UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

HELLEN TAYANÁ OLIVEIRA BITENCOURT

Pesquisa e caracterização da Hepatite B oculta em doadores de sangue do Estado
do Amapá.

Ribeirão Preto-SP
2017

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

HELLEN TAYANÁ OLIVEIRA BITENCOURT

Pesquisa e caracterização da Hepatite B oculta em doadores de sangue do Estado do Amapá.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Hemoterapia.

Aluna: Hellen Tayaná Oliveira Bitencourt

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Kashima Haddad

Ribeirão Preto-SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Bitencourt, Hellen Tayaná Oliveira

Pesquisa e caracterização da Hepatite B Oculta em doadores de sangue do Estado do Amapá.

53 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Hemoterapia.

Orientadora: Haddad, Simone Kashima.

1. Hemoterapia. 2. Hepatite B. 3. Hepatite B Oculta. 4. Anti-HBc.

Nome: BITENCOURT, Hellen Tayaná Oliveira

Título: Pesquisa e caracterização da Hepatite B oculta em doadores de sangue do Estado do Amapá.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:_____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

À minha mãe, Helena, pelo apoio e incentivo incondicional em todos os momentos da minha vida, pelo cuidado e zelo com os meus filhos nos momentos em que não pude estar presente.

Aos meus filhos, Nycolas e Henrique. Todo o meu esforço e dedicação é para poder lhes dar um futuro melhor. Espero que um dia vocês leiam esta dedicatória e entendam o porquê da minha ausência em alguns momentos. Foi tudo por vocês.

Ao meu esposo Sidney, por me incentivar a continuar nos momentos em que pensei em desistir, e por cuidar dos nossos filhos com tanto amor e carinho.

Ao meu pai, Jorge, e aos meus irmãos e irmãs, cunhada e tias. Por todo incentivo sempre.

Aos amigos, que em algum momento dessa jornada me incentivaram a não desistir.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Simone Kashima Haddad, por todas oportunidades que me foram oferecidas e pelos ensinamentos que me proporcionam novos caminhos a serem trilhados. Obrigada por sua orientação, dedicação, paciência e compreensão.

Ao Professor Dr. Svetoslav Nanev Slavov pelo grande auxílio no desenvolvimento desse projeto. Obrigada pelo ensinamento prático e teórico na análise das amostras.

À Msc. Daiane Fernanda dos Santos, pelo auxílio no desenvolvimento desse projeto.

Ao Laboratório NAT do Hemocentro de Ribeirão Preto, por processar as amostras.

Ao Ministério da Saúde, Coordenação de Sangue e Hemoderivados, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo desenvolvimento do Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia. Curso de grande importância para o aperfeiçoamento dos profissionais que atuam nos Hemocentros do Brasil.

Ao Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos colegas dos Instituto: Carla Almeida, Jeisiane Batista, Vanuza Vilhena, Luis Fernando, Geice Barbosa, Tarciane Miranda, Edileuson Silva, Márcia Chagas, que me auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa, além do incentivo em todos os momentos.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

BITENCOURT, H. T. O. **Pesquisa e caracterização da Hepatite B oculta em doadores de sangue do Estado do Amapá, Brasil.** 2017. 53f. Dissertação de Mestrado Profissional. Área de Concentração - Hemoterapia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Introdução. A infecção causada pelo vírus da hepatite B (HBV) é um dos agravos de maior prevalência no mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) existem mais de 350 milhões de portadores crônicos da doença. A infecção pelo HBV é rotineiramente identificada quando há a presença do HBsAg circulante. Entretanto, em alguns casos o HBV-DNA tem sido detectado em indivíduos HBsAg negativos, positivos ou negativos para anti-HBc e anti-HBs. Essa apresentação sorológica e molecular é denominada infecção oculta pelo HBV (OBI). Geralmente a concentração do HBV-DNA no soro será abaixo de 200 UI/mL. **Objetivo:** Determinar a prevalência da OBI, em doadores de sangue do Estado do Amapá no ano de 2014. **Material e Métodos.** Foram analisadas um total de 62 amostras de doadores de sangue do estado do Amapá, no ano de 2014, que apresentavam o perfil sorológico: HBsAg negativo, anti-HBc positivo e com anti-HBs negativo ou positivo. Os marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc foram determinados através do imunoensaio quimioluminescente. As amostras selecionadas para a detecção do HBV-DNA foram testadas utilizando as metodologias de *Real-Time PCR* Kit NAT HIV/HCV/HBV (Bio-Manguinhos®) e *PCR* “in house”. **Resultados.** Do total de 13.261 doadores triados para infecções transmissíveis pelo sangue, 283 apresentaram resultados reagentes para os marcadores da hepatite B, nos quais: 35 (0,3%) foram HBsAg e 248 (1,9%) para anti-HBc reagentes. Um total de 62 amostras foram testadas pelos métodos moleculares. Todas as amostras apresentaram resultado HBV-DNA não-detectável. **Conclusão:** O índice de inaptidão sorológica no ano de 2014 no HEMOAP foi de 1,9% para anti-HBc e 0,3% para HBsAg. A população estudada foi constituída predominantemente por adultos com idade entre 29-65 anos, do sexo masculino, casados e naturais de municípios do estado do Amapá.

Palavras-chave: Hepatite B, Infecção oculta pelo HBV, anti-HBc.

ABSTRACT

BITENCOURT, H. T. O. **Research and characterization of occult Hepatitis B in blood donors from the State of Amapá, Brazil.** 2017. 53f. Tese (Mestrado). Área de Concentração - Hemoterapia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Introduction. The infection caused by the hepatitis B virus (HBV) is one of the most prevalent diseases in the world. According to the World Health Organization (WHO) there are more than 350 million chronic carriers of the disease. HBV infection is routinely identified when there is presence of circulating HBsAg. However, in some cases HBV-DNA has been detected in HBsAg negative individuals, positive or negative for anti-HBc and anti-HBs. This serological and molecular presentation is termed HBV-occult infection (OBI). Usually the concentration of HBV-DNA in serum will be below 200 IU / mL. **Objective:** To determine the prevalence of OBI in blood donors, in the State of Amapá, in the 2014. **Material and methods.** A total of 62 samples of blood donors from the State of Amapá in the year 2014 were analyzed, presenting the serological profile: HBsAg negative, anti-HBc positive and with negative or positive anti-HBs. Serum markers HBsAg and anti-HBc were determined by the chemiluminescent immunoassay. Samples selected for HBV-DNA detection were tested using the Real-Time PCR Kit Kit HIV / HCV / HBV (Bio-Manguinhos®) and in-house PCR. **Results.** Of the total of 13,261 donors screened for blood-borne infections, 283 presented reactive results for hepatitis B markers, in which: 35 (0.3%) were HBsAg and 248 (1.9%) for anti-HBc reagents. All samples showed non-detectable HBV-DNA result. **Conclusion:** The serological disability index in the year 2014 in HEMOAP was 1.9% for anti-HBc and 0.3% for HBsAg. The studied population consisted predominantly of adults aged 29-65 years, males, married and natural of cities of the state of Amapá.

Keywords: Hepatitis B, occult HBV infection, anti-HBc.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Prevalência do marcador HBsAg nas diversas regiões do mundo.	15
Figura 2.	Taxa de detecção da hepatite B segundo região de residência e ano de notificação.	16
Figura 3.	Estrutura do vírus da hepatite B.	17
Figura 4.	Representação esquemática do genoma do HBV.	18
Figura 5.	Ciclo replicativo do vírus da hepatite B	20
Figura 6.	Curso sorológico da hepatite B aguda.	22
Figura 7.	Curso sorológico da hepatite B crônica.	23
Figura 8.	Marcadores sorológicos e molecular da infecção pelo HBV.	23
Figura 9.	Total de doadores com resultado positivo ou inconclusivo na triagem sorológica e molecular das infecções transmissíveis pelo sangue no Estado do Amapá, no ano de 2014.	37
Figura 10.	Resultados da <i>Nested-PCR</i> em Eletroforese em gel de agarose a 2%. Amostra AP-01 a AP-15, Controle Plasmidial Positivo e Branco.	39
Figura 11.	Resultados da <i>Nested-PCR</i> em Eletroforese em gel de agarose a 2%. Amostra AP-16 a AP-30, Controle Plasmidial Positivo e Branco.	40
Figura 12.	Resultados da <i>Nested-PCR</i> em eletroforese em gel de agarose a 2%. Amostra AP-31 a AP-46, Controle Plasmidial Positivo e Branco.	40
Figura 13.	Resultados da <i>Nested-PCR</i> em eletroforese em gel de agarose a 2%. Amostra AP-47 a AP-62, Controle Plasmidial Positivo e Branco.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Significado clínico dos marcadores sorológicos do HBV.	21
Tabela 2.	<i>Primers</i> utilizados para a detecção da infecção oculta pelo HBV. Metodologia: <i>Nested-PCR</i> .	27
Tabela 3.	Características sociodemográficas dos 62 doadores de sangue selecionado para a detecção do HBV-DNA do Estado do Amapá-Brasil, 2014.	38
Tabela 4.	Resultado dos marcadores sorológicos do HBV referente às 62 amostras selecionadas para a detecção do HBV-DNA dos doadores de sangue do Estado do Amapá-Brasil, no ano de 2014.	39

