. Para este fim uma amostragem de conveniência constituída por 294 doadores com este perfil sorológico, que foi levantada durante o período entre Março/2014 a Novembro/2014 e compreendia doadores de ambos os sexos.

A detecção dos marcadores sorológicos do vírus da hepatite B (HBsAg e Anti-HBc) foi realizada por quimioluminescência no laboratório de sorologia da FHEMOAM, como parte da rotina de triagem sorológica realizada pela FHEMOAM utilizando os kits CMIA-ARCHITECT, HBsAg (Abbott) e o teste confirmatório de neutralização por quimioluminescência CMIA-ARCHITECT (Abbott). A pesquisa de anticorpos contra a partícula core do vírus B da hepatite (anti-HBc total) foi realizada por quimioluminescência (CMIA)-ARCHITECT anti -HBC II (Abbott). A confirmação do perfil sorológico destes

doadores foi realizada através de busca ativa no Sistema de Acompanhamento a Doação de Sangue (SAD) bem como o tipo de doador (primeira vez ou repetição).

As amostras de soro destes 294 doadores selecionados foram alicotadas em triplicata em microtubos esféricos de 2.0 mL (Axygen) e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise molecular no laboratório de biologia molecular da FHEMOAM.

#### ➤ **Grupo II Eirunepé:**

O segundo grupo de estudo compreendeu moradores do interior do Estado do Amazonas, município de Eirunepé, pertencente a microrregião do Juruá, considerada região de alta endemicidade para HBV, que foram recrutados em 2009 como parte de projeto de pesquisa visando estimar a prevalência de hepatite B na região. Para este estudo foi realizada triagem sorológica em 720 voluntários do município de Eirunepé entre os quais a prevalência de positividade para HBsAg foi de 4,72% (34/720; Kiesslich D dados não publicados). A sorologia para pesquisa do HBsAg, anti-HBe, anti-HBc, anti-HBs, foram realizadas nas 720 amostras por meio de teste imunoenzimático do tipo ELISA (Murex, Abbot, USA), no Laboratório de Pesquisa da FHEMOAM.

As 720 amostras de soro obtidas de sangue coletado em Eirunepé foram aliqüotadas e acondicionadas freezer -80°C no Laboratório de Pesquisa na FHEMOAM. Tendo-se em conta os critérios de seleção (HBsAg negativas, anti-HBc positivas e/ou anti-HBs positivas), disponibilidade de volume suficiente para as análises moleculares e as condições das amostras (não lipêmicas, não hemolisadas) foram selecionadas 288 amostras para pesquisa da hepatite B oculta.

### **3.3. Aspectos Éticos**

Este projeto faz parte de um projeto maior intitulado: “NAT para o HBV uma necessidade” que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FHEMOAM (número de aprovação CAEE: 10152013.6.0000.0009). O mesmo recebeu financiamento da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM edital N.021/201.

O projeto que avaliou os moradores de Eirunepé foi aprovado pelo CEP da Universidade Federal do Amazonas (número de aprovação CAEE: 0072.0.115.000-07).

### 3.4. Procedimentos Laboratoriais

#### 3.4.1. Extração do DNA-HBV em pools de amostras

**Grupo I FHEMOAM:** No primeiro grupo de doadores de sangue da FHEMOAM foram inicialmente avaliados 1200 bolsas de plasma com sorologia negativa para todos os marcadores sorológicos da triagem de doadores de sangue. Estas amostras foram testadas em 100 pools, cada um com 12 amostras individuais, quanto a presença de DNA-HBV por PCR em tempo real para a região do gene X do HBV. Cada pool continha 1ml de cada amostra totalizando 12 ml. Foram centrifugados a 48,000 g por 1 hora para concentração viral. Após a centrifugação foram aliqüotados 200 µL do total de 12 ml de cada pool para extração do DNA, utilizando Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). As amostras extraídas foram estocadas no freezer a -20°C para posterior realização da reação em cadeia da polimerase em Tempo Real.

No segundo grupo de doadores, foram confeccionados 49 pools cada um com 6 amostras individuais a partir das 294 amostras selecionadas. Cada pool continha 200 µL de cada amostra totalizando 1200 µL. Foram centrifugados a 1400 rpm por 10 minutos (centrífuga - *Eppendorf 5417R*). Após a centrifugação foram aliqüotados 200 µL do total de 1200 µL para extração do DNA genômico por equipamento (QiaCube), utilizando Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, USA), seguindo normas do fabricante, e com eluição final de 100 µL. As amostras extraídas foram estocadas no freezer a -20°C para posterior realização da reação em cadeia da polimerase em Tempo Real.

**Grupo II Eirunepé:** Foram confeccionados 48 pools cada um com 6 amostras individuais a partir das 288 amostras selecionadas. Utilizamos o mesmo método de extração do DNA genômico que foi empregado para participantes do grupo I.

Após a extração do DNA genômico, todos os pools tiveram a concentração de DNA quantificada no espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 Thermo Scientific).

#### 3.4.2. PCR em Tempo Real (qRT-PCR) “in house” para amplificação do DNA-HBV

Antes de iniciar os ensaios de qRT-PCR “in house” com as amostras extraídas, construímos uma curva padrão para detecção e quantificação da região do gene X e gene S do HBV a partir de uma amostra sabidamente positiva que apresenta valor de HBeAg >3.000

mUI/ml. A fim de padronizar e controlar os testes “in house” foi utilizado também o painel de quantificação do HBV (OptiQuant HBV DNA Panel, AcroMetrix® HBV Panel 0.5 mL, Life Technologies, EUA) que possui concentrações de DNA-HBV que variam de  $2 \times 10^2$  a  $2 \times 10^7$  UI/mL e um controle negativo.

Para a construção da curva fizemos inicialmente uma diluição seriada ( $1:10^1$ ;  $1:10^2$ ;  $1:10^3$ ;  $1:10^4$ ;  $1:10^5$ ;  $1:10^6$ ;  $1:10^7$ ) a partir de amostra de concentração conhecida (HBeAg positiva) em volume final de 10ml. Os tubos contendo as diluições foram centrifugados (14.000g, 10 minutos), quais foram retirados 200  $\mu$ L de cada diluição para extração de DNA. O DNA das amostras do painel de quantificação do HBV e das amostras da curva padrão foram extraídos utilizando-se Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, USA), como descrito pelo fabricante.

Os ensaios de qRT-PCR para a curva padrão e o painel de Quantificação do HBV foram realizados em uma microplaca óptica de 96 cavidades (MicroAmp®, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) onde foram adicionados em duplicata, 25  $\mu$ L do mix contendo: 11,25  $\mu$ L TaqMan Universal PCR Master Mix (Roche, Nova Jersey, EUA), 1,25  $\mu$ L de assay (40 nM de cada primer e 10 nM da sonda) e 12,5  $\mu$ L de DNA. A reação da qRT-PCR foi realizada em plataforma 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®) nas seguintes condições de ciclagem: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A fluorescência foi detectada ao final da etapa de hibridização da sonda. O valor de *cycle threshold* (Ct) – ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o "threshold" (limiar de detecção) servindo como base para comparação entre as amostras - foi fornecido automaticamente em cada corrida permitindo a quantificação exata baseada na fluorescência.

Após os ensaios realizados com a construção da curva padrão juntamente com o painel de quantificação do HBV, os pools de amostras extraídos foram submetidos a reação de PCR em tempo real, para duas regiões do genoma (gene S<sup>(109)</sup> e gene X<sup>(110)</sup>) com seus respectivos iniciadores (quadro 1). As condições de ciclagem e o volume final de 25  $\mu$ L foram as mesmas para ambos os genes (quadro 2 e 3). A reação da qRT-PCR foi realizada em plataforma 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®) em uma microplaca óptica de 96 cavidades (MicroAmp®, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) onde foram adicionados os pools de amostra em duplicata, juntamente com os *logs* da curva padrão e do painel de quantificação do HBV.



O ensaio de PCR em tempo real “in house” foi realizado no primeiro grupo de doadores de sangue (1200 amostras/ 100 pools) apenas para a região do gene X. Neste grupo não identificamos nenhum pool positivo para DNA-HBV. Como esta amostragem foi negativa, as características destes indivíduos não foram detalhadas.

