



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação e Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE TESTES RÁPIDOS NA
DETECÇÃO DE MARCADORES DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
HEPATITE B**

HELENA MEDINA CRUZ

Rio de Janeiro
Janeiro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós Graduação em Medicina Tropical

HELENA MEDINA CRUZ

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE TESTES RÁPIDOS NA
DETECÇÃO DE MARCADORES DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
HEPATITE B**

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

Orientadora: Prof. Dra. Livia Melo Villar

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: HELENA MEDINA CRUZ

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE TESTES RÁPIDOS NA
DETECÇÃO DE MARCADORES DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
HEPATITE B**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Livia Melo Villar

Aprovada em: 30/01/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Luciane Almeida Amado - Presidente

Prof. Dra. Flávia Barreto dos Santos

Prof. Dr. Adilson José de Almeida

Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

Rio de Janeiro, 30 de Janeiro de 2014

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

Agradecimentos

À FIOCRUZ, CAPES, FAPERJ e Pós-graduação em Medicina tropical por proporcionarem apoio financeiro para realização deste trabalho e ao coordenador da pós-graduação Dr. Filipe Anibal por toda atenção;

À minha orientadora Dra. Livia Melo Villar por aceitar a tarefa de me orientar e aconselhar. E por ser mais que uma orientadora, ser um exemplo, uma amiga;

Aos pesquisadores Dra. Luciane Amado Almeida, Dra. Flavia Barreto Santos, Dr. Adilson José de Almeida, Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa e Dra. Vanessa Salete de Paula por aceitarem o convite de comporem minha banca avaliadora.

À minha família que sempre torceu por mim, especialmente meus pais João e Alice e meu irmão Vitor por serem minha base, e às minhas primas Paula, Luísa e Isabel por me ouvirem e aconselharem sendo mais que família, sendo amigas.

Ao meu noivo, Flavio Nascimento, por me escutar, apoiar, aguentar minhas reclamações, estar sempre ao meu lado, sendo um grande amigo e companheiro. Obrigada por estar nessa caminhada ao meu lado.

Às amigas, Juliana Miguel, Elisângela Ferreira e Brunna Marques por todo apoio, conversas e amizade ao longo dessa caminhada.

Aos maravilhosos amigos que conquistei no mestrado, especialmente aqueles que eu não imagino mais minha vida sem: Jorlan Fernandes, Lyana Lima e Thais Souza, vocês são presentes na minha vida, tornaram tudo mais leve e divertido.

A todos que auxiliaram na coleta, envio e obtenção de amostras: Dra. Lia Laura Lewis Ximenes, Maria Mabel Monte de Melo, Kycia Maria Rodrigues do Ó, Flavio Augusto Padua Milagres, Dra. Cristiane Alves Villela-Nogueira, Dra. Flavia Barreto, Dra. Ana Rita Coimbra Motta-Castro, Dra. Vanessa Salete de Paula, Dra. Priscila Pollo Flores, Dr. Francisco Inácio Bastos e Dr. Marcelo Santos Cruz.

A todos que auxiliaram na coleta, processamento e testagem das amostras utilizadas neste estudo, especialmente Elisângela Ferreira, Juliana Miguel, Jaqueline Correia, Letícia Scalioni e Renata Tourinho.

À Dra. Elisabeth Lampe, chefe do LAHEP, que permitiu o desenvolvimento do projeto no laboratório e a todos da equipe do LAHEP, que ajudaram com apoio, amizade, e mão-de-obra, seria injusto colocar nomes e me esquecer de alguém.

E claro, aos participantes do estudo, pois sem eles nada disso seria possível.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”.

(Carl Sagan)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Avaliação do desempenho de testes rápidos na detecção de marcadores do vírus da hepatite B

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Helena Medina Cruz

O uso de testes rápidos (TR) para detecção de marcadores de infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) pode ser uma ferramenta para aumentar o acesso ao diagnóstico em áreas de difícil acesso. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de TRs na detecção de marcadores do HBV para fins de diagnóstico e estudos epidemiológicos. Um painel de referência com amostras de soro de pacientes com infecção pelo HBV e indivíduos saudáveis foi confeccionado para avaliação dos testes rápidos na detecção do HBsAg. Após, amostras de soro, sangue total e saliva foram obtidas de indivíduos de três grupos: i) alta endemicidade, ii) Baixa prevalência, e iii) alta vulnerabilidade para aquisição do HBV, e foram empregadas para avaliação dos TRs de detecção de HBsAg, anti-HBs e anti-HBe. Cinco TR foram avaliados: Vikia HBsAg[®] (Biomérieux, França), HBsAg teste rápido (Doles, Brasil), e do fabricante Wama (Brasil), os testes: Imuno-Rápido HBsAg[®], Imuno-rápido anti-HBsAg[®] e Imuno-rápido anti-HBeAg[®]. Amostras de soro foram avaliadas em todos os TR, saliva foi avaliada nos TR para a detecção do HBsAg e sangue total somente no TR Vikia HBsAg[®]. Os resultados dos TR foram comparados com os obtidos em testes imunoenzimáticos comerciais (EIE) para detecção de HBsAg e anti-HBs e teste de eletroquimioluminescência (ECLIA) para detecção de anti-HBe. Os TR para detecção de HBsAg tiveram sua repetitividade e reprodutibilidade em amostras de soro e saliva avaliadas, assim como a determinação de reação cruzada a outras infecções. O Vikia HBsAg[®] apresentou melhor concordância, utilizando amostras de soro no painel de referência (98,68%) e no total dos grupos de diferentes perfis (96,08%), sendo melhor no grupo i (95,81%). Os diferentes TR para detecção do HBsAg utilizando amostras de soro apresentaram concordância acima de 93% no painel de referência e 87% nos grupos de diferentes perfis. Nos dois cenários, houve aumento da sensibilidade dos TRs para detecção do HBsAg de acordo com a presença do HBV DNA. O TR Vikia HBsAg[®] apresentou concordância em amostras de sangue total de 72,72%, exceto no grupo ii, onde não foi possível detectar amostras HBsAg verdadeiro positivas. Os TR para HBsAg apresentaram baixos valores de concordância em amostras de saliva (45,65%), somente o Imuno-rápido HBsAg[®] conseguiu detectar um maior número de amostras verdadeiro positivos (n=34). Os TR para detecção de anti-HBs e anti-HBe apresentaram concordâncias iguais a 54,73% e 56,89%, respectivamente. O Imuno-rápido anti-HBs[®] apresentou melhores valores de sensibilidade em amostras com altos títulos de anti-HBs e naquelas obtidas de indivíduos com anti-HBc e anti-HBs reagente. Os TR para HBsAg apresentaram excelente repetitividade e reprodutibilidade (concordância igual à 100%) em amostras de soro e saliva. Não foram observados resultados HBsAg falso positivo ou negativo em amostras reativas para Dengue, porém resultados discordantes foram observados em todos os TRs avaliados em amostras com sorologia reativa para HCV, HIV e *Treponema pallidum*. Conclui-se que, TR para detecção do HBsAg podem ser empregados no diagnóstico da infecção em amostras de soro, enquanto os TR para detecção de anti-HBe e anti-HBs apresentam baixo desempenho para uso diagnóstico. Palavras-chave: Teste rápido, HBsAg, anti-HBs, anti-Hbe



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of the performance of rapid tests for detection of hepatitis B virus markers

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINA

Helena Medina Cruz

The use of rapid tests (RT) for the detection of hepatitis B virus (HBV) markers can be a tool for increasing access to diagnosis in hard to reach areas. The objective of this study was to evaluate the performance of RTs for detection of HBV markers for purposes of diagnostic and epidemiological studies. A reference panel with serum samples from HBV patients with HBV infection and healthy individuals was made for evaluation of rapid tests for HBsAg detection. Then, serum, whole blood and saliva samples were obtained from subjects of three groups: i) high endemicity, ii) low endemicity, and iii) high vulnerability for acquisition of HBV infection and were employed for evaluation of TRs for HBsAg, anti- HBs , anti- HBe detection. Five RTs were evaluated: Vikia HBsAg[®] (Biomérieux, France), HBsAg teste rápido[®] (Doles, Brazil), and to manufactory Wama (Brazil) the testes: Imuno-rápido HBsAg[®], Imuno-rápido anti-HBsAg[®], and Imuno-rápido anti-HBeAg[®]. Serum samples were evaluated in all rapid tests, saliva samples were evaluated in all RTs for HBsAg detection and whole blood was used only along to RT Vikia HBsAg[®]. The results of RT were compared with the commercial enzyme immunoassays (EIA) for HBsAg and anti-HBs detection and electrochemiluminescence assay for detection of anti-HBe. The RT for detection of HBsAg had the repeatability and reproducibility in serum and saliva evaluated, as well as the determination of cross-reactivity to other infections. The Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) showed the best concordance using serum samples in the reference panel (98.68%) and in total of groups with different profiles of endemicity (96.08%), whereas was better in group i (95.81%). RT for HBsAg detection using serum samples showed concordance above: 93% in the reference panel and 87% in the groups with different profiles. In both scenarios, there was increased sensitivity of RT for HBsAg detection according to the presence of HBV DNA. The RT Vikia HBsAg[®] showed good agreement in whole blood samples (72.72%), except in group ii , where it was not possible to detect HBsAg true positive samples. RT for HBsAg showed low levels of agreement in saliva samples (45.65%), where only the Imuno-rápido HBsAg[®] was able to detect a larger number of true positive samples (34). RT for detection of anti-HBs and anti-HBe showed concordance of 54.73% and 56.89%, respectively. The Imuno-rápido anti-HBs[®] showed better sensibility results in samples with high titers of anti-HBs and those obtained from individuals with reactive anti-HBc and anti-HBs. RT for HBsAg showed excellent repeatability and reproducibility (concordance equal to 100%) in serum and saliva. No HBsAg positive or false negative results were observed in samples reactive for Dengue virus, but discordant results were observed in all RT evaluated in samples with reactive serology for HCV, HIV and *Treponema pallidum*. In conclusion, the rapid tests for HBsAg detection can be employed for the diagnosis of infection in serum, while RT for detection of anti-HBe and anti-HBs exhibit poor performance for diagnostic use.

Key words: Rapid test, HBsAg, anti-HBs, anti-Hbe

Sumário

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de sinais, símbolos e unidades de medida	xvi
Lista de siglas abreviaturas	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Breve Histórico	1
1.1 Estrutura viral	2
1.2 Estrutura Genômica	4
1.3 Replicação viral.....	8
1.4 Formas de transmissão.....	9
1.5 Epidemiologia do HBV	11
1.6 Prevenção e Tratamento.....	14
1.7 Patologia e manifestações clínicas	17
1.7.1 Forma aguda	19
1.7.2 Forma Crônica.....	20
1.8 Diagnóstico	21
1.8.1 Utilização de testes rápidos.....	24
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Amostra populacional estudada.....	30
4.1.1. Confecção de painel de controle	31
4.1.2. Estudo de Campo	31

4.2.	Obtenção das amostras	36
4.3.	Caracterização do material	37
4.3.3.	Painel de referência.....	37
4.3.4.	Estudo de campo.....	38
4.3.5.	Testes imunoenzimáticos	38
4.3.6.	Testes rápidos	44
4.4.	Avaliação da reprodutibilidade e repetitividade dos testes rápidos para detecção de HBsAg.....	49
4.5.	Avaliação dos testes rápidos na detecção do marcador HBsAg em amostras reagentes para outras infecções	50
4.6.	Análise dos dados.....	51
5.	RESULTADOS	52
5.1.	Painel de referência	52
5.2.	Estudo de campo	55
5.2.1.	Detecção do marcador HBsAg de acordo com o EIE.....	55
5.2.2.	Detecção do marcador anti-HBs de acordo com o EIE	63
5.2.3.	Detecção do marcador anti-HBe de acordo com o EIE	65
5.3.	Avaliação da Reprodutibilidade e Repetitividade dos testes rápidos para detecção do marcador HBsAg.....	67
5.4.	Avaliação dos testes rápidos na detecção do marcador HBsAg em amostras reagentes para outras infecções	68
6.	DISCUSSÃO.....	70
7.	CONCLUSÕES.....	77
8.	PERSPECTIVAS	79
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	ANEXO A	98
	ANEXO B	99

Lista de Figuras

Figura 1.1: Estrutura do vírus da hepatite B.....	3
Figura 1.2: Partículas completas e incompletas do HBV.....	3
Figura 1.3: Representação esquemática do genoma do vírus da hepatite B.	5
Figura 1.4: Determinante, subdeterminantes e subtipos sorológicos do HBV.....	6
Figura 1.5: Distribuição dos genótipos do HBV em diferentes regiões do Brasil.....	7
Figura 1.6: Representação esquemática da replicação viral.....	9
Figura 1.7: Prevalência da Hepatite B crônica no mundo	12
Figura 1.8: Números de casos confirmados de hepatite B por região do Brasil.....	14
Figura 1.9: Cobertura global da 3ª dose de hepatite B em crianças (1989 e 2012). .	15
Figura 1.10: Cobertura vacinal das 3 doses da vacina contra HBV em crianças (2012).....	16
Figura 1.11 Curso clínico da hepatite B aguda.....	20
Figura 1.12: Curso clínico da hepatite B crônica.....	20
Figura 1.13: Fluxograma para testagem de amostras no diagnóstico do HBV	23
Figura 1.14 Representação esquemática do teste rápido.....	25
Figura 4.1: Regiões e locais de onde foram obtidas as população dos centros de referências.....	32
Figura 4.2: Regiões e locais das amostras obtidas de populações de Baixa prevalência.....	34
Figura 4.3: Região das amostras obtidas e comportamento das populações de alta vulnerabilidade.....	35
Figura 4.4: Procedimento para a coleta de sangue.....	36
Figura 4.5: Etapas para a coleta com o coletor Salivette®	37

Figura 4.6 Princípio do EIE para detecção do marcador HBsAg utilizando o fabricante Diasorin.	39
Figura 4.7 Princípio do EIE para detecção do marcador HBsAg utilizando o fabricante Radim	41
Figura 4.8 Princípio do EIE para detecção do marcador anti-HBs utilizando o fabricante Diasorin.	42
Figura 4.9 Representação esquemática da testagem para avaliação da repetitividade e reprodutibilidade em amostras de soro e saliva	50
Figura 5.1- Número total de amostras obtidas em cada fluido e separação entre as reagentes e as não reagentes para o marcador HBsAg no estudo de campo.	55

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 – Resumo do esquema de testagem utilizando os testes rápidos selecionados pelo estudo.....	49
Tabela 5.1 - Valores de acurácia (%) pelos testes rápidos Vikia HBsAg [®] (Biomérieux), Imuno-rápido HBsAg [®] (Wama) e HBsAg teste rápido [®] (Doles) para detecção de HBsAg em comparação com os resultados obtidos em amostras de soro avaliadas em dois testes imunoenzimáticos (HBsAg One [®] , Radim e ETI-MAK-4 [®] , Diasorin)	53
Tabela 5.2 - Valores médios da razão DO/PC obtidos em dois EIes comerciais (HBsAg One [®] , Radim e ETI-MAK 4 [®] , Diasorin) de acordo com os resultados falso negativos e verdadeiro positivos obtidos nos testes rápidos (Vikia HBsAg [®] , Biomérieux; Imuno-rápido HBsAg [®] , Wama e HBsAg teste rápido [®] , Doles) no estudo utilizando painel de referência.....	54
Tabela 5.3 - Dados demográficos (sexo e idade) e frequência de detecção de HBsAg pelo EIE e HBV DNA pelo teste molecular de acordo com o fluido biológico (soro, sangue total e saliva) em cada grupo avaliado no estudo de campo.....	56
Tabela 5.4 - Valores de acurácia (%) pelos testes rápidos Vikia HBsAg [®] (Biomérieux), Imuno-rápido HBsAg [®] (Wama) e HBsAg teste rápido [®] , (Doles) em comparação com os resultados obtidos pelo teste imunoenzimático ETI-MAK-4 [®] (Diasorin) em amostras de soro de acordo com o perfil da população estudada.....	58
Tabela 5.5 - Valores médios de DO/PC obtidos pelo ensaio imunoenzimático (ETI-MAK-4 [®] , Diasorin) em amostras de soro HBsAg falso negativas (FN) e verdadeiro positivas (VP) obtidas nos testes rápidos para detecção de HBsAg (Vikia HBsAg [®] , Biomérieux; Imuno-rápido HBsAg [®] , Wama e HBsAg teste rápido [®] , Doles de acordo com o perfil da população estudada.....	59
Tabela 5.6 - Valores de acurácia (%) do teste rápido Vikia HBsAg [®] (Biomérieux) em amostras de sangue total em comparação com os resultados obtidos nas respectivas amostras de soro pelo teste imunoenzimático ETI-MAK-4 [®] (Diasorin) de acordo com o perfil da população estudada.....	60
Tabela 5.7 - Valores de acurácia (%) dos testes e frequência de amostras HBsAg verdadeiro-positivas, falso-positivas, verdadeiro-negativos e falso-negativos detectadas pelos testes rápidos Vikia HBsAg [®] (Biomérieux), Imuno-rápido HBsAg [®] (Wama) e HBsAg teste rápido [®] (Doles) em comparação com os resultados obtidos pelo ensaio imunoenzimático ETI-MAK-4 [®] (Diasorin) em amostras de saliva de acordo com o perfil da população estudada.....	62

Tabela 5.8 Valores de acurácia (%) pelo teste rápido Imuno-rápido anti-HBsAg [®] (Wama) em amostras de soro em comparação com os resultados obtidos pelo teste imunoenzimático (ETI-AB-AUK-3 [®] , Diasorin) de acordo com o perfil da população estudada.....	64
Tabela 5.9 Valores médios de DO/PC obtidos pelo teste imunoenzimático ETI-AB-AUK-3 [®] (Diasorin) em amostras anti-HBs falso negativas e verdadeiro positivas obtidas no teste rápido Imuno-rápido anti-HBsAg [®] (Wama) de acordo com o perfil da população estudada	64
Tabela 5.10 - Valores de acurácia (%) do teste e frequência de amostras anti-HBe verdadeiro-positivas, falso-positivas, verdadeiro-negativas e falso-negativas detectadas pelo teste rápido Imuno-rápido anti-HBeAg [®] (Wama) em comparação com os resultados obtidos pelo teste de eletroquimioluminescência <i>Elecsys</i> anti-HBe [®] (Roche) em amostras de soro, de acordo com o perfil da população estudada	66
Tabela 5.11 - Valores médios de DO/PC obtidos pelo ECLIA <i>Elecsys</i> anti-HBe [®] (Roche) em amostras anti-HBe falso negativas e verdadeiro positivo obtidas no teste rápido Imuno-rápido anti-HBeAg [®] (Wama) de acordo com o perfil da população estudada	67
Tabela 5.12 - Frequência de resultados verdadeiros positivos (VP), falso negativos (FN), falso positivos (FP), verdadeiro negativos (VN) e valor de concordância kappa obtidos pelos testes rápidos para detecção de HBsAg (Vikia HBsAg [®] , Biomérieux; Imuno-rápido HBsAg [®] , Wama e HBsAg teste rápido [®] , Doles) em amostras de soro com sorologia reativa para vírus dengue, <i>Treponema pallidum</i> , HCV, HIV em comparação aos resultados obtidos pelo ensaio imunoenzimático (ETI-MAK-4 [®] , Diasorin)	69

Lista de Quadros

Quadro 0.1 - Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B.....	7
Quadro 0.2 - Significados dos marcadores sorológicos do vírus da hepatite B.....	23
Quadro 0.3 - Interpretação dos resultados no diagnóstico da hepatite B.....	23
Quadro 1.4 - Relação de testes rápidos para detecção dos marcadores do HBV disponíveis em diferentes regiões do mundo até abril de 2014.....	26

Lista de sinais, símbolos e unidades de medida

nm= nanômetro

pb= pares de base

°C= Graus célsius

$\frac{3}{4}$ = três quartos

±= Símbolo de mais ou menos

N= número

+ = Símbolo de positivo ou reagente; mais

- = Símbolo de negativo ou não reagente; menos

ml= Mililitro

g= Gravidade

%= Porcentagem

Lista de siglas abreviaturas

AgAu= Antígeno Austrália

ANVISA= Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ALT= Alanina aminotransferases

Anti-HBe= Anticorpo contra antígeno “e” do vírus da hepatite B

Anti-HBc IgM= Anticorpos contra o HBcAg do tipo IgM

Anti-HBc IgG= Anticorpos contra o HBcAg do tipo IgG

Anti-HBs= Anticorpos contra o HBsAg

Anti-HBc total= Anticorpo Anti-HBc IgG + Anti-HBc IgM

AST= Aspartato aminotransferases

CDC= do inglês “Center of Disease Control and Prevention” – Centro de controle e prevenção de doenças

CEP= Comitê de Ética em Pesquisa

CQI= Controle de qualidade interno

cccDNA= do inglês *covalently closed circular*— Forma circular covalentemente fechada do DNA

DR= do inglês Direct Repeats – Sequencias diretamente repetidas

DNA= Ácido desoxirribonucleico

DST’s= Doenças sexualmente transmissíveis

ECLIA= Eletroquimioluminescência

EIE= Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima

FIOCRUZ= Fundação Oswaldo Cruz
HAV= Vírus da hepatite A
HBV= Vírus da hepatite B
HBcAg= Antígeno central do HBV
HBeAg= Antígeno “e” do vírus da hepatite B
HBsAg= Antígeno de superfície do HBV
HBxAg= Antígeno “x” do vírus da hepatite B
HCA= Hepatite crônica ativa
HCP= Hepatite crônica persistente
HCV Vírus da hepatite C
HDV= Vírus da hepatite D
HEV= Vírus da hepatite E
HRP= horseradish peroxidase - Peroxidase de rábano
HUCFF= Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IBGE= Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGHAHB= Imunoglobulina Humana anti-hepatite tipo B
IOC= Instituto Oswaldo cruz
LRNHV= Laboratório de Referencia Nacional para Hepatites Virais
MS= Ministério da Saúde
OMS= Organização Mundial de Saúde
ORFs= do inglês “Open Reading Frame”- Fases abertas de leituraPBS/BSA= do inglês “Phosphate buffered saline/ Bovine Serum Albumin” - salina tamponada com fosfato / albumina de soro bovino
PCR= do inglês “Polimerase Chain Reaction” - Reação em cadeia de polimerase
pgRNA= RNA pré-genômico
PNI= Programa Nacional de Imunizações
RC-DNA= do inglês “Relaxed circular DNA” –= Genoma de DNA circular não ligado covalentemente
SINAN= Sistema Nacional de Atendimento Médico
TCLE= Termo de consentimento livre e esclarecido
UFRJ= Universidade Federal do Rio de Janeiro

1. INTRODUÇÃO

A hepatite viral é uma inflamação no fígado que pode ser causada por cinco agentes etiológicos virais: vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite D (HDV) e vírus da hepatite E (HEV) (Ministério da Saúde 2002).

O HBV pertence à família *Hepadnaviridae*, que dois gêneros, o *Avihepadnavirus*, que tem como hospedeiros as aves, e o gênero *Orthohepadnavirus*, que tem como hospedeiros os mamíferos, onde está incluído o HBV humano (Ganem & Schneider RJ. 2001).

1.1. Breve Histórico

A existência de uma forma de hepatite provavelmente transmitida por via parenteral foi documentada cientificamente pela primeira vez em 1895 (Hollinger 1994; Reuben 2002; Alter 2003; Freitas 2009; Fonseca 2010) em trabalhadores na Alemanha que receberam vacina contra a varíola (via parenteral), preparada a partir de linfa humana, e desenvolveram quadro de icterícia após dois a oito meses da aplicação (Hollinger 1994; Schmid 1994; Reuben 2002; Fonseca 2010).

Em 1937, Findlay & MacCallum descreveram casos de icterícia ocorridos dois a sete meses após a inoculação em voluntários de vacina contra febre amarela, preparada com adição de soro humano para fins de estabilização do produto (Hollinger 1994). Estudos posteriores estabeleceram que a epidemia havia sido ocasionada pelo HBV (Seeff et al.1987; Miguel 2005; Fonseca 2010).

Em 1963, Blumberg e colaboradores identificaram no soro pertencente a um aborígine australiano a presença de um antígeno que reagia como o soro de dois doentes hemofílicos politransfundidos. Este antígeno recebeu o nome de antígeno Austrália (AgAu) e, mais tarde, passou a ser chamado de antígeno de superfície do HBV (HBsAg) (Blumberg et al.1965; Alter 2003).

Independentemente dos achados de Blumberg, Prince em 1968, isolou outro antígeno no sangue durante o período de incubação de uma hepatite pós-transfusional. O referido antígeno foi denominado de antígeno SH, relativo à hepatite

sérica (Prince 1968). Posteriormente, comprovou-se que o antígeno SH de Prince era o mesmo antígeno Austrália de Blumberg.

Em 1970, Dane e colaboradores identificaram, por microscopia eletrônica, em soros positivos para o antígeno Austrália, a partícula viral completa do HBV e, em 1972, foi descrito um novo antígeno distinto do HBsAg, sendo denominado de antígeno “e” do HBV (HBeAg), como também seu anticorpo correspondente (anti-HBe) (Magnius & Espmark 1972; Fonseca 2010).

A vacina começou a ser desenvolvida em 1971, mas somente em 1981 foi registrada a primeira vacina derivada do plasma de portadores do HBsAg. Finalmente, em 1986, a vacina derivada de plasma foi substituída pela vacina contra o HBV produzida por engenharia genética, até hoje utilizada (Blumberg 2006).

1.1 Estrutura viral

O HBV é um vírus envelopado que mede aproximadamente 42 nm de diâmetro. Apresenta capsídeo icosaédrico eletrodense interno de aproximadamente 27 nm, que abriga uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) parcialmente dupla fita com 3200 pb (Takahashi et al. 1976). A estrutura completa ou infecciosa (partícula de Dane) é composta, de envelope ou camada externa e nucleocapsídeo ou camada interna compondo o vírion (Figura 1.1).

Apresenta ainda a característica de produzir em excesso partículas não infecciosas ou incompletas, de formato esférico ou tubular com cerca de 22nm de diâmetro e de comprimento variável, constituídas por envelope viral e destituídas de nucleocapsídeo e DNA (Carneiro 1997, DCD 2012). Essas partículas são imunogênicas e por não serem infecciosas ajudam nas estratégias de escape do vírus à resposta do sistema imunológico do hospedeiro (Figura 1.2).

O envelope do HBV é formado por proteínas, lipídeos, carboidratos e pelo HBsAg, enquanto que o capsídeo, presente apenas na partícula completa, é composto pelo antígeno central do HBV (HBcAg) e o HBeAg (Yoshida et al., 2005).

O HBV é extremamente resistente, sendo capaz de resistir a temperaturas e umidades extremas, podendo sobreviver quando armazenado por 15 anos à temperatura de -20°C, por 24 meses à temperatura de -80°C, por seis meses à temperatura ambiente e por sete dias à temperatura de 44°C (Pyrsoopoulos 2011).