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Histórico	13
1.2. Epidemiologia	14
1.3. Estrutura Molecular	17
1.4. Aspectos Clínicos e Laboratoriais	20
1.5. Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B (OBI)	23
1.5.1. Definição	23
1.5.2. Epidemiologia da OBI	25
1.5.3. Patogênese da OBI	26
1.5.4. Diagnóstico Molecular	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Casuística	30
3.2. Aspectos Éticos	30
3.3. Modelo do Estudo	30
3.4. Amostragem	30
3.5. Critérios de Inclusão	31
3.6. Critérios de Exclusão	31
3.7. Testes	31
3.7.1. Detecção do HBsAg	31

3.7.2. Detecção do anti-HBc Total	31
3.7.3. Detecção do HBV-DNA	32
3.7.3.1. <i>Real-Time PCR</i> (Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos®)	32
a. Preparo das amostras	32
b. Extração do Ácido Nucleico	32
c. Amplificação	33
d. Detecção	33
3.7.3.2. <i>Nested-PCR</i>	34
a. Extração	34
b. Amplificação	35
c. Eletroforese em gel de agarose a 2%	35
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	45

REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Em 1965, o geneticista americano Baruch Blumberg, estudando anticorpos contra lipoproteínas séricas em pacientes que tinham recebido transfusão de sangue, identificou no soro pertencente a um aborígine Australiano, um antígeno que reagia com o soro de dois doentes hemofílicos politransfundidos, a que foi atribuído o nome de antígeno Austrália (AgAu) (BLUMBERG; ALTER (1965); (DA FONSECA, 2010).

Inicialmente, Blumberg levantou a hipótese de que a presença de tal antígeno entre pacientes leucêmicos poderia ser uma predisposição herdada para leucemia ou um agente causal ou até um fator predisponente para o desenvolvimento da leucemia. Estudos subsequentes revelaram a alta frequência do AgAu entre portadores da síndrome de Down institucionalizados (30%), quando comparado com pacientes leucêmicos (10%) e portadores de Down vivendo em casa (1%). Testando amostras de soro dos portadores de Down, Blumberg verificou que a alanina aminotransferase (ALT) apresentava níveis elevados entre os positivos para o antígeno, fato não observado entre os AgAu negativos (BLUMBERG et al., 1967; DA FONSECA, 2010). Somente após uma das pesquisadoras do laboratório, Barbara Werner, desenvolver um quadro clínico e bioquímico de hepatite aguda e ter o resultado positivo para o AgAu, foi que Blumberg observou a ligação entre o AgAu e a hepatite. Previamente, a amostra da mesma pesquisadora havia servido como controle negativo para o AgAu (DA FONSECA, 2010).

Em 1970, David S. Dane demonstrou por microscopia eletrônica, a existência de uma partícula de forma esférica com cerca de 42 nm em soros positivos para o antígeno Austrália, sendo denominada de partícula de Dane. Posteriormente, comprovou-se que a tal partícula era o pacote viral completo do vírus da Hepatite B, sendo constituído por um invólucro externo, o antígeno Austrália, que posteriormente passou a ser designado de antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg), e por um núcleo (DANE; CAMERON; BRIGGS, 1970).

1.2. Epidemiologia

O HBV pode ser transmitido por via parenteral, vertical, exposição percutânea, transfusão de sangue e hemoderivados e, sobretudo pela via sexual, sendo considerada uma infecção sexualmente transmissível. O HBV ainda pode ser transmitido no meio intrafamiliar, por meio do contato com pessoas infectadas pelo HBV no ambiente domiciliar através do compartilhamento de objetos pessoais e/ou contato com lesões de pele ou mucosas (HATAMI et al., 2013).

O vírus pode permanecer infeccioso sobre superfícies e no meio ambiente por mais de sete dias. Superfícies contaminadas com sangue e/ou secreções podem ser veículos de disseminação viral, favorecendo a transmissão horizontal, visto que o HBV é, aproximadamente, cem vezes mais infectante que o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e dez vezes mais do que o vírus da hepatite C (HCV) (COSTA; PAULA; IGNOTTI, 2012).

A transmissão vertical (da mãe para o filho) pode ocorrer no útero, durante o parto e até mesmo no período pós-natal, mas é durante o parto que a criança está mais exposta ao sangue e secreção cérvico-vaginal materna. Em recém-nascidos infectados por mães HBeAg-positivas durante o período perinatal, estima-se em 90% o risco de evolução para doença hepática crônica. Este risco declina para 15% em neonatos de mães HBeAg-negativas (MCMAHON, 2010).

Desde 1986, todos os produtos de sangue no Brasil, são testados laboratorialmente, com métodos de alta sensibilidade, o que diminuiu a incidência de hepatite B pós-transfusional. Entretanto, esses métodos não eliminaram totalmente o risco de infecção, que pode ainda estar persistindo por erro na triagem ou por doadores que se encontram no período de janela sorológica (BRUGUERA, 1992).

As grandes variações na prevalência da infecção crônica pelo HBV estão, em grande parte, relacionadas com as diferenças de idade no momento da infecção. A probabilidade de a infecção aguda tornar-se crônica é de 70-90% para a infecção perinatal e 20-50% para as infecções adquiridas na infância precoce (antes dos 5 anos). Na idade adulta, a probabilidade de desenvolver a infecção crônica varia de 1-3%, excluindo os casos de indivíduos imunossuprimidos.

A infecção pelo HBV é um dos maiores problemas de saúde a nível mundial. Estima-se que aproximadamente dois bilhões de pessoas já foram infectadas pelo

HBV em alguma etapa de suas vidas, e que cerca de 240 milhões dos infectados evoluam para a forma crônica da doença. Mais de 686.000 pessoas morrem todos os anos devido a complicações, incluindo cirrose hepática e hepatocarcinoma (OMS, 2016).

Baseada na prevalência de marcadores de infecção ativa e nas vias de transmissão primária encontradas nas diversas regiões, pode-se dividir o mundo em áreas de baixa, intermediária e alta endemicidade para o HBV. Áreas onde a prevalência global para o HBsAg é <2%, é interpretada como baixa endemicidade, intermediária se for de 2-7%, e de alta endemicidade se >8% (OTT et al., 2012)

Em 2015 Schweitzer e cols. (2015) publicaram uma revisão sistemática, apresentando a distribuição do HBsAg nas regiões do mundo (Figura 1). Segundo os autores, a maior parte da África Subsaariana e países do oriente (Mongólia, Vietnã, Quirguistão, Laos, Papua Nova Guiné), mantém elevada endemicidade para HBsAg. Prevalências intermediárias-alta, são observadas em alguns países da África Subsaariana (República do Congo, Zâmbia, Tanzânia, Quênia e Etiópia), África do Sul e Ásia (China, Cazaquistão e Tailândia). Endemicidade intermediária-baixa são encontradas em países do norte da África, Oriente Médio, Europa Oriental e países do norte da Ásia, da Oceania e da América do Sul. Prevalências baixas são encontradas em países da América Central, Norte da América do Sul e Europa Ocidental.

Figura 1. Prevalência do marcador HBsAg nas diversas regiões do mundo.

Fonte: Schweitzer, et al., 2015 – adaptado.

Em áreas como o Sudeste da Ásia, China, África e na região Amazônica, estima-se que a prevalência de indivíduos cronicamente infectados pelo HBV varia de 5-10% da população adulta. No Oriente Médio e Sul da Ásia a prevalência é de 2-5% da população em geral. Em regiões como o Oeste da Europa, Austrália e América do Norte, onde a minoria da população entra em contato com o vírus, consideradas de baixo nível de endemicidade, a prevalência é inferior a 1% (OMS, 2016).

No Brasil, as taxas de detecção das regiões vêm apresentando tendência de aumento desde o início da notificação compulsória, sendo que a região Sul apresenta a maior taxa dentre as regiões do país, seguida da região Norte, que nos três primeiros anos do período apresentou maior taxa. Em toda a série histórica, a região Sudeste tem apresentado taxas semelhantes à média nacional. A região Nordeste apresenta a menor taxa de detecção em todo o período (Figura 2) (BRASIL, 2016).

Figura 2. Taxa de detecção da hepatite B segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2002 a 2015.

Fonte: Brasil, 2016.

Na região Amazônica, em especial na Amazônia Ocidental, fatores como densidade populacional, aspectos genéticos, sociais, econômicos, culturais e históricos, influenciam no aumento da infecção pelo HBV (ZATTI et al., 2013). Inquéritos sorológicos determinaram que a prevalência de positividade para o anti-HBc é de 14,7% e para HBsAg de 0,6%, caracterizando a região Norte como nível

médio de endemicidade, de acordo com critérios estabelecidos pela OMS (MARESCO, et al., 2014).

Em 2004, o Estado do Amapá registrou 389 casos confirmados de hepatites virais, sendo o sexto estado da Região Norte em número de casos. Destes, 3% casos foram confirmados para hepatite B (BRASIL, 2006).