**Quadro 1:** Sequências dos iniciadores para a amplificação do gene S e gene X, respectivamente.

Nome	Sequência	Tamanho do Fragmento
<b>Gene (X)</b>		
HBV F3	5'-GGC CAT CAG CGC ATG C-3'	86 pb
HBVR3M3	5'-CGC TGC GAG CAA AAC A-3'	
Probe HBV-P3	FAM5-'CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTC-3' - TAMRA	
<b>Gene (S)</b>		
HBV 364SF	5'-CAC CAA CCT CTT GTC CTC CAA-3'	61pb
HBV 364SR	5'- GAT AAA AGC CCG CAG ACA CAT C-3'	
Probe HBV-364SM1	FAM-CCT GCT CTG GCT ATC GCT- MGB	

**Quadro 2:** Concentração, volume dos reagentes e programa para amplificação do gene X .

Reagentes	Mix	Ciclo da Reação		
TaqMan Universal Master Mix 2x	12,5 µL	Ciclos	Temperatura	Tempo
Iniciador F (10 pMol)	1,5 µL	1	50°C	2 minutos
Iniciador R (10 pMol)	1,5 µL	1	95°C	10 minutos
Sonda TaqMan (10 pMol)	0,5 µL	45	95°C	15 segundos
DNA	9.0 µL	1	60°C	1 minutos
Vol. Final	25 µL			

\*F= Foward; R= Reverse

**Quadro 3:** Concentração, volume dos reagentes e programa para amplificação do gene S.

Reagentes	Mix	Ciclo da Reação		
TaqMan Universal Master Mix 2x	11,25 µL	Ciclos	Temperatura	Tempo
Assay:	1.25 µL	1	50°C	2 minutos
DNA:	12,5 µL	1	95°C	10 minutos
Vol. Final	25 µL	45	95°C	15 segundos
		1	60°C	1 minutos

### **3.4.3. Pools positivos para DNA-HBV, extração de DNA em amostras individuais e ensaio de qRT-PCR “*in house*” para DNA-HBV**

Após a identificação dos pools positivos para DNA-HBV no ensaio de PCR em tempo real e das 6 amostras individuais que cada pool continha, procedemos a extração de DNA de cada amostra separadamente utilizando-se alíquotas armazenadas em freezer -80°C, utilizando o Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, USA), com eluição final de 100 µL.

Após a extração de DNA de todas as amostras individuais, procedemos quantificação do mesmo no espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 Thermo Scientific).

Para as amostras individuais, foi realizado o ensaio em PCR em tempo real para amplificação das regiões do gene X e gene S do HBV, com as mesmas condições e iniciadores citados nos quadros 1-3. Em microplaca óptica de 96 cavidades (MicroAmp®, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) foram adicionadas as amostras em duplicata, juntamente com as diluições da curva padrão e do painel de quantificação do HBV.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características das populações estudadas

As principais características sócio-demográficas dos dois grupos nos quais identificamos casos de HBO estão resumidas na Tabela 1.

Do grupo I composto por 294 doadores de sangue da FHEMOAM (anti-HBc positivos/HBsAg-negativo), sem avaliação do marcador anti-HBs. A faixa etária deste grupo foi entre 18 e 67 anos (mediana = 39 anos, desvio padrão = 10,29). Entre os doadores da FHEMOAM 68% (201/294) pertenciam ao gênero masculino e 32% (93/294) era do gênero feminino. Quanto a classificação do tipo de doadores 83,3% eram doadores de primeira vez e 16,7% eram doadores de repetição e a maioria dos doadores eram naturais de municípios do interior do Amazonas como: Codajás, Manacapurú, Coari, Lábrea, Carauarí, Benjamim Constant, Tefé, Tapauá, Humaitá, Itacoatiara.

No grupo II constituído por 288 indivíduos de Eirunepé, 7,7% (22/288) eram anti-HBc isolado e 92,3% (266/288) eram anti-HBc+/anti-HBs+/HBsAg(-). A faixa etária destes participantes variou entre 1 a 76 anos (mediana = 35 anos, desvio padrão = 14,51). Dentre estes, 34% (99/288) pertenciam ao gênero masculino e 66% (189/288) eram gênero feminino.

**Tabela 1:** Principais dados sócio-demográficas dos grupos do estudo para pesquisa de hepatite B oculta pelo HBV no Amazonas.

<b>Procedência</b>	<b>Grupo I Doadores (n= 294)(%)</b>	<b>Grupo II Eirunepe (n= 288)(%)</b>
Manaus	96 (32)	-
Eirunepé	-	288 (100)
Outros municípios	198 (67)	-
<b>Gênero</b>		
Masculino	201 (68)	99 (34)
Feminino	93 (32)	189 (65)
<b>Idade (anos)</b>		
<20	2 (0,7)	16 (5,5)
20-40	153 (52)	159 (55)
40-65	136 (46)	97 (34)
>65	2 (0,7)	16 (5,5)

#### 4.2. Curva padrão e painel de quantificação do ensaio de qRT-PCR “in house” para DNA-HBV

Os resultados do ensaio de PCR em tempo real para a quantificação do DNA-HBV incluiu curva padrão construída a partir de diluições decimais ( $10^1$  a  $10^7$ ) de uma amostra HBeAg sabidamente positiva testada em paralelo com o painel de quantificação do HBV (Figura 8 A e 8 B). Os resultados de um teste representativo mostram valores de coeficiente de correlação linear  $R^2 = 0,987$  e inclinação da curva/slope=  $-3,39$  e o *intercept* / valor do Ct esperado em  $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$  de amostra foi de 41.7. Sabe-se que quanto mais perto o valor de  $R^2$  for do número 1, mais perfeito é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e o Ct das amostras, e uma inclinação/slope:  $-3,3$  indica 100% de eficiência. No nosso ensaio o limite mínimo de detecção de DNA-HBV do ensaio de PCR em tempo real foi de 6UI/ml ou 34,92 cópias/mL. De acordo com a norma internacional para DNA-HBV (NIBSC Code 97/746) o fator de conversão de amplificação em tempo real é de 5,82 cópias/ml <sup>(111, 112)</sup>.

A

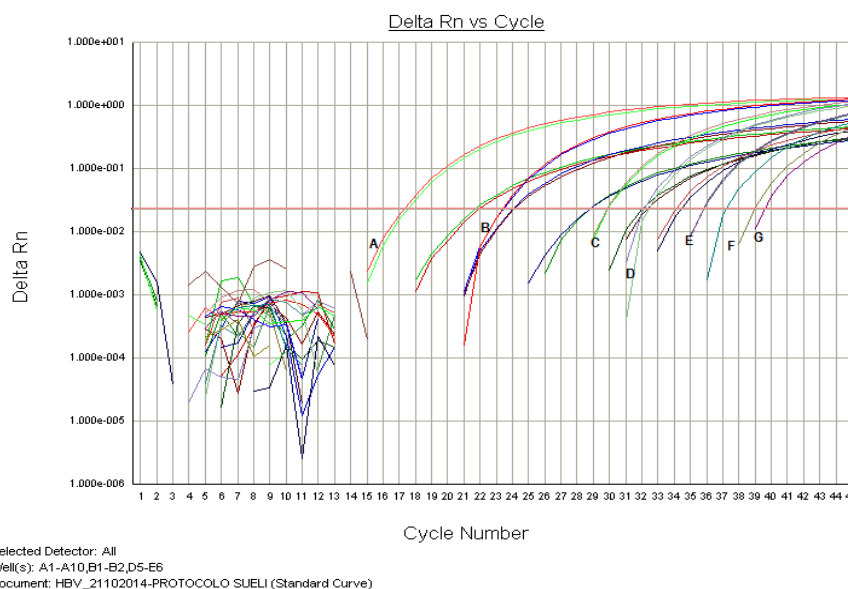


Figura 8: (A) Curva de fluorescência referente a estimativa do limite de detecção da PCR em tempo real para HBV. Cada letra corresponde as diluições decimais : A -  $10^7$ , B -  $10^6$ , C -  $10^5$ , D -  $10^4$ , E -  $10^3$ , F -  $10^2$  e G -  $10^1$ .

B

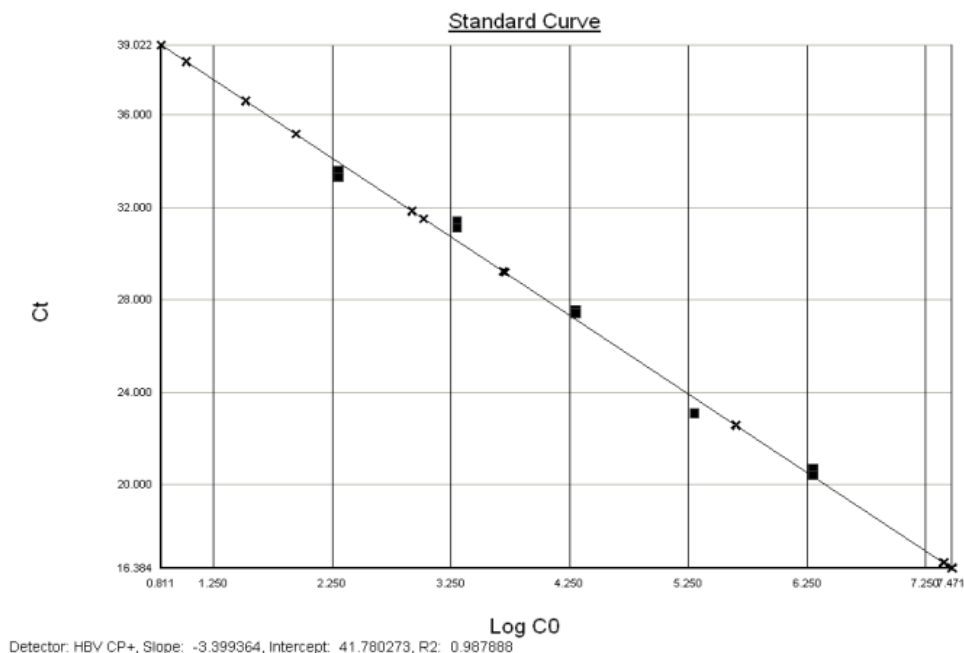


Figura 8: (B) Gráfico da curva padrão com painel de quantificação HBV e diluições. Amostras padrão do painel de quantificação do HBV estão representadas pelo quadrado ■ e a duplicata das diluições pelo x. Figuras geradas pelo 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

#### 4.3. PCR em tempo real qRT-PCR “in house” para DNA-HBV em pools de amostras dos dois grupos populacionais - FHEMOAM e Eirunepé/Amazonas

Para o grupo de doadores de sangue FHEMOAM (grupo I = 294 doadores) e os indivíduos de Eirunepé (grupo II = 288 indivíduos) após a realização da extração do DNA-HBV em pools, este foi quantificado por espectrofotometria cuja concentração de DNA nos pools extraídos do grupo I (49 pools) e grupo II (48 pools) variou de 1,7 ng/  $\mu$ L a 8,9 ng/  $\mu$ L.