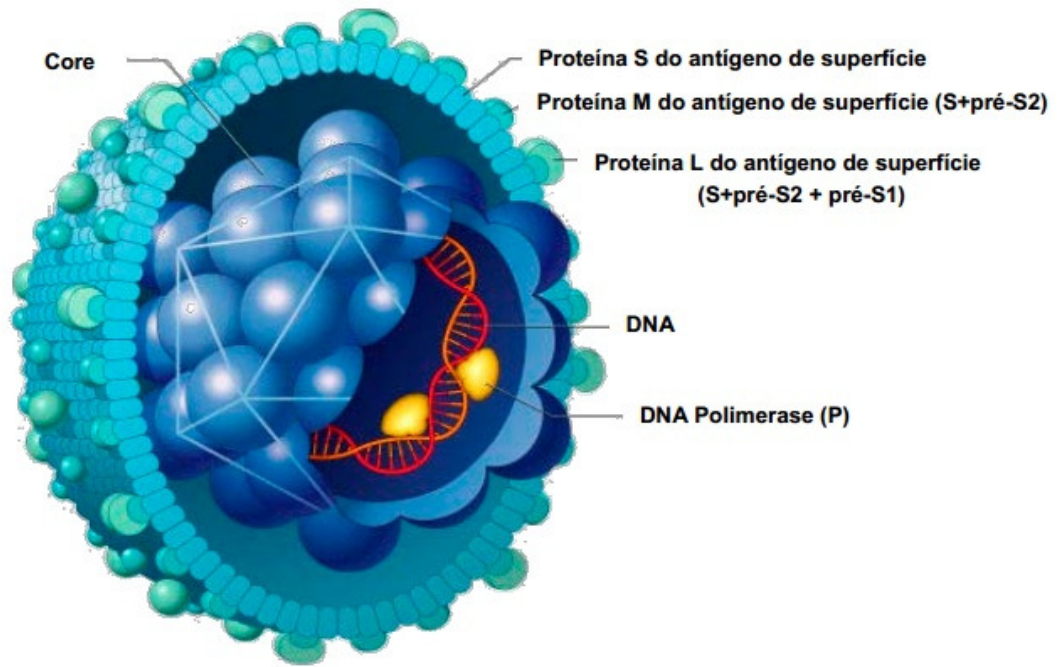


Figura 1.1: Estrutura do vírus da hepatite B.

(Fonte: Adaptado de James A. Perkins, Medical and Scientific illustrations[©] 2002. Disponível em: <http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>).

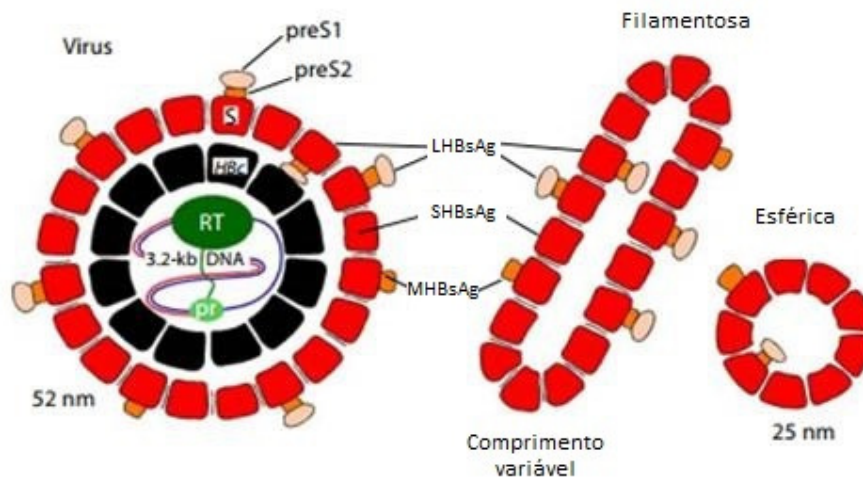


Figura 1.2: Partículas completas e incompletas do HBV

(Fonte: Adaptado de Gerlich et al 2010)

1.2 Estrutura Genômica

O genoma do HBV é um dos menores genomas de vírus que infectam o homem. Este genoma possui 3200 pb e apresenta quatro fases abertas de leitura (Open Reading Frame- ORFs) sobrepostas, que correspondem às regiões S, C, P e X (Ganem & Vermus 1987) (Figura 1.3). A fita maior é complementar ao RNA mensageiro e por convenção, é denominada de negativa. A fita menor é denominada de positiva e apresenta a porção terminal 3' de tamanho variável, ou seja, o comprimento da fita positiva é variado, correspondendo de 50-90% do comprimento da fita complementar. Próximo das extremidades de ambas as fitas observa-se uma pequena sequência de 11 nucleotídeos que são diretamente repetidas (Direct Repeats - DR) designadas de DR1 e DR2. Tais sequências são importantes na iniciação da replicação do HBV (Tiollais et al. 1985; Seeger et al. 1986; Ganem & Varmus 1987; Locarnini 2004; Locarnini & Omata 2006; de Matos 2007).

O gene S é a região do genoma responsável pela síntese das proteínas presentes no envelope externo (Sherlock 1990; Yoshida et al. 2005; Pyrsopoulos 2011). Nessa região estão incluídas as regiões pré-S1, pré-S2 e S que apresentam três códons de iniciação na mesma fase de leitura e, todos apresentam o mesmo códon de parada (Yoshida et al. 2005). Essas regiões dão origem a três proteínas, a principal proteína e mais abundante é a proteína S (small), que é uma proteína pequena, está na superfície do vírus e é sintetizada a partir do códon de iniciação localizado no início da região S (Liberto & Oliveira 2002; Yoshida et al. 2005; Seeger & Zoulim 2007). A proteína L (large) é sintetizada nas regiões pré-S1, pré-S2 e S, é a maior das proteínas e a menos abundante (Liberto & Oliveira 2002; Seeger & Zoulim 2007), parece ter papel importante na ligação do vírus a receptores da célula hospedeira e também na montagem e liberação do vírion a partir da célula infectada (Bruss & Ganem 1991; Yoshida et al. 2005). As regiões pré-S2 e S dão origem à proteína M (middle) que é de tamanho intermediário e de função desconhecida (Yoshida et al. 2005).

O gene C apresenta dois códons de iniciação, na mesma fase de leitura aberta, que sintetizam duas proteínas com especificidades antigênicas distintas: o HBcAg e o HBeAg. O HBcAg irá formar o capsídeo e não é detectado no soro, apenas nos hepatócitos de pacientes com hepatite aguda ou crônica, e o HBeAg, que é um antígeno solúvel não estrutural e sua presença está associada à

infecciosidade por ser produzida durante um estágio de replicação viral intenso (Yoshida et al. 2005; de Matos 2007; Pyrsopoulos 2011).

O gene P é o maior gene do HBV, sobrepondo-se a todos os outros genes e englobando cerca de $\frac{3}{4}$ do genoma do HBV. Codifica uma enzima com atividade de DNA polimerase, transcriptase reversa e ribonuclease (RNAse) e está envolvido na síntese de DNA (Yoshida et al. 2005; de Matos 2007).

O Gene X codifica a proteína HBx e embora sua função ainda não esteja claramente definida, sabe-se que HBx é uma proteína reguladora que pode ativar a transcrição de alguns genes virais e celulares (Feitelson & Duan 1997; Seeger & Mason 2000). Após a infecção pelo HBV, os hepatócitos expressam HBxAg e na infecção crônica, o acúmulo contínuo de HBxAg leva a proliferação e acúmulo de mutações em sítios de controle de regeneração e reparo de DNA celular (Liberto & Oliveira 2002). Além disso, alguns estudos relataram a associação entre a expressão do gene X e o aparecimento de câncer hepático (Rapicetta et al. 2002; Robertson & Margolis 2002; Cougot et al. 2005; de Matos 2007; Pyrsopoulos 2011)

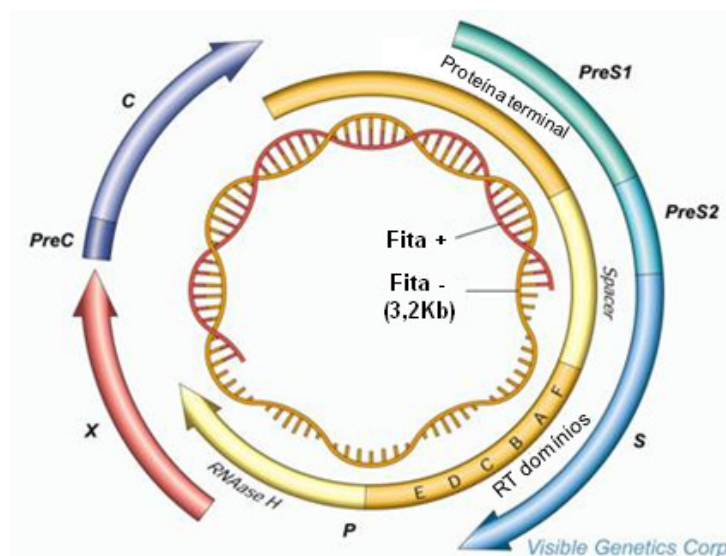


Figura 1.3: Representação esquemática do genoma do vírus da hepatite B.

(Fonte: de Araújo, 2011).

O antígeno de superfície do HBV apresenta alta heterogeneidade. O envelope glicoproteico do HBV contém um epítipo grupo-específico, presente em todos os subtipos, denominado de determinante comum “a”, que também apresenta subdeterminantes antigênicos exclusivos (d/y e w/r), além de subtipos, conhecidos como: adw2, adw4, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adrq+, adrq- e ayr (Figura 1.4).

A identificação dos subtipos pode ser útil na compreensão epidemiológica da infecção pelo HBV e, em alguns casos, ajudar a estabelecer rotas e mecanismos de transmissão (Kidd-Ljunggren et al. 2002; de Matos 2007; Pyrsopoulos 2011).

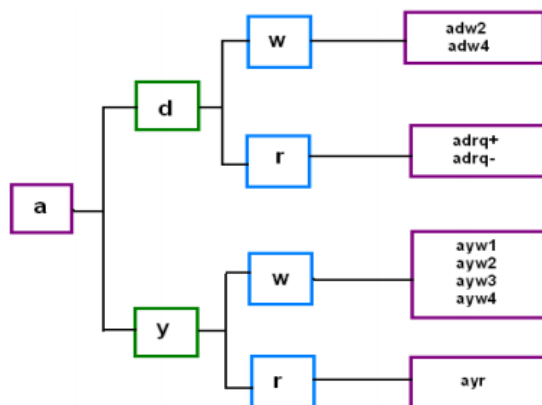


Figura 1.4: Determinante, subdeterminantes e subtipos sorológicos do HBV (Fonte: de Matos 2007).

Os genótipos são definidos pela divergência nucleotídica no genoma do HBV em mais de 8% e o termo subgenótipo é usado quando há divergência nucleotídica de 4 a 8% dentro de um mesmo grupamento genotípico. Foram descritos oito genótipos que são denominados em ordem alfabética (A-H), sendo que dois novos genótipos vêm sendo propostos (I e J) (Lin, 2011). Os subgenótipos são descritos pela nomenclatura de números (1, 2, 3, 4 e 5).

A prevalência dos genótipos varia de acordo com a região. A distribuição dos principais genótipos e subgenótipos, observada no mundo pode ser vista no quadro 1.1 e dos principais genótipos que circulam no Brasil pode ser vista na figura 1.5.

O genótipo C, quando comparado com o B, parece estar mais associado com uma maior progressão da doença e com uma resposta menos favorável ao tratamento com agentes antivirais (Lopes & Schinoni 2011; Pyrsopoulos 2011;). O genótipo B é associado com altas taxas de soroconversão do HBeAg para anti-HBe quando comparadas com o genótipo C (Fonseca 2010; Lopes & Schinoni 2011).

Reinfecção e infecção simultânea com diferentes genótipos do HBV têm sido descritas (Kramvis et al. 2005; Schaefer 2005). Além disso, os genótipos podem influenciar a progressão da doença hepática, bem como a resposta à terapia antiviral em pacientes com hepatite B (Miyakawa & Mizokami 2003; Echavarria et al. 2005; Günther 2006; de Matos 2007).

Quadro 1.1 Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos do vírus da hepatite B (Adaptado de Lin & Kao 2011).

Genótipo / Subgenótipo	Localização geográfica
A	
A1	África Subsaariana, Brasil
A2	Norte da Europa, Brasil
A3	África ocidental, Brasil
B	
B1	Japão
B2-5	Leste da Ásia, Taiwan, China, Indonésia, Vietnã, Filipinas
B6	Alasca, Norte do Canadá, Groenlândia
C	
C1-3	Taiwan, China, Coreia do Sul e Sudeste da Ásia
C4	Austrália
C5	Filipinas, Vietnã
D	
D1-5	África, Europa, Brasil, países do Mediterrâneo e Índia
E	Restrito para a África Ocidental
F	
F1-4	América Central e do Sul
G	França, Alemanha e Estados Unidos
H	América Central
I	Vietnã e Laos
J	Ryukyu, Japão

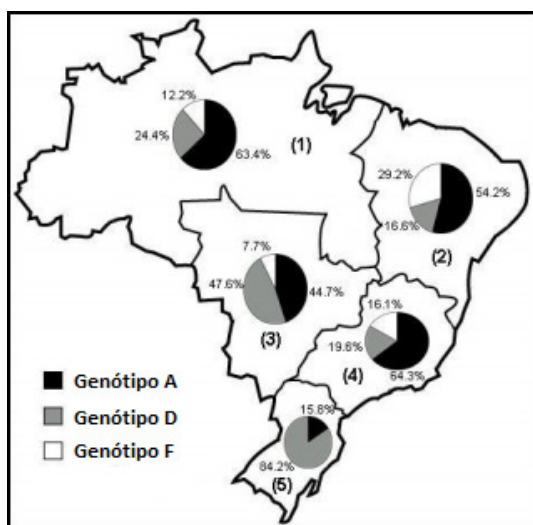


Figura 1.5: Distribuição dos genótipos do HBV em diferentes regiões do Brasil. 1-Região Norte; 2- Região Nordeste; 3- Região Centro-Oeste; 4- Região Sudeste e 5-Região Sul. (Fonte: Adaptado de: de Mello et al. 2007).

1.3 Replicação viral

Os vírus pertencentes à família *Hepadnaviridae* são predominantemente hepatotrópicos e estão relacionados ao desenvolvimento de um processo de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular, porém pequenas quantidades de DNA viral podem ser encontradas nos rins, pâncreas e células mononucleares (Mahoney 1999; Hollinger & Liang 2001; Miguel 2005; de Matos 2007).

A interação entre o vírus e a célula é mediada por receptores presentes no envelope viral e nos hepatócitos. O receptor para o HBV nos hepatócitos ainda não é conhecido, mas sabe-se que o HBsAg se liga à célula hospedeira e penetra na mesma por endocitose; em seguida, o vírus é adsorvido, penetrando no hepatócito (Seeger & Zoulim 2007).

O genoma presente no interior do capsídeo é parcialmente dupla fita, de DNA circular, mas não ligado covalentemente (RC-DNA). Após a adsorção, o vírus perde seu envelope e o nucleocapsídeo é transportado ao núcleo celular (Liberto & Oliveira 2002). A fita positiva (incompleta) se converte por ação da DNA polimerase viral, em uma forma circular covalentemente fechada (*covalently closed circular* - cccDNA –) (de Matos 2007).

A RNA polimerase II celular transcreve o genoma do HBV a partir do cccDNA em RNAs pre-genômico (pgRNA) e subgenômico, sendo que todos eles apresentam um cap na extremidade 5' e compartilham o mesmo sinal de poliadenilação (AATAAA) na extremidade 3' (Seeger & Mason 2000; Ganem & Prince 2004; Locarnini 2004; Locarnini & Omata 2006). O pgRNA serve como RNA mensageiro para a síntese das proteínas do core e como molde para a transcrição reversa. A polimerase/transcriptase reversa liga-se ao gene P (estrutura ϵ) do pgRNA, ocorrendo então, a síntese do DNA viral.

Em seguida, as moléculas de RNA mensageiro (RNAm) viral são transportadas para o citoplasma e traduzidas em proteínas do *core*, polimerase e X. Logo após essa tradução, o RNA pré-genômico é encapsidado dentro das partículas do *core* (HBcAg), juntamente com a polimerase viral. Essa encapsidação parece ser resultado da interação da polimerase, proteínas do capsídeo e de um sinal de encapsidação (ϵ) localizado na extremidade 5' do RNA pré-genômico (Bartenschlager & Schaller 1992; Ganem 1996; Seeger & Mason 2000; Ganem & Schneider 2001; Ganem & Prince 2004; Locarnini 2004; Locarnini & Omata 2006).

No interior do nucleocapsídeo, há a transcrição reversa do RNA pré-genômico em DNA, com a síntese da fita de DNA de polaridade negativa e, posteriormente, há formação da fita de polaridade positiva, que permanece incompleta. A partir daí, o nucleocapsídeo adquire o envelope lipoproteico no retículo endoplasmático ou complexo de golgi e, finalmente, a partícula viral completa é liberada da célula hepática por exocitose. Curiosamente, algumas moléculas de DNA voltam ao núcleo, possibilitando uma espécie de reservatório intranuclear, podendo ser convertidas em cccDNA (Gerelsaikhan et al. 1996; Seeger & Mason 2000; Ganem & Prince 2004) (Figura 1.6).

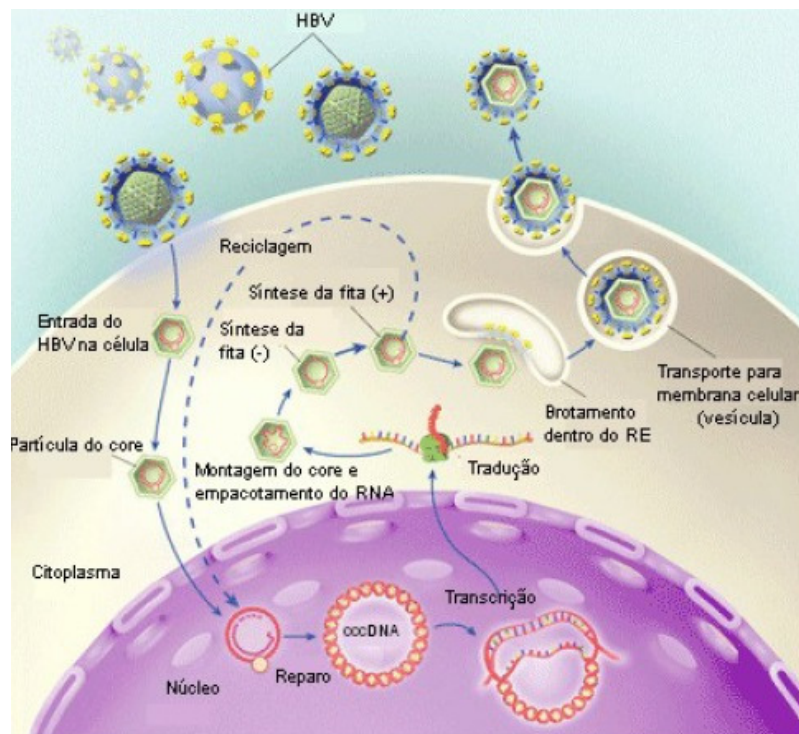


Figura 1.6: Representação esquemática da replicação viral.

(Fonte: Adaptado de:

<http://www.qiagen.com/geneglobe/static/images/Pathways/HBV%20Replication%20Cycle.jpg>).

1.4 Formas de transmissão

A transmissão do HBV pode se dar por diferentes vias, tais como: sexual, vertical (mãe para o filho) e parenteral. A via de transmissão está diretamente associada com o padrão de endemicidade da infecção (Yoshida 2005, CDC 2012).

O HBV é transmitido por via percutânea e através das mucosas tendo como veículo o sangue e outros fluidos corporais infectados, como sêmen e secreção vaginal. A presença do HBsAg já foi verificada na saliva, sêmen, leite materno, urina, secreções pancreáticas, biliares e vaginal, lágrima, líquidos menstrual, pleural e nasofaríngeo (de Matos 2007).

A concentração do vírus é alta em sangue e exsudatos, moderada em sêmen, fluido vaginal e saliva, e baixa ou não detectável em urina, fezes, lágrimas, suor e leite materno. A saliva pode ser um veículo de transmissão através de mordidas, por outro lado, o beijo é uma via improvável de transmissão (CDC 2012).

A transmissão sexual pode ocorrer então, através de sêmen e secreções vaginais contaminados. Comportamentos de risco como: relações sexuais desprotegidas, múltiplos parceiros, o tipo de prática sexual e a presença de outras doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) podem aumentar as chances desse tipo de transmissão que atualmente é considerada como a principal forma de contaminação (Miguel, 2005).

A transmissão vertical pode ser intrauterina, pré e pós-parto, e depende do perfil dos marcadores HBsAg e HBeAg nas gestantes. Em mulheres HBsAg+/HBeAg+, a transmissão ocorre em 70-90% dos casos. Já em mulheres HBsAg+/HBeAg-, esse índice varia de 40-70% (MS 2008). A probabilidade de transmissão vertical é maior quando a mãe é infectada pelo HBV no último trimestre de gestação em comparação com infecção no primeiro semestre da gravidez, ou caso a mãe seja portadora crônica do HBV (Hollinger 1996; Hou et al. 2005; de Matos 2007, Focaccia 2013).

A transmissão parenteral pode ocorrer por compartilhamento de objetos perfurocortantes, tais como: alicates de unha, agulhas para tatuagem, piercing e acupuntura, e também durante hemodiálise ou através de transfusão de sangue e hemoderivado (MS 2008). Na década de 80, testes de triagem para hepatite B foram introduzidos em bancos de sangue, o que reduziu a transmissão do HBV por transfusão sanguínea.

São considerados grupos de maior vulnerabilidade ao HBV os profissionais de saúde, usuários de drogas, manicuras/pedicuras, hemofílicos, hemodialisados, contactantes de indivíduos infectados, receptores de transfusão sanguínea e de hemoderivados, gestantes, portadores de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) e grupos populacionais com comportamentos sexuais de risco (Maynard et

al. 1990; MS 2003; Valente et al. 2005; de Araújo 2008, MS 2008; Ministério da saúde 2013a).

Há poucos trabalhos envolvendo a avaliação da prevalência de hepatite B em profissionais de beleza. Em geral, estes profissionais demonstram falhas no conhecimento sobre o HBV e em instruções de biossegurança. Esses pontos evidenciam a necessidade da elaboração de cursos de capacitação que promovam uma maior conscientização sobre biossegurança entre esses profissionais (Oliveira & Focaccia 2010; Moraes et al. 2012). Oliveira & Focaccia (2010), em estudo com profissionais de beleza, observaram a presença do HBV em 8% dos avaliados, e sugeriram que eles constituem um grupo de risco independente, na cidade de São Paulo.

Com relação aos usuários de drogas não injetáveis (como o crack), também são poucos os estudos de prevalência da infecção pelo HBV, especialmente no Brasil. Bastos e colaboradores, em 2000, observaram prevalência global de 14,7% no Rio de Janeiro, Turchi, na cidade de São Paulo, em 2000, observou prevalência do marcador anti-HBc igual a 7,9%. Ferreira, em 2008 nas cidades de Cuiabá, Campo Grande e Goiânia observou prevalência global para infecção pelo HBV de 19,6%, 10,0% e 14,7%, respectivamente, e Cruz e colaboradores (2013) em estudo com usuários de crack nas cidades do Rio de Janeiro e Salvador observaram prevalência de hepatite B de 6,2% e 0%, respectivamente.

1.5 Epidemiologia do HBV

A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que dois bilhões de indivíduos já tiveram contato com o vírus, sendo 240 milhões portadores crônicos com risco de desenvolverem um quadro grave, como cirrose e carcinoma hepatocelular. Além disso, anualmente ocorrem cerca de 600 mil mortes por complicações tardias associadas ao HBV (WHO 2013).

Indivíduos assintomáticos podem transmitir a infecção por anos sem saberem da sua situação, tendo estes grande importância na transmissão dessa doença (Grosheide & van-Damme 1996; Miguel 2005), o que demonstra a sua grande importância no cenário de saúde pública mundial.

A infecção pelo HBV varia de acordo com as regiões geográficas, com maior incidência nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, podendo ser em decorrência de um menor controle em bancos de sangue, ações de biossegurança

menos eficazes, entre outros fatores. Dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em 2012, indicam que cerca de 45% da população global vive em áreas de alta prevalência de HBV, 43% em áreas com prevalência moderada e 12% em áreas de baixa prevalência.

A classificação das áreas de endemicidade ocorre da seguinte forma: alta endemicidade quando mais de 8% da população são HBsAg positivos ou acima de 60% da população possui evidências sorológicas de infecção passada pelo HBV (anti-HBc reagente); intermediária quando de 2-7% da população apresenta o marcador HBsAg ou 20-60% da população apresenta evidências sorológicas de infecção passada; e baixa endemicidade quando menos que 2% da população apresenta a doença ou menos de 20% da população apresenta evidências sorológicas de infecção passada (Beasley 1991; Souto 1999; Yoshida 2005; CDC 2012; Focaccia 2013). A prevalência da hepatite B crônica no mundo pode ser vista na figura 1.7.

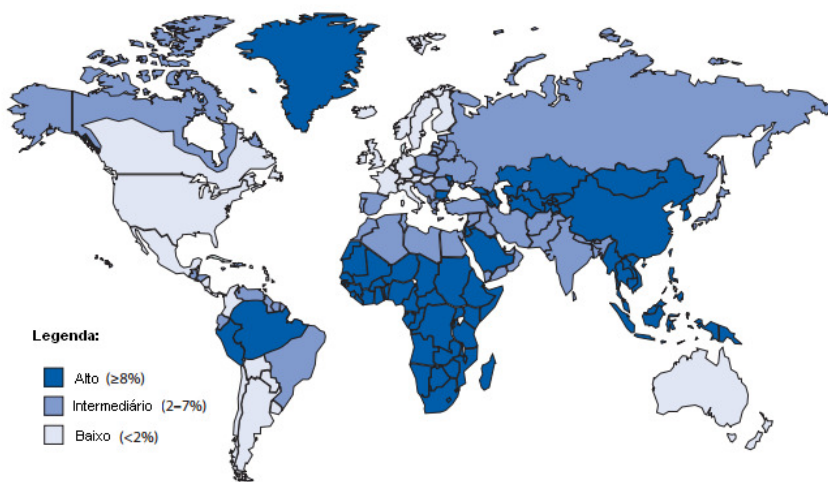


Figura 1.7: Prevalência da Hepatite B crônica no mundo
(Fonte: CDC, 2005)

No Brasil, a hepatite B é uma doença de notificação compulsória. Cerca de 33 mil novos casos de hepatites virais são notificados anualmente e, destes, o maior número de infecções nos últimos 14 anos foi por hepatite B (Portal Saúde 2012).

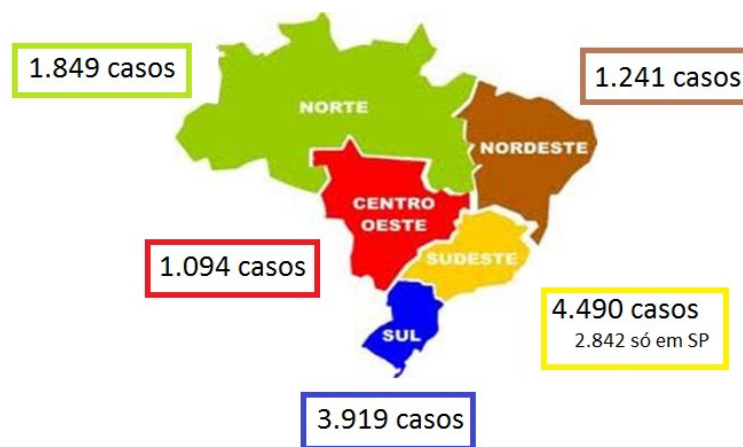
A OMS classifica a região Norte do Brasil como área de alta endemicidade, e as demais regiões, como de baixa endemicidade, mas é possível observar variação na prevalência para o HBsAg entre as regiões e dentro das mesmas (Souto 1999; Tanaka 2000; Chávez et al. 2003). Os estados do Acre, Amazonas e Rondônia são

considerados como regiões geográficas de alta prevalência (Ferreira & Silveira, 1997, Ferreira 2000; Lopes & Schinoni 2011). Ainda há evidências de uma maior prevalência de HBV em populações com menor complexidade urbana, na Amazônia e em outros bolsões regionais do interior do Brasil (Tavares-Neto et al 2004; Viana 2005). Estudo em banco de sangue na região Centro Oeste indica diminuição na prevalência de HBsAg do ano 2001 para o ano 2010 (Lindenberg et al. 2013). Dados obtidos em levantamentos realizados em bancos de sangue demonstram padrões de baixa endemicidade nas regiões Sul e Sudeste (Souto et al. 1999; Chávez et al. 2003).

A prevalência média da infecção pelo HBV no Brasil, de acordo com o marcador anti-HBc, é em torno de 8%, sendo 7,6% na Região Sul, 1,2% na Região Nordeste, 21,4% na Região Amazônica e de 1 a 2,1% na Região Sudeste (Clemens 2000; Caetano & Beck 2006; Barros et al. 2008; Nunes et al. 2007; Diogo et al. 2012).