1.3. Estrutura Molecular

O vírus da hepatite B pertence ao gênero *Orthohepadnavirus* da família *Hepadnaviridae*. A partícula viral possui a forma esférica, de dupla camada com 42nm de diâmetro. A estrutura central chamada de nucleocapsídeo ou *core* possui 27nm de diâmetro e é constituída pela proteína viral HBcAg, que contém em seu interior o material genético e proteínas virais. Já o componente externo (envelope) é composto de proteínas de superfície (HBsAg) incorporadas em lipídeos derivados da membrana da célula hospedeira (Figura 3) (COELHO, 2001; TANG; MCLACHLAN, 2001).

Figura 3. Estrutura do vírus da hepatite B. **Fonte:** PERKINS, 2002. http://www.hepcentro.com.br/hepatite_b.htm – adaptado.

O genoma viral é constituído por DNA (ácido desoxirribonucleico) circular de fita-dupla parcial, contendo 3.200 nucleotídeos (KAO; CHEN, 2002). O genoma viral apresenta quatro sequências abertas de leitura (do inglês, *open reading frame*, *ORF*): sequência *S*, *C*, *X* e *P*, que codificam as proteínas virais, e quatro promotores,

que regulam a atividade gênica (HATZAKIS; MAGIORKINIS; HAIDA, 2006; LEE, 1997).

A primeira *ORF* é a região Pré-S/S (Figura 4), que codifica as proteínas da superfície, denominadas: L (*large*), M (*middle*) e S (*small*), as quais são sintetizadas a partir dos códons de iniciação das regiões Pré-S1, Pré-S2 e S. Tais proteínas, são componentes imunogênicos de superfície do HBV e por isso, desempenham um papel importante na indução da imunidade (HOLLINGER, F., 2007).

Figura 4: Representação diagramática do genoma do HBV. O genoma do HBV é constituído por uma molécula circular de DNA com duas fitas: uma completa e outra parcialmente incompleta. Os genes codificantes das proteínas do vírus são distribuídos em 4 regiões principais. O *gene S* codifica proteínas do invólucro (HBsAg). O *gene C* controla a síntese das proteínas do nucleocapsídeo, o HBcAg e o HBeAg. O *gene P* codifica a DNA polimerase. O *gene X* codifica uma proteína ainda não identificada, que pode estar relacionada com o carcinoma hepatocelular.

Fonte: <https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/HBVdbGenome> - adaptado.

A segunda *ORF*, a região Pré-core/core (Figura 4) é responsável por codificar as proteínas do core (HBcAg) e antígeno e (HBeAg) (SUGIYAMA et al., 2007). A proteína do core apresenta capacidade de automontagem para a formação do nucleocapsídeo, sendo importante na etapa de empacotamento do RNA pré-genômico. O HBeAg é um peptídeo solúvel derivado de ambas as regiões pré-core/core, que é processado e secretado pelas células hepáticas e serve como marcador de replicação viral ativa (GERLICH et al., 2006).

A terceira *ORF* é a região X (Figura 4), que é responsável pela síntese de um polipeptídeo de 17 kDa, o antígeno X (HBxAg). Algumas funções têm sido atribuídas a essa proteína, como a ação ativadora transcricional alterando a expressão de genes da célula hospedeira, o que explica o número de mutações importantes, além da sua capacidade de interferir na atividade da proteína *p53*, que apresenta a função supressora de tumor e ativadora de apoptose, podendo ser então responsável pela evolução para a cirrose ou carcinoma hepatocelular nos pacientes cronicamente infectados (SEEGER; MASON, 2000).

A última *ORF* é conhecida como região P ou *Pol* (Figura 4). Essa região codifica a polimerase viral e apresenta quatro domínios: (1) amino-terminal, que atua como proteína terminal ou primase, necessária para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; (2) espaçadora, com função pouco definida; (3) transcriptase reversa, responsável pela transcrição reversa do RNA pré-genômico em DNA, e (4) carboxiterminal, que exibe atividade de RNase (NGUI; HALLET; TEO, 1999; SEEGER; MASON, 2000).

O ciclo replicativo (Figura 5) do HBV é caracterizado pela síntese do DNA de fita dupla parcial, através da transcrição reversa do RNA intermediário. O mecanismo pelo qual o vírus entra no hepatócito ou em outras células susceptíveis ainda não é completamente compreendido. Sugere-se que o passo inicial para a fusão das membranas esteja relacionado com a interação de polipeptídios do envelope viral (aminoácidos 21-47 da região pré-S1) com proteínas da membrana celular hepática, incluindo: endonexina II, IL-6, anexina V, apolipoproteína e receptor de transferrina (GUIDOTTI; CHISARI, 2006). Após a adesão o invólucro interno é transportado pelo citoplasma celular até o núcleo. Dentro do núcleo do hepatócito, o DNA viral é convertido em cccDNA (do inglês, *covalently closed circular DNA*). Posteriormente, a síntese e agregação organizada ocorrem no citoplasma originando novas partículas virais que são liberadas para a circulação, possibilitando a infecção de novos hepatócitos (LOPES; SCHINONI, 2011).

Figura 5. Ciclo replicativo do vírus da hepatite B.

Fonte: http://www.infekt.ch/updown/images/hbv_cycl.gif - adaptado.

1.4. Aspectos Clínicos e Laboratoriais

A infecção aguda pelo HBV pode ser benigna. O tempo médio de incubação do vírus é de aproximadamente 60 dias, podendo variar entre 28 e 160 dias. O prognóstico da infecção depende de fatores imunológicos, das características do vírus e também da idade em que ocorre a infecção. Lactentes e crianças são em sua maioria assintomáticos, enquanto que cerca de 70% dos adultos têm hepatite subclínica ou anicterícia e 30% apresentam icterícia. Menos de 1% dos adultos com infecção aguda progride para hepatite fulminante, cuja taxa de mortalidade é cerca de 80% quando não há a possibilidade de transplante de fígado (LOPES; SCHINONI, 2011; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

O diagnóstico desta infecção pode ser realizado através de testes sorológicos capazes de detectar a presença de marcadores específicos, como os antígenos (HBsAg e HBeAg) e anticorpos (anti-HBs, anti-HBe e anti-HBc) (Tabela 1), além da pesquisa do DNA viral utilizando técnicas moleculares (GONÇALES; CAVALHEIRO, 2006; HOLLINGER, F., 2007). A avaliação hepática dos portadores

pode ser realizada pela dosagem de bilirrubinas, fosfatase alcalina, gama-glutamilttransferase (γ -GT), desidrogenase láctica, aspartato aminotranspferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que são indicadores de dano hepatocelular (HOLLINGER, F. B.; LIANG, 2001).

Tabela 1. Significado clínico dos marcadores sorológicos do vírus da Hepatite B.

Significado Clínico	Marcadores Sorológicos					
	HBsAg	HBeAg	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	Anti-HBe	Anti-HBs
Susceptível	-	-	-	-	-	-
Incubação	+	-	-	-	-	-
Fase Aguda	+	+	+	+	-	-
Fase Aguda final ou Hepatite Crônica	+	+	-	+	-	-
	+	-	-	+	+	-
	+	-	-	+		-
Início da fase convalescente	-	-	+	+	-	-
Imunidade infecção passada recente	-	-	-	+	+	+
Imunidade, infecção passada	-	-	-	+	-	+ ou -
Imunidade, resposta vacinal	-	-	-	-	-	+

Fonte: (Brasil, 2010) – adaptado.

O primeiro marcador sorológico detectado é o HBsAg, que surge por volta de 2-10 semanas após a exposição ao vírus. Na hepatite B aguda, os títulos de HBsAg declinam a níveis indetectáveis entre 4-6 meses (Figura 6). Após esse período, há o desenvolvimento de anticorpos específicos para esse antígeno (anti-HBs), cuja presença indica recuperação clínica e imunidade ao HBV. A persistência do HBsAg por mais de 6 meses indica a progressão para o quadro crônico da doença (Figura 7) (GONÇALES; CAVALHEIRO, 2006; HOLLINGER, F., 2007). Uma parcela dos casos crônicos evolui para cirrose, com surgimento de icterícia, edema, ascite, varizes de esôfago e alterações hematológicas, podendo também evoluir para hepatocarcinoma sem passar pelo estágio de cirrose (BRASIL, 2005).

Figura 6. Curso sorológico da hepatite B aguda. Os títulos de HBsAg declinam a níveis indetectáveis entre 4-6 meses.

Fonte: www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset - adaptado.

O HBcAg é um antígeno intracelular expresso nos hepatócitos infectados, não sendo encontrado no soro dos pacientes. Entretanto, rotineiramente, detecta-se o anticorpo direcionado contra ele, o anti-HBc, que pode ser da classe IgM ou IgG. Os da classe IgM aparecem na fase aguda da infecção e encontram-se no soro até 32 semanas após a infecção. Em seguida, são produzidos os anticorpos anti-HBc da classe IgG que permanecem circulantes por muito tempo, mesmo após a eliminação do vírus, indicando contato passado com o vírus (SILVA et al., 2005).