Assim, após a padronização dos ensaios com as diluições e o painel de quantificação do HBV, os pools de amostras dos participantes do grupo I e II foram testadas por PCR em tempo real. Para cada reação foi incluída a curva padrão, o painel de quantificação do HBV e os pools das amostras em duplicata.

As amostras dos 294 doadores anti-HBc positivos (grupo I) (Tabela 1), foram testadas em 49 pools, cada um deles com 6 amostras. Dentre estes pools 9 se mostraram reativos para

DNA-HBV por PCR em Tempo Real com Ct variando de 37,47 a 44,9 (Figura 9A). No grupo II, constituído de amostras de 288 indivíduos de Eirunepé, foram testados 48 pools cada um com 6 amostras. Dentre estes pools, 25 se mostraram reativos para o DNA-HBV com Ct variando de 37,35 a 42,3 (Figura 9B).

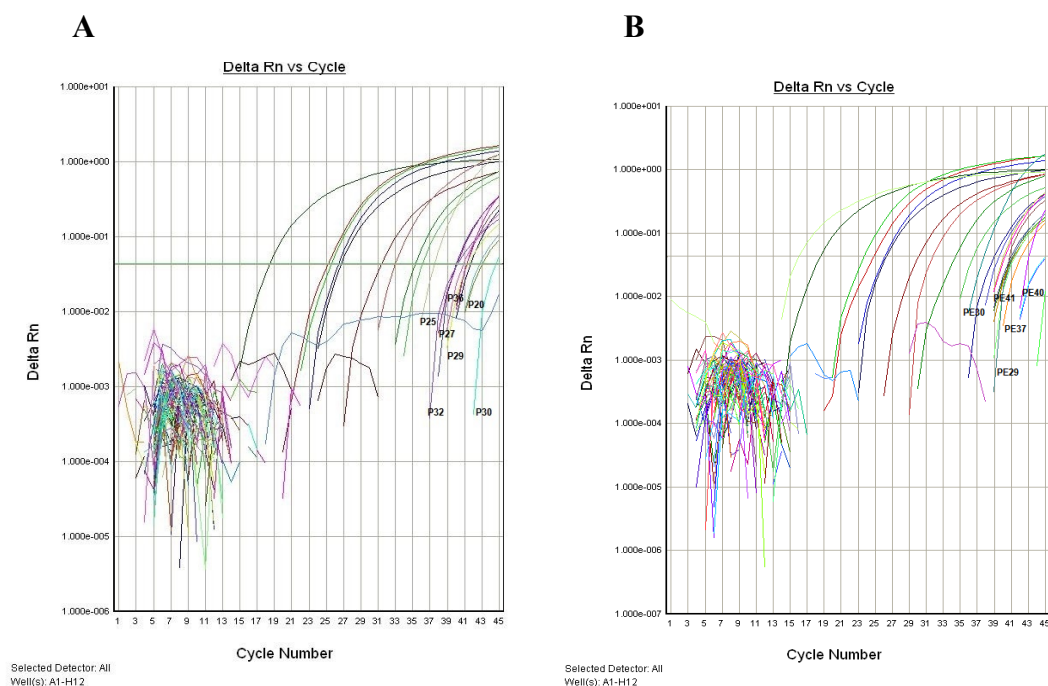


Figura 9 : qRT-PCR “in house” para DNA-HBV: (A) pools de DNA de doadores da FHMOAM; (B) pools de DNA indivíduos de Eirunepé/AM.

Na tabela 2 estão representados os resultados da concentração de DNA através da quantificação por espectrofotometria ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) dos 9 pools de DNA positivos para DNA-HBV pertencentes ao grupo I e dos 25 pools de DNA positivos para DNA-HBV do grupo II juntamente com o *cycle threshold* (Ct) do ensaio de PCR em tempo real dos pools positivos para ambos os grupos.

**Tabela 2:** Características dos pools positivos para DNA-HBV em participantes do grupo I- Doadores FHEMOAM e do grupo II-Eirunepé/Am.

<b>Grupo I- Doadores FHEMOAM (pools +)</b>		
	<b><u>DNA (ng/ <math>\mu</math>L)</u></b>	<b><u>Ct</u></b>
<b>P 20</b>	2,8	43,0
<b>P 25</b>	3,7	37,4
<b>P 27</b>	2,9	40,0
<b>P 29</b>	3,1	41,3
<b>P 30</b>	3,1	41,1
<b>P 31</b>	3,0	42,3
<b>P 32</b>	3,6	40,1
<b>P 36</b>	3,0	40,8
<b>P 40</b>	3,6	44,9

concentração DNA (ng/  $\mu$ L) e *cycle threshold* (Ct)

<b>Grupo II- Eirunepé/Am (pools +)</b>		
	<b><u>DNA (ng/ <math>\mu</math>L)</u></b>	<b><u>Ct</u></b>
<b>PE 1</b>	3,3	39,6
<b>PE 2</b>	3,6	42,3
<b>PE 3</b>	3,8	37,6
<b>PE 4</b>	2,8	42,2
<b>PE 6</b>	3,9	38,1
<b>PE 7</b>	2,9	37,8
<b>PE 8</b>	3,1	38,0
<b>PE 9</b>	3,1	39,2
<b>PE 10</b>	3,4	38,0
<b>PE 11</b>	3,2	38,8
<b>PE 12</b>	3,3	40,7
<b>PE 13</b>	3,5	39,3
<b>PE 14</b>	3,8	37,7
<b>PE 17</b>	3,0	40,1
<b>PE 18</b>	2,9	40,2
<b>PE 19</b>	3,5	39,6
<b>PE 20</b>	2,5	42,1
<b>PE 21</b>	3,4	41,7
<b>PE 29</b>	3,3	44,9
<b>PE 30</b>	3,4	39,6
<b>PE 32</b>	2,9	40,5
<b>PE 37</b>	2,2	42,5
<b>PE 40</b>	3,1	44,7
<b>PE 41</b>	2,4	42,7
<b>PE 45</b>	3,3	40,5

concentração DNA (ng/  $\mu$ L) e *cycle threshold* (Ct)



#### 4.4. PCR em Tempo Real para DNA-HBV das amostras individuais que constituíam os pools positivos

Após a análise de quantificação dos pools positivos do grupo I e II, identificamos as amostras que compunham os respectivos pools. Cada amostra de soro dos pools positivos foram individualmente submetida a extração do DNA e quantificadas por espectrofotometria (concentração variou de 0,6 ng/  $\mu$ L a 8,7 ng/  $\mu$ L) para realização dos ensaios de PCR em tempo real em paralelo com a curva padrão e o painel de quantificação do HBV. Na detecção do DNA-HBV por PCR em tempo real em amostras individuais dos grupos de estudo pode-se observar:

No grupo I, no qual 9 pools foram reativos para DNA-HBV e cada pool continha 6 amostras, 54 amostras que compunham estes pools positivos foram testadas individualmente. Dentre elas, três amostras foram positivas para o DNA-HBV (Figura 10) resultando numa prevalência de hepatite B oculta nestes 294 doadores de sangue da FHEMOAM de 1,0%. Dentre os três doadores com amostras DNA-HBV positivas, 2 eram do gênero feminino e 1 do gênero masculino (Tabela 3).

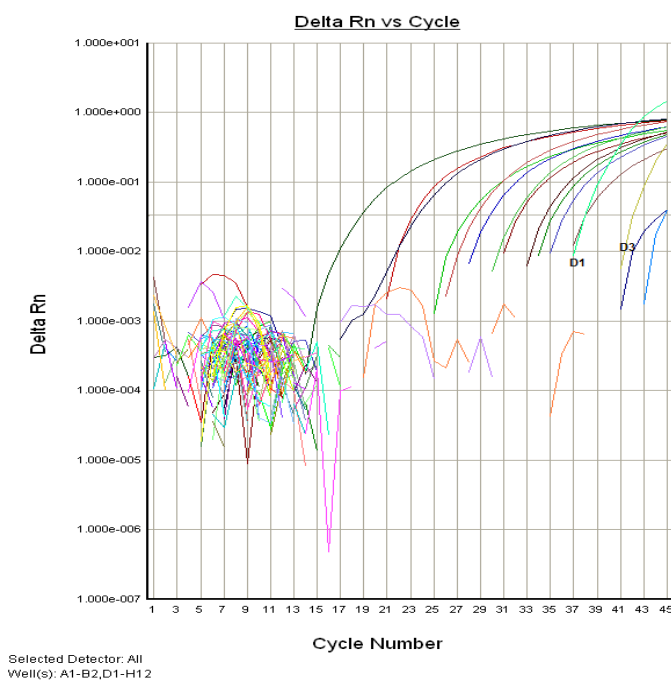


Figura 10: qRT-PCR “in house” para DNA-HBV: curva de fluorescência das amostras de doadores da FHEMOAM com Hepatite B oculta.