O cenário nacional vem se modificando e estudos realizados a partir da década de 90 indicam mudanças na endemicidade da infecção pelo vírus (Focaccia et al 1998; Souto 1999; Braga et al, 2004; Viana 2005). Isso se deve, provavelmente, à implementação da vacinação universal contra hepatite B para menores de um ano, em 1998 (Ministério da Saúde 2003).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), entre 1999 e 2011, o número de casos confirmados por HBV foi de 120.343; já o ano de 2012 um total de 12.593 casos foi registrado (Figura 1.8). Um inquérito epidemiológico de base populacional realizado no Brasil demonstrou índices de endemicidade menores que 1% da infecção pelo HBV no conjunto das capitais brasileiras de cada macrorregião e do Distrito Federal. Esse estudo mostrou que ocorre aumento da positividade do anti-HBc total com a idade e a via sexual foi considerada como a principal forma de transmissão. A prevalência dos marcadores anti-HBc e HBsAg foram maiores na Região Norte e menores na Região Centro-Oeste do Brasil. (MS 2012).



Total de casos: 12.593

Figura 1.8: Números de casos confirmados de hepatite B por região do Brasil.

(Fonte: SINAN, 2013)

1.6 Prevenção e Tratamento

A prevenção para a infecção pelo HBV tem como objetivo a redução de casos de hepatite B e seus agravos subsequentes. Medidas de saúde pública vêm sendo adotadas, alterando comportamentos de risco e levando à diminuição da sua transmissão, como, por exemplo, a introdução em 1978 de testagem obrigatória para o HBV em bancos de sangue, tornando esta via de transmissão remota (MS 2005).

A forma mais segura para a prevenção da hepatite B é a aplicação da vacina, produzida por engenharia genética através de DNA recombinante, que é eficaz (90-95% de eficiência). No Brasil foi implementada em 1992, e deixou de ser restrita aos grupos de alta vulnerabilidade da infecção, passando a ser oferecida a crianças menores de 2 anos em todo o país. Desde 1998, o Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde recomenda que crianças, a partir do seu nascimento, sejam vacinadas contra a hepatite B. A imunização apresenta alta eficácia quando são aplicadas as três doses, com intervalo de um mês entre a primeira e a segunda dose e de seis meses entre a primeira e a terceira dose. Desta forma o esquema é realizado da seguinte forma: primeiras 12-24 horas de vida (dia zero), um mês de vida e seis meses de vida (Ministério da Saúde 2013a).

Atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza gratuitamente a vacina contra a hepatite B para indivíduos com idade até 29 anos, 11 meses e 29 dias ou que pertença a grupo de maior vulnerabilidade. Além disso, para reduzir a

transmissão vertical do vírus foi intensificada a oferta de triagem sorológica a todas as gestantes que fazem o pré-natal no SUS (Ministério da Saúde 2013a).

O tempo prolongado entre a 1ª e 3ª doses da vacina contra hepatite B (180 dias) provavelmente contribuiu para obtenção de coberturas vacinais mais baixas quando comparadas às demais coberturas vacinais na faixa etária de menores de um ano (MS 2010a). A OMS no período de 1989-2012 observou uma cobertura vacinal global contra hepatite B em crianças de 83% (Figura 1.9). Também observou que um grande número de países (119) apresentou cobertura vacinal de mais de 90% entre as suas crianças (Figura 1.10).

Existe ainda a Imunoglobulina Humana anti-hepatite tipo B (IGHAHB) que deve ser administrada, usualmente em dose única, 0,5 ml, para recém-nascidos ou 0,06 ml/kg de peso corporal, mínimo de 5 ml, para as demais idades. A IGHAHB é indicada para pessoas não vacinadas, após exposição ao vírus da hepatite B, nas seguintes situações: 1) Prevenção da infecção perinatal pelo vírus da hepatite B; 2) Vítimas de acidentes com material biológico positivo ou fortemente suspeito de infecção por HBV, sem vacinação para hepatite B; 3) Comunicantes sexuais de casos agudos de hepatite B; 4) Vítimas de abuso sexual; 5) Imunodeprimido após exposição de risco, mesmo que previamente vacinados (MS 2008).

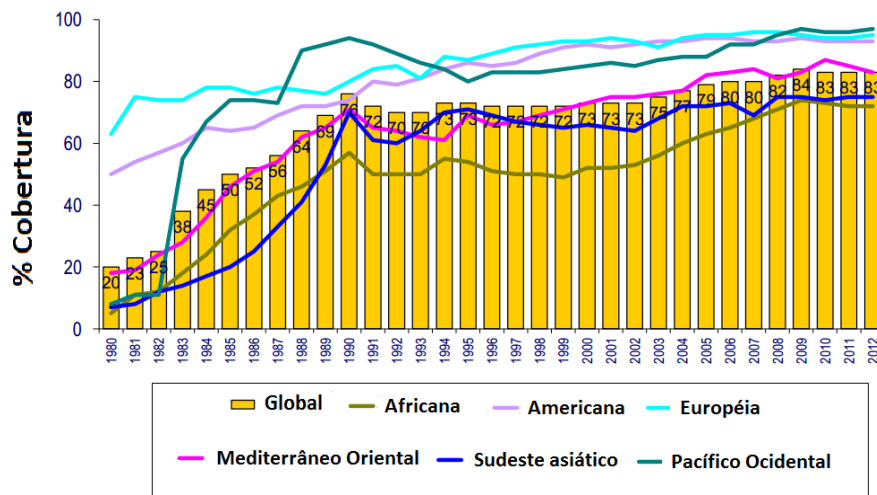


Figura 1.9: Cobertura global da 3ª dose de hepatite B em crianças (1989 e 2012).

(Fonte: Adaptado de:

http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/SlidesGlobalImmuneization)

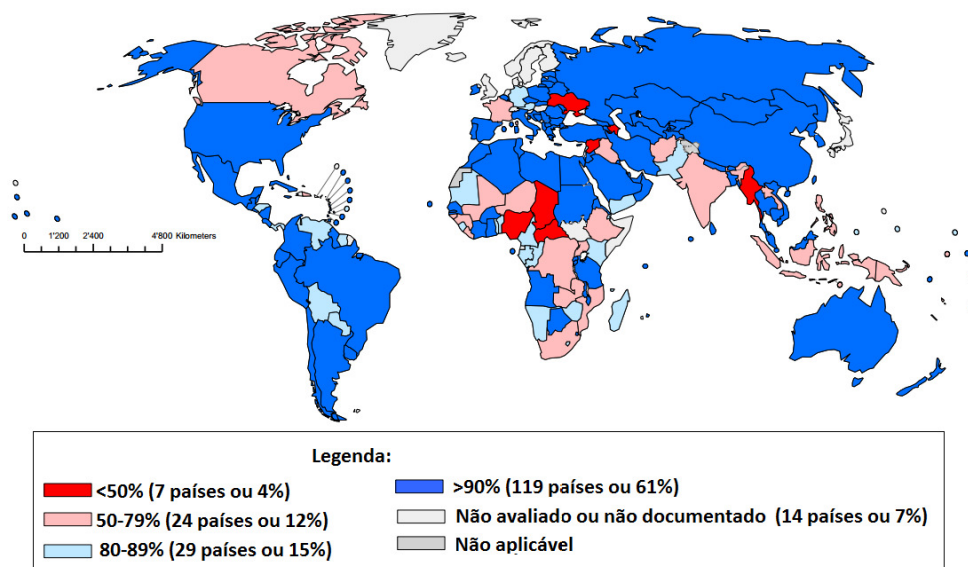


Figura 1.10: Cobertura vacinal das 3 doses da vacina contra HBV em crianças (2012).

(Fonte: Adaptado de:

http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/HepB_map_schedule.jpg)

Não existe um tratamento específico para a forma aguda da infecção, sendo realizado apenas para minimizar a sintomatologia. Na hepatite crônica o tratamento é realizado com objetivo de reduzir a replicação viral antes que ocorram danos irreversíveis ao fígado, minimizando a inflamação crônica e prevenindo complicações posteriores como progressão para a cirrose hepática, e hepatocarcinoma celular (Ferreira 2000; Miguel 2005; MS 2010b).

De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções do Ministério da Saúde (MS 2010c), o desfecho ideal desejado após a terapia é a perda sustentada do HBsAg, com ou sem soroconversão para anti-HBs. Isso está associado à completa remissão da atividade da hepatite crônica. Tal resultado dificilmente é obtido e outros desfechos devem ser seguidos em pacientes HBeAg reagentes e HBeAg não reagentes.

Nos pacientes HBeAg reagentes, a soroconversão para anti-HBe é um desfecho satisfatório, por estar associado a um melhor prognóstico. Nos pacientes HBeAg reagentes que não obtêm soroconversão e nos HBeAg não reagentes, a manutenção da supressão do HBV-DNA é o desejável. Nos pacientes cirróticos, a redução da carga viral e o desaparecimento do HBeAg, tanto induzido pelo

tratamento quanto espontaneamente, associam-se à diminuição no risco de descompensação e à melhora da sobrevida (MS 2010c).

As opções farmacológicas disponíveis para o tratamento da hepatite viral crônica B e as coinfeções deste com HDV, HIV e HCV são: interferon-alfa, lamivudina, peg-interferon-alfa 2a e 2b, adefovir, entecavir, telbivudina e tenofovir (MS 2010c).

1.7 Patologia e manifestações clínicas

Durante a infecção pelo HBV, a resposta imune do hospedeiro provoca tanto dano hepatocelular, quanto a eliminação viral. A hepatite B pode se apresentar nas formas aguda, crônica ou fulminante. O curso da hepatite B aguda é apresentado em quatro fases: período de incubação, prodrômica (pré-ictérica), doença clínica (ictérica) e de convalescência. No entanto, evidências recentes sugerem que as fases não são tão distintas como se acreditava anteriormente, o que desafia as diretrizes de tratamento (Focaccia 2013).

O período de incubação dura de 45-180 dias (média de 60-90 dias), dependendo de fatores como idade do paciente, modo de transmissão, porta de entrada e resposta imune do hospedeiro (Befeler & Di Bisceglie 2000; Juszczuk 2000; de Matos 2007). Logo após o período de incubação ocorre a fase pré-ictérica que é caracterizada por sinais e sintomas inespecíficos como febre, mal-estar, fadiga, mialgia, anorexia, náuseas, além de perda de peso e dor no quadrante superior esquerdo e hepatomegalia.

Pode ocorrer ainda a fase ictérica, que é resultado do aumento dos níveis de bilirrubina no sangue, ocasionando a presença de urina escura (colúria), fezes esbranquiçadas (acolia fecal) e pele, mucosa e esclerótica amarelados. Esta fase dura cerca de três a quatro semanas e nem sempre se faz presente. O período de convalescência é marcado pela eliminação viral e melhora do quadro clínico, com duração de 20 a 30 dias (Befeler & Di Bisceglie 2000; de Matos 2007).

Na maioria dos casos, a infecção pelo HBV pode passar despercebida uma vez que a doença clínica (icterícia) só ocorre em 10% dos casos em menores de cinco anos e de 30-50% em maiores de cinco anos. Além disso, naqueles em que há manifestação clínica, cerca de 30% são de quadros brandos ou transitórios. A infecção pelo HBV na fase adulta está usualmente associada com hepatite

sintomática e evolui para a cura em 90% a 95% dos casos, exceto em imunodeprimidos (Hoofnagle & Di Bisceglie 1991; Moyer & Mast 1994; Purcell & Gerin 1996; Ferreira 2000; Lok & McMahon 2001; MS 2002; de Matos 2007).

A taxa de evolução para doença crônica na hepatite B pode chegar a 90% em menores de cinco anos quando a transmissão ocorre durante a gestação, o parto ou a amamentação (MS 2002). Formas fulminantes podem estar relacionadas a uma resposta imune amplificada e ocorre em menos de 1% dos pacientes com infecção aguda pelo HBV (de Mendonça & Vigani 2006).

O curso da hepatite B crônica resulta em um estado de portador assintomático ou oligossintomático e, na maioria das vezes, não há quadros de icterícia em sua história pregressa. Também pode apresentar inflamação de intensidade variável, podendo desenvolver cirrose com alto risco de evolução para carcinoma e hepatocarcinoma (Sherlock *et al.* 1990; Moyer & Mast 1994; MS 2002; Liaw *et al.* 2004). Na maioria das vezes, o doente seguirá com doença compensada por anos, e a contínua inflamação e necrose dos hepatócitos usualmente progride para cirrose hepática e desenvolvimento de hipertensão portal, com edema, circulação colateral, ascite e encefalopatia. Falência hepática com hemorragia, coma e síndrome hepatorenal aparecem nos estágios finais da hepatite crônica (Focaccia 2013). O risco de progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular é proporcional aos títulos do DNA do HBV mantido persistentemente ao longo do tempo (Dienstag 2008). A persistência do marcador HBsAg é o principal risco para o desenvolvimento de doença hepática crônica e carcinoma hepatocelular mais tarde na vida (WHO 2013).

A hepatite B oculta, ou infecção “silenciosa” é definida pela presença do HBV DNA no soro e/ou no fígado, com ausência do marcador HBsAg (Hu 2002; Kao 2002; Chemin & Trepo 2005; Hou *et al.* 2005; Prati *et al.* 2006). Assim, o HBV DNA pode ser detectado em pacientes HBsAg negativos com anti-HBs detectável, naqueles que são anti-HBc positivos isolados, assim como na ausência de todos os marcadores sorológicos (Nalpas *et al.* 1985; Tanaka *et al.* 1990; Fukuda *et al.* 1999; Chemin *et al.* 2001; de Matos 2007).

1.7.1 Forma aguda

O curso clínico da infecção aguda (Figura 1.11) inicia-se com o aparecimento do HBsAg em torno da 4^a à 6^a semana, antes mesmo do aparecimento dos sintomas, permanecendo, em média, por 3 meses. Sua persistência, além de 6 meses (com ou sem a presença do HBeAg) no sangue, pode indicar evolução para a cronicidade (Ferreira 2000; WHO 2013).

Simultaneamente ou logo após o aparecimento do HBsAg, o HBeAg pode ser detectado e sua presença indica alta replicação viral e, com isso, alta infectividade. Com o desaparecimento do HBeAg, surge o anticorpo anti-HBe que caracteriza o fim da fase replicativa do vírus, estando associada com baixa infectividade de soro (CDC 2012).

Poucos dias após o surgimento do HBsAg, anticorpos dirigidos contra o HBcAg do tipo IgM (anti-HBc IgM) surgem. Indicam infecção recente pelo HBV (CDC 2012). Em seguida, há o surgimento dos anticorpos dirigidos contra o HBcAg do tipo IgG, que permanece detectável no soro em valores mais baixos, na maioria dos indivíduos, pelo resto da vida, mesmo após a cura, indicando infecção por HBV em um tempo indefinido no passado (Ferreira 2000; CDC 2012).

O fim da fase aguda ocorre quando o HBsAg desaparece e dá lugar ao surgimento do anticorpo anti-HBs, algumas semanas ou meses depois, indicando a convalescença com evolução para cura e imunidade contra reinfecção (Ferreira 2000; Park & Keefe 2005).

Além dos antígenos e anticorpos, o HBV DNA também é encontrado no soro dos indivíduos com infecção aguda, estando associado com replicação viral, e seu desaparecimento na fase aguda indica a resolução espontânea da infecção (De Franchis et al. 2003; Pawlotsky 2003).

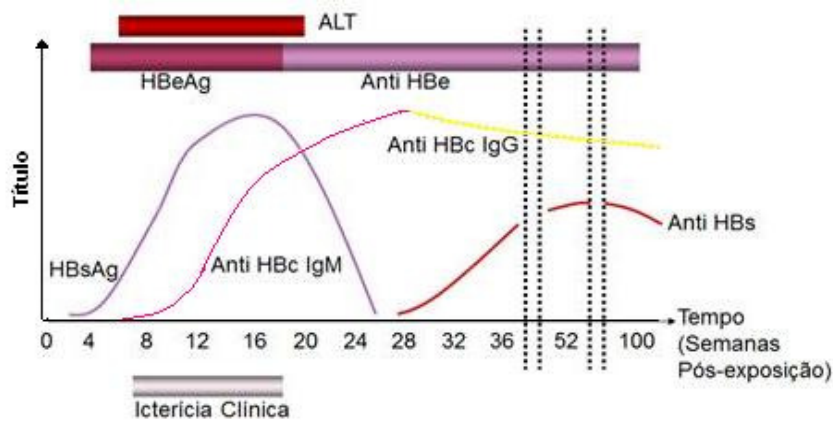


Figura 1.11 Curso clínico da hepatite B aguda.
(Fonte: Adaptado de Yoshida 2005)

1.7.2 Forma Crônica

O curso clínico da infecção crônica (Figura 1.12) é determinado pela persistência do HBsAg em níveis elevados no soro por mais de 6 meses, sem apresentar soroconversão para anti-HBs. Classicamente, vários fatores estão implicados no desenvolvimento e na evolução da infecção crônica pelo HBV, como época de aquisição da infecção e aspectos relativos a raça, sexo e genótipo do HBV (Focaccia 2013).

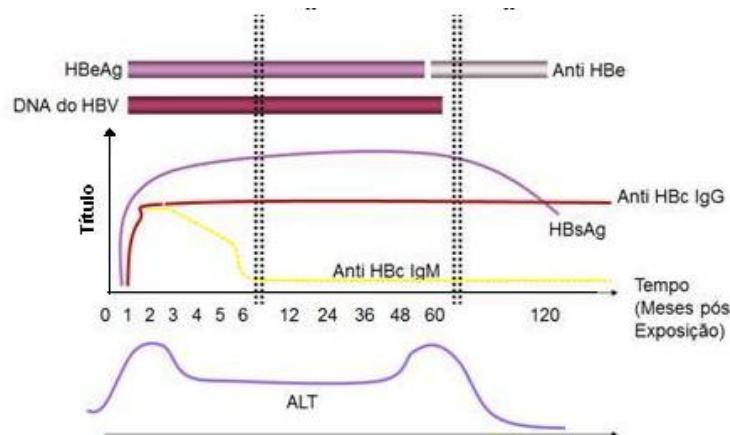


Figura 1.12: Curso clínico da hepatite B crônica.
(Fonte: Adaptado de Yoshida, 2005)

O paciente HBeAg positivo pode soroconverter para anti-HBe positivo indicando o fim da replicação viral, ou permanecer detectável no soro, significando um estado infeccioso contínuo, que pode persistir de anos a décadas. Os títulos de anticorpos anti-HBc IgM declinam e desaparecem, embora esteja presente também em alguns indivíduos nos períodos de reativação, e o anti-HBc IgG permanece com o HBsAg indicando uma exposição prévia ao vírus (Ferreira 2000; MS, 2008).

O HBV DNA também pode ser encontrado no soro de indivíduos com infecção crônica e os níveis de HBV DNA no soro estão relacionados à dinâmica de seu curso com as seguintes fases: imunotolerância (altos níveis de replicação viral), imunoliberação (baixos níveis de HBV DNA) e “latência clínica” (níveis muito baixos ou indetectáveis de DNA) (De Franchis et al. 2003; Pawlotsky 2003).

As hepatites crônicas podem ser classificadas em: hepatite crônica persistente (HCP), hepatite crônica ativa (HCA) e, mais recentemente, em hepatite crônica lobular. A HCP é considerada uma patologia benigna que se caracteriza por processo inflamatório confinado aos espaços porta. A HCA se caracteriza pela presença de necrose hepatocelular e fibrose hepática e a hepatite crônica lobular pode se apresentar histologicamente com alterações que lembram as hepatites virais agudas, porém com duração maior que três meses (Focaccia 2013).

Uma particularidade da infecção viral crônica é a possibilidade de evolução para câncer hepático, independentemente da ocorrência de cirrose, fato considerado pré-requisito nos casos de surgimento de carcinoma hepatocelular nas demais infecções virais crônicas (MS 2008).

1.8 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial é realizado por meio de testes bioquímicos que são empregados rotineiramente a fim de avaliar os níveis séricos das transaminases alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST respectivamente) e bilirrubinas, que indicam dano hepático. Testes sorológicos também são utilizados na detecção de antígenos e anticorpos, assim como testes moleculares para detecção do genoma viral (MS 2008).

O HBV apresenta diferentes marcadores sorológicos e a combinação destes será a responsável pela indicação do estado clínico do paciente. O significado de cada marcador e o perfil sorológico do indivíduo, de acordo com cada marcador presente/ausente, pode ser visto nos quadros 1.2 e 1.3.

Para que ocorra uma análise correta da amostra do paciente, quando as mesmas chegam ao laboratório para testagem, um fluxograma de testagem deve ser seguido. Este fluxograma inicia-se com a testagem dos marcadores HBsAg e Anti-HBc total (anti-HBc IgM + anti-HBc IgG) e dependendo de como os resultados aparecerem, outros testes deverão ser feitos em sequência. A sequência de testes pode ser melhor visualizada na figura 1.13.

Quadro 1.2: Significados dos marcadores sorológicos do vírus da hepatite B

(Fonte: adaptado de MS 2008).

Marcador	Significado
HBsAg	Primeiro marcador a aparecer no curso da infecção; Permanência por mais de 24 semanas após a infecção indica cronicidade.
Anti-HBc IgM	Marcador de infecção recente; Encontrado no soro até 32 semanas após a infecção.
Anti-HBc total (IgM + IgG)	Infecções agudas pela presença de IgM; Infecções crônicas pela presença de IgG; Representa contato prévio com o vírus.
HBeAg	Marcador de replicação viral; Positividade indica alta infecciosidade.
Anti-HBe	Surge após o desaparecimento do HBeAg; Sua presença sugere redução ou ausência de replicação viral, exceto nas cepas com mutação pré-core (não produtoras da proteína “e”).
Anti-HBs	Surge após desaparecimento do HBsAg; Indicador de cura e imunidade; Está presente isoladamente em pessoas vacinadas.

Quadro 1.3: Interpretação dos resultados no diagnóstico da hepatite B.

(Fonte: MS 2008)

	HBsAg	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc IgM	Anti-HBc Total	Anti-HBs
Suscetível	-	-	-	-	-	-
Incubação	+/-	+/-	-	-	-	-
Fase aguda	+	+	-	+	+	-
Fase crônica	+	+/-	+/-	-	+	-
Imunidade	-	-	+	-	+	+/-
Vacinação	-	-	-	-	-	+

Legenda: - ausência do marcador; + presença do marcador; +/- ausência ou presença do marcador.

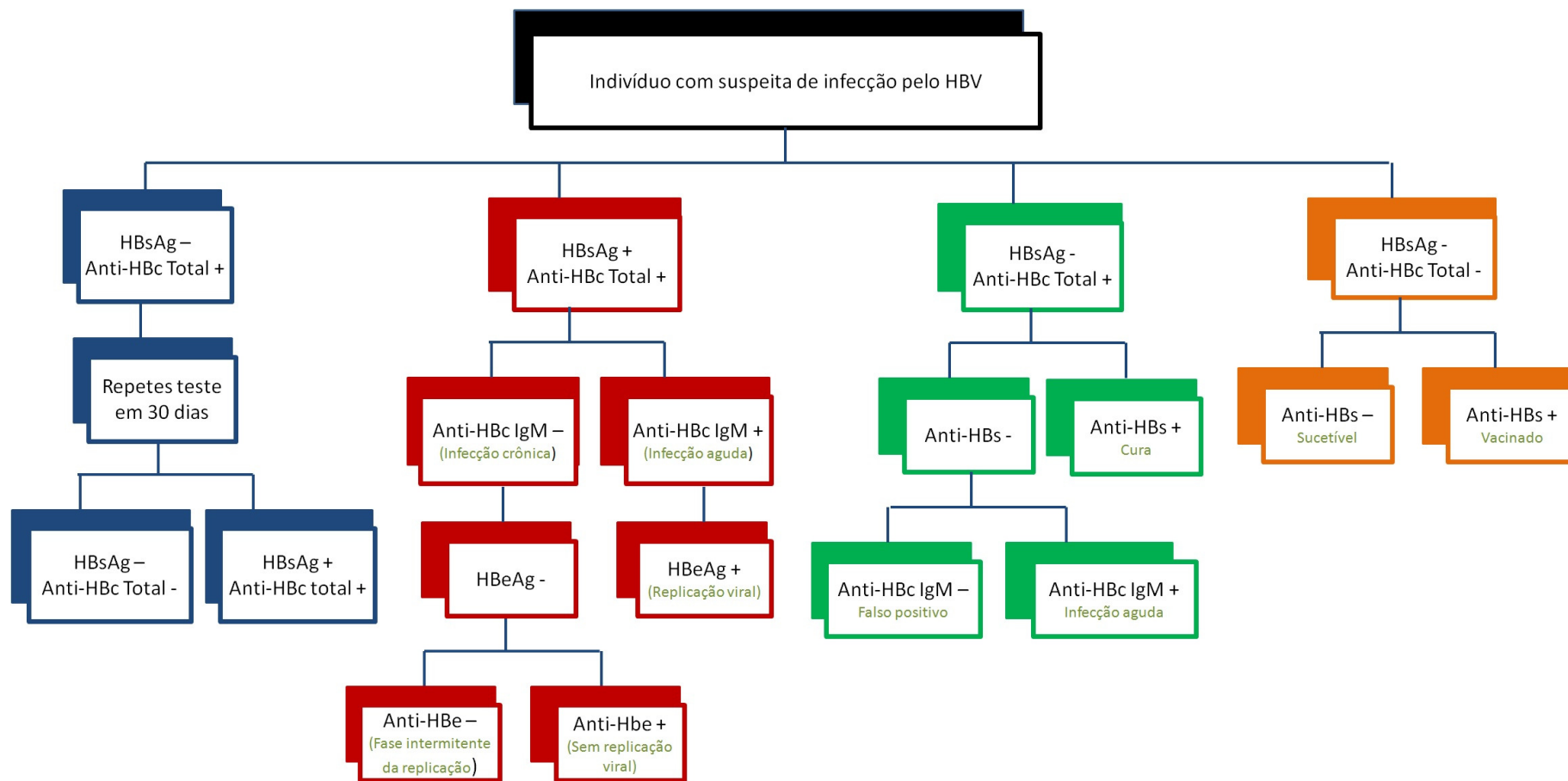


Figura 1.13: Fluxograma para testagem de amostras no diagnóstico do HBV
(Fonte: Adaptado de MS 2008).

O aumento três vezes acima do valor norma das transaminases séricas e de 25 vezes acima do valor normal das bilirribunas, indicam dano hepático.

Além dos testes bioquímicos, testes sorológicos são utilizados para detecção de antígenos (HBsAg e HBeAg) e anticorpos (anti-HBc total, anti-HBs e anti-HBe) do HBV por ensaios imunoenzimáticos (EIEs) e de eletroquimioluminescência (ECLIA).

EIE e ECLIA utilizados no diagnóstico laboratorial detectam antígenos e anticorpos, eles apresentam padrão de qualidade adequado e já padronizado, o que garante resultados confiáveis. Entretanto, algumas limitações prejudicam sua utilização em determinadas situações, como: tempo para a realização dos ensaios (cerca de quatro horas), necessidade de profissionais com grande especialização e de equipamentos e insumos não disponíveis em laboratórios de pequeno porte ou em áreas de difícil acesso. Além disso, os testes não são realizados individualmente, sendo geralmente realizados com um grande número de amostras e, com isso, laboratórios de menor porte optam por esperar receber mais amostras para a realização dos testes, o que aumenta o tempo para a liberação dos resultados.

Testes moleculares para detecção do genoma viral também são empregados e podem ser tanto quantitativos, auxiliando no prognóstico e monitoramento da terapia, quanto qualitativos auxiliando na determinação de infecção ativa pelo HBV, no diagnóstico precoce e na confirmação de resultados sorológicos duvidosos (MS 2002).

O primeiro método desenvolvido para detecção do DNA do HBV no soro foi a hibridização in situ, posteriormente novos métodos foram desenvolvidos, tais como: a técnica de DNA ramificado (bdDNA) e a reação em cadeia de polimerase (PCR) (DAI et al. 2006).