O HBeAg é outro antígeno detectável no início do curso da infecção. Portanto, está presente na fase aguda da doença e desaparece algumas semanas após a resolução da mesma. Sua presença está associada à replicação viral e infecciosidade. Em resposta ao HBeAg, anticorpos anti-HBe são detectados, indicando a diminuição ou ausência de replicação viral durante a infecção aguda, e por isso, esses anticorpos associam-se a uma provável resolução espontânea da infecção. Contudo, em alguns pacientes HBeAg negativos e anti-HBe positivos, o DNA viral pode ser detectado em função das mutações na região pré-core e promotora do core (GONÇALES; CAVALHEIRO, 2006; HOLLINGER, F., 2007).

Figura 7. Curso sorológico da hepatite B crônica. A persistência do HBsAg por mais de 6 meses indica a progressão para o quadro crônico da doença.

Fonte: www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset - adaptado.

Além dos marcadores sorológicos, há o marcador molecular (DNA viral). O DNA viral detectável no soro do paciente é considerado o marcador mais confiável de infecção presente, pois mostra a atividade de replicação do vírus, além de ser um parâmetro importante para as decisões terapêuticas e monitoramento da resposta ao tratamento (Figura 8). Métodos moleculares sensíveis podem detectar o DNA viral de 10 a 20 dias antes da detecção do HBsAg (TRÉPO et al., 2014).

Figura 8. Marcadores sorológicos e molecular da infecção pelo HBV.

Fonte: (BRASIL, 2014) - adaptado.

1.5. Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B (OBI)

1.5.1. Definição

O vírus da Hepatite B pode ser comumente identificado através da detecção dos marcadores sorológicos no sangue de indivíduos infectados. Em 1979, relatou-se pela primeira vez a presença do HBV-DNA, devido a utilização de técnicas sensíveis de Biologia Molecular, em sangue de doadores soronegativos para HBsAg (TABOR, et al., 1979). Atualmente, essa apresentação sorológica e molecular é classificada como infecção oculta pelo HBV.

Em março de 2008, em um *workshop* internacional realizado pela Associação Europeia para o Estudo do Fígado (*European Association for the Study of the Liver – EASL*), realizado em Taormina – Itália, especialistas discutiram sobre os aspectos imunológicos da infecção oculta pelo HBV (OBI), bem como o seu diagnóstico, epidemiologia, risco de transmissão por transfusão de sangue ou transplante de fígado, risco de reativação em condições de imunossupressão, o potencial em promover a progressão da hepatite crônica, assim como o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, culminando em uma série de declarações e recomendações acerca da OBI (RAIMONDO, G. et al., 2008).

Raimondo e cols, (2008) definiram a infecção oculta como sendo a presença de HBV-DNA no fígado (com HBV-DNA detectável ou indetectável no soro) em indivíduos com teste HBsAg negativo. Quando detectável, a quantidade de HBV-DNA no soro normalmente será abaixo de 200 UI/mL, podendo apresentar duas variações, de acordo com o perfil de anticorpos contra o HBV:

-OBI – Soropositiva (anti-HBc e/ou anti-HBs positivos): o HBsAg pode tornar-se negativo por resolução da hepatite B aguda ou após anos de quadro crônico com HBsAg positivo.

-OBI – Soronegativa (anti-HBc e anti-HBs negativos): nestes casos, haveria diminuição progressiva dos títulos dos anticorpos específicos, ou, teoricamente, o indivíduo pode ter sido negativo para os anticorpos contra o HBV durante toda a infecção.

Casos que apresentem níveis séricos de HBV-DNA semelhantes àqueles detectáveis nas diferentes fases sorológicas têm sido considerados como “falso” OBI. Provavelmente, estes indivíduos foram infectados por variantes de HBV com mutações no gene S, que produzem o HBsAg modificado, que não é reconhecido por alguns ou todos os testes comerciais disponíveis.

Anticorpos contra o HBV (anti-HBc, Anti-HBs e anti-HBe) são frequentemente detectados na infecção oculta pelo HBV (OCANA et al., 2011). Aproximadamente 42% dos casos de OBI são positivos para anti-HBc e 35% são positivos para anti-HBs (HOLLINGER, F.; SOOD, 2010; TORBENSON; THOMAS, 2002).

1.5.2. Epidemiologia da OBI

Diversos fatores podem influenciar a prevalência da infecção oculta pelo HBV. Entre eles, podemos ressaltar que a área geográfica, a população estudada, a sensibilidade dos testes laboratoriais utilizados para a detecção do HBsAg e do ácido nucleico e a presença de coinfeções, são determinantes para estabelecer a frequência da OBI (SAMAL; KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012).

A OBI tem sido frequentemente reportada em regiões com o leste da Ásia onde, 41%-90% da população foi previamente exposta a infecção pelo HBV. E em menor frequência regiões de baixa endemicidade, como na América do Norte onde de 5%-20% da população foi previamente exposta (KWAK; KIM, 2014).

Georgiadou e cols. (2009) estudaram a prevalência da OBI em pacientes tratados com imunossuppressores, e concluíram que havia uma proporção significativamente maior de casos de OBI entre esses pacientes em comparação aos doadores de sangue (GEORGIADOU et al., 2009). Além disso, pacientes submetidos à hemodiálise também devem ser investigados quanto à presença de OBI devido ao risco de reativação decorrente da imunossupressão e o risco de infecção.

Em alguns grupos de pacientes, a prevalência da OBI é significativamente elevada quando os testes de detecção são realizados em amostras do tecido hepático, entretanto essa técnica não é usualmente utilizada (HOLLINGER; SOOD, 2010). Pacientes com infecção crônica pelo vírus da Hepatite C, infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), usuários de drogas injetáveis, pacientes que fazem hemodiálise, portadores de carcinoma hepatocelular, cirrose hepática criptogênica e pacientes que realizaram transplante de fígado apresentam alto risco para a OBI.

Brechot e cols. (2001) demonstraram uma frequência de 25%-67% de HBV-DNA detectável no soro de pacientes HBsAg-negativo com hepatite crônica, cirrose

ou com carcinoma hepatocelular. Em usuários de drogas intravenosas e hemofílicos a frequência é de 45%-50% (TORBENSON, et al., 2004), até 36% dos pacientes em diálise (MINUK, et al., 2004; BESISIK, et al., 2003), em 8%-51% dos pacientes infectados pelo HIV (RAIMONDO, et al., 2007) e em aproximadamente 30%-95% dos pacientes com hepatite C crônica com HBsAg-negativo (CACCIOLA, et al., 1999; KOIKE, et al., 1998).

Estudos realizados, reportam a prevalência da OBI entre 0,1%-1,05% em doadores de sangue HBsAg-negativos, anti-HBc-positivos da América do Norte, 0%-1,59% em doadores da Europa e acima de 6% em doadores de sangue de áreas onde há altas taxas de infecção pelo HBV (KWAK; KIM, 2014).

No Brasil, estudos reportam que a frequência da OBI em doadores de sangue varia entre 2,7%-4,0%. No interior do estado do Amazonas, a frequência da OBI foi de 2,7% (MARESCO, et al., 2014), em Campinas, São Paulo, 4,0% (JARDIM et al., 2008)

1.5.3. Patogênese da OBI

Os mecanismos envolvidos na patogênese da OBI têm sido objeto de diversos estudos, mas ainda precisam ser esclarecidos. A maioria dos estudos publicados relaciona a OBI a mutações do HBV, principalmente na região que codifica para HBsAg (BRUNI et al., 2011). A patogênese da OBI pode ser multifatorial dependendo em grande parte da interação vírus-hospedeiro, mediada pela resposta imune. A maioria dos casos de OBI é secundária à infecção viral, podendo apresentar baixa viremia, suprimida pela resposta imune, em conjunto com desordens que ocorrem durante a infecção aguda ou crônica pelo HBV (SAID, 2011).

A base molecular da OBI está relacionada com a persistência do HBV cccDNA de longa duração nos núcleos dos hepatócitos. Quase todos os casos de OBI são de HBV que, em geral, demonstra forte supressão da atividade de replicação e expressão gênica. Já um pequeno número de casos de OBI é devido a infecções de mutantes de HBV com atividade defeituosa na replicação, devido a mutações no gene *Pol*, ou na síntese de proteínas S, cujo defeito é na região genômica do promotor S. (RAIMONDO et al., 2008).

Em indivíduos aparentemente saudáveis, pode ocorrer quatro tipos de condições clínicas: (1) recuperação da infecção definida pela presença de anticorpos anti-HBs; (2) hepatite crônica, onde a infecção está relacionada a variantes que não (ou apenas fracamente) são reconhecidos por ensaios que utilizam anticorpos monoclonais e policlonais; (3) hepatite crônica, com a presença de anticorpos anti-HBc com ou sem anticorpos detectáveis anti-HBe; (4) hepatite crônica, com apenas o HBV-DNA detectável com os outros marcadores negativos (ALLAIN, J. P., 2004).