No grupo II (Eirunepé/Am), no qual 25 pools foram reativos para DNA-HBV e cada pool continha 6 amostras, 150 amostras que compunham estes pools positivos foram testadas individualmente. Dentre elas, nove (3,1%) amostras foram positivas para o DNA-HBV (Figura 11) sendo que 22,2% (2/9) eram anti-HBc isolado, 77,8% (7/9) tinham anti-HBs associado acima de 100UI/ml. Dentre os 9 participantes de Eirunepé/AM identificados como casos de hepatite B oculta, 6 eram do gênero feminino e 3 eram do gênero masculino e a mediana de idade era 43 anos ( Tabela 4).

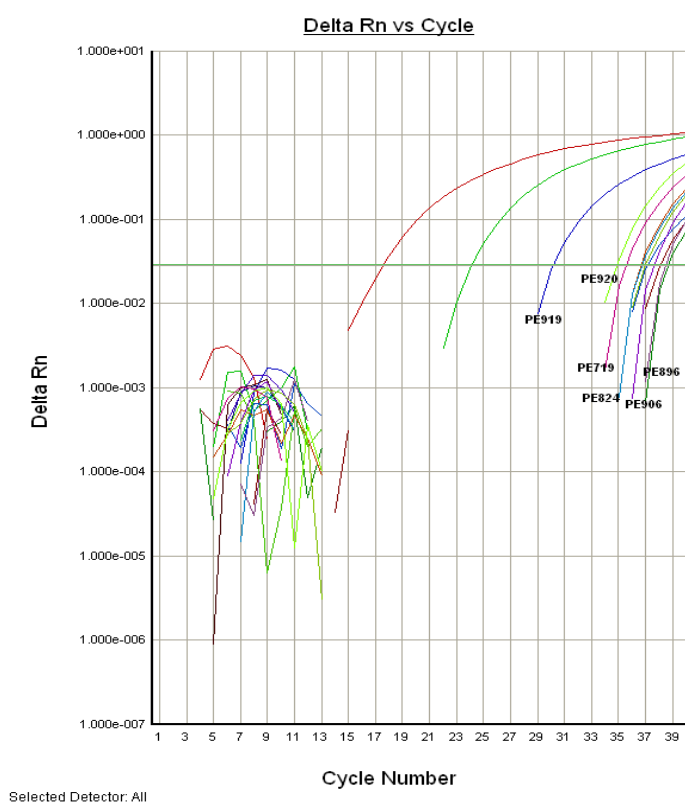


Figura 11: qRT-PCR “in house” para DNA-HBV: curva de fluorescência das amostras de indivíduos de Eirunepé/AM com Hepatite B oculta.

**Tabela 3:** Dados de pacientes com HBO entre doadores da FHMOAM.

Características	Grupo I (n=294)		
	D1	D2	D3
Sexo	F	F	M
Idade	21	42	31
Procedência	Manaus/AM	Jacundá/PA	Benjamim Constant/AM
Anti-HBc Positivo (S/CO) <sup>a</sup>	8.87	7.72	10.75
DNA-HBV (UI/ml)	1.679	1.000	49.48

<sup>a</sup>CMIA – quimioluminescência; S/CO – ponto de corte (*cut-off*) valores > 1 são reativos;  
F: feminino; M: masculino  
D1-D3: Doadores FHMOAM com HBO

**Tabela 4:** Dados individuais dos moradores de Eirunepé/Am identificados com hepatite B oculta.

Grupo II (n = 288)		Características			
Identificação	Sexo	Idade	Anti-HBc (+) <sup>a</sup>	Anti-HBs (+) <sup>b</sup>	DNA HBV (UI/ml)
			DO	DO	
896	F	45	0.068	3000	678.5
719	F	27	0.042	3000	23.4
780	F	38	0.050	2031	21.2
777	F	41	0.058	1704	33.7
824	F	32	0.044	3000	7.42
906	M	46	0.063	1507	6,37
920	F	43	0.037	3000	953.6
1085	M	64	0.040	N	302.5
919	M	43	0.051	N	33.3

<sup>a</sup>ELISA – ensaio Murex, *cut-off* <1 são considerados positivos; <sup>b</sup>ELISA – *cut-off* > 100 é positivo; N: negativo;  
DO: densidade ótica

## 5. DISCUSSÃO

A região Amazônica Brasileira é considerada uma área de alta endemicidade para o HBV. Além do diagnóstico clássico de infecção pelo HBV, definida pela presença de HBsAg, a hepatite B oculta, definida pela presença de DNA- HBV, na ausência do HBsAg com ou sem a presença de anticorpos anti-HBc, ou anti-HBs fora do período de janela imunológica, embora considerada rara, pode também ocorrer. Entretanto, pouco se sabe sobre a prevalência de hepatite B oculta nesta região. Em bancos de sangue, a infecção pelo vírus da hepatite B por transfusões é bem documentada <sup>(85)</sup>. Entre doadores a HBO é particularmente importante visto que pode estar associada ao risco adicional de transmitir hepatite B por doação de sangue ou hemoderivados, transplante hepático, hemodiálise, transplante de células tronco hematopoiéticas <sup>(85)</sup>. Sabe-se que portadores de hepatite B oculta são fontes prováveis de transmissão do HBV em transfusões sanguíneas <sup>(68, 69, 85)</sup>.

Nossos resultados em subgrupo de doadores do FHEMOAM HBsAg negativos e anti-HBc positivos mostraram prevalência de 1% de HBO e a sorologia anti-HBc positiva foi mais frequente em jovens adultos (52%). Estudos sobre prevalência de HBV oculto entre doadores de sangue no Brasil são escassos. Estudo recente realizado por Moresco et al. (2014), identificou uma prevalência de 2,7 % (8/294) entre doadores de sangue (HBsAg negativos e anti-HBc+ e ou anti-HBs+) do interior do Amazonas, dos quais todos os casos eram do gênero masculino. Importante a observação quanto a característica sorológica dos doadores do estudo citado, pois dentre os 8 doadores HBO, seis eram anti-HBs positivos ( $\geq 100$  UI/ml), reafirmando que a presença de anti-HBs com títulos  $\geq 100$  não assegura ausência de DNA-HBV <sup>(113)</sup>. Na cidade de Porto Alegre três estudos mostraram diferentes taxas de prevalências entre doadores de sangue: Silva et al. (2005) estudaram 150 doadores de sangue anti-HBc +/HBsAg negativos identificando uma prevalência de hepatite B oculta de 3,3 % <sup>(114)</sup>. O segundo estudo no entanto <sup>(115)</sup> não detectou DNA-HBV positivo em nenhuma das 158 amostras de doadores de sangue HBsAg negativos. O terceiro estudo realizado no estado do RS <sup>(116)</sup> registrou uma prevalência de 6% de HBO em 100 doadores de sangue HBsAg-/anti-HBc +. Em um estudo realizado por Arraes et al. (2003) em Recife avaliando 120 amostras anti-HBc reativas, a prevalência de HBO foi estimada em 2,5% <sup>(117)</sup>. Em geral todos estes estudos seja no Rio grande do sul ou no Amazonas, indicam a existência de HBO em doadores de sangue em baixa prevalência.

Nossos achados no segundo grupo de estudo com os moradores do município de Eirunepé a prevalência de HBO foi de 3,1% o que corresponde a uma taxa semelhante a encontrada no sul do país. Taxa semelhante também foi identificada entre imigrantes estrangeiros na Itália <sup>(118)</sup>. Taxa de prevalência de HBO de 4,8% <sup>(119)</sup> foi descrita em doadores de sangue italianos apesar do baixo índice de HBV neste país. Outros estudos realizados em áreas consideradas altamente endêmicas para o HBV como a Índia, China, Irã mostraram taxas bem mais elevadas de HBO. No nordeste da China <sup>(120)</sup> entre 359 indivíduos saudáveis (HBsAg negativos com anti-HBc positivo associado ou não ao anti-HBs) a prevalência de HBO observada foi de 10,6%. No Laos a prevalência de HBO em 320 doadores de sangue foi de 10,9% <sup>(121)</sup>. Estudo realizado na Índia em 220 doadores HBsAg -/anti-HBc + descreveu taxa de HBO de 30% <sup>(122)</sup>. Em estudo recente realizado entre 100 doadores de repetição no Sudeste da Nigéria o achado de HBO foi de 8% <sup>(123)</sup>. Desta forma, embora as taxas de HBO observadas entre moradores de Eirunepé/AM tenha sido mais altas que a identificada entre os doadores da FHEMOAM, estas taxas podem ser consideradas baixas quando comparadas com resultados de outros países endêmicos para HBV.