Na determinação dos genótipos do HBV, diferentes metodologias são utilizadas, tais como: o sequenciamento do genoma completo ou da região pre-S/S, PCR com *primers* genótipo-específicos, PCR com posterior análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), hibridização reversa dos produtos da PCR (LiPA-Line Probe Assay), PCR em tempo real (pela análise da curva de anelamento) (de Oliveira 2007).

1.8.1 Utilização de testes rápidos

Os testes rápidos se baseiam em diferentes princípios como aglutinação de partículas, imunocromatografia, imunodot e imunofiltração. O resultado é

produzido em, no máximo, 2 horas, podendo ser em até 10 minutos. Os testes podem ser realizados por profissionais com treinamento mínimo e pouca experiência, em locais com pouca infraestrutura e sem a necessidade de equipamentos caros ou complexos. Estes testes são simples de serem realizados, utilizando geralmente, antígenos virais fixados em um suporte sólido (membranas de celulose ou nylon, látex, micropartículas ou cartelas plásticas) e são acondicionados em embalagens individualizadas, permitindo a testagem individual das amostras (BVSMS 2013).

Atualmente, existem no mercado testes rápidos produzidos por diferentes fabricantes para detecção de patógenos distintos, tal como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o HCV. O Ministério da Saúde já estabeleceu portarias para uso dos testes rápidos para HIV e HCV (Ministério da saúde 2009 e 2013b), o que tem facilitado o acesso ao diagnóstico em diferentes áreas do Brasil.

Os princípios dos testes rápidos baseiam-se em ligações antígeno-anticorpo na área de aplicação de amostra e na zona “T” ou zona de teste. As amostras fluem pela placa teste por capilaridade e ainda apresentam uma zona “C” ou zona controle que apresenta reagentes para os anticorpos presentes no conjugado do teste para garantir o funcionamento do teste. A figura 1.14 mostra de forma geral o princípio do teste rápido para detecção de antígenos na amostra.

Ainda que a leitura dos resultados dos testes seja simples, algumas medidas e treinamentos devem ser realizados para que os resultados sejam confiáveis.

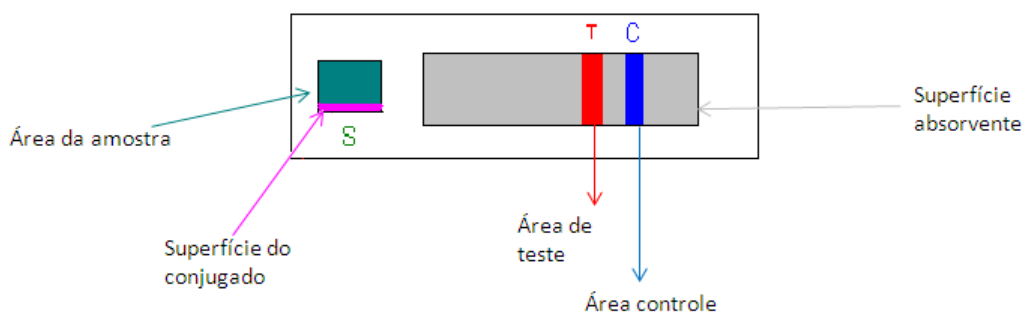


Figura 1.14 Representação esquemática do teste rápido.

Estudos em outros países e com diferentes testes rápidos demonstraram bons desempenhos (concordância acima de 90%) para detecção do marcador HBsAg (Davies e colaboradores 2010; Randrianirina e colaboradores, 2008; Bottero et al, 2013). Atualmente, diversos testes rápidos para detecção de marcadores da

infecção pelo HBV estão disponíveis em todo mundo e podem ser observados no quadro 1.4.

Quadro 1.4 Relação de testes rápidos para detecção dos marcadores do HBV disponíveis em diferentes regiões do mundo até abril de 2014.

Fabricante	País	Teste rápido	Marcador
Doles	Brasil	HBsAg teste rápido	HBsAg
Wama	Brasil	Imuno-Rápido HBsAg	HBsAg
Türklab Dispositivos Médicos	Turquia	INFO HBsAg®	HBsAg
Biomérieux	França	Vikia HBsAg®	HBsAg
Inverness Biomedical Innovations	Alemanha	Determine™ HBsAg	HBsAg
Lumiquick	USA	Quick Profile®	HBsAg anti-HBs
Abbott laboratorios	USA	Dainascreen HBsAg®	HBsAg
Fujirebio	Japão	Serodia® HBsAg	HBsAg
Dispositivos Médicos	Turquia	INFO HBsAg®	HBsAg
Orchid Biomedical Systems	Índia	Virucheck®	HBsAg
HBsAg dipstick®	Bélgica	Cypress Diagnostics	HBsAg
Fenox Medical Solutions,	República da Bielorrússia	Hexagon®	HBsAg
French Forest	Austrália	AMRAD ICT®	HBsAg
MP Biomedicals Asia Pacific Pte. Ltd.	República de Singapura	Assure HBsAg Rapid Test	HBsAg
Acon Laboratories, Inc.	USA	Acon HBsAg One Step Diagnostic Test Strip	HBsAg
Pacific Biotech Co., Ltd.	Tailândia	One Step Bioline Hepatitis B Surface Antigen Test Strip	HBsAg
MED Laboratories Co., Ltd.	Tailândia	LAB HBsAG Test	HBsAg
Newmarket Laboratories Ltd.	Inglaterra	One Step HBsAg Dipstick Test	HBsAg
J.Mitra & Co. Ltd.	Índia	Hepacard One Step Rapid Visual Test	HBsAg
Firmer Co. Ltd., manufactured by Guangzhuo Wondfo Biotech Co. Ltd.	Tailândia	Quick HBsAg Test	HBsAg
YD Diagnostics	Coréia do Sul	HepaScan HBsAg Cassette Type / HepaScan HBsAg Strip Type	HBsAg
World of Health Biotech Company	China	Diagnostic Test HBsAg Cassette Format	HBsAg
David & Tom Biotechnology Co., Ltd.	China	HBsAg (WB)	HBsAg
Veda Lab	França	HEP-CHECK-1 (Mini Clip HBsAg)	HBsAg
Veda Lab	França	HEP-CHECK-1-STRIP (HBsAg)	HBsAg
Equipar Diagnostici S.R.L.	Itália	Hepatitis B Antigen (HBsAg) Cassette	HBsAg
Acon Biotech Co., Ltd., China	China	HBsAg Line Test Device	HBsAg
Ranbaxy Laboratories Ltd.□	Índia	Hep-alert-B One step HBsAg Card Test	HBsAg
Mizuho Medy Co., Ltd.	Japão	Quick Chaser HBsAg	HBsAg
Intec Products	China	Advanced Quality™onestep Test	Anti-HBs Anti-HBe

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, um grande avanço tem ocorrido no desenvolvimento de testes rápidos para diagnóstico de doenças infecciosas, porém variações nas taxas de sensibilidade, especificidade e valores preditivos podem ainda ser observadas para diferentes infecções.

Os testes são de fácil execução e seus resultados são produzidos em, no máximo, 2 horas, podendo ser em até 10 minutos. O seu uso é importante, especialmente em áreas de difícil acesso, estudos de campo, laboratórios de pequeno porte, casos de exposição ocupacional de profissionais de saúde e em populações vulneráveis. Nesses locais e situações, um teste que libere resultados rápidos ou que necessitem de menos aparelhos caros para sua execução se faz extremamente necessário.

A utilização de testes rápidos na população geral como triagem de diagnóstico teria então grande importância no cenário atual, uma vez que, os testes seriam mais facilmente executados, custariam menos aos laboratórios para sua execução, pacientes descobririam mais cedo sua situação e poderiam partir para o tratamento, evitando complicações futuras, decorrentes do vírus, bem como o acompanhamento do tratamento seria mais rápido com a sua utilização.

Os testes rápidos são realizados, geralmente, em amostras de soro, ou sangue total. A coleta do soro é realizada por punção venosa, necessitando de uma infraestrutura mínima para coleta e processamento das amostras, o que é bastante difícil em áreas com recursos escassos. Por este motivo, a pesquisa da utilidade de espécimes clínicos alternativos, como saliva e sangue total pela coleta por punção digital, pode fornecer vantagens, pois são menos invasivas, dolorosas e onerosas quando comparadas à coleta de sangue por punção venosa.

A validação de testes rápidos de diagnóstico para a hepatite B, bem como a análise do seu desempenho para a detecção de diferentes marcadores do vírus pode ser uma excelente alternativa para triagem de indivíduos infectados e tem grande importância na liberação rápida de resultados. Mas, antes da implantação de testes rápidos para o seu diagnóstico, fatores como custo, disponibilidade, tempo de entrega e viabilidade devem ser considerados. Além disso, é necessário um estudo inicial para determinar os valores de acurácia dos testes, de acordo com o teste padrão, a fim de diminuir resultados falsos positivos ou negativos.

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar o desempenho de testes rápidos para fins de diagnóstico e estudos epidemiológicos da hepatite B em diferentes grupos populacionais no Brasil, a fim de facilitar o acesso ao diagnóstico em populações vulneráveis ou situadas em áreas de difícil acesso. Os resultados liberados rapidamente podem permitir a identificação de indivíduos suscetíveis e doentes, que deverão se encaminhando para a vacinação ou ao tratamento, diminuindo o risco de evolução para a cirrose ou câncer no fígado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de testes rápidos para detecção de marcadores do HBV para fins de diagnóstico e estudos epidemiológicos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a acurácia do teste rápido para detecção do marcador HBsAg em amostras de soro, em painel de amostras controles reagentes e não reagentes para o HBsAg;
- Avaliar a acurácia do teste para detecção do marcador HBsAg em amostras de soro, sangue total e saliva e dos marcadores anti-HBs e anti-HBe em amostra de soro de indivíduos de diferentes populações (centros de referências, baixa prevalência, e alta vulnerabilidade para HBV);
- Avaliar a reprodutibilidade e repetitividade dos testes rápidos para detecção do marcador HBsAg em amostras de soro HBsAg reagentes e não reagentes definidas por teste imunoenzimático; Avaliar o desempenho dos testes rápidos para detecção do marcador HBsAg em amostras de soro reagentes para outras infecções (HIV, HCV, Sífilis e Dengue).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) sob parecer número 498/08 para sua execução (Anexo A).

4.1. Amostra populacional estudada

Os indivíduos recrutados para participarem deste estudo foram previamente informados do estudo e tiveram suas dúvidas esclarecidas. Somente foram incluídos aqueles indivíduos que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO B), no caso de menores de idade, somente foram incluídos àqueles cujo termo de consentimento foi assinado pelo responsável legal. Todos os resultados foram repassados aos indivíduos e em caso de portadores, os mesmos foram encaminhados aos Serviços de Saúde para aconselhamento e tratamento necessários.

O estudo foi desenvolvido em duas etapas: 1) Estudo laboratorial, onde foi utilizada apenas amostras de soro para pesquisa do marcador HBsAg, e que foi composto conforme cálculo amostral para validação de testes de diagnóstico (Crowther 2001); e 2) Estudo de campo realizado em diferentes populações. Nesse estudo, foram utilizadas amostras de soro, sangue total e saliva para a pesquisa do marcador HBsAg e amostras de soro para a pesquisa dos marcadores anti-HBs e anti-HBe. O estudo foi composto tomando como base o número de indivíduos residentes em cada localidade de estudo segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), e a taxa de detecção de anti-HBc total por 100.000 indivíduos que foram notificados ao Sistema Nacional de Atendimento Médico (SINAN) por Unidade da Federação em 2009 (MS, 2012). Para o cálculo amostral foi utilizada a calculadora on line (Santos 2012), com erro amostral de $\pm 3\%$ e nível de confiança de 95%.

Não houve critério de exclusão de pacientes e/ou amostras.

4.1.1. Confeção de painel de controle

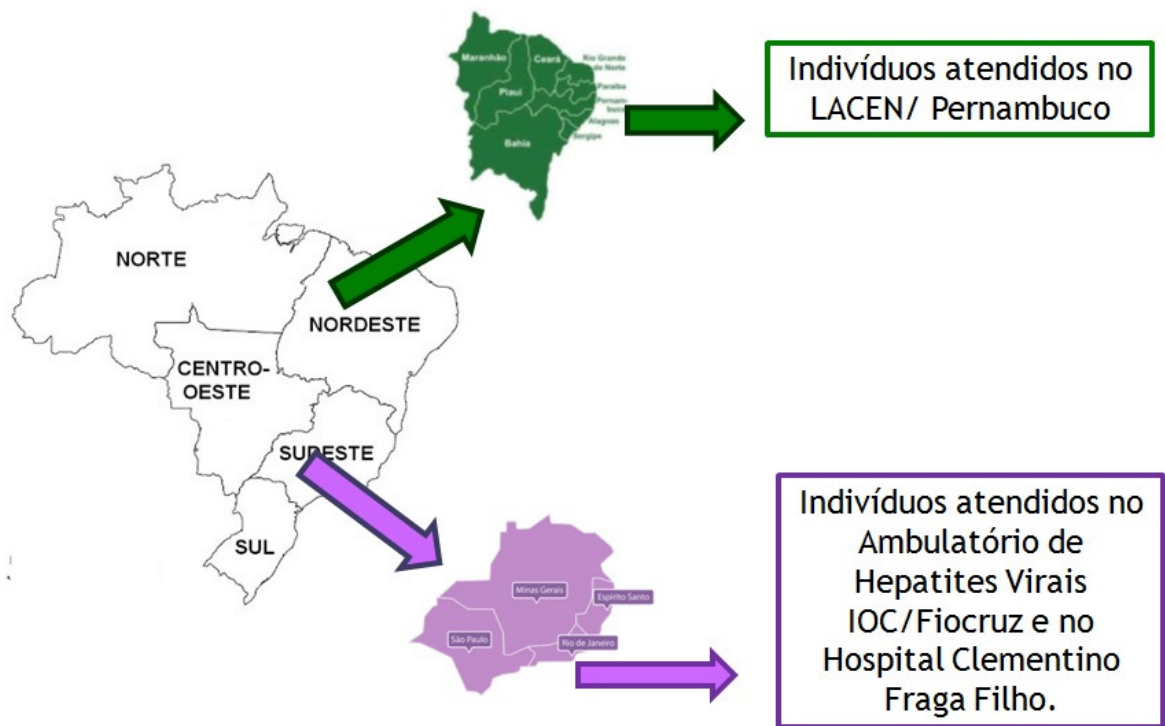
O estudo laboratorial foi composto por amostras de soro provenientes de pacientes e acompanhantes encaminhados ao Ambulatório de Hepatites Virais (AHV) do Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais (LRNHV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), RJ. Os indivíduos foram recrutados no período de 2010 a 2012. Foi determinado um recrutamento mínimo de 100 indivíduos, sendo, reagentes para HBsAg (n= 50) e não reagentes para o HBsAg (n= 50). Ao final do estudo foi obtido um recrutamento total de 393 indivíduos para essa análise.

4.1.2. Estudo de Campo

Neste estudo foram utilizados três grupos de populações:

a) Grupo 1: composto por indivíduos provenientes de áreas de alta prevalência (Figura 4.1), neste caso, pacientes atendidos em Centros de Referência para Hepatites Virais [Ambulatório de Hepatites Virais do IOC, Hospital Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, (UFRJ), e Laboratório Central de Saúde Pública Pernambuco (LACEN/PE)] com recrutamento mínimo de 50 indivíduos consecutivamente por localidade de acordo com a demanda de atendimento. Os indivíduos foram recrutados no período de 2009 a 2013. Ao final, foram obtidas para essa análise amostras de 371 indivíduos para o marcador HBsAg, 423 para o marcador anti-HBs e 166 para o marcador anti-HBe.

A população obtida de Centros de Referência foi composta por indivíduos com suspeita de infecção pelos vírus das hepatites. Os Centros de Referência do Rio de Janeiro recebe indivíduos residentes em comunidades situadas na área de Manguinhos, Vila do João, Favela da Maré, entre outras comunidades carentes de assistência médica, situadas próximas a estas localidades. O Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco recebe casos suspeitos de hepatite provenientes do Estado de Pernambuco para esclarecimento de diagnóstico de hepatites virais.



Legenda: A) Ambulatório de Hepatites Virais do IOC, FIOCRUZ (Fonte: www.ioc.fiocruz.br); B) Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ (Fonte: nicepinheiro.blogspot.com); C) LACEN Pernambuco (Fonte: <http://www.destakjornal.com.br/noticias/recife/ministerio-da-saude-repassa-r-6-milhoes-para-o-lacen-pe-173416/>).

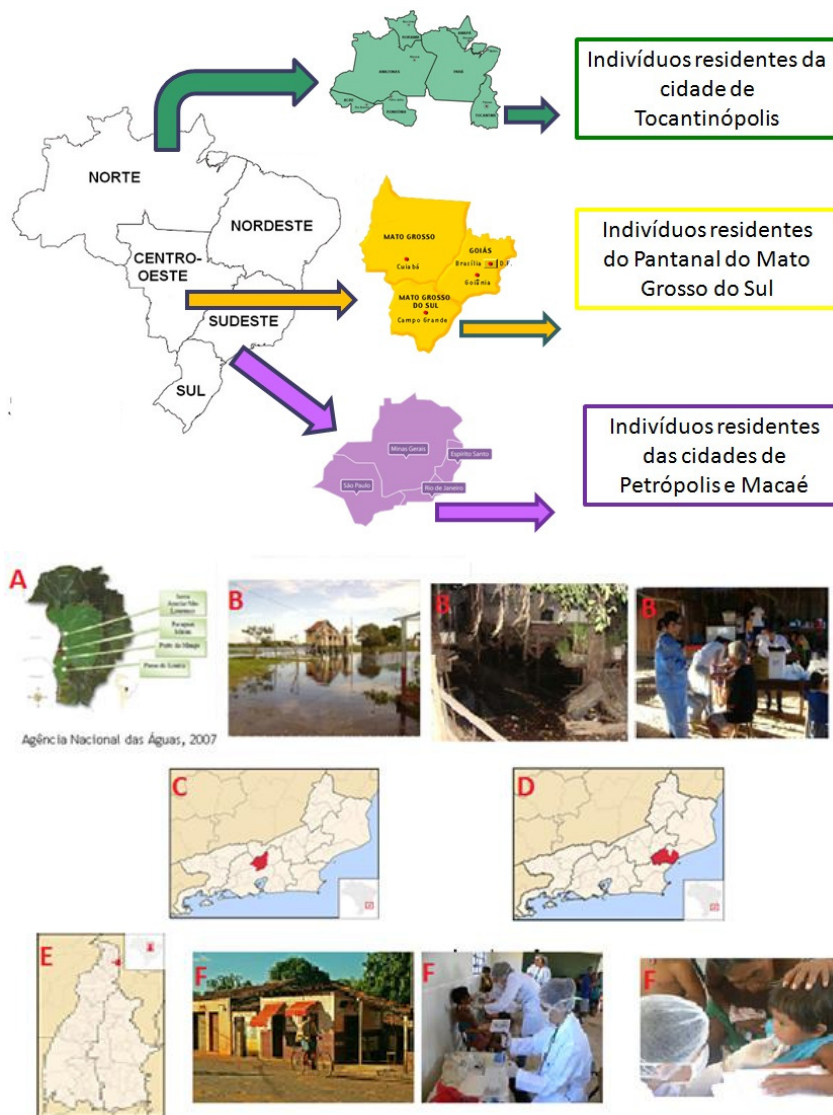
Figura 4.1: Regiões e locais de onde foram obtidas as população dos centros de referências

b) Grupo 2: composto por indivíduos provenientes de áreas de Baixa prevalência (Figura 4.2) para HBV. De acordo com o cálculo amostral realizado, com recrutamento mínimo de 239 indivíduos residentes no Estado do Rio de Janeiro (nas cidades de Petrópolis e Macaé), 124 indivíduos residentes no Pantanal do Mato Grosso do Sul e 532 indivíduos residentes da cidade de Tocantinópolis (Tocantins), perfazendo um total de, no mínimo, 895 indivíduos nesse grupo. Ao final foram obtidas amostras de 881 indivíduos para o marcador HBsAg, 1526 para o marcador anti-HBs e 788 para o marcador anti-HBe.

Os indivíduos residentes na cidade de Petrópolis foram recrutados durante um evento, em 2009, para diagnóstico das hepatites virais em funcionários de um hospital privado da cidade, e outro evento semelhante em 2013, enquanto os indivíduos da cidade de Macaé foram recrutados durante uma campanha, em 2010, de acesso a informações básicas de saúde em uma comunidade carente daquela cidade.

Os indivíduos residentes na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul viviam em construções bem características, as casas de pau-a-pique e as palafitas, com arquitetura delineada para períodos de inundações. Sua população era constituída principalmente por pescadores que utilizam o rio como fonte de subsistência. As comunidades avaliadas se encontram distantes da capital Campo Grande (300 a 385 km) e algumas se encontram a quilômetros (170 a 217 km) por via fluvial da cidade de Corumbá. A coleta foi realizada de todos os habitantes disponíveis nas comunidades, no ano de 2010, após assinatura de termo de consentimento (Tourinho, 2011).

A população de Tocantinópolis foi obtida a partir de um estudo para avaliação da doença de Chagas, realizado pelo Ministério da Saúde, em indivíduos residentes de área rural e urbana, no ano de 2011. Algumas comunidades rurais se situavam a cerca de 30 km de distância da área urbana da cidade.



Legenda: A) Mapa das coletas realizadas no Pantanal do Mato Grosso do Sul (Fonte: Agência Nacional das Águas, 2007); B) Região e coleta no Pantanal do Mato Grosso do Sul; C) Mapa da localização do município de Petrópolis (Fonte: pt.wikipedia.org); D) Mapa da localização do município de Macaé (Fonte: pt.wikipedia.org); E) Mapa da localização do município de Tocantinópolis (Fonte: pt.wikipedia.org); F) Localização e coletas em Tocantinópolis (fonte: www.achetudoeregiao.com.br).

Figura 4.2: Regiões e locais das amostras obtidas de populações de Baixa prevalência.

c) Grupo 3: composto por indivíduos que apresentavam alta vulnerabilidade para aquisição do HBV (Figura 4.3), tais como: profissionais de beleza (manicures, pedicuras e depiladores, por exemplo) e usuários de drogas não injetáveis (crack) residentes do estado do Rio de Janeiro. Esses grupos foram escolhidos conforme o parecer técnico de atualização da vacina da hepatite B nos serviços de saúde do

SUS, que inclui dentre outros, esses dois grupos, como sendo de alta vulnerabilidade para aquisição do HBV (MS 2010 d).

Uma vez que há poucos estudos de prevalência de hepatites nestes grupos, foi considerado o mesmo número de indivíduos recrutados para áreas de Baixa prevalência no Rio de Janeiro, ou seja, um recrutamento mínimo de 239 indivíduos para este grupo. Ao final foram obtidas amostras de 251 indivíduos para o marcador HBsAg, 381 para o marcador anti-HBs e 241 para o marcador anti-HBe.

Os profissionais de beleza foram recrutados em uma feira de negócios para profissionais da área realizada na cidade de Niterói/RJ, no ano de 2010. Esse evento contou com os mais variados profissionais da área (manicures, pedicuras, cabelereiros, entre outros) que participavam na exposição ou na compra de produtos. Os usuários de crack foram recrutados, nos anos de 2011 e 2012 em centros de tratamento ou em áreas de consumo da droga, nas cidades de Macaé e Rio de Janeiro, onde somente foram incluídos aqueles indivíduos que tivessem utilizado crack nos últimos 12 meses e não estivessem sobre o efeito da droga no momento da coleta de informações e amostras biológicas.



Legenda: A) Usuários de crack (Fontes: www.sempretops.com e blogmundopossivel.com.br); B) Profissionais de beleza (Fonte: mluisafp.sp.blogspot.com)

Figura 4.3: Região das amostras obtidas e comportamento das populações de alta vulnerabilidade.

4.2. Obtenção das amostras

Após a assinatura do TCLE, amostras de soro, sangue total e saliva foram coletadas dos indivíduos.

- Amostras de soro e sangue total

As amostras de sangue total foram coletadas por punção venosa (Figura 4.4) em tubos BD SST II *Advance*® com 8,5 mL de capacidade, sem anticoagulante e tubos BD *Vacutainer*® com anticoagulante (EDTA) e capacidade de 4 ml.

As amostras foram encaminhadas ao LRNHV onde os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 3000 g (Centrífuga Centurion Vector Invertes System, Laborline, Brasil) à temperatura de 25°C durante 5 minutos para obtenção do sobrenadante (soro), que foi acondicionado em microtubos de poliestireno previamente identificados com o número de registro e armazenados à temperatura de -20°C até a realização das análises.

As amostras obtidas no tubo com anticoagulante foram utilizadas nos testes rápidos e, após, acondicionadas em microtubos de poliestireno previamente identificado com o número de registro e armazenado à temperatura de -70°C para análises.



Figura 4.4: Procedimento para a coleta de sangue

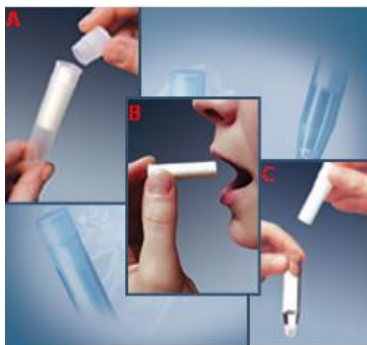
(Fonte: <http://enfermagemcomentada.blogspot.com.br/2007/08/coleta-de-sangue.html>)

- Amostras de saliva

A coleta de saliva foi realizada utilizando o coletor *Salivette*® (Sarstedt, Alemanha) (Figura 4.5) que é composto por um tubo contendo um algodão coletor. O algodão é depositado entre os dentes e a gengiva do indivíduo por cerca de 2 minutos e, em seguida é recolocado no tubo.

Após esse procedimento, 1 ml do tampão (“phosphate buffered saline/ Bovine Serum Albumin” - PBS/BSA 0,5%) foi adicionado ao algodão. O coletor contendo o algodão foi centrifugado à 3000 g à temperatura de 25°C por 10 minutos, conforme preconizado anteriormente por Cruz *et al* (2011). O fluido oral obtido foi armazenado em microtubos de poliestireno previamente identificados com número de registro e armazenado à temperatura de -20°C até as análises.

Não houve critérios para a aceitação das amostras, tais como: volume mínimo de amostra, presença de sangue na amostra, ingestão prévia de alimentos ou líquidos. Assim, todas as amostras foram aceitas para os testes.



Legenda: A) Retirar o algodão do coletor; B) depositar o coletor entre a gengiva e a bochecha do paciente por aproximadamente 2 minutos; C) Recolocar o algodão no tubo coletor.

Figura 4.5: Etapas para a coleta com o coletor Salivette®

(Fonte: <http://www.scimart.com/product/detail/salivette-cotton-swab-wo-prep-100pack>).

4.3. Caracterização do material

4.3.3. Painel de referência

As amostras de soro foram submetidas à detecção de HBsAg, utilizando-se dois ensaios comerciais para diagnóstico (ETI-MAK-4®, Diasorin, Itália e HBsAg One®, Radim, Itália). Adicionalmente, foram realizados testes para detecção dos marcadores anti-HBc (ETI-AB-COREK-PLUS®, Diasorin, Itália) e anti-HBs (ETI-AB-AUK-3®, Diasorin, Itália), utilizando ensaio imunoenzimático comercial para determinar o perfil sorológico da infecção. Todas as amostras inicialmente reativas foram retestadas em duplicata para os dois ensaios comerciais (FDA, 1987). Amostras consideradas HBsAg reagente após retestagem nos EIEs foram submetidas à detecção do HBV DNA pelo método comercial (Cobas Taqman HBV®, Roche, França) quando havia volume de amostra disponível. Apenas amostras

concordantes em ambos os ensaios comerciais para detecção do HBsAg foram incluídas nessa análise.