1.5.4. Diagnóstico Molecular

O HBV-DNA é único marcador confiável para o diagnóstico da OBI. As amostras devem ser coletadas e armazenadas sob condições adequadas para a realização da *PCR*. O teste padrão ouro para a infecção oculta é a análise do HBV-DNA extraído a partir de amostra de biópsia do fígado, bem como a partir de amostras de sangue, amplificado em duas rodadas subsequentes de *PCR* (*Nested-PCR*) ou por *PCR* em tempo real, com limites de detecção menor que 10 cópias de HBV-DNA por reação. Além disso, são utilizados *primers* específicos para diferentes regiões genômicas e complementares de regiões altamente conservadas. Um conjunto de *primers* foi utilizado por pesquisadores e estão demonstradas na Tabela 2 (RAIMONDO et al., 2008).

Tabela 2. *Primers* utilizados para a detecção da infecção oculta pelo HBV: Metodologia: *Nested-PCR*.

Regiões genômicas do HBV	Posição do nucleotídeo
Região S	
S1-F: 5'-CATCAGGATTCCTAGGACCCCT-3'	[168-189]
S2-F: 5'-CTTGTTGACAAGAATCCTCACA-3'	[214-235]
S3-R: 5'-AGGACAAACGGGCAACATAC-3'	[478-458]
S4-R: 5'-CCAACAAGAAGATGAGGCATA-3'	[442-420]
Região <i>pre-core/core</i>	
C5-F: 5'-TCACCTCTGCCTAATCATC-3'	[1825-1843]
C6-F: 5'-TTCAAGCCTCCAAGCTGTGCC-3'	[1862-1882]
C7-R: 5'-GAGGGAGTTCTTCTTCTAGG-3'	[2391-2371]
C8-R: 5'-AGGAGTGCGAATCCACACTCC-3'	[2277-2267]

Região *Pol*

P9-F: 5'-CGTCGCAGAAGATCTCAATC-3' [2420-2439]

P10-F: 5'-CCTTGGACTCATAAGGT-3' [2463-2479]

P11-R: 5'-TCTTGTTCCCAAGAATATGGT-3' [2845-2825]

P12-R: 5'-TCCCAAGAATATGGTGACCC-3' [2839-2820]

Região *X*

X13-F: 5'-CGCCAACTTACAAGGCCTTTC-3' [1100-1120]

X14-F: 5'-CCATACTGCGGAACTCCTAG-3' [1266-1685]

X15-R: 5'-GGCGTTCACGGTGGTCTCCAT-3' [1628-1608]

X16-R: 5'-CGTAAAGAGAGGTGCGCCCC-3' [1540-1521]

Fonte: (RAIMONDO et al., 2008) adaptado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Detectar a prevalência da infecção oculta pelo vírus da hepatite B em doadores de sangue do Estado do Amapá.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar o índice de inaptidão sorológica pela presença de marcadores da hepatite B;
- Identificar e genotipar amostras de doadores com hepatite B oculta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

As amostras de sangue periférico foram coletadas por meio de punção venosa em tubos estéreis contendo gel separador para ativação do coágulo e obtenção do soro, no momento da doação, e testadas para detecção dos marcadores de infecções transmissíveis pelo sangue (Sífilis, Doença de Chagas, Hepatite B, Hepatite C, HIV, HTLV I/II e Malária) no laboratório de Sorologia do HEMOAP.

As amostras positivas tanto para HBsAg quanto para Anti-HBc foram enviadas ao Laboratório Central do Amapá – Lacen-Ap, para realização dos testes confirmatórios, além do teste para detecção do marcador Anti-HBs.

3.2. Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (número do processo 13797/2013, Parecer 931.539/2014). Foi solicitada a dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.3. Modelo do Estudo

Foi realizado um estudo retrospectivo descritivo, visando à identificação da hepatite B oculta nos doadores de sangue do Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá - HEMOAP, no período de Janeiro a Dezembro de 2014.

3.4. Amostragem

Um total de 62 amostras com resultado negativo para HBsAg, positivo para Anti-HBc, com positividade ou não para Anti-HBs, foi selecionado e enviado ao Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto-SP. Nessa

instituição, foram adotadas duas metodologias para pesquisa de HBV-DNA: o Kit NAT Biomanguinhos® e *Nested-PCR*.

3.5. Critérios de Inclusão

- Amostra anti-HBc total positivo combinado com HBsAg negativo;
- Amostra HBsAg negativo;
- Amostra anti-HBs positivo ou negativo;
- Amostras com resultados concordantes nos testes de triagem e confirmatórios.

3.6. Critérios de Exclusão

- Amostras com resultado reagente para HBsAg;
- Resultado inconclusivo para anti-HBc;
- Resultado discordante com os testes confirmatórios.

3.7. Testes

3.7.1. Detecção do HBsAg

Foi utilizado o imunoensaio por quimioluminescência “ARCHITECT HBsAg Qualitative II” de micropartículas para a detecção qualitativa do HBsAg em soro e plasma humanos, incluindo amostras coletadas *post-mortem* (sem batimentos cardíacos). Este ensaio é indicado no diagnóstico da infecção por HBV e como teste de triagem para evitar a transmissão do HBV a receptores de sangue, componentes sanguíneos, células, tecidos e órgãos.

3.7.2. Detecção de anti-HBc Total

Foi utilizado o imunoensaio por quimioluminescência “ARCHITECT Anti-HBC II” de micropartículas, para a detecção qualitativa de anticorpos contra o antígeno core da hepatite B (anti-HBc) em soro e plasma humanos, inclusive amostras

coletadas *post-mortem* (sem batimentos cardíacos). Da mesma forma que o teste para detecção de HBsAg, este ensaio também é indicado tanto no diagnóstico da infecção por HBV quanto na triagem para evitar a transmissão do HBV a receptores de sangue, componentes sanguíneos, células, tecidos e órgãos.

3.7.3. Detecção do HBV-DNA

3.7.3.1. *Real-Time PCR* (Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos®)

As amostras selecionadas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão foram testadas no “Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos®”, que tem como base a plataforma de PCR em tempo real. Os testes NAT foram desenvolvidos para a detecção de ácido nucleico viral no período que precede a produção sistêmica de anticorpos. Dessa forma, a adoção do NAT para a triagem de doadores de sangue tornou-se importante para o aumento da segurança transfusional.

A reação de amplificação é baseada em alvos de RNA e, por isso mesmo requer uma etapa de transcrição reversa (RT) para amplificação de vírus com genoma RNA.

a. Preparo das amostras

As amostras de soro foram testadas individualmente, onde na plataforma automática Janus (Perkin Elmer) cada amostra foi transferida para tubos de poliestireno de 15 mL. Além disso, uma partícula calibradora (PC) foi adicionada ao teste, com o objetivo de controlar a condição da reação (intra-ensaio) e assim, validar o resultado das determinações. Esta partícula calibradora foi adicionada a cada determinação com uma quantidade constante

b. Extração de Ácido Nucleico

A extração de ácidos nucleicos foi realizada de forma automatizada pelo biorrobô MDx (Qiagen). Essa tecnologia é baseada nas propriedades de ligação seletiva da membrana de sílica e permite uma alta recuperação de ácido nucleico.

Para tanto, as amostras foram lisadas com tampão de lise e protease sob condições desnaturantes (temperatura de 56°C). Após essa etapa, o etanol foi adicionado para permitir a ligação do lisado à membrana de sílica. Assim, o material genético foi absorvido pela membrana através de uma etapa de vácuo. Então, o ácido nucleico ligado à membrana passou por três etapas de lavagem sob vácuo. A primeira foi realizada com a adição do Tampão de Lavagem 1, e subsequente vácuo. Em seguida, realizou-se a adição do Tampão de Lavagem 2 e vácuo, e a repetição desta etapa. Após as lavagens, o produto final foi eluído, ficando livre de albumina séria, outras proteínas, nucleases, sais inorgânicos e orgânicos e outros possíveis interferentes.

c. Amplificação

Após a extração de ácidos nucleicos das amostras, foi realizada a etapa de amplificação do material genético. A metodologia de amplificação específica do alvo com sondas de hidrólise marcadas com fluorocromos foi usada para determinar a presença de: HIV, HCV, e PC, em um módulo, e de HBV e PC em outro módulo, de forma discriminatória. Os equipamentos utilizados nas etapas de amplificação e detecção foi o *7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)*.

d. Detecção

A técnica possibilitou determinar a presença dos produtos de PCR durante o transcorrer da mesma em tempo real. Tal processo é decorrente de uma sonda de DNA sintético que possui duas marcações em suas extremidades: um fluorocromo e um “quencher”. Durante a PCR em tempo real, a sonda hibridiza com a sequência de DNA complementar alvo para a amplificação. Com isso, a sonda é clivada devido à atividade exonuclease da enzima Taq DNA polimerase, responsável pela amplificação dos ácidos nucleicos. Portanto, a degradação da sonda culmina na separação do fluorocromo e do “quencher”, o que resulta no aumento da intensidade de fluorescência. Assim, a emissão de luz é diretamente proporcional à massa de produto de PCR que está sendo sintetizado, possibilitando a detecção em tempo real.