Estratégias para diagnosticar o HBV e reduzir a transmissão do vírus por transfusão de sangue nos hemocentros incluem testes sorológicos (HBsAg/ anti-HBc/ anti-HBs), programas de vacinação e mais recentemente, a realização de testes moleculares que detectam o DNA-HBV por NAT em minipools (MP) ou em amostras individuais (ID) <sup>(85, 124-127)</sup>. A obrigatoriedade do NAT na hemorrede Nacional e privada, veio através da portaria 2.712/2013, de 12 de novembro de 2013. Antes disso estes testes eram realizados apenas em alguns centros privados e poucos hemocentros como FHEMOAM que iniciou implantando NAT para detecção do HIV e HCV em pools de 6 amostras. A rotina de triagem das bolsas de sangue pelo NAT na FHEMOAM iniciou em Junho de 2012 e em Dezembro/2014 a FHEMOAM foi contemplada para a realização do teste NAT para HBV. Novos algoritmos devem ser discutidos sobre a classificação de amostras HBsAg negativas, anti-HBc e ou anti-HBs positivas e DNA-HBV negativas pois a Amazônia brasileira é uma área de alta prevalência do HBV e que apresenta taxas de anti-HBc que variam de 5% a 76% <sup>(7, 10, 49)</sup>. A eficácia da implantação do NAT para o HBV na FHEMOAM ainda não foi avaliada mas certamente esta medida vem contribuindo para a segurança transfusional pois desde do início de sua implantação vários casos de doadores com HBO foram indetificados <sup>(informação pessoal FHEMOAM)</sup>.

A política adotada pelo MS é descartar todas as bolsas de sangue anti-HBc reativas colocando em risco o suprimento do estoque de sangue principalmente no interior do estado onde as taxas são elevadas. Uma vez identificada a positividade para anti-HBc o doador é considerado inapto definitivo. Os EUA estimaram que cerca de 500.000 doadores foram excluídos devido a reatividade do anti-HBc isolado. A positividade anti-HBc isolada pode estar associada tanto a infecções resolvidas, em que os níveis de anti-HBs decaem não sendo detectado por testes sorológicos como pode refletir estágio final de infecções crônicas não sendo detectado HBsAg <sup>(68)</sup>. Nos EUA 65% dos casos anti-HBc positivos era devido a resultados falso-positivos, e em outros estudos na América do Norte e na Europa constou-se que 90% dos doadores de sangue tinham anti-HBs associado ao anti-HBc e os 10% restante eram anti-HBc falso - reativos devido a baixa especificidade dos ensaios <sup>(85)</sup>.

Sabe-se que o anti-HBs é um anticorpo de proteção contra o HBV, refletindo uma resposta vacinal ou resposta de uma infecção pelo HBV resolvida <sup>(126)</sup>. Estudos anteriores sugeriram que as unidades de sangue com títulos de anti-HBs >100 mUI/mL eram seguros para transfusão <sup>(128)</sup>. No nosso estudo não foi possível a avaliação do anti-HBs nos doadores de sangue que carregavam anti-HBc sendo a maioria jovens adultos (52%). No grupo de moradores de Eirunepé/AM, 92% dos indivíduos apresentavam anti-HBc associado a anti-HBs com títulos acima de 100 mUI/ml sendo a maioria jovens adultos (55%) o que corrobora com vários outros estudos <sup>(89, 97, 102, 113, 122)</sup>. Sendo assim é possível contestar a segurança de unidades de sangue com títulos de anti-HBs >100 mUI/mL uma vez que estes apresentam DNA-HBV mesmo que em baixos títulos, podendo transmitir HBV por transfusões sanguíneas, hemoderivados, transplante de fígado <sup>(87, 129, 130)</sup>.

O teste para a detecção de ácidos nucléicos (NAT) do HBV veio contribuir para segurança transfusional tendo sido introduzido a partir de 1990 em alguns países como Europa e no Japão. O objetivo do NAT para DNA-HBV é de detectar unidades infectantes de HBV em indivíduos na fase aguda da infecção e em portadores crônicos e foram originalmente realizados em pools 16 a 96 doações <sup>(131, 132)</sup>. A sensibilidade dos testes realizados em minipools (MP) de 96 doações passou a ser questionada para detecção de agentes infecciosos, devido as baixas cargas virais encontradas em doadores cronicamente infectados pelo HBV, sendo mais eficaz quando se é realizado a detecção individualmente (NAT-ID) <sup>(131, 133)</sup>. O Japão optou por reduzir o tamanho do pool para 20 doações por acreditar que unidades de sangue em fase tardia de infecção pelo HBV poderiam não ser

detectadas por MP-NAT, comprovando através de ensaios realizados em pools de 50 doações e depois de 20 doações <sup>(134)</sup>. No nosso estudo testamos pools contendo entre 6 a 12 amostras evitando assim a diluição de DNA-HBV originalmente em baixa concentração quando se testa pools com um grande número de amostras. Novas estratégias para melhorar a detecção de agentes infecciosos, com maior sensibilidade e especificidade e menores custos se tornaram possíveis mediante uso de ensaios comerciais em formato multiplex (HIV, HCV e HBV) por plataformas automatizadas <sup>(135)</sup>.

O NAT para o HBV no Brasil foi implantado até o momento apenas em alguns hemocentros nacionais, utiliza plataformas automatizadas com kits comerciais fabricados pela Biomanguinhos em MP-6 doações. Estudos no Brasil relacionados a transmissão do HBV por transfusões sanguíneas, transfusão de órgãos, prevalência de HBO são ainda escassos. Nós aplicamos a estratégia para detecção do DNA-HBV em MP-6 doações utilizando a técnica de PCR em tempo real “in house” para detecção de pelo menos duas regiões do genoma como é recomendado pela literatura <sup>(68)</sup>. No grupo dos doadores de sangue da FHEMOAM dos 48 MP-6 doações, 9 pools foram positivos para DNA-HBV. Quando esses 9 pools foram abertos, 54 amostras individuais foram rastreadas para pesquisa do DNA-HBV onde apenas 3 foram positivas. Isso evidencia um possível risco de transmissão do HBV por doadores de sangue com HBO assintomáticos, pois este estudo não avaliou o potencial de infecciosidade destas partículas virais.

Em um recente estudo na Itália, foi realizada a pesquisa do DNA-HBV utilizando PCR em tempo real “in house” em amostras que estavam armazenadas de uma soroteca em MP de 6 doações e amostras de acompanhamento e que inicialmente foram negativas para o DNA-HBV. Os pesquisadores investigaram 70 minipools de 6 doações que foram inicialmente reativos pelo NAT, testaram novamente “in house” e confirmaram que 25 pools eram positivos e 18 amostras se mostraram DNA-HBV positivas. Este estudo analisou também 28 amostras de soro de doações anteriores de 13 doadores identificados como casos de HBO registrando que o NAT em MP-6 doações não conseguiu detectar DNA-HBV em 14/28 (50%) amostras que foram liberadas para transfusão. Neste estudo italiano os casos de HBO eram em doadores de repetição assim como em nosso estudo em doadores da FHEMOAM. No estudo italiano foram identificados 2 receptores que receberam transfusão de hemoderivados de um doador com HBO e 5 meses após a transfusão apresentaram marcadores sorológicos para HBV <sup>(129)</sup>.

Um estudo realizado no Japão detectou 265 doações com sorologia e MP-NAT positivas para HBV, dentre 685.844 doadores de repetição. O NAT individual (NAT-ID) detectou 13 doações DNA-HBV positivas dentre as 265 doações. Foi observado também que 1 receptor transfundido com componentes de sangue de um desses doadores com HBO foi identificado como caso de transmissão do HBV por transfusão, mostrando uma frequência de transmissão por HBO de aproximadamente 1/53.000 doações neste país <sup>(136)</sup>. Em outro estudo no Japão foram analisadas 789 amostras de sangue que foram triadas pelo NAT em MP-20 doações, e revelou que 75 e 85% das infecções pelo HBV transmitidas por transfusão surgiram a partir de doadores em período de janela imunológica e de doadores com HBO, respectivamente. A segurança transfusional teria sido aumentada com o uso do NAT-ID. Este estudo investigou também a relação entre os títulos do anti-HBc e a proporção de doadores virêmicos em 4.742 doadores de sangue com baixos títulos para anti-HBc e anti-HBs através de NAT-ID. Esta análise mostrou que 1,94% das doações com baixos títulos de anti-HBc e anti-HBs eram virêmicos e que os títulos de anti-HBc e a frequência de viremia não se correlacionam <sup>(137)</sup>. Nosso estudo não correlacionou os títulos de anti-HBc com estado virêmico dos doadores de sangue, entretanto os doadores com HBO tinham alta positividade de anti-HBc.