4.3.4. Estudo de campo

As amostras de soro foram submetidas à detecção do marcador HBsAg utilizando-se testes imunoenzimáticos comerciais (ETI-MAK-4[®], Diasorin, Itália ou HBsAg One[®], Radim, Itália). A detecção do marcador anti-HBs foi feita utilizando o EIE comercial (ETI-AB-AUK-3[®], Diasorin, Itália) e a detecção de anti-HBe foi feita utilizando a técnica de eletroquimioluminescência (ECLIA) (Elecsys anti-HBe[®], Roche, França). Adicionalmente, foram realizados testes para detecção os marcadores anti-HBc (ETI-AB-COREK-PLUS[®], Diasorin, Itália) e HBeAg (Elecsys HBeAg[®], Roche, França) utilizando ensaios comerciais para determinar o perfil sorológico da infecção.

Todas as amostras inicialmente reativas foram retestadas em duplicata (FDA, 1987). Amostras consideradas HBsAg reagente após retestagem nos EIEs foram submetidas à detecção do HBV DNA pelo método comercial (Cobas Taqman HBV[®], Roche, França) quando havia volume de amostra disponível. O padrão ouro para amostras de saliva e sangue total foi o resultado obtido pelo EIE comercial realizado nas amostras de seus soros correspondentes.

4.3.5. Testes imunoenzimáticos

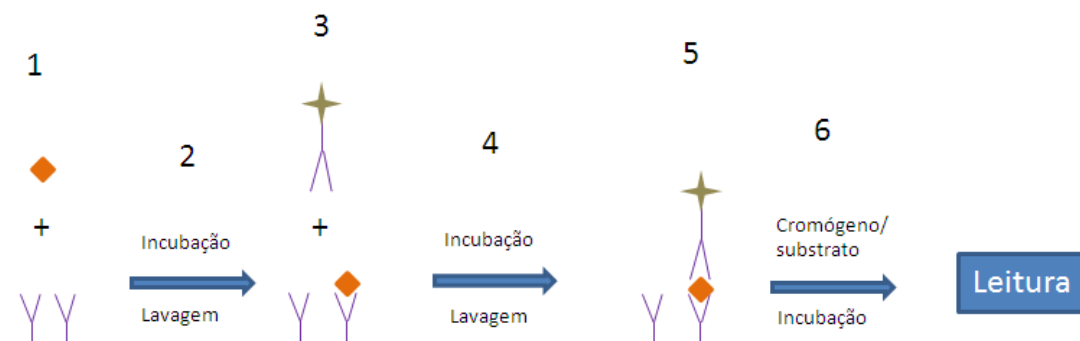
4.3.5.1. Detecção do marcador HBsAg utilizando o EIE ETI-MAK-4[®] (Diasorin, Itália)

O teste é um método imunoenzimático direto do tipo sanduíche para a determinação qualitativa do HBsAg, baseado na técnica de EIE (Figura 4.6). É composto por uma placa que apresenta 96 poços revestidos com anticorpos anti-HBs (monoclonais) tampão de lavagem composto por PBS, Tween[®] 20 e conservantes; conjugado que é um anticorpo anti-HBs (carneiro) conjugado com peroxidase de rábano (“horseradish peroxidase” - HRP); cromógeno/ substrato (peróxido de hidrogênio em solução cromógena de tetrametilbenzidina) e ácido sulfúrico.

Para execução do ensaio, 100 µl da amostra e dos respectivos controles negativo e positivo foram adicionados nos seus respectivos poços e incubados por 1 hora ± 5 minutos à 37º C. Neste momento, ocorre a ligação do HBsAg presente na amostra ao anticorpo anti-HBs adsorvido na fase sólida. Após incubação, realizou-se ciclo de cinco lavagens, com tampão de lavagem, para remoção dos resíduos e 100 µl do conjugado enzimático foram adicionados em todos os poços exceto no branco. A reação foi incubada por 1 hora ± 5 minutos à 37º C onde o conjugado enzimático pode se ligar à fase sólida.

Após a incubação com o conjugado, foi realizado novo ciclo de cinco lavagens com tampão de lavagem. Em seguida, 100 µl do cromógeno/substrato foram adicionados em todos os poços e a placa foi então incubada ao abrigo da luz por 30 minutos à temperatura ambiente. A ação da enzima no cromógeno/substrato produz uma coloração azulada. Ao final deste tempo, foram adicionados 100 µl de ácido sulfúrico em todos os poços e a coloração azulada mudou para amarelada. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro em filtro de 450 nm com filtro de referência de 630nm.

O valor de ponto de corte foi determinado pela adição de 0,030 à absorbância média do controle negativo. A presença ou a ausência de HBsAg foi determinada pela comparação dos valores de absorbância das amostras com o valor de ponto de corte. As amostras com valores de absorbância acima da zona duvidosa (±10% do valor de ponto de corte) foram consideradas reativas para HBsAg e aquelas com valores abaixo dessa zona foram consideradas não reativas. As amostras com valores dentro da faixa duvidosa foram retestadas em duplicata.



Legenda: 1) anticorpo anti-HBs fixado na placa + antígeno HBsAg do paciente. 2) Incubação 37°C por 1h seguida de ciclo de 5 lavagens com tampão apropriado. 3) adição do conjugado enzimático (anticorpo anti-HBs (carneiro) conjugado com peroxidase de rábano ("horseradish peroxidase" – HRP). 4) Incubação 37°C por 1h seguida de ciclo de 5 lavagens com tampão apropriado. 5) Complexo antígeno-anticorpo ligado. 6) Adição de cromógeno/substrato e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente.

Figura 4.6 Princípio do EIE para detecção do marcador HBsAg utilizando o fabricante Diasorin.

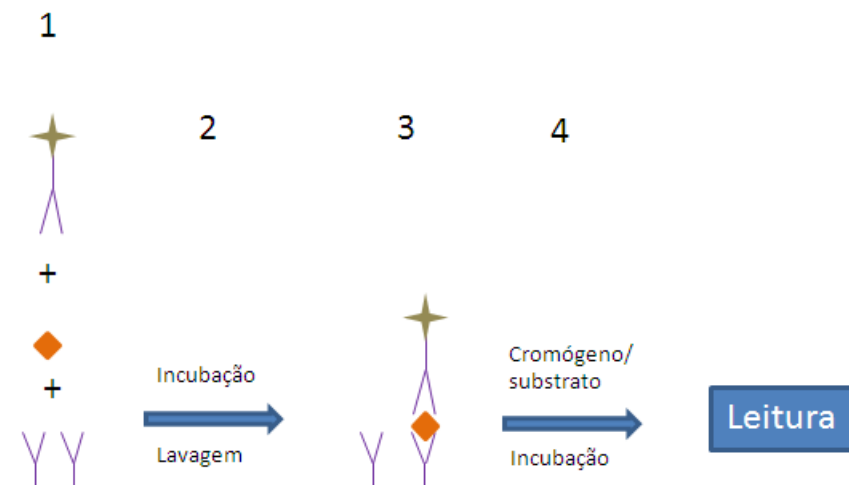
4.3.5.2. Detecção do marcador HBsAg utilizando o EIE HBsAg One® (Radim, Itália)

O teste é um método imunoenzimático direto do tipo sanduíche para a determinação qualitativa do HBsAg, baseado na técnica EIE (Figura 4.7). É composto por placa que apresenta 96 poços revestidos com anticorpos anti-HBs (monoclonais), tampão de lavagem que é uma mistura de tampão fosfato, Tween® 20 e Kathon GC, conjugado (anticorpos monoclonais anti-HBs ligados ao peróxido de hidrogênio); cromógeno/substrato (peróxido de hidrogênio em solução cromógena de tetrametilbenzidina) e ácido sulfúrico.

Na realização deste ensaio uma pré-lavagem foi inicialmente realizada. Em seguida 150 µl de amostra, calibradores e controles positivos e negativos foram adicionados aos seus respectivos poços. 100 µl do conjugado enzimático foram adicionados em todos os poços, exceto no branco e foi realizada a incubação da placa por 2 horas \pm 10 minutos à 37° C, para que o HBsAg pudesse se ligar ao anticorpo HBs adsorvido na placa e, para que o conjugado enzimático pudesse se ligar ao antígeno HBs presente na amostra.

Novo ciclo de lavagem foi realizado, para remoção dos resíduos e 100 µl do cromógeno/substrato foi adicionado em todos os poços. A placa foi novamente incubada, mas agora ao abrigo da luz por 30 minutos à temperatura ambiente. Neste momento, a ação da enzima no cromógeno/substrato produziu uma coloração azulada. Após a incubação com o substrato, adicionou-se 100 µl de ácido sulfúrico em todos os poços e a coloração azulada mudou para amarelada. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro utilizando filtro de 450 nm e filtro de referência de 630nm.

O valor de ponto de corte foi determinado pela adição de 0,050 à absorbância média do controle negativo. A presença ou a ausência de HBsAg foi determinada pela comparação dos valores de absorbância das amostras com o valor de ponto de corte. As amostras com valores de absorbância acima da zona duvidosa (\pm 10% do valor de ponto de corte) foram consideradas reativas para HBsAg e aquelas com valores de abaixo desta zona foram consideradas não reativas. As amostras com valores dentro da faixa duvidosa foram retestadas em duplicata.



Legenda: 1) anticorpo anti-HBs fixado na placa + antígeno HBsAg do paciente + conjugado enzimático (anticorpos monoclonais anti-HBs ligados ao peróxido de hidrogênio). 2) Incubação à 37°C por 2 hs seguida de ciclo de 5 lavagens. 3) Complexo antígeno-anticorpo ligado 4) Adição de cromógeno/substrato e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente.

Figura 4.7 Princípio do EIE para detecção do marcador HBsAg utilizando o fabricante Radim

4.3.5.3. *Detecção do marcador Anti-HBs utilizando o EIE ETI-AB-AUK-3[®] (Diasorin, Itália)*

O teste é um método imunoenzimático direto do tipo sanduíche para a determinação qualitativa/quantitativa do anti-HBs, baseado na técnica EIE. É composto por placa que apresenta 96 poços revestidos com HBsAg humano, tampão de incubação, tampão de lavagem que é uma mistura de PBS, Tween[®] 20 e conservantes; conjugado que é HBsAg humano conjugado com peroxidase de rábano (HRP); cromógeno/ substrato (peróxido de hidrogênio em solução cromógena de tetrametilbenzidina) e ácido sulfúrico.

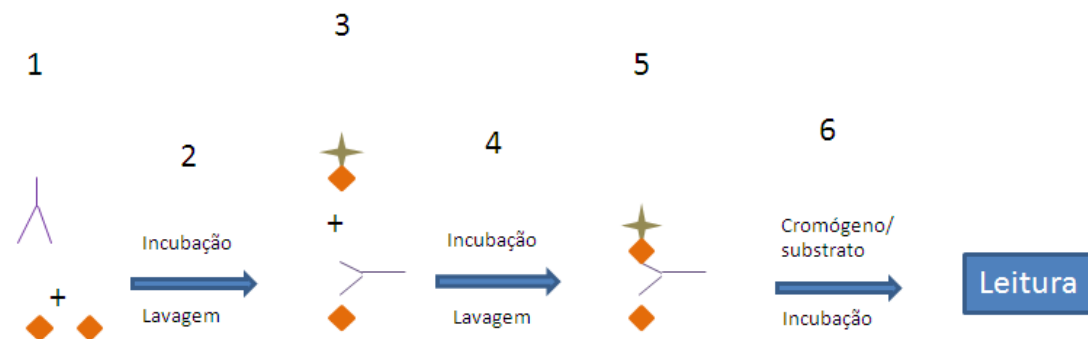
Nesse teste primeiro foram adicionados 100 µl do tampão de incubação em todos os poços exceto no branco, logo em seguida foram adicionados 100 µl da amostra, controle e calibradores nos seus respectivos poços. A placa foi então, incubada por 2 h ± 10 minutos à 37°C para que os anticorpos que estivessem presentes nas amostras pudessem se ligar ao antígeno fixado na placa. Após a incubação foi realizado ciclo de cinco lavagens com tampão de lavagem para remoção dos resíduos. O conjugado enzimático foi então, adicionado na placa (100 µl), em todos os poços, exceto no branco e a reação foi incubada por mais 1 hora ±

5 minutos à 37°C. Neste momento caso a amostra contivesse anticorpos HBs, estes estariam ligados ao HBsAg fixado na placa e o conjugado se ligaria a este complexo.

Após adição do conjugado, foi realizado novo ciclo de cinco lavagens com tampão de lavagem para remoção dos resíduos e 100µl do cromógeno/substrato foi adicionado em todos os poços. A reação foi, por fim, incubada ao abrigo da luz por 30 minutos à temperatura ambiente e a ação da enzima no cromógeno/substrato produziu coloração azulada. Em seguida, adicionou-se 100 µl de ácido sulfúrico em todos os poços para interromper a reação e a coloração azulada passou para amarelada. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro com filtro de 450 nm e filtro de referência de 630nm.

A presença ou a ausência de anticorpos anti-HBs foi determinada pela comparação das absorbâncias das amostras com a absorbância média do calibrador 1 (valor de ponto de corte).

As amostras com valores de absorbância acima da zona duvidosa ($\pm 10\%$ do valor de ponto de corte) foram consideradas reativas para anti-HBs e aquelas com valores de abaixo desta zona foram consideradas não reativas. As amostras com valores dentro da faixa duvidosa foram retestadas em duplicata. O esquema da reação está representado na figura 4.8.



Legenda: 1) antígeno HBsAg fixado na placa + anticorpo anti-HBs do soro paciente. 2) Incubação à 37°C por 2 hs seguida de ciclo de 5 lavagens. 3) adição do conjugado enzimático (HBsAg humano conjugado com peroxidase de rábano- HRP). 4) Incubação à 37°C por 1h seguido de ciclo de 5 lavagens. 5) Complexo antígeno-anticorpo ligado. 6) Adição de cromógeno/substrato e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente.

Figura 4.8 Princípio do EIE para detecção do marcador anti-HBs utilizando o fabricante Diasorin.

4.3.5.4. *Detecção do marcador anti-HBe por eletroquimioluminescência (Elecsys anti-HBe, Roche, França)*

O ensaio Elecsys anti-HBe é baseado na técnica de ECLIA que utiliza antígenos HBeAg recombinantes e anticorpos anti-HBe monoclonais. O princípio do teste é de competição e tem duração total de 18 minutos.

Para a realização do teste são necessários 3 conjuntos de reagentes: um recipiente denominado “rack M” composto por micropartículas revestidas de estreptavidina e conservantes, um recipiente denominado “rack R1” composto por HBeAg, tampão HEPES e conservantes, e um terceiro recipiente denominado “rack R2” composto por anticorpo anti-HBe monoclonal biotilado, anticorpo anti-HBe monoclonal marcado com complexo de rutênio, tampão HEPES e conservantes, Para realização do ensaio também é necessário um tampão do sistema (Procell) composto por: tampão de fosfato, tripropilamina, detergente e conservante, e uma solução de limpeza para célula de leitura (Cleancell) composta por hidróxido de potássio e detergente.

O teste ainda apresenta dois calibradores: o calibrador 1 que é o calibrador negativo e contém soro humano e conservantes, e o calibrador 2 que é o calibrador positivo contendo anti-HBe humano em soro humano e conservantes.

Para a realização do ensaio, o conjunto de reagentes foi utilizado nos calibradores a fim de verificar se os insumos estavam adequados. Este primeiro ensaio serve como um controle interno da reação. Em seguida, adicionou-se 150 µl da amostra em cubeta própria para o teste (o equipamento utiliza cerca de 35 µl desta amostra para realização do ensaio).

Na primeira incubação o anticorpo anti-HBe da amostra se liga ao HBeAg presente na rack R1 do teste. Na segunda incubação há a adição de anticorpos biotilados e de anticorpos marcados com complexo de rutênio específicos contra o HBeAg presentes na rack R2, juntamente com micropartículas revestidas de estreptavidina presentes na rack M os locais de ligação ainda livres nos antígenos do HBeAg são ocupados. O complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.

A mistura de reação foi aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados foram então removidos com uso do tampão do sistema (Procell). A

aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induziu uma emissão quimioluminescente que foi medida por um fotomultiplicador.

Os resultados são determinados automaticamente pelo programa dos analisadores Elecsys e cobas comparando o sinal de ECLIA obtido do produto de reação da amostra com o sinal do valor do ponto de corte anteriormente obtido pela calibração do anti-HBe.

4.3.6. Testes rápidos

O presente estudo foi desenvolvido para avaliar o desempenho de testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HBV, onde somente testes com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foram incluídos. Desta forma, foram empregados três distintos testes rápidos para detecção do marcador HBsAg de três testes distintos: Vikia HBsAg[®] (Biomérieux, França), HBsAg teste rápido (Doles, Brasil) e Imuno-Rápido HBsAg (Wama, Brasil) e para detecção dos marcadores anti-HBs e anti-HBe foram empregados testes rápidos do fabricante Wama, Brasil (Imuno-Rápido anti-HBsAg e Imuno-Rápido anti-HBeAg, respectivamente). Todos os procedimentos para a realização dos testes foram realizados conforme as recomendações do fabricante, exceto para as amostras de saliva onde foi utilizado o dobro do volume de amostra recomendado pelo fabricante, conforme padronizado anteriormente.

Para a avaliação dos testes rápidos para detecção de anti-HBs e anti-HBe somente amostras de soro foram empregadas, conforme preconizado pelo fabricante. Para a avaliação dos testes rápidos para detecção do HBsAg, amostras de soro, conforme recomendado pelo fabricante e, saliva, a fim de avaliar o seu possível uso, ainda que não recomendado pelos fabricantes foram empregadas em todos os testes rápidos avaliados e amostras de sangue total foram avaliadas apenas no teste Vikia HBsAg[®], uma vez que era o único teste que permitia o uso desse tipo de amostra.

4.3.6.1. Teste imunocromatográfico Vikia HBsAg[®] (Biomérieux, França)

O Vikia HBsAg[®] (Biomérieux, França) é um teste qualitativo rápido baseado na técnica de imunocromatografia lateral pela associação de anticorpos monoclonais

e policlonais específicos para o HBsAg. O método permite a detecção dos principais subtipos *ad* e *ay* no soro, no plasma e sangue total.

O teste consiste em um suporte impregnado com conjugado constituído por mistura de anticorpos monoclonais anti-HBs ligados à microesferas de poliestireno de cor vermelha e complexo BSA-biotinilado ligado às microesferas de cor azul

Para execução do ensaio, 75 µl de soro ou sangue total foram adicionados ao dispositivo na região determinada, migrando por capilaridade ao longo da membrana. No caso das amostras de saliva testadas nesse dispositivo, o dobro de amostra foi adicionado ao teste (150 µL de amostra).

Se o antígeno HBs estivesse presente na amostra, formaria um complexo antígeno-anticorpo com os anticorpos específicos deste vírus, presentes nas microesferas de poliestireno de cor vermelha.

Os complexos antígeno-anticorpos migraram ao longo da membrana e fixaram-se aos anticorpos anti-HBs formando complexos visíveis numa linha vermelha na zona de teste “T” da membrana.

Ao mesmo tempo, o complexo BSA-biotinilado ligado à microsferas de poliestireno de cor azul migrou ao longo da membrana e fixou-se ao anticorpo anti-biotina que forma um complexo visível numa linha azul na zona de controle C. A ausência desta linha invalida o teste.

A leitura do teste, independente do tipo de amostra, foi realizada entre 15 e 30 minutos e, conforme o fabricante, não se deve interpretar os resultados após 60 minutos.

4.3.6.2. *Teste imunocromatográfico Teste Rápido HBsAg® (Doles, Brasil)*

O HBsAg teste rápido® (Doles, Brasil) é um teste para determinação qualitativa do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), por método imunocromatográfico, usando anticorpos mono e policlonais imobilizados na membrana para identificação seletiva de HBsAg em amostras de soro.

O teste consiste em um suporte impregnado com conjugado gamaglobulina-corante contendo uma combinação de anticorpos monoclonais e policlonais de fase sólida em forma de sanduíche e duas áreas, uma delas contendo reagentes para detecção de níveis elevados do HBsAg, e a segunda área onde existe um conjunto de reagentes que representam o controle de qualidade da placa teste.

Para execução do ensaio, 100 µl de soro foi adicionado ao dispositivo na região determinada migrando por capilaridade ao longo da membrana. No caso de amostras de saliva, adicionou-se o dobro de amostra ao teste (200 µl).

Se o antígeno HBs estivesse presente na amostra, ele iria se ligar ao conjugado gamaglobulina-corante, formando um complexo antígeno-anticorpo.

Os complexos antígeno-anticorpos fluíram pela área adsorvente da placa-teste, indo se ligar aos anticorpos anti-HBs na área de positividade da reação “T” o que determina o surgimento de uma banda de cor rosa-clara.

A mistura da reação continuou a fluir até atingir a área controle “C”. O conjugado não ligado ao antígeno uniu-se aos reagentes desta área produzindo uma banda de cor rosa e demonstrando que os reagentes estavam funcionando corretamente. A ausência desta linha invalida o teste.

A leitura foi realizada entre 10 e 20 minutos e, conforme instruções do fabricante, resultados após 30 minutos não foram interpretados.

4.3.6.3. Teste imunocromatográfico Imuno-Rápido HBsAg® (Wama, Brasil)

O Imuno-rápido HBsAg® (Wama, Brasil) é um teste baseado no método imunocromatográfico para determinação qualitativa da presença de HBsAg em soro, que utiliza uma combinação de anticorpos monoclonais e policlonais para detecção de HBsAg no soro.

O teste consiste em um suporte impregnado com conjugado gamaglobulina-corante contendo uma combinação de anticorpos monoclonais e policlonais de fase sólida em forma de sanduíche e duas áreas, uma área para detecção do HBsAg contendo anticorpos anti-HBs (área “T”), e a outra área onde existe um conjunto de reagentes que representam o controle de qualidade da placa teste.

Para execução do ensaio, 100 µl de soro foram adicionados ao dispositivo na região determinada, migrando por capilaridade ao longo da membrana. No caso de amostras de saliva, adicionou-se o dobro de amostra ao teste (200 µl).

Se o antígeno HBs estivesse presente na amostra, o mesmo iria se ligar ao conjugado gamaglobulina-corante formando um complexo antígeno-anticorpo. Os complexos antígeno-anticorpos fluiriam pela área adsorvente da placa-teste até se

ligar aos anticorpos anti-HBs na área de positividade da reação “T” determinando o surgimento de uma banda de cor rosa-clara.

A mistura da reação continuou a fluir atingindo a área controle “C”. O conjugado não ligado ao antígeno uniu-se aos reagentes desta área, produzindo uma banda de cor rosa e demonstrando que os reagentes estão funcionando corretamente. A ausência desta linha invalida o teste.

A leitura foi realizada entre 10 e 20 minutos e, conforme instruções do fabricante, resultados após 30 minutos não foram interpretados.

4.3.6.4 Teste imunocromatográfico Imuno-Rápido anti-HBsAg[®] (Wama, Brasil)

O Imuno-rápido anti-HBsAg[®] (Wama, Brasil) é um teste imunocromatográfico, que utiliza o princípio sanduíche para detectar a presença de anticorpos HBs no sangue total, soro ou plasma humano, usando HBsAg marcado com ouro coloidal. O teste consiste em um suporte impregnado com conjugado de HBsAg e ouro coloidal e duas áreas, uma área para detecção de anti-HBs contendo antígenos HBs presentes na região da área teste (T), e a segunda que representa o controle de qualidade da placa teste contendo anticorpo HBs presente na região da área controle (C).

Para execução do ensaio 100 µl de soro foram adicionados ao dispositivo na região determinada migrando por capilaridade ao longo da membrana.

Se o anticorpo HBs estivesse presente na amostra, o mesmo iria se ligar ao conjugado HBsAg-ouro coloidal formando um complexo antígeno-anticorpo. Os complexos antígeno-anticorpos fluíram pela área adsorvente da placa-teste indo se ligar aos antígenos HBsAg presentes na área de positividade da reação “T”, o que determina o surgimento de uma banda colorida.

A mistura da reação continuou a fluir até atingir a área controle “C”. O conjugado não ligado ao antígeno da área teste uniu-se ao anticorpo HBs presente na região da área controle, determinando o aparecimento de uma banda colorida nesta região (C) e demonstrando que os reagentes estão funcionando corretamente. O não aparecimento dessa banda invalida o teste.

A leitura foi realizada entre 15 e 20 minutos e, conforme instruções do fabricante, resultados após 20 minutos não foram interpretados.

4.3.6.5 Teste imunocromatográfico Imuno-Rápido anti-HBeAg[®] (Wama, Brasil)

O Imuno-rápido anti-HBeAg[®] (Wama, Brasil) é um teste imunocromatográfico, que utiliza o princípio competitivo para detectar a presença de anticorpos HBe no sangue total, soro ou plasma humano, com a finalidade de identificar indivíduos em fase de convalescência da hepatite B.

O teste consiste em um suporte impregnado com uma quantidade limitada de conjugado HBeAg marcado com ouro coloidal e duas áreas, uma contendo anticorpos HBe imobilizados e a segunda onde existe um conjunto de reagentes que representam o controle de qualidade da placa teste.

Para execução do ensaio, 100 µl de soro foram adicionados ao dispositivo na região determinada migrando por capilaridade ao longo da membrana.

Se a amostra contivesse anticorpos HBe, os mesmos competiriam com anticorpos HBe imobilizados na região teste da membrana de nitrocelulose da placa-teste por uma quantidade limitada de conjugado HBeAg marcado com ouro coloidal, levando a ausência de banda colorida na área teste (T).

Deste modo, reação entre o anticorpo imobilizado na membrana e o conjugado coloidal seria neutralizado pela presença dos anticorpos HBe da amostra. Na ausência dos anticorpos HBe na amostra, haveria o aparecimento de uma banda colorida na área teste.

Na área controle (C) sempre aparece uma banda colorida, demonstrando que os reagentes estão funcionando corretamente. A ausência desta linha invalida o teste.

A leitura é realizada entre 15 e 20 minutos e, conforme instruções do fabricante, resultados após 20 minutos não devem ser interpretados.

O esquema resumido para testagem utilizando os testes rápidos selecionados nesse estudo pode ser observado na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Resumo do esquema de testagem utilizando os testes rápidos selecionados pelo estudo

Fabricante	Teste	Tipo de amostra	Volume de amostra	Leitura
Biomérieux	Vikia HBsAg	Soro	75 µL	Até 15 min
		Sangue	75 µL	
		totalSaliva	150 µL	
Doles	HBsAg teste rápido	Soro	100 µL	Até 20 min
		Saliva	200 µL	
Wama	Imuno-rápido HBsAg	Soro	100 µ L	Até 20 min
		Saliva	200 µL	
	Imuno-rápido anti-HBsAg	Soro	100 µL	Até 20 min
		Soro	100 µL	

4.4. Avaliação da reprodutibilidade e repetitividade dos testes rápidos para detecção de HBsAg

Para a avaliação da repetitividade, onze replicatas de soro conhecidamente reagentes e não reagentes para o marcador HBsAg [amostras proveniente do controle de qualidade interno (CQI) do LRNHV/IOC] com valores da razão de DO/PC entre 1,3 e 3,2 foram testadas simultânea e independentemente, por dois diferentes técnicos. Para a avaliação da reprodutibilidade (inter-teste), o mesmo protocolo foi repetido por dois diferentes dias.

A avaliação foi realizada para todos os testes rápidos para detecção do marcador HBsAg em amostras de soro e saliva. O protocolo foi realizado como descrito acima para os dois tipos de amostra (Figura.4.9).