3.7.3.2. *Nested-PCR*

Todas as amostras de DNA extraídas foram submetidas à reação de *Nested-PCR* para obtenção de fragmentos 1.306pb da Região *S/pol*.

a. Extração

Na etapa de extração foi utilizando o kit *QIAamp® DNA Mini Kit* (QIAGEN®) de acordo com o procedimento descrito abaixo:

- 1- Em um microtubo de 1.5mL foi pipetado 560µL da solução de *Buffer AVL (Viral Lysis Buffer)*, que contem 5,6µL de *Carrier RNA*;
- 2- Adicionou-se 140µL de plasma ao microtubo contendo *Buffer AVL-carrier RNA*, homogeneizado em vortéx durante 15 segundos;
- 3- O microtubo foi incubado durante 10 minutos em temperatura ambiente (15-25°C);
- 4- Após a incubação a amostras foi centrifugada rapidamente para remover todas as gotículas do interior da tampa;
- 5- Adicionou-se 560µL de etanol (96-100%) ao microtubo que foi homogeneizado por 15 segundos e centrifugado rapidamente;
- 6- Após esse procedimento, foram adicionados 630µL da solução a um novo microtubo contendo a coluna de sílica *QIAamp Mini®* e centrifugado a 8.000 rpm durante 1 minuto. A coluna de sílica foi colocada em um novo microtubo e o anterior foi descartado;
- 7- O passo 6 foi repetido;
- 8- Adicionou-se 500µL do *Buffer AW1 (Wash Buffer)* a coluna de sílica, que foi centrifugada a 8.000rpm durante 1 minuto. O microtubo foi descartado e a coluna foi colocada em um novo microtubo;
- 9- Adicionou-se mais 500µL do *Buffer AW2 (Wash Buffer)* que foi centrifugada por mais 3 minutos a 14.000rpm;
- 10- O microtubo foi descartado e a coluna de sílica foi colocada em um novo microtubo e centrifugada por mais 1 minuto a 14.000rpm

- 11- Por fim, o microtubo foi descartado e a coluna de sílica foi colocada em um novo microtubo onde foi adicionado 60µL de água livre de nucleasse e centrifugada durante 1 minuto a 8.000rpm;
- 12- O eluido foi identificado e armazenado a -80°C.

b. Amplificação

Para a primeira etapa de amplificação, foi utilizada uma solução MIX 1, contendo *Buffer* (1x), MgCl₂ (3 mM), Primer F1 (600 nM) - PS3132F: 5' CCTCCYGCHTCYACCAATCG 3', Primer R1 (600 nM) - 2920RM; 5' ACGTCCCKCGHAGRATCCAG 3', dNTPs (400 µM), Taq DNA polimerase (1,5 U), DNA e água. Para isso, as condições de ciclagem foram: -um ciclo a 95°C durante cinco minutos, quarenta ciclos de 95°C por um minuto, 50°C por trinta segundos, 72°C por noventa segundos, e um ciclo a 72°C por dez minutos, finalizando com temperatura de 4°C.

Na segunda etapa de amplificação foi utilizada a solução MIX 2, contendo *Buffer* (1x), MgCl₂ (3 mM), Primer F2 (600 nM) - PS3201F - 5' CAYCCHCAGGCMATGCAGTGG 3', Primer R2 (600 nM) - P1285R; 5' CWAGGAGTTCCGCAGTATGG 3', dNTPs (400 µM), Taq DNA polimerase (1,5 U), DNA obtido da primeira amplificação e água. Nessa segunda etapa, foram adotadas as seguintes condições de ciclagem: um ciclo a 95°C durante cinco minutos, quarenta ciclos de 95°C por um minuto, 60°C por trinta segundos, 72°C por noventa segundos, e um ciclo a 72°C por dez minutos, finalizando com temperatura de 4°C, no equipamento *ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)*.

c. Eletroforese em gel de agarose a 2%

O gel foi preparado a 2% de agarose a 100 mL de TBE 1X (Tris/Borato/EDTA), acrescentando a solução de 8µL de marcador gel 1Kb mais 1 µL de GelRead. A cada 15µL das amostras, dos controles e do branco, foram acrescentados a solução de 6µL de xileno mais 1µL de GelRead e a solução de 6 µL de Xileno, 1µL de GelRead, aplicados ao gel e submetidos à eletroforese sob

voltagem de 80 volts. As bandas formadas durante a corrida foram visualizadas através da luz ultravioleta.

4. RESULTADOS

No ano de 2014, um total de 18.958 pessoas se candidataram à doação de sangue no Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá. Em todos, os candidatos considerados aptos pela triagem clínica à doação de sangue, foram realizados todos os testes de triagem laboratoriais para as doenças transmissíveis pelo sangue, obrigatórios pelas legislações vigentes, totalizando 13.261 amostras testadas.

Entre os doadores, 445 (3,4%) apresentaram resultados positivo ou inconclusivo para os marcadores testados na triagem sorológica e molecular (Figura 9). Desses, 283 (2,1%) apresentaram resultados reagentes para os marcadores da hepatite B, sendo: 248 (1,9%) para anti-HBc e 35 (0,3%) para HBsAg.

Figura 9. Total de doadores com resultado positivo ou inconclusivo na triagem sorológica e molecular das infecções transmissíveis pelo sangue no Estado do Amapá, no ano de 2014. **Fonte:** Sistema HEMOVIDA/HEMOAP.

Entre as amostras que apresentaram resultados positivo ou inconclusivos, 62 foram selecionadas para pesquisa e caracterização da infecção oculta pelo HBV, pois enquadravam-se nos critérios de inclusão e exclusão delimitados para essa pesquisa. Desse total, todas as 62 amostras foram provenientes de doadores de primeira vez, 39 (62,9%) eram doadores do sexo masculino e 23 (37,1%), feminino;

12 (19,4%) apresentavam idade entre 18-29 anos, 31 (50%) entre 30-49 anos, 14 (22,6%) de 49-59 anos e 05 (8%) acima de 50 anos; 35 (56,5%) são naturais de municípios do Estado do Amapá, 16 (25,8%) do Pará, 07 (11,3%) Maranhão, 01 (1,6%) Piauí, 01 (1,6%) Ceará, 01 (1,6%) Goiás e 01 (1,6%) do Mato Grosso (tabela 3).

Tabela 3. Características sócio-demográficas dos 62 doadores de sangue selecionados para a detecção do HBV-DNA do Estado do Amapá, Brasil.

Características	N	%
Sexo		
Masculino	39	62,9%
Feminino	23	37,1%
Faixa Etária		
18-29 anos	12	19,4%
30-49 anos	31	50%
49-59 anos	15	22,6%
Acima de 60 anos	05	8%
Naturalidade		
Amapá	35	56,5%
Pará	16	25,8%
Maranhão	07	11,3%
Goiás	01	1,6%
Ceará	01	1,6%
Mato Grosso	01	1,6%
Piauí	01	1,6%

Fonte: Sistema HEMOVIDA.

A Tabela 5 mostra os resultados dos marcadores sorológicos do HBV referente as 62 amostras selecionadas para a detecção do HBV-DNA dos doadores de sangue do HEMOAP. Seguindo os critérios de inclusão e exclusão das amostras, 100% foram negativas para o HBsAg e positivas para o anti-HBc Total. Para o marcador Anti-HBs: 09 (14,5%) resultados negativos, 50 (80,7%) tiveram resultados positivos e 03 (4,8%) das amostras não foram testadas; para o marcador HBeAg: 09 (14,5%) negativos e 53 (85,4%) não foram testadas; Anti-HBe: 08 (12,8%) foram

negativos, 04 (6,5%) positivos e (80,7%) não testadas; e, quanto ao anti-HBc Ig: 11 (17,4%) foram negativos e 51 (82,3%) amostras não foram testadas.

Tabela 4. Resultado dos marcadores sorológicos do HBV referente as 62 amostras selecionas para detecção do HBV-DNA dos doadores de sangue do Estado do Amapá, no ano de 2014.

Resultado (n=62)	Marcador Sorológico					
	HBsAg	Anti-HBc Total	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc (IgM)
Negativo	62	0	09	09	08	11
Positivo	0	62	50	0	04	0
Não Testado	0	0	03	53	50	51

Fonte: Sistema HEMOVIDA.

As 62 amostras selecionadas foram identificas com número sequencial de AP-01 a AP-62 e testadas para a pesquisa de infecção oculta pelo HBV utilizando a metodologia de *Real-Time PCR* com o Kit NAT-HIV/HCV/HBV Biomanguinhos®. Posteriormente, as amostras foram testadas na metodologia *Nested-PCR*, obtendo como resultado HBV-DNA não-detectável em todas as amostras testadas em ambas metodologias. Os produtos da *Nested-PCR* foram visualizados através de eletroforese em gel agarose a 2% (Figuras 10 – 13).

Figura 10. Resultados de *Nested-PCR* em Eletroforese em gel de agarose a 2%. Amostra AP-01 a AP-15, Controle Plasmidial Positivo (Ctle⁺) e Branco (Brc)

Figura 11. Resultados de *Nested-PCR* em Eletroforese em gel de agarose a 2%. Amostra AP-16 a AP-30, Controle Plasmidial Positivo (Ctle⁺) e Branco (Brc).

Figura 12. Resultados de *Nested-PCR* em Eletroforese em gel de agarose a 2%. Amostra AP-31 a AP-46, Controle Plasmidial Positivo (Ctle⁺) e Branco (Brc).

Figura 13. Resultados de *Nested-PCR* em Eletroforese em gel de agarose a 2%. Amostra AP-47 a AP-62, Controle Plasmidial Positivo (Ctle⁺) e Branco (Brc).