No grupo de indivíduos de Eirunepé, dos 48 MP-6 amostras (soro), 25 pools foram DNA-HBV positivos e 9 amostras foram individualmente DNA-HBV positivas. Dentre as 9 amostras DNA-HBV positivas 7 amostras tinham títulos de anti-HBs acima de 100 mUI/ml. O Anti-HBs é um anticorpo que confere imunidade contra o vírus da hepatite B o resultado positivo no teste Anti HBs, acima de 10 mUI/ml, significa que a pessoa está imunizada contra o vírus da hepatite B, por ter tomado a vacina ou por ter tido contato com o vírus HBV no passado. No Japão as unidades de sangue com títulos de anti-HBs acima de 200 UI/L são aceitas independentemente da titulação do anti-HBc, e as unidades de sangue com títulos baixos anti-HBc também são aceitas independentemente dos títulos de anti-HBs e amostras de sangues com altos positividade do anti-HBc e baixos títulos de anti-HBs (<200 UI/L) são descartados <sup>(137)</sup>. Os anticorpos totais contra antígeno nuclear da hepatite B aparecem na circulação após HBsAg e podem persistir por muitos anos após o desaparecimento do HBsAg. Anti HBc positivo pode ser o único sinal sorológico de exposição ao HBV durante o período da janela imunológica (negativação HBsAg, positividade do anticorpo anti-HBs). Em países cuja prevalência de HBV é moderada como na Itália a triagem para anti-HBc não é realizada, utilizando somente testes para detecção do HBsAg e o NAT para o HBV em minipools de 6



ou 20 doações. Este procedimento foi questionado por Spreafico et al. (2015) num recente estudo que relatou a transmissão do HBV por transfusão a partir da não detecção do DNA-HBV em testes NAT em minipools. Diante destes resultados os autores recomendaram a exclusão de doadores anti-HBc positivos ou a substituição por um NAT mais sensível aplicado a amostras individuais ao invés de pools <sup>(129)</sup>. No Brasil todas as unidades de sangue reativas para anti-HBc são excluídas, gerando um forte impacto na manutenção do estoque de sangue. No nosso estudo com o grupo de doadores de sangue da FHEMOAM das 294 amostras anti-HBc positivas testadas 3 amostras se mostraram DNA-HBV positivo.

Nosso estudo realizado nos 288 indivíduos de Eirunepé/AM observamos uma prevalência de hepatite B oculta relativamente baixa (3,1%) para uma área considerada de média a alta prevalência para o HBV. Em um estudo realizado em 314 pacientes atendidos em um hospital de emergência de Uganda/África, a prevalência de hepatite B oculta foi de 30% (94/314), região esta também altamente endêmica para o HBV. Em nosso estudo a maioria dos indivíduos era adulto jovem do gênero feminino (57%) e tinham anti-HBc associado a anti-HBs semelhante aos indivíduos africanos estudados <sup>(138)</sup>.

Nosso estudo apresenta limitações como o reduzido número amostral. Além disso não dispomos de dados sócio-demográficos, vacinação para HBV, presença de membros da família acometidos por HBV, exposições de risco (transfusão de sangue, cirurgias, uso de bebidas alcoólicas) e nem todos doadores foram avaliados quanto a detecção de anti-HBs. Devido a baixa carga viral característica da HBO o ideal seria a realização dos testes de PCR em tempo real individualmente em todos participantes (doadores de sangue e indivíduos de Eirunepé/AM). A baixa carga viral também não permitiu a realização do sequenciamento e genotipagem das amostras classificadas como HBO.

É possível a observação de transmissão do HBV por transfusão de sangue a partir de indivíduos com HBO com baixos níveis de DNA-HBV no soro sendo potencialmente infectante como observado em muitos estudos e que permanece em discussão até hoje <sup>(71, 85, 129, 134, 137, 139)</sup>. Pesquisas sobre a prevalência de HBO em doadores da Amazônia Brasileira são importantes para dimensionar o impacto da HBO na segurança transfusional em hemocentros de referência para região norte/FHEMOAM. Esse estudo confirma a existência de HBO em doadores de sangue da FHEMOAM e em indivíduos do interior da Amazônia Brasileira, reforçando a importância da implementação do NAT para o HBV neste hemocentro

## 6. CONCLUSÃO

A prevalência de Hepatite B oculta entre os doadores de sangue da FEHMOAM foi de 1,0% (3/294): 2 casos HBO no gênero feminino, 2 doadores de primeira vez.

Aprevalência de Hepatite B oculta nos indivíduos de Eirunepé/Amazonas foi de 3,3% (9/288), sendo 6 casos em mulheres.

Entre os 9 indivíduos com HBO de Eirunepé, 7 apresentaram titulação do anti-HBs acima de 100 mUI/mL.

Este estudo evidenciou baixa prevalência de HBO em subgrupo de doadores de sangue da FHEMOAM e moderada prevalência no grupo de moradores de Eirunepé/Amazonas com HBsAg negativo. Embora baixa, esta prevalência indica que transmissão por HBO pode ocorrer na FHEMOAM. Estes resultados reforçam a importância da implementação de métodos mais sensíveis para detecção da infecção pelo HBV, como NAT em uso desde Junho de 2012 permitindo assegurar melhor segurança transfusional na FHEMOAM e útil para triagem de doadores de áreas endêmicas do interior do estado do Amazonas.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of viral hepatitis*. 2004;11(2):97-107.
2. Valente F, Lago BVd, Castro CAVd, Almeida AJd, Gomes SA, Soares CC. Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010;105(8):970-7.
3. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-73.
4. Lu F, Li T, Liu S, Zhuang H. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection in China. *Journal of viral hepatitis*. 2010;17(1):4-9.
5. Kao J-H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *The Korean journal of internal medicine*. 2011;26(3):255-61.
6. Chávez JH, Campana SG, Haas P. An overview of hepatitis B in Brazil and in the state of Santa Catarina. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 2003;14(2):91-6.
7. Braga WSM, Castilho MdC, Borges FG, Martinho ACdS, Rodrigues IS, Azevedo EPd, et al. Prevalence of hepatitis B virus infection and carriage after nineteen years of vaccination program in the Western Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45(1):13-7.
8. Brabin L, Brabin BJ. Cultural factors and transmission of hepatitis B virus. *American journal of epidemiology*. 1985;122(5):725-30.
9. Costa CA, Kimura LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus among the indigenous population of the Curuçá and Itaquá Rivers, Javari Valley, State of Amazonas, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45(4):457-62.
10. Braga WSM, Brasil LM, Souza RABd, Melo MSd, Rosas MDG, Castilho MdC, et al. Prevalência da infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite delta (VHD) em Lábrea, Rio Purus, Estado do Amazonas. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2004;13(1):35-46.
11. Carvalho P, Schinoni MI, Andrade J, Vasconcelos Rêgo MA, Marques P, Meyer R, et al. Hepatitis B virus prevalence and vaccination response in health care workers and students at the Federal University of Bahia, Brazil. *Annals of hepatology*. 2012;11(3):330-7.
12. Schilsky ML. Hepatitis B “360”. *Transplantation proceedings*. 2013 4/;45(3):982-5.
13. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *The New England journal of medicine*. 2004 Mar 11;350(11):1118-29. PubMed PMID: 15014185.
14. McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatology international*. 2009;3(2):334-42.

15. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2006;1:23-61.
16. de la Fuente RA, Gutiérrez ML, Garcia-Samaniego J, Fernández-Rodríguez C, Lledó JL, Castellano G. Pathogenesis of occult chronic hepatitis B virus infection. *World journal of gastroenterology: WJG.* 2011;17(12):1543.
17. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *New England Journal of Medicine.* 2004;350(11):1118-29.
18. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2000;64(1):51-68.
19. Moreno D, Alegre F, García-González N. Virología, epidemiología y mecanismos de transmisión del VHB *Virology, epidemiology and transmission mechanisms of Hepatitis B Virus.* *An Sist Sanit Navar.* 2004;27(Supl.2): 7- 16.
20. Gomes SA. Genoma Viral. In: Focaccia R. *Tratado de hepatites Virais.* SãoPaulo, Atheneu; 2002. p. 119-25.
21. Roncato M, Ballardín PA, Lunge VR. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite B. *Revista HCPA, Porto Alegre.* 2008;28(3): 188-193.
22. Ganem D, Varmus H. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annual Review of Biochemistry.* 1987;56(1):651-93.
23. Silva LCd. *Hepatites agudas e crônicas 2ª ed.* Revista Ampl.São Paulo, Sarvier, 332p,1995.
24. Kann M, Gerlich WH. Structure and molecular virology. *Viral Hepatitis, Third Edition.* 2005:147-80.
25. Chen MT, Billaud J-N, Sällberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, et al. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(41):14913-8.
26. Milich DR, McLachlan A, Thornton GB, Hughes JL. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. 1987; 329(6139):547-9
27. Milich DR, Schödel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *Journal of virology.* 1997;71(3):2192-201.
28. Milich DR, Chen M, Schödel F, Peterson DL, Jones JE, Hughes JL. Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1997;94(26):14648-53.