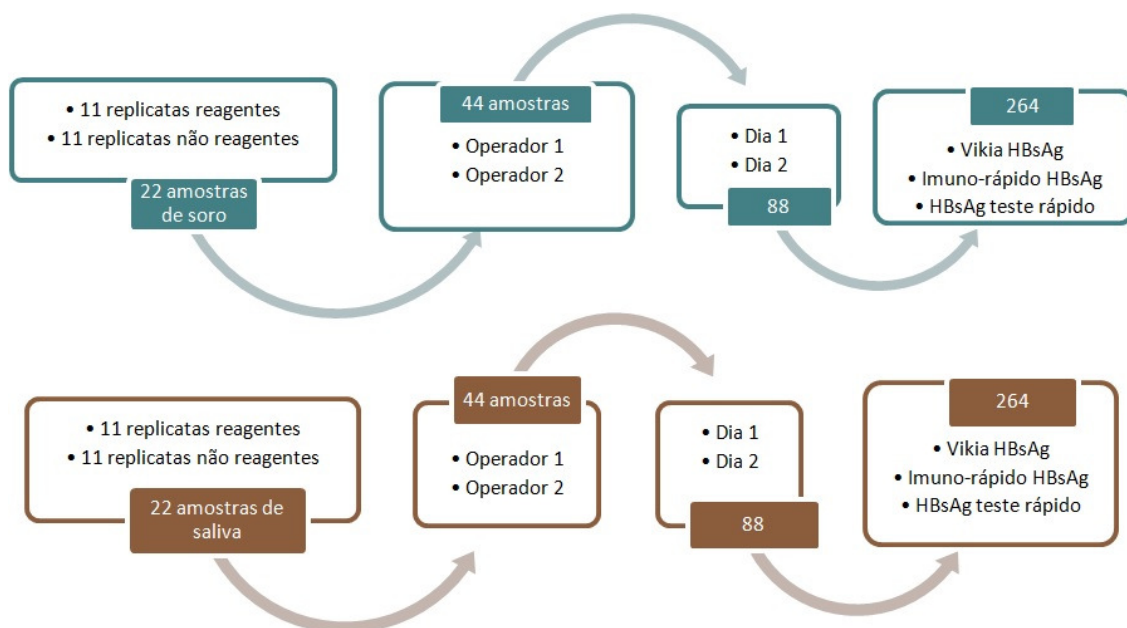


Figura 4.9 Representação esquemática da testagem para avaliação da repetitividade e reprodutibilidade em amostras de soro e saliva

Em relação às amostras de saliva, essas foram coletadas como descrito no item 4.2 de indivíduos com sorologia negativa para HBsAg. Estas amostras foram homogeneizadas para obtenção de uma única amostra com volume suficiente para realização dos ensaios. Em seguida, foi realizada uma diluição de 1:1 com amostras de soro HBsAg reigente. Para esta diluição, 12,1 ml de soro HBsAg reigente foram adicionados em 12,1 ml de saliva proveniente de indivíduos soronegativos e homogeneizados com auxílio de agitador automático tipo vortex (GV Lab, Gilson).

4.5. Avaliação dos testes rápidos na detecção do marcador HBsAg em amostras reagentes para outras infecções

Para avaliar a interferência de outras infecções no desempenho dos testes rápidos para detecção do marcador HBsAg, foram incluídas amostras de soro reativas para diferentes infecções, sendo 20 amostras reativas para o vírus da dengue (cinco para cada um dos sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), 69 para o HIV, 49 para *Treponema pallidum* e 137 para HCV.

As amostras foram testadas primeiramente para detectar a presença de HBsAg utilizando o ensaio comercial ETI-MAK-4[®] (Diasorin, Itália). Em seguida, as amostras foram submetidas à detecção do HBsAg utilizando os três testes rápidos

(Vikia HBsAg[®], Biomérieux, França; Imuno-rápido HBsAg[®], Wama, Brasil e HBsAg teste rápido[®], Doles, Brasil).

4.6. Análise dos dados

Apenas amostras com resultados definidos (reagentes ou não reagentes) foram incluídas para avaliação do desempenho dos testes. Amostras com sorologia indeterminada foram excluídas da análise.

As informações epidemiológicas, clínicas, resultados dos testes sorológicos e dos testes rápidos foram digitados e incluídos em um banco de dados (Access 2000, Microsoft Inc., EUA) para análises posteriores; análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS para Windows, versão 10.0 (SPSS Inc., EUA) e para a avaliação de parâmetros relacionados ao desempenho do teste (sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo) foram utilizados os Programas GraphPad InStat, versão 3.01 (GraphPad Software, San Diego, EUA) e MedCalc, versão 9.2.1.0 (MedCalc Software, Mari-akerke, Bélgica).

Análises descritivas foram avaliadas para cálculo de frequência, média \pm desvio padrão (DP), mediana e intervalos de confiança (IC 95%). Análises de frequências foram realizadas para avaliar as diferenças entre os valores observado e esperado dos grupos e foram utilizados teste χ^2 ou teste exato de Fisher, e variáveis quantitativas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney.

A detecção do marcador HBsAg em amostras de soro em EIEs comerciais foi utilizada como padrão ouro para avaliação da sensibilidade clínica (S_c), especificidade (E), valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) para cada um dos testes rápidos avaliados, e intervalos de confiança de noventa e cinco por cento (IC 95%) foram calculados com o método exato.

Para avaliar a concordância entre o perfil sorológico das amostras dos painéis e os resultados apresentados pelos testes rápidos, procedemos à análise de tabelas de contingência e cálculo do índice Kappa.

O coeficiente Kappa (k) foi utilizado para avaliar o grau de concordância entre os resultados obtidos nos testes rápidos e ensaios imunoenzimáticos, de acordo com a seguinte interpretação: k <20%, pobres, k = 21-40 %, justo, k = 41-60 %, moderada; k = 61-80 %, bom, e k = 81-100%, muito bom (Altman 1991). Os valores de P (bicaudal) <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Painel de referência

Na construção do painel de referência para avaliação do marcador HBsAg foram incluídas 393 amostras de soro. A população recrutada apresentava média de idade (\pm desvio padrão) igual a 40,32 anos ($\pm 14,78$) e predominância do sexo feminino (61,24%). Dentre as amostras obtidas, o HBsAg foi detectado em 103 amostras e não foi detectado em 290 amostras utilizando os dois EIEs (HBsAg One[®], Radim e ETI-MAK-4[®], Diasorin). Oitenta e seis amostras HBsAg reagentes foram submetidas a detecção do HBV DNA e 66 delas foram reagentes.

Ao avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes rápidos em relação aos resultados do EIE, o teste Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) apresentou melhor concordância (98,68%), seguido pelo Imuno-rápido HBsAg[®], Wama (94,7%) e HBsAg teste rápido[®] (Doles) (93,34%). Quando somente amostras HBsAg reagentes e HBV DNA detectado foram incluídas (n=66), houve um pequeno aumento na sensibilidade dos testes avaliados, porém os desempenhos foram semelhantes àqueles observados na análise anterior conforme pode ser observado na tabela 5.1. Um maior número de amostras falso-negativas foi observado com o teste HBsAg Teste Rápido[®] (Doles) e nenhuma amostra falso positiva foi encontrada com o teste Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) nos dois cenários avaliados. As amostras falso negativas observadas nos testes rápidos avaliados apresentaram valores médios de DO/PC pelo EIEs inferiores aqueles observados nas amostras com resultados verdadeiros positivos (Tabela 5.2).

Tabela 5.1 - Valores de acurácia (%) pelos testes rápidos Vikia HBsAg® (Biomérieux), Imuno-rápido HBsAg® (Wama) e HBsAg teste rápido® (Doles) para detecção de HBsAg em comparação com os resultados obtidos em amostras de soro avaliadas em dois testes imunoenzimáticos (HBsAg One®, Radim e ETI-MAK-4®, Diasorin)

Perfil da avaliação / Fabricante	Sensibilidade (IC%)	Especificidade (IC%)	VPP (IC%)	VPN (IC%)	K (IC%)	P	VP+VN/TOT AL
HBsAg não reagente / HBsAg reagente(n=393)							
Vikia HBsAg®	98,06% (93,16-99,76)	100,00% (98,74-100,00)	100,00% (96,42-100,00)	99,32% (97,54-99,92)	98,68% (96,85-100)	<0.0001	99,49%
Imuno-Rápido HBsAg®	95,15% (89,03-98,40)	98,97% (97,01-99,79)	97,03 (91,58-99,38)	98,29% (96,05-99,44)	94,7% (91,07-98,33)	< 0.0001	97,96%
HBsAg teste rápido®	93,20% (86,51-97,22)	98,97% (97,01-99,79)	96,97% (91,39-99,37)	97,62% (95,16-99,04)	93,34% (89,26-97,42)	< 0.0001	97,45%
HBsAg não reagente / HBsAg reagente com HBV DNA detectado (n=356)							
Vikia HBsAg®	98,48% (91,84-99,96)	100,00% (98,74-100,00)	100,00% (94,49-100,00)	99,66% (98,10-99,99)	99,06% (97,23-100,00)	<0.0001	99,72%
Imuno-Rápido HBsAg®	96,97% (89,47-99,63)	98,97% (97,01-99,79)	95,52% (87,47-99,07)	99,31% (97,52-99,92)	95,38% (91,36-99,4)	< 0.0001	98,87%
HBsAg teste rápido®	96,97% (89,47-99,63)	98,97% (97,01-99,79)	95,52% (87,47-99,07)	99,31% (97,52-99,92)	95,38% (91,36-99,4)	< 0.0001	98,87%

Legenda: VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo; k= concordância kappa; n= número de amostra; IC= intervalo de confiança

Tabela 5.2 - Valores médios da razão DO/PC obtidos em dois EIEs comerciais (HBsAg One[®], Radim e ETI-MAK 4[®], Diasorin) de acordo com os resultados falso negativos e verdadeiro positivos obtidos nos testes rápidos (Vikia HBsAg[®], Biomérieux; Imuno-rápido HBsAg[®], Wama e HBsAg teste rápido[®], Doles) no estudo utilizando painel de referência

Ensaio imunoenzimático	Teste rápido					
	Vikia HBsAg [®] (Biomérieux)		Imuno-rápido HBsAg [®] (Wama)		HBsAg teste rápido [®] (Doles)	
	HBsAg	HBsAg	HBsAg	HBsAg	HBsAg	HBsAg
	Falso negativo DO/PC média ± DP	Verdadeiro positivo DO/PC média ± DP	Falso negativo DO/PC média ± DP	Verdadeiro positivo DO/PC média ± DP	Falso negativo DO/PC média ± DP	Verdadeiro positivo DO/PC médio ± DP
HBsAg One [®] (Radim)	2,60±1,63	64,01±10,14	21,59±22,23	64,92±8,35	36,49±30,77	64,73±8
	p= 0,0004		p= 0,0004		p=0,0443	
ETI-MAK-4 [®] (Diasorin)	4,64 ± 1,29	75,07±9,90	39,03±32,48	75,47±9,63	53,00±33,25	75,21±10,09
	p=0,0004		p=0,0005		p=0,0378	

Legenda: DO/PC= densidade ótica/ponto de corte; DP= desvio padrão

5.2. Estudo de campo

5.2.1. Detecção do marcador HBsAg de acordo com o EIE

Para a avaliação dos testes rápidos de detecção de HBsAg no estudo de campo, foram obtidas 3273 amostras biológicas, onde 1503 eram amostras de soro, 1268 amostras de sangue total e 502 amostras de saliva.

A média de idade (\pm desvio padrão) dos indivíduos que forneceram amostras de soro, sangue total e saliva foi igual a 32,63 (\pm 18,43) anos, 34,89 (\pm 12,95) anos e 34,06 (\pm 16,15) anos, respectivamente. Houve também predomínio do sexo feminino com 51,93%, 55,19% e 52,93%, respectivamente, nos 3 grupos de indivíduos que forneceram soro, sangue total e saliva (Tabela 5.3).

Entre as 1503 amostras de soro testadas, o HBsAg foi detectado em 178 e não detectado em 1325 pelo EIE comercial. Dentre as 178 amostras HBsAg reagentes, 119 foram submetidas à detecção do HBV DNA e 96 foram HBV DNA reagentes. Amostras de sangue total e saliva tiveram o HBsAg detectado em 37 e 88 amostras e não detectado em 1231 e 414 amostras de seus soros correspondentes, respectivamente.

A quantidade de amostra obtida de cada tipo de fluido biológico, bem como o número de amostras reagentes e não reagentes, em cada situação pode ser melhor observada na figura 5.1.

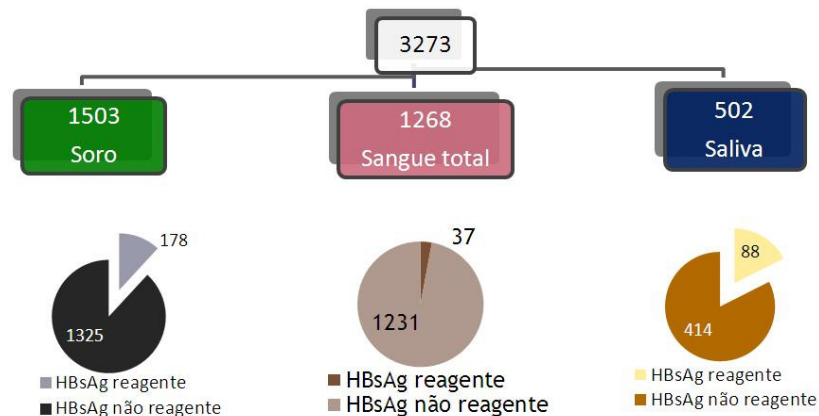


Figura 5.1- Número total de amostras obtidas em cada fluido e separação entre as reagentes e as não reagentes para o marcador HBsAg no estudo de campo.

Tabela 5.3 - Dados demográficos (sexo e idade) e frequência de detecção de HBsAg pelo EIE e HBV DNA pelo teste molecular de acordo com o fluido biológico (soro, sangue total e saliva) em cada grupo avaliado no estudo de campo.

Dados	Centros de referência			Baixa prevalência			Alta vulnerabilidade			Total dos grupos		
	Soro	Sangue total	Saliva	Soro	Sangue total	Saliva	Soro	Sangue total	Saliva	Soro	Sangue total	Saliva
Sexo												
Feminino (%)	46,64%	49,06%	51,12%	53,39%	53,98%	49,54%	55,69%	58,93%	57,32%	51,93%	55,19%	52,93%
Masculino (%)	53,36%	50,94%	48,88%	46,61%	46,02%	50,46%	44,31%	41,07%	42,68%	48,07%	44,81%	47,07%
Idade												
Média (Desvio padrão) em anos	46,59 (±13,78)	48,49 (±13,73)	45,27 (±13,52)	26,80 (±18,99)	32,71 (±19,35)	29,42(±17,59)	31,30 (±13,35)	33,40 (±14,25)	32,88 (±14,91)	32,63 (±18,43)	34,49 (12,95)	34,06 (±16,15)
Marcador HBsAg												
Reagentes (n/%)	167 (45,01%)	28 (25,93%)	82 (44,32%)	5 (0,57%)	3 (0,39%)	2 (1,25%)	6 (2,39%)	6 (1,53%)	4 (0,25%)	178 (11,84%)	37 (2,92%)	88 (17,53%)
Não reagentes (n/%)	204 (54,99%)	80 (74,07%)	103 (55,68%)	876 (99,43%)	764 (99,61%)	158 (98,75%)	245 (97,61%)	387 (98,47)	153 (97,45%)	1325 (88,16%)	1231 (97,08%)	414 (82,47%)
HBsAg reagente + HBV DNA												
HBV DNA não detectado (n/%)	22 (13,17%)	7 (25,00%)	7 (8,54%)	1 (20,00%)	2 (66,67%)	1 (50,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	23 (12,92%)	9 (24,32%)	8 (9,09%)
HBV DNA detectado (n/%)	95 (56,89%)	14 (50,00)	59 (71,95%)	1 (20,00%)	1 (33,33)	1 (50,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	96 (53,93%)	15 (40,55%)	60 (68,18%)
HBV DNA não testado (n/%)	50 (29,94%)	7 (25,00%)	16 (19,51%)	3 (60,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	6 (100,00%)	6 (100,00%)	4 (100,00%)	59 (33,15%)	13 (35,13%)	20 (22,73%)

Avaliação da detecção do marcador HBsAg pelos testes rápidos

Ao avaliarmos a detecção do HBsAg pelos três testes rápidos empregados (Vikia HBsAg[®], Biomérieux; Imuno-rápido HBsAg[®], Wama e HBsAg teste rápido[®], Doles) em amostras de soro, verificamos que o teste Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) apresentou melhor desempenho (concordância igual a 96,08%), seguido pelos testes HBsAg teste rápido[®] (Doles) com concordância igual a 88,41% e Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) com concordância igual a 87,62%.

O desempenho dos testes rápidos em amostras de soro variou de acordo com o perfil da população estudada. No grupo de centros de referências (i) e no grupo com alta vulnerabilidade (iii), o teste Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) apresentou melhor desempenho (concordância igual a 96,17% no grupo i e 79,61% no grupo iii), seguido pelos testes Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) (concordância igual a 93,98% no grupo i e 72,12% no grupo iii) e HBsAg teste rápido[®] (Doles) (concordância igual a 93,43% no grupo i e 65,85% no grupo iii). Na população com Baixa prevalência (grupo ii), o teste Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) apresentou bom desempenho (concordância igual a 66,5%) enquanto que os testes HBsAg teste rápido[®] (Doles) e Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) apresentaram baixo desempenho (concordância igual a 17,96% e 21,5%, respectivamente). Maiores valores de sensibilidade do teste rápido foram observados no grupo de alta endemicidade e a especificidade foi acima de 97% em todos os grupos avaliados (Tabela 5.4).

Os valores médios de DO/PC pelo EIE foram inferiores em amostras HBsAg falso negativas pelos testes rápidos quando comparadas às amostras HBsAg verdadeiro positivas (Tabela 5.5).

A detecção do HBsAg em amostras de soro pelos três testes rápidos avaliados apresentou 95,5% de concordância entre eles. A concordância de resultados entre os testes Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) e Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) e entre os testes HBsAg teste rápido[®] (Doles) e Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) foram iguais a 97,19%, enquanto a concordância entre os testes rápidos dos fabricantes Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) e HBsAg teste rápido[®] (Doles) foi igual a 96,63%.

Tabela 5.4 - Valores de acurácia (%) pelos testes rápidos Vikia HBsAg® (Biomérieux), Imuno-rápido HBsAg® (Wama) e HBsAg teste rápido®, (Doles) em comparação com os resultados obtidos pelo teste imunoenzimático ETI-MAK-4® (Diasorin) em amostras de soro de acordo com o perfil da população estudada

Fabricante (n)		Sensibilidade (IC%)	Especificidade (IC%)	VPP (IC%)	VPN (IC%)	K (IC%)	P
Centros de referências	Vikia HBsAg® (371)	95,81% (91,54-98,30)	100,00% (98,21-100,00)	100% (97,72-100,00)	96,68% (93,30-98,65)	96,17% (93,36-98,98)	< 0,0001
	Imuno-rápido HBsAg® (371)	94,01% (89,27-97,09)	99,51% (97,30-99,99)	99,37% (96,53-99,98)	95,31% (91,53-97,72)	93,98% (90,48-97,48)	< 0,0001
	HBsAg Teste rápido® (371)	93,41% (88,53-96,67)	99,51% (97,30-99,99)	99,36% (96,51-99,98)	94,86% (90,99-97,41)	93,43% (89,77-97,09)	< 0,0001
Baixa prevalência	Vikia HBsAg® (881)	60,00% (14,67-94,73)	99,89% (99,37-100,00)	75,00% (19,42-99,37)	99,77% (99,18-99,97)	66,50% (28,65-100)	< 0,0001
	Imuno-rápido HBsAg® (881)	60,00% (14,67-94,73)	97,26% (95,94-98,24)	11,11% (23,55-29,18)	99,77% (99,16-99,97)	17,96% (0-49,02)	0,0002
	HBsAg Teste rápido® (881)	60,00% (14,67-94,73)	97,83% (96,63-98,69)	13,64% (29,04-34,94)	99,77% (99,16-99,97)	21,50% (0-54,67)	0,0001
alta vulnerabilidade	Vikia HBsAg® (251)	66,67% (22,27-95,67)	100,00% (98,51-100,00)	100,00% (39,76-100,00)	99,19% (97,11-99,90)	79,61% (51,46-100)	< 0,0001
	Imuno-rápido HBsAg® (251)	66,67% (22,27-95,67)	99,59% (97,75-99,99)	80,00% (28,35-99,49)	99,19% (97,11-99,90)	72,12% (40,76-100)	< 0,0001
	HBsAg Teste rápido® (251)	66,67% (22,27-95,67)	99,18% (97,08-99,90)	66,67% (22,27-95,67)	99,19% (97,11-99,90)	65,85% (32,65-99,05)	< 0,0001
Total dos grupos	Vikia HBsAg® (1503)	93,82% (89,21-96,87)	99,92% (99,58-100,00)	99,40% (96,73-99,98)	99,18% (98,53-99,59)	96,08% (93,87-98,29)	< 0,0001
	Imuno-rápido HBsAg® (1503)	92,13% (87,14-95,63)	98,04% (97,14-98,71)	86,32% (80,57-90,86)	98,93% (98,21-99,42)	87,62% (83,83-91,41)	< 0,0001
	HBsAg Teste rápido® (1503)	91,57% (86,50-95,21)	98,34% (97,49-98,96)	88,11% (82,57-92,39)	98,86% (98,13-99,36)	88,41% (84,72-92,1)	< 0,0001

VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo; k= concordância kappa; n= número de amostra; IC= intervalo de confiança

Tabela 5.5 - Valores médios de DO/PC obtidos pelo ensaio imunoenzimático (ETI-MAK-4[®], Diasorin) em amostras de soro HBsAg falso negativas (FN) e verdadeiro positivas (VP) obtidas nos testes rápidos para detecção de HBsAg (Vikia HBsAg[®], Biomérieux; Imuno-rápido HBsAg[®], Wama e HBsAg teste rápido[®], Doles de acordo com o perfil da população estudada

Grupo	Vikia HBsAg [®] (Biomérieux)		Imuno-rápido HBsAg [®] (Wama)		HBsAg teste rápido [®] (Doles)	
	HBsAg	HBsAg	HBsAg	HBsAg	HBsAg	HBsAg
	Falso negativo (DO/PC média ± DP)	Verdadeiro positivo (DO/PC média ± DP)	Falso negativo (DO/PC média ± DP)	Verdadeiro positivo (DO/PC média ± DP)	Falso negativo (DO/PC média ± DP)	Verdadeiro positivo (DO/PC média ± DP)
Centros de referência	24,77±25,28	70,81±10,69	35,50±27,56	71,00±10,69	43,30± 32,09	70,68± 10,93
	p<0,0001		p<0,0001		p=0,0120	
Baixa prevalência	2,82±1,19	79,00±2,94	2,82±1,19	79,00±2,94	2,82±1,19	79,00±2,94
	Baixo n de amostras não permitiu cálculo de p		Baixo n de amostras não permitiu cálculo de p		Baixo n de amostras não permitiu cálculo de p	
Alta vulnerabilidade	2,12±0,26	67,10±6,55	2,12±0,26	67,10±6,55	2,12±0,26	67,10±6,55
	Baixo n de amostras não permitiu cálculo de p		Baixo n de amostras não permitiu cálculo de p		Baixo n de amostras não permitiu cálculo de p	
Total dos grupos	16,66±22,59	70,82±10,20	26,06± 27,67	71,71± 10,08	32,41±32,94	70,70±10,35
	p<0,0001		p<0,0001		p<0,0001	

Legenda: DO/PC= densidade ótica/ponto de corte; DP= desvio padrão

O teste Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) também foi avaliado em amostras de sangue total, onde o melhor desempenho foi observado na população de alta vulnerabilidade (concordância igual a 79,75%). Ao avaliarmos o desempenho do teste na população com alta endemicidade e na população total, observamos concordância deste teste rápido com o EIE igual a 72,7% nos dois grupos de amostras. Não foi possível determinar a concordância do ensaio na população de Baixa prevalência, pois o teste deste fabricante não conseguiu detectar os verdadeiros positivos (Tabela 5.6).

Uma vez que o teste rápido não foi capaz de detectar os verdadeiros positivos na população com Baixa prevalência e que não foi possível ser realizada a testagem do HBV DNA na população com alta vulnerabilidade, essa avaliação não foi realizada.

Tabela 5.6 - Valores de acurácia (%) do teste rápido Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) em amostras de sangue total em comparação com os resultados obtidos nas respectivas amostras de soro pelo teste imunoenzimático ETI-MAK-4[®] (Diasorin) de acordo com o perfil da população estudada

Parâmetros	Grupos Avaliados			
	Alta endemicidade (n=108)	Baixa prevalência (n=767)	Alta vulnerabilidade (n=393)	Total dos grupos (n=1268)
Sensibilidade (IC%)	64,29% (44,10-81,38)	0,00% (0-70,76)	66,67% (22,27-95,67)	59,46% (42,05-75,23)
Especificidade (IC%)	100,00% (95,49-100,00)	99,87% (99,27-100,00)	100% (99,05-100,00)	99,92% (99,55-100,00)
VPP (IC%)	100,00% (81,46-100,00)	0,00% (0,00-97,50)	100,00% (39,76-100,00)	95,65% (78,07-99,89)
VPN (IC%)	88,89% (80,50-94,54)	99,61% (98,86-99,92)	99,49% (98,15-99,94)	98,80% (98,02-99,32)
K (IC%)	72,73% (56,63-88,83)	*	79,75% (51,76-100,00)	72,72% (59,44-86,00)
P	< 0.0001	1.0000	< 0.0001	< 0.0001

Legenda: VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo; k= concordância kappa; n= número de amostra; IC= intervalo de confiança; * resultado não obtido.

Os testes rápidos Vikia HBsAg[®] (Biomérieux), Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) e HBsAg teste rápido[®] (Doles) também foram avaliados em amostras de saliva, onde os valores de especificidade foram maiores que 96% em todos os testes e grupos avaliados. Por outro lado, os valores de sensibilidade foram baixos em todos os testes e populações avaliadas.

A tabela 5.7 demonstra melhor desempenho do teste rápido Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) com concordâncias iguais a 45,65% no total das populações estudadas, 40,68% na população de centros de referência e 32,2% na população com baixa endemicidade. Na população com alta vulnerabilidade, nenhum dos testes rápidos avaliados conseguiu detectar amostras HBsAg verdadeiro positivas. Também foi possível observar alta frequência de resultados falsos negativos para detecção do HBsAg em todos os testes rápidos avaliados em comparação com os resultados verdadeiros positivos.

Tabela 5.7 - Valores de acurácia (%) dos testes e frequência de amostras HBsAg verdadeiro-positivas, falso-positivas, verdadeiro-negativos e falso-negativos detectadas pelos testes rápidos Vikia HBsAg® (Biomérieux), Imuno-rápido HBsAg® (Wama) e HBsAg teste rápido® (Doles) em comparação com os resultados obtidos pelo ensaio imunoenzimático ETI-MAK-4® (Diasorin) em amostras de saliva de acordo com o perfil da população estudada

Perfil	Fabricante	Se (IC%)	E (IC%)	VPP (IC%)	VPN (IC%)	K (IC%)	VP (n)	FN (n)	VN (n)	FP (n)
Centro de referência	Vikia HBsAg®	7,31% (2,72-15,2)	98,06% (93,16- 99,76)	75,00% (34,90-96,82)	57,06% (49,47%- 64,53)	5,92% (0,00-21,8)	6	76	101	2
	Imuno-Rápido HBsA®	40,24% (29,54-51,71)	98,06% (93,16 - 99,76)	94,29% (80,85-99,30)	67,33% (59,16-74,80)	40,68% (26,82-54,54)	33	49	101	2
	Teste rápido HBsAg®	2,43% (0,29-8,53)	98,06% (93,16-99,76)	50,00 (67,61-93,24)	55,80% (48,20-63,21)	0,55% (0,00-16,61)	2	80	101	2
Baixa prevalência	Vikia HBsAg®	0,00% (0,00-84,19)	96,84% (92,77-98,97)	0,00% (0,00-52,17)	98,71% (95,42-99,84)	*	0	2	153	5
	Imuno-Rápido HBsA®	50,00% (1,25-98,74)	98,10% (94,56-99,61)	25,00 (0,63-80,58)	99,36% (96,48-99,98)	32,2% (0,00- 97,8)	1	1	155	3
	Teste rápido HBsAg®	*	*	*	*	*	0	2	158	0
alta vulnerabilidade	Vikia HBsAg®	*	*	*	*	*	0	4	153	0
	Imuno-Rápido HBsA®	0,00% (0,00-60,24)	97,39% 93,45-99,28	0,00% (0,00-60,24)	97,39% 93,45-99,28	*	0	4	149	4
	Teste rápido HBsAg®	0,00% (0,00-60,24)	98,04% (94,39-99,59)	0,00% (0,00-70,76)	97,40% (93,49-99,29)	*	0	4	150	3
Total dos grupos	Vikia HBsAg®	6,81% (2,54-14,27)	98,31% (96,55-99,32)	46,15% (19,22-74,88)	83,23% (79,64%-86,40)	7,72% (0,00- 25,11)	6	82	407	7
	Imuno-Rápido HBsA®	38,64 (28,40-49,62)	97,8% (95,92-99,00)	79,07% (63,93-89,95)	88,24% (84,91-91,02)	45,65% (33,1-58,2)	34	54	405	9
	Teste rápido HBsAg®	2,27% (0,27-7,96)	98,79% (97,21-99,61)	28,57% (3,66-70,93)	28,57% (3,66-70,93)	1,67% (0,00-19,95)	2	86	409	5

Se= Sensibilidade clínica; E= Especificidade; VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo; k= concordância kappa; VP= verdadeiro positivo; FN= falso negativo, VN=verdadeiro negativo, FP= falso positivo, IC= intervalo de confiança; * resultado não obtido.