5. DISCUSSÃO

A presente pesquisa consiste no primeiro estudo da infecção oculta pelo HBV entre os doadores de sangue do Estado do Amapá. Sabe-se que a hepatite B é um dos maiores problemas de saúde a nível mundial, onde existem aproximadamente 400 milhões de portadores (OMS, 2016). Além disso, é a doença de transmissão parenteral mais frequente detectada durante a triagem para a doação de sangue (FOLETTTO et al., 2008), embora a sua incidência tenha reduzido substancialmente desde a introdução da triagem para HBsAg e do teste NAT-HBV (SAID, 2011).

A infecção causada pelo HBV pode ser diagnosticada por testes sorológicos e moleculares que detectam a presença de antígenos (HBsAg e HBeAg) e anticorpos (anti-HBs, anti-HBe e anti-HBc) específicos, além do HBV-DNA, que são de grande importância para determinar o quadro clínico da doença (GONÇALVES; CAVALHEIRO, 2006; HOLLINGER, F., 2007).

Nos bancos de sangue do Brasil, assim como em bancos de sangue de vários países com altos índices de transmissão do HBV, o maior índice de descarte sorológico, dentre os marcadores de doenças infecciosas Na triagem é obrigatória a utilização de teste laboratoriais de alta sensibilidade para a detecção de infecções transmissíveis pelo sangue A pesquisa do HBV em doadores de sangue do Brasil, tem sido realizada desde 1989. Inicialmente com a pesquisa do HBsAg, primeiro marcador a aparecer no curso da infecção. Em 1993, a identificação do anti-HBc total foi incluída na triagem sorológica dos Hemocentros.

Segundo dados do Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais do Brasil divulgado em 2012, a região Sul registra os maiores números de casos notificados de hepatite B desde 2002. A região Norte representa 11,0% por mil habitantes, ficando em segundo lugar das regiões com maior quantidade de casos notificados. Em 2010, a região Amazônica representou 13,3% do total do Brasil para esse ano, a maioria dos quais nos estados do Amazonas (29,3%) e Acre (23,8%) (BRASIL, 2012).

Em 2004, o Estado do Amapá registrou 389 casos confirmados de hepatites virais, sendo o sexto estado da Região Norte em número de casos. Destes, 24% casos foram confirmados para hepatite B (BRASIL, 2006). No ano de 2014, 283

doadores de sangue apresentaram resultado positivo ou inconclusivo para os marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc.

Estudos sobre as hepatites virais na população urbana do Brasil, demonstram a prevalência de 0,37% para o HBsAg, 7,4% para o anti-HBc e 76,7% para o anti-HBs. Na região Norte, a prevalência de positividade para os marcadores sorológicos da hepatite B, chega a 14,7% para anti-HBc e 0,6% para HBsAg, sendo caracterizada com área de média endemicidade pela Organização Mundial de Saúde (MORESCO, et al., 2014).

A frequência de 1,9% de doadores de sangue com anti-HBc positivo, encontrada entre os doadores de sangue do Hemocentro do Amapá, concordou com estudos, os quais relatam uma frequência entre 1,59% e 3,35% (SALLES, et al., 2003; CAETANO, BECK, 2006). Estados da região Amazônica chegam a apresentar a prevalência de até 57,2% dos doadores de sangue positivos para o anti-HBc (MARESCO, et al., 2015). Entretanto, os resultados de estudos que pesquisam marcadores sorológicos em doadores de sangue não devem ser considerados indicadores de infecção para o HBV em nível populacional, visto que o doador deve ter entre 16 e 69 anos, além de cumprir outros critérios – os quais podem excluir o candidato à doação por um período temporário ou definitivo (BRASIL, 2016).

Sabe-se que, na região Amazônica, fatores como a densidade populacional, aspecto genético, sociais, econômicos, culturais e históricos, têm grande influência na determinação da alta taxa de endemia na região (ZATTI et al., 2013). Considerando os dados sóciodemográficos, observou-se que a população estudada foi constituída predominantemente por adultos com idade entre 29-65 anos, do sexo masculino, casados e naturais de municípios do estado do Amapá. Características como: sexo, e faixa etária são relevantes, considerando que em pesquisas realizadas com não doadores destaca-se o sexo feminino e faixa etária de 20 a 24 anos, enquanto que entre os doadores prevalece o sexo masculino e faixa etária de 30 a 39 anos, concordando com o perfil encontrado nesta pesquisa.

A apresentação clínica característica da infecção pelo HBV pode cursar desde a forma assintomática até a forma fulminante da doença. Na hepatite B aguda, o marcador o HBsAg surge por volta de 2-10 semanas após a exposição ao vírus, declinando a níveis indetectáveis entre 4-6 meses, onde há o desenvolvimento do anti-HBs, cuja presença indica recuperação clínica e imunidade ao HBV. A

persistência do HBsAg por mais de 06 meses indica a progressão para o quadro crônico da doença (GONÇALES; CAVALHEIRO, 2006; HOLLINGER, F., 2007).

Entre os marcadores, a detecção HBV-DNA é considerado o mais confiável de infecção presente. Os métodos moleculares considerados “padrão ouro” para a detecção do HBV-DNA são a *Real Time – PCR*, e *Nested-PCR*. Com a utilização desses testes, a detecção do HBV-DNA se dá de 10 a 30 dias antes da detecção do HBsAg, reduzindo assim o período de janela imunológica (período entre o momento da contaminação com um agente infeccioso e o momento que esse agente se torna detectável em um teste laboratorial).

Devido às características clínicas e laboratoriais do HBV, a partir de 2016, tornou-se obrigatória a inclusão do teste de detecção do ácido nucleico NAT-HBV na rotina de triagem laboratorial de todos os doadores de sangue do Brasil (BRASIL, 2016), com isso houve redução do período de janela imunológica, aumentando a segurança transfusional.

O Kit NAT HIV/HCV/HBV Biomanquinhos®, utilizados pelos Hemocentros Públicos do Brasil, utiliza como metodologia a reação de amplificação baseada em alvos RNA, e por isso mesmo, requer uma etapa de transcrição reversa para a amplificação. A sensibilidade do teste é de 50UI/mL para o HBV no processamento de amostras individualmente.

Em uma parcela dos infectados ocorre a presença de HBV-DNA no fígado com HBV-DNA detectável ou indetectável no soro em indivíduos com teste HBsAg negativo, quando detectável no soro, a quantidade de HBV-DNA é normalmente abaixo de 200UI/mL ou menos de 10^3 cópias/mL. Essa característica é denominada de infecção oculta pelo HBV, que podem apresentar duas variações: OBI soropositiva (anti-HBc e/ou anti-HBs positivos) e OBI soronegativa (anti-HBc e anti-HBs) (RAIMONDO, et al., 2008).

Do ponto de vista clínico, a OBI é extremamente relevante, visto que pode ser a causa de doença hepática e desenvolvimento da cirrose e carcinoma hepatocelular. Uma vez que a persistência do HBV-DNA manteria uma baixa taxa de replicação viral, na qual a atividade de replicação fortemente reduzida poderia ser acompanhada de sinais histológicos de inflamação hepática (POLLICINO; SAITTA, 2014; LARRUBIA, 2011).

Entre as 62 amostras testadas nas metodologias de *Real Time – PCR* e *Nested-PCR* não houve detecção do HBV-DNA. Um estudo realizado em doadores de sangue iranianos, duas de 105 amostras apresentaram HBV-DNA detectável. Na Austrália, foram analisados 2.673.521 doadores de sangue, a incidência de HBO foi de aproximadamente 5,55 por 100.000 doadores, em comparação com os 1,06 por 100.000 doadores com a doença aguda no período de janela (KIELY et al., 2014). Existem também relatos da detecção da OBI em doadores anti-HBc positivos em países como Itália (4,86%) (MANZINI, et al., 2007) e Índia (7,5%) (ASIM, et al., 2010).

Estudos que reportam a frequência da OBI em doadores de sangue do Brasil são raros. Em Campinas, uma análise aleatória de 150 doadores de sangue revelou a presença da OBI em 4% (6/150) das amostras analisadas (JARDIM, et al., 2008). Silva e colaboradores (2005) encontraram a prevalência da OBI em 3,3% dos doadores de sangue de Porto Alegre, positivos para anti-HBc. Em Recife, a prevalência foi de 2,7% (ARRAES, et al., 2003). No estado do Amazonas, um estudo realizado em 296 doadores de sangue, 08 (oito) foram HBV-DNA detectáveis (MARESCO, et al., 2014).

Embora terem sido utilizados métodos moleculares considerados padrão ouro para a detecção do HBV-DNA, entre as 62 amostras selecionada para esta pesquisa não houve a identificação da OBI. Devemos considerar o número menor de amostras avaliadas, visto que em outros estudos o número de amostras avaliadas foi consideravelmente superior.