29. Feng H, Hu K-h. Structural characteristics and molecular mechanism of hepatitis B virus reverse transcriptase. *Virologica Sinica*. 2009;24(6):509-17.
30. Chen P, Gan Y, Han N, Fang W, Li J, Zhao F, et al. Computational Evolutionary Analysis of the Overlapped Surface (S) and Polymerase (P) Region in Hepatitis B Virus Indicates the Spacer Domain in P Is Crucial for Survival. *PloS one*. 2013;8(4):e60098.
31. Benhenda S, Cougot D, Buendia M-A, Neuveut C. Hepatitis B virus X protein: Molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Advances in Cancer Research*. 2009;103:75-109.
32. Block TM, Guo H, Guo J-T. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clinics in liver disease*. 2007;11(4):685-706.
33. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(1):48.
34. Kann M, Schmitz A, Rabe B. Intracellular transport of hepatitis B virus. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(1):39.
35. Schädler S, Hildt E. HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses*. 2009;1(2):185-209.
36. Mota A, Areias J, Cardoso MF. A expressão genotípica do vírus da hepatite B em Portugal e no mundo. *Acta Médica Portuguesa*. 2011;24(4):587-94.
37. Couroucé-Pauty AM, Plançon A, Soulier J. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox sanguinis*. 1983;44(4):197-211.
38. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Research*. 2007;127(2):164-76.
39. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatology Research*. 2010;40(1):14-30.
40. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *The Journal of General Virology*. 1988;69:2575-83.
41. Thedja MD, Muljono DH, Nurainy N, Sukowati CH, Verhoef J, Marzuki S. Ethnogeographical structure of hepatitis B virus genotype distribution in Indonesia and discovery of a new subgenotype, B9. *Archives of Virology*. 2011;156(5):855-68.
42. Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *Journal of Viral Hepatitis*. 2005;12(2):111-24.
43. Shi Y-H. Correlation between Hepatitis B Virus Genotypes and Clinical Outcomes. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2012;65(6):476-82.

44. Cao G-W. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World journal of Gastroenterology: WJG*. 2009;15(46):5761.
45. Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(6):2455-60.
46. Mello F, Souto F, Nabuco L, Villela-Nogueira C, Coelho H, Franz H, et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiology*. 2007;7(1):103.
47. Nabuco LC, Mello FCdA, Gomes SdA, Perez RM, Soares JAS, Coelho HSM, et al. Hepatitis B virus genotypes in Southeast Brazil and its relationship with histological features. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(6):758-89.
48. Haddad R, Martinelli AdLC, Uyemura SA, Yokosawa J. Hepatitis B virus genotyping among chronic hepatitis B patients with resistance to treatment with lamivudine in the City of Ribeirão Preto, State of São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010;43(3):224-8.
49. Dias ÁLB, Oliveira CMdC, Castilho MdC, Silva MdSPd, Braga WSM. Molecular characterization of the hepatitis B virus in autochthonous and endogenous populations in the Western Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45(1):9-12.
50. de Oliveira CM, Farias IP, da Fonseca JCF, Brasil LM, de Souza R, Astolfi-Filho S. Phylogeny and molecular genetic parameters of different stages of hepatitis B virus infection in patients from the Brazilian Amazon. *Archives of Virology*. 2008;153(5):823-30.
51. Caldas Ribeiro NR, Soares Campos G, Dias Angelo AL, Lorens Braga E, Santana N, Mesquita Soares Gomes M, et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. *Liver international*. 2006;26(6):636-42.
52. da Costa Castilho M, de Oliveira CMC, de Lima Gimaque JB, Leão JDT, Braga WSM. Epidemiology and Molecular Characterization of Hepatitis B Virus Infection in Isolated Villages in the Western Brazilian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;87(4):768-74.
53. Kiesslich D, Crispim MA, Santos C, Ferreira FdL, Fraiji NA, Komninakis SV, et al. Influence of hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of disease in patients coinfecting with HBV and hepatitis delta virus. *Journal of Infectious Diseases*. 2009;199(11):1608-11.
54. Krajden M, McNabb G, Petric M. The laboratory diagnosis of hepatitis B virus. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 2005;16(2):65.
55. Gonçalves Júnior FL, Gonçalves NSL, Focaccia R. Hepatite B: imunodiagnóstico; Hepatitis B: immunodiagnosis. 2002:167-73.

56. Petersen J. Hepatitis B: Diagnostic Tests. In: Mauss B, Rockstroh, Sarrazin, Wedemeyer, editor. Hepatology A clinical text book. 4<sup>a</sup> ed. 2013, Flying Publisher ed.2013. p. 124-6.
57. Ministério da Saúde Hepatites Virais: o Brasil está atento. In: Epidemiológica DdV, 3<sup>a</sup> ed. Brasília - DF: Secretaria de Vigilância em Saúde; Série A Normas e Manuais Técnicos. 2008. p. 60.
58. da Silva CN, C. Hepatite B. In: Resseti MLdS, Claudia Maria Dornelles; Rodrigues, Jaqueline Josi Samá, editor. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. 1<sup>a</sup>.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ed.2006. p. 112-22.
59. Allain J-P. Occult hepatitis B virus infection. Transfusion Clinique et Biologique. 2004;11(1):18-25.
60. Niesters HG. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004 Jan;10(1):5-11.
61. Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, et al. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. Journal of Clinical Microbiology. 1999;37(9):2899-903.
62. Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. Methods. 2001;25(4):419-29.
63. Paraskevis D, Beloukas A, Haida C, Katsoulidou A, Moschidis Z, Hatzitheodorou H, et al. Development of a new ultra sensitive real-time PCR assay (ultra sensitive RTQ-PCR) for the quantification of HBV-DNA. Virology Journal. 2010;7(1):57.
64. Thermo Fisher. TaqMan® Chemistry vs. SYBR® Chemistry for Real-Time PCR .Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>>. Acesso em: 12 Jul. 2015
65. Comanor L, Holland P. Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas. Vox Sanguinis. 2006 Jul;91(1):1-12.
66. Raimondo G, Allain J-P, Brunetto MR, Buendia M-A, Chen D-S, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology. 2008;49(4):652-7.
67. Join E. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. 2008.
68. Hollinger F, Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. Journal of Viral Hepatitis. 2010;17(1):1-15.
69. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. Vox Sanguinis. 2004;86(2):83-91.

70. Bianco C, Dodd RY. Infectivity of occult hepatitis B from two different points of view. *Transfusion*. 2013;53(7):1379-81.
71. Hollinger FB. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. *Transfusion*. 2008;48(5):1001-26.
72. EAFTSOT L. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 2012;57(1):167-85.
73. Bréchet C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Bréchet P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely “occult”? *Hepatology*. 2001;34(1):194-203.
74. Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012;25(1):142-63.
75. Lledó JL, Fernández C, Gutiérrez ML, Ocaña S. Management of occult hepatitis B virus infection: an update for the clinician. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2011;17(12):1563.
76. Launay O, Masurel J, Servant-Delmas A, Basse-Guérineau AL, Méritet JF, Laperche S, et al. High levels of serum hepatitis B virus DNA in patients with ‘anti-HBc alone’: role of HBsAg mutants. *Journal of Viral Hepatitis*. 2011;18(10):721-9.
77. van Hemert F, Zaaijer H, Berkhout B, Lukashov V. Occult hepatitis B infection: an evolutionary scenario. *Virology Journal*. 2008;5(1):146.
78. Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology*. 2004;127(5):1356-71.
79. Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, et al. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007;45(2):277-85.
80. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002;2(8):479-86.
81. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*. 2007;46(1):160-70.
82. Raimondo G, CG, Filomia R, Pollicino T. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol*. 2013;Vol 35(1):39-52.
83. Bes M, Vargas V, Piron M, Casamitjana N, Esteban JI, Vilanova N, et al. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *Journal of Hepatology*. 2012;56(4):765-74.



84. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, et al. Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion*. 2001;41(9):1093-9.
85. Candotti D, Allain J-P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 2009;51(4):798-809.
86. Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M, Harritshoj LH, Lattermann A, Wienzek S, et al. HBsAg non-reactive HBV infection in blood donors: Transmission and pathogenicity. *Journal of Medical Virology*. 2007;79(S1):S32-S6.
87. Levicnik-Stežinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, Lelie N, Allain J-P. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *Journal of Hepatology*. 2008;48(6):1022-5.
88. Kwak MS, Kim YJ. Occult hepatitis B virus infection. *World Journal of Hepatology*. 2014; 27;6(12):860-9.
89. Rios-Ocampo WA, Cortes-Mancera F, Olarte JC, Soto A, Navas MC. Occult hepatitis B virus infection among blood donors in Colombia. *Virology Journal*. 2014;11:206.
90. Maldonado-Rodriguez A, Cevallos AM, Rojas-Montes O, Enriquez-Navarro K, Alvarez-Munoz MT, Lira R. Occult hepatitis B virus co-infection in human immunodeficiency virus-positive patients: A review of prevalence, diagnosis and clinical significance. *World Journal of Hepatology*. 2015; 27;7(2):253-60.
91. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999;341(1):22-6.
92. Mandour M, Nemr N, Shehata A, Kishk R, Badran D, Hawass N. Occult HBV infection status among chronic hepatitis C and hemodialysis patients in Northeastern Egypt: regional and national overview. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015; 48(3):258-64.
93. Khamduang W, Ngo-Giang-Huong N, Gaudy-Graffin C, Jourdain G, Suwankornsakul W, Jarupanich T, et al. Prevalence, risk factors, and impact of isolated antibody to hepatitis B core antigen and occult hepatitis B virus infection in HIV-1-infected pregnant women. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;56(12):1704-12.
94. Elbahrawy A, Alaboudy A, El Moghazy W, Elwassief A, Alashker A, Abdallah AM. Occult hepatitis B virus infection in Egypt. *World journal of hepatology*. 2015;7(12):1671-8.
95. Martinez MC, Kok CC, Baleriola C, Robertson P, Rawlinson WD. Investigation of occult hepatitis B virus infection in anti-hbc positive patients from a liver clinic. *PLoS one*. 2015;10(3):e0117275.

96. Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Chowdhury A, Chakravarty R. Genotype, phylogenetic analysis, and transmission pattern of occult hepatitis B virus (HBV) infection in families of asymptomatic HBsAg carriers. *Journal of Medical Virology*. 2006;78(1):53-9.
97. Darmawan E, Turyadi, El-hobar KE, Nursanty NK, Thedja MD, Muljono DH. Seroepidemiology and occult hepatitis B virus infection in young adults in Banjarmasin, Indonesia. *Journal of Medical Virology*. 2015;87(2):199-207.
98. A. Jafarzadeh1\* MKA, M. Mirzaee1 and A. Pourazar2. Occult Hepatitis B Virus Infection Among Blood Donors with antibodies to Hepatitis B Core Antigen. *Acta Medica Iranica*. 2008;46(1):27-32.
99. Said ZN, Sayed MH, Salama, II, Aboel-Magd EK, Mahmoud MH, Setouhy ME, et al. Occult hepatitis B virus infection among Egyptian blood donors. *World Journal of Hepatology*. 2013;5(2):64-73.
100. Khamesipour A, Amiri ZM, Kafiabad SA, Saadat F, Mansour-ghanaei F, Esteghamati AR, et al. Frequency of hepatitis B virus DNA in anti-HBc positive, HBsAg negative blood donors in Rasht, northern Iran. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : Official Journal of the European Society for Haemapheresis*. 2011; 45(2):195-7.
101. Opaleye OO, Oluremi AS, Atiba AB, Adewumi MO, Mabayoje OV, Donbraye E, et al. Occult Hepatitis B Virus Infection among HIV Positive Patients in Nigeria. *Journal of Tropical Medicine*.;2014:796121.
102. Doda V, Arora S, Kirtania T. Serological characterization of occult hepatitis B virus infection among blood donors in India. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : Official Journal of the European Society for Haemapheresis*. 2014;51(2):162-7.
103. Gutierrez C, Leon G, Loureiro CL, Uzcategui N, Liprandi F, Pujol FH. Hepatitis B virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1999;6(5):768-70.
104. Garcia-Montalvo BM, Ventura-Zapata LP. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico. *Annals of Hepatology*. 2011;10(2):133-41.
105. Motta-Castro AR1 MR, Araujo NM, Niel C, Facholi GB, Lago BV, Mello FC, Gomes SA. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. *Archives Virology*. 2008;153(12):2197-205.
106. Albuquerque AC, Coelho MR, Lemos MF, Moreira RC. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45(5):558-62.
107. Barros Junior GM, Braga WS, Oliveira CM, Castilho Mda C, Araujo Jde R. [Occult hepatitis B: prevalence and clinical characteristics in a population with high endemicity of

hepatitis B infection in the western Brazilian Amazon region]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41(6):596-601.

108. Urbani S, Fagnoni F, Missale G, Franchini M. The role of anti-core antibody response in the detection of occult hepatitis B virus infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2010;48(1):23-9.

109. Pourkarim MR, Vergote V, Amini-Bavil-Olyae S, Sharifi Z, Sijmons S, Lemey P, et al. Molecular characterization of hepatitis B virus (HBV) strains circulating in the northern coast of the Persian Gulf and its comparison with worldwide distribution of HBV subgenotype D1. *Journal of Medical Virology*. 2014;86(5):745-57.

110. Welzel TM, Miley WJ, Parks TL, Goedert JJ, Whitby D, Ortiz-Conde BA. Real-time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(9):3325-33.

111. NIBSC. Who international standard for hepatitis b virus dna for nucleic acid amplification technology (nat) assays - NIBSC Code 97/746. NIBSC - Assuring the Quality of Biological Medicines.2004:1-4.

112. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A, et al. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sanguinis*. 2001;80(1):63-71.

113. Moresco MN, Virgolino Hde A, de Moraes MP, da Motta-Passos I, Gomes-Gouvea MS, de Assis LM, et al. Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. *Vox Sanguinis*. 2014;107(1):19-25.

114. Silva CM, Costi C, Costa C, Michelon C, Oravec R, Ramos AB, et al. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. *The Journal of Infection*. 2005;51(1):24-9.

115. Wolff FH, Fuchs SC, Brandao AB. Absence of occult hepatitis B among blood donors in southern Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2011;15(2):159-62. ]

116. Pereira JS GN, Silva C, Lazarini MS, Pavan MH, Fais VC, Goncales Junior FL. HBV vaccination of HCV-infected patients with occult HBV infection and anti-HBc-positive blood donors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica*. 2006;39(4):525-31.

117. Arraes LCX, R.; Andrieu, J.-M.; LU, W.; Barreto, S.; Pereira, LMMB. & Castelo, A. The biological meaning of anti-HBc positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2003;45(3):137-40.

118. Tramuto F, Maida CM, Colomba GM, Di Carlo P, Mazzola G, Li Vecchi V, et al. Occult hepatitis B infection in the immigrant population of Sicily, Italy. *Journal of immigrant and minority health / Center for Minority Public Health*. 2013;15(4):725-31.

119. Manzini P, Girotto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, et al. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica*. 2007; 92(12):1664-70.
120. Fang Y, Shang QL, Liu JY, Li D, Xu WZ, Teng X, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection among hepatopathy patients and healthy people in China. *The Journal of Infection*. 2009;58(5):383-8.
121. Jutavijittum P, Andernach IE, Yousukh A, Samounry B, Samounry K, Thammavong T, et al. Occult hepatitis B infections among blood donors in Lao PDR. *Vox Sanguinis*. 2014; 106(1):31-7.
122. Panigrahi R, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Mahapatra PK, et al. Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for transfusion. *Virology Journal*. 2010;7:204.
123. Nna E, Mbamalu C, Ekejindu I. Occult hepatitis B viral infection among blood donors in South-Eastern Nigeria. *Pathogens and Global Health*. 2014;108(5):223-8.
124. Allain JP. International collaborative study proposal for the characterization of occult hepatitis B virus infection identified by nucleic acid or anti-HBc screening. *Vox Sanguinis*. 2007;92(3):254-7.
125. Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, Gubbe K, Holm-Harritshoj L, Garcia JM, et al. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion*. 2013;53(7):1405-15.
126. Allain J-P, Candotti D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion. *Blood Transfusion*. 2009;7(3):174.
127. Stramer SL, Wend U, Candotti D, Foster GA, Hollinger FB, Dodd RY, et al. Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors. *The New England Journal of Medicine*. 2011; 364(3):236-47.
128. Liu Y, Li P, Li C, Zhou J, Wu C, Zhou Y-H. Detection of hepatitis B virus DNA among accepted blood donors in Nanjing, China. *Virology Journal*. 2010;7(193):193.
129. Spreafico M, Berzuini A, Foglieni B, Candotti D, Raffaele L, Guarnori I, et al. Poor efficacy of nucleic acid testing in identifying occult HBV infection and consequences for safety of blood supply in Italy. *Journal of Hepatology*. 2015
130. Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 2009;51(4):798-809.
131. Roth WK, Weber M, Petersen D, Drosten C, Buhr S, Sireis W, et al. NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion*. 2002; 42(7):869-75.
132. Candotti D, Allain J-P. Molecular virology in transfusion medicine laboratory. *Blood Transfusion*. 2013;11(2):203.

133. Kleinman SH, Kuhns MC, Todd DS, Glynn SA, McNamara A, DiMarco A, et al. Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening. *Transfusion*. 2003; 43(6):696-704.
134. Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion*. 2007;47(7):1197-205.
135. Roth WK, Busch MP, Schuller A, Ismay S, Cheng A, Seed CR, et al. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sanguinis*. 2012; 102(1):82-90.
136. Bouike Y, Imoto S, Mabuchi O, Kokubunji A, Kai S, Okada M, et al. Infectivity of HBV DNA positive donations identified in look-back studies in Hyogo-Prefecture, Japan. *Transfusion Medicine*. 2011;21(2):107-15.
137. Taira R, Satake M, Momose S, Hino S, Suzuki Y, Murokawa H, et al. Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection caused by blood components derived from donors with occult HBV infection in Japan. *Transfusion*. 2013;53(7):1393-404.
138. Apica BS, Seremba E, Rule J, Yuan HJ, Lee WM. High prevalence of occult hepatitis B infection in an African urban population. *Journal of Medical Virology*. 2015.
139. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sanguinis*. 2004;86(2):83-91.