5.2.2. Detecção do marcador anti-HBs de acordo com o EIE

Para avaliação do teste rápido para detecção do marcador anti-HBs, foram coletadas amostras de soro de um total de 2330 indivíduos, sendo 812 anti-HBs reagentes e 1518 anti-HBs não reagentes pelo EIE. (ETI-AB-AUK-3[®], Diasorin) A população apresentava média de idade (\pm desvio padrão) igual a 34 anos (\pm 19,38) e predomínio do sexo feminino (54,71%).

A média de idade (\pm desvio padrão) de acordo com os grupos avaliados no estudo de campo foi igual a 48 (\pm 13,99), 29 (\pm 20,39) e 33 (\pm 14,41) para os grupos de centro de referência (grupo i), Baixa prevalência (grupo ii) e alta vulnerabilidade (grupo iii). Todos os grupos apresentaram predomínio do sexo feminino. O anti-HBs foi detectado pelo EIE em 133, 572 e 107 indivíduos e não detectado em 290, 954 e 274 amostras para os grupos I, II e III, respectivamente.

Como pode ser observado na tabela 5.8, a especificidade do teste rápido para detecção do anti-HBs foi semelhante nos três grupos avaliados, onde foram observados resultados discordantes em 1, 4 e 19 amostras de soro nos grupos i, iii e ii, respectivamente. A sensibilidade de teste para detecção do anti-HBs foi relativamente baixa em todos os grupos avaliados, onde maior sensibilidade foi encontrada na população com baixa prevalência (51,05%, 292/572), seguido da população de alta endemicidade (50,38%, 67/133) e alta vulnerabilidade (46,73%, 50/107).

Na tabela 5.9 podemos observar que as amostras anti-HBs falso-negativas pelo teste rápido Imuno-rápido anti-HBsAg[®] (Wama) apresentam valores médios de DO/PC pelo EIE ETI-AB-AUK-3[®] (Diasorin) significativamente inferiores àqueles observados nas amostras anti-HBs verdadeiro positivas.

Tabela 5.8 Valores de acurácia (%) pelo teste rápido Imuno-rápido anti-HBsAg® (Wama) em amostras de soro em comparação com os resultados obtidos pelo teste imunoenzimático (ETI-AB-AUK-3®, Diasorin) de acordo com o perfil da população estudada.

Dados	Centros de referência (n=423)	Baixa prevalência (n=1526)	Alta vulnerabilidade (n=381)	Total dos grupos (n=2330)
Sensibilidade	50,38%	51,05%	46,73%	50,37%
(IC%)	(41,63-59,10)	(46,92-55,16)	(37,05-56,59)	(46,94-53,80)
Especificidade	99,66%	98,01%	98,54%	98,42%
(IC%)	(98,09-99,99)	(96,91-98,80)	(96,30-99,60)	(97,66-98,99)
VPP	98,53%	93,89%	92,59%	94,46%
(IC%)	(92,09-99,96)	(90,62-96,27)	(82,13-97,95)	(91,86-96,41)
VPN	81,41%	76,95%	82,57%	78,76%
(IC%)	(76,94-85,33)	(74,54-79,28)	(78,06-86,50)	(76,86-80,62)
k	57,66%	53,99%	53,32%	54,73%
(IC%)	(48,36-66,96)	(49,31-58,67)	(42,58-64,06)	(50,85-58,61)
P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo; k= concordância kappa; n= número de amostra; IC= intervalo de confiança; VP= verdadeiro positivo; VN=verdadeiro negativo; FP= Falso positivo; FN= Falso negativo

Tabela 5.9 Valores médios de DO/PC obtidos pelo teste imunoenzimático ETI-AB-AUK-3® (Diasorin) em amostras anti-HBs falso negativas e verdadeiro positivas obtidas no teste rápido Imuno-rápido anti-HBsAg® (Wama) de acordo com o perfil da população estudada

Grupo	Teste rápido Imuno-rápido anti-HBsAg® (Wama)	
	Anti-HBs falso negativo DO/PC médio ± DP	Anti-HBs verdadeiro positivo DO/PC médio ± DP
Centros de referência	5,91± 5,44	29,56±22,84
		p<0,0001
Baixa prevalência	5,00±6,46	35,21±24,87
		p<0,0001
Alta vulnerabilidade	10,76±8,98	30,60±27,23
		p<0,0001
Total	6,03±7,02	33,67±24,90
		p<0,0001

Legenda: DO/PC= densidade ótica/ponto de corte; DP= desvio padrão

Ao avaliar a sensibilidade do teste rápido para detecção do anti-HBs em relação à presença do marcador em indivíduos vacinados (presença isolada de anti-HBs) ou previamente infectados (presença do anti-HBs e anti-HBc simultaneamente), verificamos os seguintes valores de sensibilidades: 45,35% (39/86) comparado a 59,57% (28/47) no grupo de alta endemicidade; 39,90% (158/396) comparado a 76,14% (134/176) no grupo de baixa prevalência, 39,32% (35/89) comparado a 83,33% (15/18) no grupo de alta vulnerabilidade e 40,63% (232/571) comparado a 73,44% (177/241) na população total.

A sensibilidade também foi avaliada em relação à presença de anti-HBs com títulos maiores ou menores que 100 UI/ml. Foi observado que amostras com títulos menores que 100 UI/ml apresentavam valores de sensibilidades inferiores aos obtidos pelas amostras com títulos acima de 100 UI/ml: 13,72% (7/51) comparado à 73,17% (60/82) no grupo de centros de referência; 14,92% (40/268) comparado à 82,89% (252/304) no grupo de baixa prevalência; 4,87% (2/41) comparado à 72,72% (48/66) no grupo com alta vulnerabilidade e 13,61% (49/360) comparado a 79,65% (360/452) na população total.

5.2.3. Detecção do marcador anti-HBe de acordo com o EIE

Para avaliação do desempenho do teste de detecção do marcador anti-HBe, amostras de soro foram obtidas de 1195 indivíduos, sendo 217 reagentes e 978 não reagentes no ECLIA *Elecsys* anti-HBe (Roche). A média de idade (\pm desvio padrão) da população foi igual a 33,3 anos ($\pm 18,4$) com predomínio do sexo feminino (51,45%).

O anti-HBe foi detectado pelo ECLIA comercial em 113, 87 e 17 amostras e não foi detectado em 53, 701 e 224 amostras nos grupos de alta endemicidade (grupo i), baixa prevalência (grupo ii) e alta vulnerabilidade (grupo iii), respectivamente. A média de idade (\pm desvio padrão) em cada grupo foi igual a 45,3 $\pm 14,6$ no grupo i, 31,6 $\pm 20,7$ no grupo ii e 30,4 $\pm 12,7$ no grupo iii. O sexo masculino foi predominante apenas no grupo i. O teste rápido para detecção de anti-HBe apresentou melhor desempenho em amostras do grupo i (concordância igual a 65,36%). Os valores de especificidade foram acima de 96% em todos os grupos avaliados. A sensibilidade foi abaixo de 77,00% em todos os grupos, com valores

iguais a 76,99% (87/111) no grupo i; 10,34% (9/87) no grupo ii e 11,76% (2/17) no grupo iii (tabela 5.10).

Tabela 5.10 - Valores de acurácia (%) do teste e frequência de amostras anti-HBe verdadeiro-positivas, falso-positivas, verdadeiro-negativas e falso-negativas detectadas pelo teste rápido Imuno-rápido anti-HBeAg® (Wama) em comparação com os resultados obtidos pelo teste de eletroquimioluminescência *Elecsys* anti-HBe® (Roche) em amostras de soro, de acordo com o perfil da população estudada

Dados	Centros de referência (n=166)	Baixa prevalência (n=788)	Alta vulnerabilidade (n=241)	Total dos grupos (n=1195)
Sensibilidade	76,99%	10,34%	11,76%	45,16%
(IC%)	(68,18-84,39)	(48,43-18,76)	(14,57-36,41)	(38,43-51,97)
Especificidade	96,23%	100,00%	100,00%	99,80%
(IC%)	(87,02-99,54)	(99,48-100)	(98,37-100,00)	(99,26-99,98)
VPP	97,75%	100,00%	100,00%	98,00%
(IC%)	(92,12-99,73)	(66,39-100)	(15,81-100,00)	(92,96-99,76)
VPN	66,23%	89,99%	93,72%	89,13%
(IC%)	(54,54-76,60)	(87,69-92,00)	(89,85-96,44)	(87,15-90,94)
K	65,36%	17,03%	19,86%	56,89%
(IC%)	(53,66-77,06)	(0,00-34,51)	(0,00-59,13)	(49,61-64,17)
P	< 0,0001	< 0,0001	0,0047	< 0,0001
VP (n)	87	9	2	98
FN (n)	26	78	15	119
VN (n)	51	701	224	976
FP (n)	2	0	0	2

Legenda: VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo; k= concordância kappa; n= número de amostra; IC= intervalo de confiança; VP= verdadeiro positivo; VN=verdadeiro negativo; FP= Falso positivo; FN= Falso negativo

A tabela 5.11 demonstra que os valores médios de DO/PC observadas no teste ECLIA para detecção de anti-HBe em amostras com resultado falso-negativo no teste rápido Imuno-rápido anti-HBeAg[®], Wama eram superiores àqueles observados nas amostras com resultados verdadeiros positivos.

Tabela 5.11 - Valores médios de DO/PC obtidos pelo ECLIA *Elecsys* anti-HBe[®] (Roche) em amostras anti-HBe falso negativas e verdadeiro positivo obtidas no teste rápido Imuno-rápido anti-HBeAg[®] (Wama) de acordo com o perfil da população estudada

Grupo	Teste rápido Imuno-rápido anti-HBeAg [®]	
	Anti-HBe falso negativo DO/PC médio ± DP	Anti-HBe verdadeiro positivo DO/PC médio ± DP
Centros de referência	0,264±0,316	0,025± 0,122
		p<0,0001
Baixa endemicidade	0,370±0,357	0,099± 0,282
		p=0,0006
Alta vulnerabilidade	0,349±0,422	0,005±0,001
		p=0,1791
Total dos grupos	0,347± 0,357	0,032±0,142
		p<0,001

Legenda: DO/PC= densidade ótica/ponto de corte; DP= desvio padrão

5.3. Avaliação da Reprodutibilidade e Repetitividade dos testes rápidos para detecção do marcador HBsAg

Na avaliação da reprodutibilidade e repetitividade para detecção de HBsAg por meio de testes rápidos em amostras de soro e saliva foram incluídos um padrão de amostras reagentes e um padrão de amostras não reagente para o HBsAg. Cada um deles foi testado onze vezes por dois dias consecutivos e por dois observadores distintos, sendo realizado um total de 528 testes, 88 para cada um dos três fabricantes avaliado em cada espécime clínico.

Houve 100% de concordância entre os resultados de cada fabricante de teste rápido avaliado em comparação ao EIE, tanto em amostras de soro como em amostras de saliva.

5.4. Avaliação dos testes rápidos na detecção do marcador HBsAg em amostras reagentes para outras infecções

Para avaliação do desempenho dos testes rápidos para detecção do marcador HBsAg em amostras com sorologia reativa para outras infecções, foram incluídas 20 amostras reativas para vírus Dengue e nenhuma delas foi HBsAg reagente pelo EIE e pelos três testes rápidos avaliados, demonstrando 100% de concordância. Também foram avaliadas 49 amostras com sorologia reagentes para *T. pallidum*, onde nove foram HBsAg reagentes e 40 HBsAg não reagentes pelo EIE. Os testes rápidos apresentaram valores de concordância em relação ao EIE iguais a: 76,6% no teste rápido Imuno-Rápido HBsAg[®] (Wama) e 85,1% no teste rápido Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) e HBsAg teste rápido[®] (Doles). Não foram observados resultados falso positivos. Já resultados falso negativos foram observados em duas amostras nos testes rápidos Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) e HBsAg teste rápido[®] (Doles) e em três amostras no teste rápido Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama).

Sessenta e nove amostras anti-HIV reagentes foram avaliadas, 15 delas eram HBsAg reagente e 54 HBsAg não reagentes pelo EIE. Os testes rápidos apresentaram concordância com o EIE igual a 81,1%, 70,1%, 77,0% para os testes dos fabricantes Biomérieux, Wama e Doles, respectivamente. Uma amostra falso positiva foi detectada pelo teste HBsAg teste rápido[®] (Doles), enquanto que quatro amostras falso negativas foram obtidas pelos testes rápidos Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) e HBsAg teste rápido[®] (Doles) e seis amostras falso negativas foram detectadas pelo teste rápido Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama).

Foram incluídas 137 amostras anti-HCV reagentes, nas quais o marcador HBsAg foi detectado pelo EIE comercial em oito amostras e não foi detectado em 129 amostras. As concordâncias dos testes rápidos com o EIE foram iguais a: 85,0%; 78,8% e 86,1% para os testes rápidos Vikia HBsAg[®] (Biomérieux), Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) e HBsAg teste rápido[®] (Doles), respectivamente. Uma amostra falso positiva foi detectada nos testes Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) e HBsAg teste rápido[®] (Doles), e duas amostras falso negativas foram detectadas pelo teste Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) e Imuno-rápido HBsAg[®] (Wama) e uma amostra falso negativa pelo teste HBsAg teste rápido[®] (Doles) (Tabela 5.12)

Tabela 5.12 - Frequência de resultados verdadeiros positivos (VP), falso negativos (FN), falso positivos (FP), verdadeiro negativos (VN) e valor de concordância kappa obtidos pelos testes rápidos para detecção de HBsAg (Vikia HBsAg[®], Biomérieux; Imuno-rápido HBsAg[®], Wama e HBsAg teste rápido[®], Doles) em amostras de soro com sorologia reativa para vírus dengue, *Treponema pallidum*, HCV, HIV em comparação aos resultados obtidos pelo ensaio imunoenzimático (ETI-MAK-4[®], Diasorin)

	VP (n)	FN (n)	FP (n)	VN (n)	K% (IC%)
Dengue (n=20)					
Vikia HBsAg [®]	0	0	0	20	100,00%
Imuno-Rápido HBsA [®]	0	0	0	20	100,00%
Teste rápido HBsAg [®]	0	0	0	20	100,00%
T. pallidum (n=49)					
Vikia HBsAg [®]	7	2	0	40	85,10%
Imuno-Rápido HBsA [®]	6	3	0	40	76,60%
Teste rápido HBsAg [®]	7	2	0	40	85,10%
HIV (n=69)					
Vikia HBsAg [®]	11	4	0	54	81,10%
Imuno-Rápido HBsA [®]	9	6	0	54	70,10%
Teste rápido HBsAg [®]	11	4	1	53	77,00%
HCV (n=137)					
Vikia HBsAg [®]	6	2	0	129	85,00%
Imuno-Rápido HBsA [®]	6	2	1	128	78,80%
Teste rápido HBsAg [®]	7	1	1	128	86,70%

k= Concordância kappa; *n*= número de amostra; IC= intervalo de confiança; VP= verdadeiro positivo; VN=verdadeiro negativo; FP= Falso positivo; FN= Falso negativo.

6. DISCUSSÃO

Uma grande variedade de testes rápidos para detecção de marcadores de doenças infecciosas já está disponível comercialmente para avaliação diagnóstica. No Brasil, o Ministério da Saúde já estabeleceu medidas para o uso dos testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HIV e HCV (MS, 2009; 2013), porém não existe regulamentação para uso dos testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HBV.

Inicialmente, o desempenho dos testes rápidos para detecção do marcador HBsAg foi determinado utilizando-se um painel de referência com amostras de soro com resultados concordantes em dois EIEs, cujos os valores de sensibilidade e especificidade foram maiores que 90%, demonstrando muito bom desempenho dos ensaios avaliados. O teste rápido do fabricante Biomérieux apresentou os melhores resultados de concordância com o EIE (98,68%), seguido dos testes rápidos dos fabricantes Wama (94,7%) e Doles (93,34%). Bottero e colaboradores em 2013 também observaram boa concordância do teste rápido do fabricante Biomérieux para detecção do HBsAg utilizando amostras de sangue total (96,98%), porém o desempenho dos testes rápidos dos fabricantes Wama e Doles não foram avaliados previamente.

Os testes rápidos para detecção de HBsAg apresentaram maiores valores de sensibilidade quando amostras HBsAg e HBV DNA reagentes foram incluídas, indicando que a presença do HBV DNA pode ter efeito positivo no desempenho dos testes rápidos avaliados. Seremba e colaboradores (2010) também observaram melhor desempenho de testes rápidos para detecção de HBsAg em amostras HBsAg e HBV DNA reagentes em comparação com aquelas amostras sem HBV DNA detectado. Esses resultados podem estar relacionados à presença de maiores concentrações do antígeno HBsAg em amostras com HBV DNA detectado, o que pode ter gerado melhores resultados pelos testes rápidos avaliados.

O desempenho dos testes rápidos para detecção do HBsAg também parece ser influenciado pela concentração de antígeno, visto que as amostras com resultados falso negativos apresentavam valores médios de DO/PC mais baixos do que amostras verdadeiro positivas. Martínez-Lamas e colaboradores (2011) também observaram que o teste rápido INFO HBsAg® (Türklab Dispositivos Médicos, Turquia) apresentou resultados falso negativos em amostras de soro com valores de

DO mais próximos do ponto de corte. Bottero e colaboradores (2013) verificaram que amostras com resultados HBsAg falso negativos pelos testes rápidos Vikia HBsAg[®] (Biomérieux, França), Determine[™] HBsAg (Inverness Biomedical Innovations, Alemanha) e Quick Profile[®] (Lumiquick, USA) apresentavam níveis médios de HBsAg significativamente mais baixos do que aquelas amostras com resultados verdadeiro positivos.

O estudo com o painel de referência mostrou bom desempenho dos testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HBV, especialmente naqueles indivíduos com maiores concentrações de antígeno e/ou presença de HBV DNA. Em seguida, o desempenho dos testes rápidos para detecção do HBsAg foi avaliado de acordo com o tipo de fluido biológico e perfil da população estudada, onde os valores de especificidade foram maiores que 96%, independente do fabricante, perfil populacional e fluido biológico avaliado, mostrando uma boa caracterização dos verdadeiros negativos pelos testes rápidos. Altos valores de especificidade de testes rápidos de detecção de HBsAg também foram observados por Lien et al. (2000) utilizando os testes Determine[™] HBsAg (Inverness Biomedical Innovations, Alemanha) (100%); Dainascreen HBsAg[®] (Abbott laboratories, Estados Unidos da América) (100%) e Serodia[®] HBsAg (Fujirebio, Japão) (100%), por Martínez-Lamas e colaboradores (2011) utilizando o fabricante INFO HBsAg[®] (Dispositivos Médicos, Turquia) (100%) e por Randrianirina e colaboradores (2008) empregando os testes Determine[®] (Inverness Biomedical Innovations, Alemanha); Virucheck[®] (Orchid Biomedical Systems, Índia); HBsAg dipstick[®] (Cypress Diagnostics, Bélgica) e Hexagon[®] (Fenix Medical Solutions, República da Bielorrússia) (100%, 98,2%, 96,3% e 96,3%, respectivamente).

O teste rápido Vikia HBsAg[®] (Biomérieux) apresentou melhor desempenho no estudo de campo, assim como observado no painel de referência. O desempenho deste teste foi melhor em amostras de soro e na população de centros de referência, o que pode ter ocorrido devido à possíveis diferenças na composição do ensaio em comparação aos outros testes rápidos avaliados ou, à maior concentração de antígenos e anticorpos presentes em amostras de soro em relação às amostras de sangue total e saliva. Lien e colaboradores (2010) também demonstraram excelente desempenho do teste rápido Serodia[®] (Fujirebio, Japão) (96,65%); Dainascreen HBsAg[®] (Abbott laboratorries, Estados Unidos da América) (100%) e Determine[™] (Inverness Biomedical Innovations, Alemanha) (100%) para detecção de HBsAg em

população de voluntários de alta vulnerabilidade obtidos de hospitais e clínicas no Vietnã, empregando amostras de soro.

O desempenho dos testes rápidos para detecção do HBsAg foi inferior na população com baixa prevalência. De modo contrário, Bottero e colaboradores (2013) obtiveram altos valores de concordância para os testes rápidos Vikia HBsAg[®] (Biomérieux, França), Determine[™] (Inverness Biomedical Innovations, África do Sul) e Quick profile (Lumiquick, Estados Unidos da América) em indivíduos da população geral na França. Em nossas análises, observamos melhores desempenhos dos testes rápidos em amostras com maiores valores de DO/PC. Esses achados podem justificar os resultados encontrados na população de Baixa prevalência, uma vez que as amostras falso negativas apresentaram baixos valores médios de DO/PC ($2,82 \pm 1,19$) em comparação à $79,00 \pm 2,94$ dos verdadeiros positivos em todos os testes rápidos analisados). Essa baixa concentração de antígenos poderia explicar o número de falso negativos encontrados.

Os testes rápidos para detecção do HBsAg apresentaram boa concordância com EIE no grupo com alta vulnerabilidade (79,62% para o fabricante Biomérieux, 72,13% para o fabricante Wama e 65,85% para o fabricante Doles). Lau e colaboradores (2003) também observaram boa concordância do teste rápido AMRAD ICT[®] (French Forest, NSW, Austrália) para detecção de HBsAg em um população de indivíduos encarcerados (97,15%), porém os valores foram superiores ao encontrados no presente estudo. Isto pode ter ocorrido devido às diferenças entre os testes rápidos avaliados ou na prevalência de HBsAg nas duas populações. Até o presente momento, foram encontrados poucos estudos de avaliação de testes rápidos para detecção de HBsAg em profissionais de beleza ou usuários de crack.

A detecção do HBsAg em amostras de sangue total pelo teste rápido Vikia HBsAg[®] também foi avaliada, visto que este era o único ensaio que permitia o emprego deste tipo de amostra. Foi possível observar maior concordância de resultados entre o teste rápido realizado em sangue total e o resultado na amostra de soro correspondente no EIE no grupo de alta endemicidade (72,73%) e naquele com alta vulnerabilidade (79,75%) em comparação ao grupo de indivíduos de Baixa prevalência, onde o teste não conseguiu detectar os verdadeiros positivos. De modo contrário, testes rápidos de detecção de HBsAg apresentaram concordância maior que 90% em estudo realizado com voluntários do Vietnã e Madagascar (Lien et al. 2000; Randrianirina et al., 2008). Entretanto, nestes estudos o teste rápido Vikia HBsAg[®] não foi empregado, o que pode explicar estas diferenças. Nossos

resultados demonstram que o teste rápido Vikia HBsAg[®] em sangue total poderia ser utilizado em estudos de prevalência em áreas de difícil acesso e/ou com recursos escassos, porém não apresentam bom desempenho para uso diagnóstico, uma vez que não foi possível detectar os verdadeiros positivos em população de baixa prevalência.

O teste rápido de detecção de HBsAg obteve menor número de resultados concordantes com EIE em amostras de sangue total em comparação ao soro, provavelmente devido a menor concentração de antígeno no primeiro fluido biológico. Outra explicação deste menor desempenho do teste pode ser o uso de sangue total obtido por punção venosa em tubos com anticoagulante que poderia interferir na ligação antígeno-anticorpo. Siedner e colaboradores (2004) observaram que o uso de sangue por punção capilar obteve maiores valores de concordância com o teste padrão ouro para detecção de sífilis em comparação ao uso de sangue total obtido por punção venosa em tubos com anticoagulante. O presente estudo fez a avaliação utilizando sangue total obtido por punção venosa em tubos com anticoagulante, por outro lado o estudo de Bottero e colaboradores (2013), obteve sangue total por punção venosa em tubos sem anticoagulante, essa diferença, então, pode ter gerado melhores resultados no estudo da França em comparação com o presente estudo.

No presente estudo, os testes rápidos para detecção de HBsAg também foram avaliados em amostras de saliva, onde o melhor desempenho foi observado utilizando o teste rápido do fabricante Wama, entretanto, alto número de resultados falso negativos foram observados. A alta frequência de resultados falso negativos pode ter ocorrido devido à baixa concentração de HBsAg neste tipo de fluido (Parry, 1987). O uso da saliva facilita a coleta de amostra principalmente em indivíduos com acesso venoso difícil e o HBsAg já foi detectado pelo EIE neste tipo de amostra (Hutse *et al* 2005; Amado *et al* 2006; Cruz *et al* 2011; Scalioni *et al* 2013). Entretanto, adaptações no protocolo comercial devem ser realizadas a fim de aumentar a eficiência do teste. No presente estudo, o volume de saliva foi aumentado no teste rápido para detecção de HBsAg, porém outras modificações podem ser necessárias para aumento da eficiência do ensaio, como aumento do tempo de leitura.

A detecção de anti-HBs por teste rápido também foi avaliada no presente estudo, porém baixos valores de concordância com o EIE foram observados, independente do perfil de endemicidade da população estudada. Bottero e

colaboradores (2013) utilizando amostras de sangue total e El-Ghitany & Farghaly (2013) utilizando amostras de soro também observaram baixos valores de sensibilidade de testes rápidos para detecção de anti-HBs em indivíduos da França (Quick Profile, Lumiquick, USA) (58,08%) e do Egito (Advanced Qualitytmonestep Test, Intec Products, China) (64,2%), respectivamente. Por outro lado, altos valores de especificidade do teste rápido para detecção de anti-HBs foram observados no presente estudo, assim como na França (97,8%) e no Egito (95,08%), demonstrando que o teste apresenta bom desempenho para identificação dos verdadeiros negativos.

O teste rápido para detecção de anti-HBs apresentou maior número de resultados falso negativos nas amostras com baixos valores de DO/PC no EIE ou com baixos títulos de anticorpos (abaixo de 100 UI/L), do mesmo modo que o observado por El-Ghitany & Farghaly (2013), demonstrando que os testes podem ser úteis para triagem de indivíduos com alta reatividade para anti-HBs. O teste rápido para detecção de anti-HBs também apresentou melhor desempenho nos indivíduos que apresentavam infecção prévia quando comparados aos indivíduos com resposta vacinal. Essa diferença pode ter ocorrido devido a menor concentração de títulos de anticorpos relacionados à vacina de acordo com diferentes situações, tais como: local de aplicação da vacina, menor intervalo de tempo entre segunda e terceira dose, idade de aplicação, uma vez que indivíduos acima de 40 anos apresentam redução na soroconversão, e também pelo declínio de títulos de anticorpos em grande número de indivíduos após 9-11 anos da vacinação (Focaccia 2013).