6. CONCLUSÃO

- Os índices de inaptidão sorológica para os marcadores sorológicos para o HBV foram de 1,9% para anti-HBc e 0,3% para HBsAg;
- A população estudada foi constituída predominantemente por adultos com idade entre 29-65 anos, do sexo masculino, casados e naturais de municípios do estado do Amapá;
- Nas 62 amostras selecionadas para a realização do *Nested-PCR* e NAT HIV/HCV/HBV, Biomanguinhos®, não houve a detecção do HBV-DNA.

REFERÊNCIAS

ALLAIN et al. Characterization of occult hepatitis B virus strains in South African blood donors. **Hepatology**, v. 49, n. 6, p. 1868-1876, 2009.

ALLAIN, J. P. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. **Vox sanguinis**, v. 86, n. 2, p. 83-91, 2004.

Arraes, L. C., et al.: The biological meaning of antiHBc positive result in blood donors:relation to HBV-DNA and to other serological markers. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 46:137–140, 2003;

ASIM, M. et al. Significance of anti-HBc screening of blood donors & its association with occult hepatitis B virus infection: Implications for blood transfusion. **Indian J Med Res**, 132:312-317, 2010.

BLUMBERG, B. S.; ALTER, H. J. A new antigen in leukemia sera. **Jama**, v. 191, n. 7, p. 541-546, 1965.

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

BRASIL. Manual de aconselhamento em hepatites virais. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: DF**, 2005.

_____. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Amapá. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília: DF**, v. 2 ed., 2006.

_____. Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids**, 2012.

_____. Diagnóstico de Hepatites Virais. **TELELAB. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids, e Hepatites Virais. Universidade Federal de Santa Catarina**, 2014.

BRUGUERA M. Hepatitis B y bancos de sangue. **Med Clin (Barc)**. 1992;98(12):469-71.

BRUNI, R. et al. A computational approach to identify point mutations associated with occult hepatitis B: significant mutations affect coding regions but not regulative elements of HBV. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 1, 2011.

CANDOTTI, D.; ALLAIN, J.-P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. **Journal of hepatology**, v. 51, n. 4, p. 798-809, 2009.

CDC. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. **Washington DC: Public Health Foundation**, v. 12, 2011.

COELHO, H.S.M.C. Gastroenterologia Hepatites. 1 ed. Rio de Janeiro: **Rubio**, 2001.

COSTA, L. G.; PAULA, R. C. D.; IGNOTTI, E. Detecção de infecção pelo vírus da hepatite B nos municípios brasileiros segundo cobertura dos serviços de hemoterapia, no período de 2001 a 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 617-626, 2012.

DA FONSECA, J. C. F. History of viral hepatitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**., v. 43, n. 3, 2010.

DANE, D.; CAMERON, C.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. **The lancet**, v. 295, n. 7649, p. 695-698, 1970.

FANG, Y. et al. Molecular characterization and functional analysis of occult hepatitis B virus infection in Chinese patients infected with genotype C. **J Med Virol**, v. 81, n. 5, p. 826-835, 2009.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. D. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Rev Bras Epidemiol**, v. 7, n. 4, p. 473-87, 2004.

FOLETTTO, A. S.; DALMORA, C. H.; BECK, S. T. Hepatite B oculta entre doadores de sangue: importância do estudo do perfil sorológico da hepatite B em indivíduos anti-HBc positivos. **Saúde (Santa Maria)**, v. 33, n. 2, p. 39-43, 2008.

GEORGIADOU, S. P. et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with autoimmune liver diseases. **Liver International**, v. 29, n. 3, p. 434-442, 2009.

GERLICH, M. et al. Prevalence of hepatitis and HIV infections and vaccination rates in patients entering the heroin-assisted treatment in Switzerland between 1994 and 2002. **European journal of epidemiology**, v. 21, n. 7, p. 545-549, 2006.

GONÇALES, N.; CAVALHEIRO, N. Marcadores sorológicos da hepatite B e sua interpretação. **Braz J Infect Dis**, v. 10, n. Suppl 1, p. 19-22, 2006.

GUIDOTTI, Luca G.; CHISARI, Francis V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 1, p. 23-61, 2006.

HATAMI H, SALEHI M, SANEI E, KHOSRAVI S, ALAVIAN SM. Intra-familial transmission of hepatitis B virus infection in Zahedan. **Iran Red Crescent Med J**. 2013;15(1):4-8.

HATZAKIS, A.; MAGIORKINIS, E.; HAIDA, C. HBV virological assessment. **Journal of hepatology**, v. 44, p. S71-S76, 2006.

HOLLINGER, F. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays. **Journal of viral hepatitis**, v. 14, n. s1, p. 11-15, 2007.

HOLLINGER, F.; SOOD, G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. **Journal of viral hepatitis**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2010.

HOLLINGER, F. B.; LIANG, T. J. Hepatitis B virus. **Fields virology**, v. 4, p. 2971-3036, 2001.

JARDIM, R. N. C. M. et al. Occult hepatitis B virus infection in immunocompromised patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 300-305, 2008.

KAO, J.-H.; CHEN, D.-S. Global control of hepatitis B virus infection. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 7, p. 395-403, 2002.

KAZEMI-SHIRAZI, L.; PETERMANN, D.; MÜLLER, C. Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronic hepatitis C. **Journal of hepatology**, v. 33, n. 5, p. 785-790, 2000.

KIELY, P. et al. Hepatitis B virus nucleic acid amplification testing of Australian blood donors highlights the complexity of confirming occult hepatitis B virus infection. **Transfusion**, v. 54, n. 8, p. 2084-2091, 2014.

KRAMVIS, A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. **Intervirology**, v. 57, n. 3-4, p. 141-150, 2014.

LARRUBIA, J. R. Occult hepatitis B virus infection: a complex entity with relevant clinical implications. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 12, p. 1529-30, 2011.

LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **Journal of viral hepatitis**, v. 11, n. 2, p. 97-107, 2004.

LEE, W. M. Hepatitis B virus infection. **New England journal of medicine**, v. 337, n. 24, p. 1733-1745, 1997.

LIU, G.-C. et al. A Bayesian meta-analysis on prevalence of hepatitis B virus infection among Chinese volunteer blood donors. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79203, 2013.

LOK, A. S.; MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 507-539, 2007.

LOPES, T. G. S. L.; SCHINONI, M. I. Aspectos gerais da hepatite B. 2011.

MCMAHON, Brian J. Natural history of chronic hepatitis B. **Clinics in liver disease**, v. 14, n. 3, p. 381-396, 2010.

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

MINUK, G. Y. et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. **Journal of hepatology**, v. 42, n. 4, p. 480-485, 2005.

MORESCO, M. D. S. et al. Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. **Vox sanguinis**, v. 107, n. 1, p. 19-25, 2014.

NGUI, S.; HALLET, R.; TEO, C. Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. **Reviews in medical virology**, v. 9, n. 3, p. 183-209, 1999.

OCANA, S. et al. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 12, p. 1553-7, 2011.

OMS. Hepatits B. **Organização Mundial da Saúde**, 2016.

POLLICINO, T.; SAITTA, C. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 20, p. 5951-5961, 2014.

RAIMONDO et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. **Journal of hepatology**, v. 49, n. 4, p. 652-657, 2008.

RAIMONDO et al. Occult hepatitis B virus infection. **Journal of hepatology**, v. 46, n. 1, p. 160-170, 2007.

RAIMONDO et al. A 2010 update on occult hepatitis B infection. **Pathologie Biologie**, v. 58, n. 4, p. 254-257, 2010.

RAIMONDO, G. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. **Journal of hepatology**, v. 49, n. 4, p. 652-657, 2008.

SAID, Z. N. A. An overview of occult hepatitis B virus infection. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 15, p. 1927, 2011.

SAMAL, J.; KANDPAL, M.; VIVEKANANDAN, P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 1, p. 142-163, 2012.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B virus biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 51-68, 2000.

SILVA, C. et al. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. **Journal of Infection**, v. 51, n. 1, p. 24-29, 2005.

SUGIYAMA, M. et al. Influences on hepatitis B virus replication by a naturally occurring mutation in the core gene. **Virology**, v. 365, n. 2, p. 285-291, 2007.

TANG, Hong; MCLACHLAN, Alan. A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency. **Virology**, v. 303, n. 1, p. 199-210, 2002.

TATEMATSU, K. et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. **Journal of virology**, v. 83, n. 20, p. 10538-10547, 2009.

TORBENSON, M.; THOMAS, D. L. Occult hepatitis B. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 479-486, 2002.

TRÉPO, C.; CHAN, H. L.; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, v. 384, n. 9959, p. 2053-2063, 2014.

UCHIDA, T. et al. Hepatitis C virus is frequently coinfects with serum marker-negative hepatitis B virus: Probable replication promotion of the former by the latter as demonstrated by in vitro cotransfection. **Journal of medical virology**, v. 52, n. 4, p. 399-405, 1997.

YU, H. et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9297, 2010.

YUEN, M.-F. et al. Prevalence of occult hepatitis B infection in a highly endemic area for chronic hepatitis B: a study of a large blood donor population. **Gut**, v. 59, n. 10, p. 1389-1393, 2010.

ZATTI, C. A. et al. Hepatite B: Conhecendo a Realidade Brasileira. **Brazilian Journal of Clinical Research–BJSCR**, v. 4, n. 1, p. 05-11, 2013.