Em relação ao marcador anti-HBe, somente um estudo foi realizado previamente para avaliar o desempenho dos testes rápidos na detecção deste marcador (El-Ghitany & Farghaly 2013). No presente estudo, o teste rápido para detecção de anti-HBe apresentou melhor desempenho em população com alta endemicidade (65,36%), o que pode ter ocorrido devido à característica desta população, onde muitos dos indivíduos com resultados concordantes podem já ter tido a infecção ou serem portadores crônicos. El-Ghitany & Farghaly (2013), no Egito observaram concordância de 90% para detecção de anti-HBe por teste rápido, este alto valor de concordância pode ter ocorrido devido às diferenças nos testes rápidos empregados (teste Advanced Qualitytmonestep Test, Intec Products, China por El-Ghitany & Farghaly, 2013 e Imunorápido anti-HBe, Wama, Brasil, no presente estudo) ou no padrão ouro utilizado (EIE no estudo do Egito e ECLIA no presente

estudo). O desempenho do teste rápido para anti-HBe também foi maior em indivíduos com maior concentração de anticorpos no presente estudo, o que não foi observado por El-Ghitany & Farghaly (2013), provavelmente devido ao teste padrão ouro utilizado em seu estudo (EIE).

No presente estudo, os testes rápidos para detecção de anti-HBs e anti-HBe apresentaram baixos valores de sensibilidade em comparação com os valores descritos na bula do fabricante (100% em ambos os casos), o que demonstra a necessidade de avaliação de testes rápidos em grupos com diferentes perfis de endemicidade antes do seu uso em larga escala.

O desempenho dos testes rápidos para detecção de HBsAg foi avaliado em relação à reatividade para outras infecções, onde o melhor desempenho foi obtido em amostras reativas para dengue, provavelmente devido à ausência de amostras HBsAg reativas ou ao baixo número de amostras avaliadas. Na análise do desempenho dos testes rápidos para HBsAg em amostras reativas para *T. pallidum*, HIV e HCV, amostras HBsAg falso negativas e positivas foram observadas em todos os casos.

Esses resultados podem sugerir interferência na detecção do HBsAg pelos testes rápidos em decorrência da presença de outras infecções. Entretanto, Davies e colaboradores (2010) e Franzeck e colaboradores (2013) observaram maiores valores de concordância de testes rápidos para detecção de HBsAg em amostras com sorologia reativa para HIV, porém outro fabricante foi empregado, o que poderia explicar as diferenças observadas no presente estudo.

Os testes rápidos para detecção de HBsAg apresentaram excelente repetitividade e reprodutibilidade em amostras de soro e saliva artificialmente contaminadas, demonstrando bom desempenho dos ensaios em condições laboratoriais.

Em geral, os testes rápidos apresentam diferenças de sensibilidade em estudos realizados em diferentes países, o que pode estar relacionado com uma deficiência de detecção de genótipos e/ou subgenótipos do HBV nos testes (Bjoerkvoll et al., 2010; El-Ghitany & Farghaly 2013). Este fato também pode explicar a diferença dos valores de sensibilidade entre o presente estudo e os realizados em outros países. Além disso, observamos grande heterogeneidade entre os estudos em relação à região geográfica, grupo de pacientes incluídos, tipo de teste rápido empregado e padrão ouro utilizado, o que impede melhor comparação entre os estudos disponíveis.

Scheiblaue e colaboradores (2010) avaliaram 70 testes de detecção de HBsAg, entre EIes e testes rápidos, onde os EIes apresentaram maior eficiência e os testes rápidos tiveram baixos valores de sensibilidade em amostras com baixas concentrações de HBsAg. Apesar disto, testes rápidos de detecção de HBsAg tem sido utilizados em áreas com poucos recursos, tal como Camboja, onde a prevalência de HBsAg foi igual a 3,5% em menores de 5 anos, frequência comparável a outros estudos de prevalência realizados na região (Soeung et al 2009). Estes resultados demonstram que o teste rápido pode ser uma ferramenta útil em áreas com infraestrutura mínima e baixos recursos para a realização de estudos de prevalência da infecção pelo HBV, mesmo que ainda existam limitações nos testes.

Em resumo, o presente estudo demonstrou boa aplicabilidade dos testes rápidos para detecção do marcador HBsAg para fins de estudo epidemiológico, especialmente do teste Vikia HBsAg® (Biomérieux) em amostras de soro. Por outro lado, os testes rápidos para detecção dos marcadores anti-HBs e anti-HBe não apresentaram desempenho satisfatório. O teste rápido para detecção do marcador anti-HBs poderia ser utilizado em estudos de triagem de imunidade em áreas de difícil acesso e/ou com recursos escassos.

7. CONCLUSÕES

- Os testes rápidos para detecção de HBsAg de três fabricantes distintos (Biomérieux, Wama e Doles) apresentaram excelente desempenho em amostras de soro do painel de referência, indicando que os mesmos podem ser utilizados neste tipo de amostra;
- No estudo de campo, o teste rápido para detecção do HBsAg do fabricante Biomérieux apresentou melhor desempenho, em especial em indivíduos do grupo de centros de referência, utilizando amostras de soro, de modo que poderia ser útil para o diagnóstico nesta população;
- O teste rápido para detecção de HBsAg apresentou bom desempenho em amostras de sangue total para emprego em estudos de prevalência, porém não poderia ser empregado para o diagnóstico da infecção pelo HBV;
- A detecção do HBsAg em amostras de saliva pelos testes rápidos não apresentou boa eficiência, porém o tipo de saliva empregado e a execução do ensaio precisam ser adaptados para melhor desempenho do ensaio;
- O teste rápido para detecção de anti-HBs em amostras de soro apresentou baixa concordância com EIE, porém resultados mais eficientes foram observados em amostras com altos títulos de anticorpos ou em indivíduos com evidência sorológica de infecção pregressa pelo HBV (anti-HBc e anti-HBs reagente), demonstrando que o teste poderia ser utilizado para identificação de anti-HBs em indivíduos com este perfil.
- O teste rápido de detecção do marcador anti-HBe apresentou baixa concordância em relação ao ECLIA, especialmente em populações com menor prevalência de HBV, de modo que o teste poderia ser empregado somente na triagem de indivíduos provenientes de áreas de alta endemicidade.
- Os testes rápidos para detecção de HBsAg apresentaram excelente desempenho na análise de repetitividade e reprodutibilidade em amostras de soro e saliva

artificialmente contaminadas, demonstrando que os mesmos possuem boa eficiência em condições laboratoriais.

- O desempenho dos testes rápidos na detecção do HBsAg foi excelente em amostras reativas para o vírus dengue, porém resultados falso positivos e falso negativos foram observados em amostras com sorologia reativa para *Treponema pallidum*, HIV, HCV, indicando que os testes podem apresentar menor eficiência em indivíduos coinfectados por estes agentes infecciosos.

8. PERSPECTIVAS

- Determinar a interferência de infecções por outros agentes etiológicos no desempenho de testes rápidos para detecção de anti-HBs e anti-HBe
- Avaliar a repetitividade e reprodutibilidade dos testes rápidos para detecção dos marcadores anti-HBs e anti-HBe;
- Avaliar o custo-efetividade dos testes rápidos para detecção dos marcadores HBsAg, anti-HBs e anti-HBe em comparação a técnicas convencionais de diagnóstico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional De Águas, 2007. Projeto GEF: Pantanal/ Alto Paraguai, Disponível em: <http://www.ana.gov.br/gef/graficos/mapaGEF.jpg>. Acesso em: 13 maio de 2009.

Alter HJ. 2003. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. *J Hepatol* 39: 149-152.

Altman DG. Practical Statistics for Medical Research. *London: Chapman and Hall*, 1991.

Amado L.A, Villar LM, de Paula VS, de Almeida AJ, Gaspar AMC. 2006. Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 10(2): 149-155.

Barros GMJ, Braga WSM, Oliveira CMC, Castilho MC, Araújo JR. 2008. Hepatite crônica B oculta: prevalência e aspectos clínicos em população de elevada endemicidade de infecção pelo vírus da hepatite B na Amazônia ocidental brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop* 41(6): 596-601.

Bartenschlager, R. & Schaller, H. 1992. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO Journal* 11: 3413-3420.

Bastos FI, Lowndes CM, Derrico M, Castello-Branco LR, Linhares-de-Carvalho MI, Oelemann W, Bernier F, Morgado MG, Yoshida CF, Rozental T, Alary M. 2000. Sexual behaviour and infection rates for HIV, blood-borne and sexually transmitted infections among patients attending drug treatment centers in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J STD AIDS* 11: 383-392.

Beasley RP, Whang LY. 1991. Overview on the epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HM, editors. *Proceedings of the 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins. 532-5 pp.

Befeler AS & Di Bisceglie AM. 2000. Hepatitis B. *Infectious Disease Clinics of North America* 14:617-632.

Bjoerkvoll B, Viet L, Ol HS, Lan NT, Sothy S, Hoel H, Gutteberg T, Husebekk A, Larsen S, Husum H. 2010. Screeningtest accuracy among potential blood donors of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV to detect hepatitis B and C virus infection in rural Cambodia and Vietnam. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 41 (5): 1127–1135.

Blogmundopossivel.com.br [homepage on the Internet]. Usuários de crack. [Citado em: 28/08/2013] Disponível em: www.blogmundopossivel.com.br

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich A. 1965. A “new” antigen in leukemia sera. *JAMA* 191: 541-546.

Blumberg BS. 2006. The Curiosities of Hepatitis B Virus, Prevention, Sex Ratio, and Demography. *Proc Am Thor Soc* 3: 14-20.

Bottero J, Boyd A, Gozlan J, Lemoine M, Carrat F, Collignon A, Boo N, Dhotte P, Varsat B, Muller G, Cha O, Picard O, Nau J, Campa P, Silbermann B, Bary M, Girard PM, Lacombe K. 2013. Performance of rapid tests for detection of HBsAg and Anti-HBsAb in a large cohort, France. *J. Hepatol* S0168-8278

Braga, WSM, Brasil LM, de Souza RAB, de Melo MS, Rosas MDG, Castilho MC, Fonseca JCF. 2004. Prevalência da infecção pelos vírus da hepatite viral crônica B (VHB) e da hepatite Delta (VHD) em Lábrea, Rio Purus, Estado do Amazonas. *Epidemiol Serv Saúde* 13(1):35-46.

Bruss V & Ganem D. 1991. Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. *J Virol* 65(7):3813–3820.

BVSMS. *Testes rápidos: considerações gerais para seu uso com ênfase na indicação de terapia anti-retroviral em situações de emergência*. Unidade de Assistência, Unidade de Laboratório e Rede de Direitos Humanos da Coordenação

Nacional de DST/Aids Ministério da Saúde. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/61testes_rapidos.pdf

Caetano MM & Beck ST. 2006. Importância da detecção de anticorpos anti-HBc na prevenção da transmissão do vírus da hepatite B (VHB) em bancos de sangue. *RBAC* 38(4):235-7.

Carneiro de Moura M. *Hepatites víricas. Bases científicas e prática clínica*. Lisboa: Pernmayer Portugal, 1997

CDC. 2005. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports. *A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection in the United States*. December 23, 2005 / Vol. 54 / No. RR-16. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5416.pdf>

CDC. 2012. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. Atkinson W, Hamborsky J, Wolfe S, eds. 12th ed., second printing. Washington DC: Public Health Foundation.

Chávez, JH, Campana, SG, Hass, P. 2003. Panorama da hepatite no Brasil e no estado de Santa Catarina. *Revista Panamericana de Salude Publica* 14(2): 91-96.

Chemin I, Jeantet D, Kay A, Trepo C. 2001. Role of silent hepatitis B virus in chronic hepatitis B surface antigen(-) liver disease. *Antiviral Res* 52:117-123.

Chemin I & Trepo C. 2005. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol* 34(1):S15-21.

Clemens SAC, Da Fonseca JC, Azevedo T, Cavalcanti A, Silveira TR, Castilho MC, Clemens R. 2000. Soroprevalência para a hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 33(1):1-10

Clement F, Dewint P, Leroux-Roels G. 2002. Evaluation of a New Rapid Test for the Combined Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen and Hepatitis B Virus e Antigen. *J. Clin. Microbiol* 40 (12): 4603–4606

Cougot D, Neuveut C, Buendia MA 2005. HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol* 34 (1):S75-78.

Crowther J.R. 2001. *The EIE guidebook: Methods in molecular biology*. v149. Humana Press. Totowa, New Jersey.

Cruz HM, da Silva EF, Villela-Nogueira CA, Nabuco LC, do Ó KM, Lewis-Ximenez LL, Yoshida CF, Lampe E, Villar LM. 2011. Evaluation of Saliva Specimens as an Alternative Sampling Method to Detect Hepatitis B Surface Antigen. *J Clin Lab Anal* 25: 134–141.

Cruz MS, Andrade T, Bastos FI, Leal E, Bertoni N, Villar LM, Tiesmaki M, Fischer B. 2013. Key drug use, health and socio-economic characteristics of young crack users in two Brazilian cities. *Int J Drug Policy* 24(5):432-8.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet* 1:695-698. Davies J, van Oosterhout JJG, Nyirenda M, Bowden J, Moore E, Hart IJ, Zijlstra EE, Chaponda M, Faragher B, Beeching NJ, Beadsworth MJB. 2010. Reliability of rapid testing for hepatitis B in a region of high HIV endemicity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104: 162–164

de Araújo ESA. 2008. *ABC das hepatites: manual clínico para o manuseio, terapia e prevenção da hepatite B*. Editora: Bristol- Myers Squibb Farmacêutica S.A.

de Araújo, ACO. 2011. *Nova abordagem para expressão da partícula sSHBsAg do antígeno HBsAg do vírus da hepatite B em células de inseto*. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 81 pp

de Franchis R, Hadengue A, Lau G, Lavanchy D, Lok A, McIntyre N, Mele A, Paumgartner G, Pietrangelo A, Rodes J, Rosenberg W, Valla D 2003. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. *J Hepatol* 39 (1):S3-25.

de Matos, MAD. 2007. *Estudo epidemiológico e molecular da infecção pelo vírus da hepatite B em Afrodescendentes de comunidade isolada no Estado de Goiás (Kalungas)*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia-go. 149 p.

de Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Coelho HS, Franz HC, Saraiva JC, Virgolino HA, Motta-Castro AR, Melo MM, Martins RM, Gomes SA. 2007. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol.* 7:103.

de Mendonça, JS; VIGANI, AG. 2006. História Natural da Hepatite B Aguda e Crônica. *The Brazilian J Infec Dis* 10(1): 15-18.

de Oliveira ACDS & Focaccia R. 2010. Survey of hepatitis B and C infection control: procedures at manicure and pedicure facilities in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect* 14 (5).

Destakjornal.com.br [homepage on the Internet]. LACEN Pernambuco [Citado em: 23/08/2013] Disponível em: <http://www.destakjornal.com.br/noticias/recife/ministerio-da-saude-repassa-r-6-milhoes-para-o-lacen-pe-173416/>

Dienstag JL. 2008. Hepatitis B Virus Infection. *N Engl J Med* 359:1486-500.

Diogo FV, Souza VA da SM, Diogo FL, Chavasco JK. 2012. Estudo da soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B entre os doadores de sangue do Núcleo Hemoterápico da Santa Casa de Alfenas (Alfenas/MG) por meio do marcador anti-HBc. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde* 14(2): 59-64

Echavarria JM, Avellon A, Magnus LO. 2005. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: Identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J Med Virol* 76: 176-184.

El-Ghitany EM & Farghaly AG. 2013. Evaluation of commercialized rapid diagnostic testing for some Hepatitis B biomarkers in an area of intermediate endemicity. *J Virol Methods* 194:190-193

Enfermagemcomentada.blogspot.com.br [homepage on the Internet]. Coleta de sangue. [Citado em: 38/05/2013] Disponível em: <http://enfermagemcomentada.blogspot.com.br/2007/08/coleta-de-sangue.html>

FDA. 1987. Food and drug administration. *Management of Donors & Units initially reactive for HBsAg*. Office of Biologics Research and Review.

Feitelson MA, Duan LX 1997. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 150:1141-1157.

Ferreira CT & Silveira TR. 1997. Hepatites Virais: Atualização. *J. Pediatr* 73(6): 367-376.

Ferreira, MS. 2000. Diagnóstico e tratamento da Hepatite B. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 33(4): 389-400.

Ferreira RC. 2008. *Infecção pelo vírus da hepatite B em usuários de drogas ilícitas na região Centro-Oeste do Brasil: Aspectos epidemiológicos e moleculares*. Tese de Doutorado. Universidade Federal De Goiás, Instituto De Patologia Tropical E Saúde Pública, Programa De Pós-Graduação Em Medicina Tropical. Goiania, GO, 112 p

Findlay GM, MacCallum FO. 1937. An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viroses. *J. Path. Bact* 44(2):405-424.

Focaccia R, da Conceição OJ, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lorenço R, Vieira SF, Kiffer CR, Santos EB, Gonzales MP, Sáez-Alquézar A, Riscal JR, Fischer D. 1998. Estimated prevalence of viral hepatitis in general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Braz. J. Infect Dis* 2: 269-84.

Focaccia R. 2013. *Tratado de hepatites virais e doenças associadas*. 3. Ed. Editora Atheneu, São Paulo.

Fonseca, JCF. 2010. Histórico das hepatites virais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* v.43, n. 3.

Franzeck C, Ngwale R, Msongole B, Hamisi M, Abdul O, Henning L, Letang E, Mwaigomole G, Battegay M, Hatz C, Tanner M. 2013. Viral Hepatitis and Rapid Diagnostic Test Based Screening for HBsAg in HIV-infected Patients in Rural Tanzania. *PLoS ONE* 8(3): e58468.

Freitas J. 2009. Hepatites Víricas: Perspectiva histórica. Disponível em: <<http://www.aidsportugal.com/hepatites@53.aspx>> acessado em 01 de dez de 2013.

Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M, Hamamoto S, Satoh S, Tanaka S, Kushiyama Y, Uchida Y, Iihara S, Akagi S, Watanabe M, Kinoshita Y 1999. Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance. *J Med Virol* 58: 201-207.

Ganem D & Vermus HE. 1987. Molecular biology of hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 56 :651-693.

Ganem D. 1996. Hepadnaviridae and their replication. In: Fields BN.; Kipe DM., Howwley, P.N., Chanock, RM, Melnick, JM, Monatha, TP, Roizman, B., Strauss, SE. *Virology*. 2ª edição. Editora: lippincot-raven. Cap. 85, p. 2703-2737.

Ganem, D & Schneider RJ. 2001. Hepadnaviridae: the viruses and their replication, p. 2923-2969. In Knipe D M. & Howley PM. editores, Fields *Virology*, 4ª ed., v. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

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

Gerelsaikhan T., Tavis JE., Bruss V. 1996. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *Journal of Virology* 70: 4269-4274.

Gerlich WH, Bremer C, Saniewski M, Schüttler CG, Wend UC, Willems WR, Glebe D. 2010. Occult Hepatitis B Virus Infection: Detection and Significance *Immunology and Liver Disease* 28:116-125

Grosheide P. & van Damme P. 1996. Prevention and control of hepatitis B in the community. In: HALLAUER, J. et al. *Communicable Disease Series*, 1.

Gunter S 2006. Genetic variation in HBV infection: genotypes and mutants. *J Clin Virol* 36(1): S3-S11.

Hollinger FB. 1994. The five viruses: a perspective. AASLD Postgraduate Course "Viral hepatitis A to F: An Update", p 2-20.

Hollinger FB. 1996. Hepatitis B virus. In: Fields BN.; Kipe DM., Howwley, P.N., Chanock, RM, Melnick, JM, Monatha, TP, Roizman, B., Strauss, SE. *Virology*. 2ª edição. Editora: lippincot-raven cap 86, p. 2739-2807.

Hollinger FB & Liang TJ. 2001. Hepatitis B virus. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. 4ª edição Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. pp. 2971-3036

Hoofnagle, JH & DI Bisceglie AM. 1991. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Seminars of Liver Disease*. v. 11: 73-83

Hou J, Liu Z, Gu F 2005. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2:50-57.

Hu HQ. 2002. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 9: 243–257.

Hutse V, Verhaegen E, de Cock L, Quoilin S, Vandenberghe H, Horsmans Y, Michielsens P, VAN Dame P, VAN Vlierberghe, H, Claeys F, Vranckx, R, VAN Oyen, H. 2005. Oral fluid as a medium for the detection of Hepatitis B surface antigen. *J Med Virol* 77: 63-56.

IBGE. 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Censo demográfico 2010. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/ioc.com> [homepage on the Internet]. Ambulatório de Hepatites Virais [Citado em: 23/08/2013] Disponível em: www.ioc.fiocruz.br

Juszczak J. 2000. Clinical course and consequences of hepatitis B infection. *Vaccine* 18(1): 23-25.

Kao JH. 2002. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 17:643-650.

Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH 2002. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 83:1267-1280.

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

Lau DTY, Ma, H, Lemon SM, Doo E, Ghany MG, Miskovsky E, Woods GL, Park Y, Hoofnagle JH. 2003. A rapid immunochromatographic assay for hepatitis B virus screening. *Journal of Viral Hepatitis* 10, 331–334

Liaw Y-F, Sung JJY, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Tanwandee HYT, Tao QM, Shue K, Pharm MRS, Oliver NK, Dixon JS, Gray F, Sabbat J. 2004. Lamivudine for Patients with Chronic Hepatitis B and Advanced Liver Disease. *N Engl J Med* 351:1521-31.

Liberto, MIM & Oliveira, BCEPD. 2002. Hepatites Virais. In: Santos, NSO; Romanos, MT; *Introdução à virologia humana*. Editora: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 135-155.

Lien TX, Tien NTK, Chanpong GF, Cuc CT, Yen VT, Soderquist R., Laras K., Corwin A. 2000. Evaluation of rapid diagnostic tests for the detection of Human Immunodeficiency Virus types 1 and 2, hepatitis B surface antigen, and Syphilis In Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 62(2): 301–309

Lin CL & Kao JH. 2011. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J of Gastr and Hep* 26 S1: 123–130

Lindenberg A de SC, Motta-Castro ARC, Puga MA, Tanaka TSO, Torres MS, Fernandes-Fitts SM, Cunha RV. 2013. Decrease in hepatitis B prevalence among blood donors in Central-West Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19:7

Locarnini S. 2004. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 24 1:3-10.

Lok, ASF & McMahon BJ. 2001. Chronic hepatitis B. *Hepatology*.34: 1225-1241.

Lopes, TGSL & Schinoni MII. 2011. Aspectos gerais da hepatite B. *R. Ci. med. Biol.* 10 (3): 337-344.

Locarnini S & Omata M 2006. Molecular virology of hepatitis B virus and the development of antiviral drug resistance. *Liver International* 26: 11-22

Magnius LO & Espmark JA. 1972. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand* 80: 335-337.

Mahoney FJ. 1999. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 12:351-366.

Martínez-Lamas L, Calviño JJR, García BJR, Guirao AA. 2011. Evaluación de um test rápidominmunocromatográfico para la detección del antígeno de superficie de la hepatitis B. *Rev Esp Quimioter* 24(3):164-165

Maynard, JE. 1990. Hepatitis B: global importance and head for control. *Vaccine* 8(1): 18-20.

Miguel, JC. 2005. *Avaliação da imunogenicidade de vacina recombinante brasileira (Butang) contra hepatite B entre crianças do Rio de Janeiro*. Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 87pp.

Ministério da Saúde. 2002. Secretaria de Políticas de Saúde. Programa Nacional de Hepatites Virais. *Hepatites Virais: o Brasil está atento* / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Programa Nacional de Hepatites Virais. Editora MS, Brasília.

Ministério da Saúde. 2003. *30 anos do PNI/CGPNI/DEVEP/SVS*. Editora MS, Brasília.

Ministério da Saúde. 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de aconselhamento em hepatites virais* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora: MS, Brasília.

Ministério da Saúde. 2008. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Hepatites virais: o Brasil está atento* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3. ed. Editora MS, Brasília.

Ministério da saúde. 2009. Teste rápido para detecção de HIV. PORTARIA Nº 151 de 14 de Outubro de 2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2009/prt0151_14_10_2009.html

Ministério da Saúde. 2010a. Secretaria-Executiva. Departamento de Apoio à Gestão Descentralizada. *Pactuação unificada de indicadores: avaliação 2007* / Ministério da Saúde, Secretaria-Executiva, Departamento de Apoio à Gestão Descentralizada. Editora: MS, Brasília. 174 p.

Ministério da Saúde. 2010b. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de vigilância epidemiológica. Editora MS. 8ª ed. 448 p.

Ministério da Saúde. 2010c. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. *Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o*

tratamento da hepatite viral crônica B e coinfeccões / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Editora MS, Brasília. 112 p.

Ministério da saúde 2010d. Parecer Técnico Nº 042010/CGPNI/DEVEP/SVS/MS e DST AIDS e Hepatites Virais/SVS/MS. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/page/2010/grupos_de_maior_vulnerabilidade_e_22484.pdf.

Ministério da Saúde. 2012. *Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais*. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais Ed. Premium, Brasília. Ano III - nº 1. 176 p.

Ministério da saúde. 2013a. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Hepatites Virais, Hepatite B. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-b>. acessado em 01/12/2013.

Ministério da saúde. 2013b. Teste rápido para detecção de hepatite C. PORTARIA Nº 730, de 2 de Julho de 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0730_02_07_2013.html

Miyakawa Y, Mizokami M. 2003. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 46:329-338

Mluisaflops.blogspot.com.br [homepage on the Internet]. Profissionais de beleza. [Citado em: 28/08/2013] Disponível em: www.mluisaflops.blogspot.com

Moraes JT, Barbosa FI, Costa TRS, Ferreira AF. 2012. Hepatite B: conhecimento dos riscos e adoção de medidas de biossegurança por manicures/pedicures de Itaúna-MG. *R. Enferm. Cent. O. Min* 2(3):347-357.

Moyer LA & Mast EE. 1994. Hepatitis B: virology, epidemiology, diseases and prevention: an overview of viral hepatitis. *Am. J. Prevent. Med.* 10: 45-54.

Nalpas B, Berthelot P, Thiers V, Duhamel G, Courouce AM, Tiollais P, Brechot C. 1985. Hepatitis B virus multiplication in the absence of usual serological markers. A study of 146 chronic alcoholics. *J Hepatol* 1:89-97.

Nicepinheiro.blogspot.com [homepage on the Internet]. Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ [Citado em: 23/08/2013] Disponível em: www.nicepinheiro.blogspot.com

Nunes HM, Monteiro RCC, Soares MCP. 2007. Prevalência dos marcadores sorológicos dos vírus das hepatites B e D na área indígena Apyterewa, do grupo Parakanã, Pará, Brasil. *Cad Saúde Pública* 23 (11): 2767-79.

Park W & Keefe B. 2005. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B. *Minerva gastroenterol Dietol* 50: 289-303.

Parry, JV, Perry KR, Mortimer PP. 1987. Sensitive tests for viral antibodies in saliva; an alternative to tests on serum. *Lancet* v.2, p. 72–75.

Pawlotsky JM. 2003. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *J Hepatol* 39 (1):31-35.

Perkins JA. 2002. Medical and Scientific illustrations. Disponível em: <http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>).

Portal Saúde. 2012. Ministério da Saúde Núcleo de Comunicação. Secretaria de Vigilância em Saúde. *CLIPPING SVS 68 matérias- 26 de julho de 2012 – quinta-feira.* 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/26072012.pdf>. Acessado em: 07/08/2013

Prati D, Gerosa A, Porretti L 2006. Occult HBV infection and blood transfusion. *J Hepatol* 44:818-819.

Prince AM. 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Nat Acad Sci* 60:814-819.

Pt.wikipedia.org [homepage on the Internet]. Mapa da localização do município de Petrópolis [Citado em: 23/08/2013] Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Petrópolis>

Pt.wikipedia.org [homepage on the Internet]. Mapa da localização do município de Macaé [Citado em: 23/08/2013] Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Macaé>

Pt.wikipedia.org [homepage on the Internet]. Mapa da localização do município de Tocantinópolis [Citado em: 23/08/2013] Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Tocantinópolis>

Purcell RH & Gerin JL. 1996. Hepatitis delta virus. In: Fields et al, Fieds *Virology*, 3^a ed. 87(2): 2819-2829.

Pyrsoopoulos, NT. 2011. Hepatitis B. Medscape Reference. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/177632-overview>>. Acessado em: 25 maio 2013.

Qiagen.com [homepage on the Internet]. Replicação do HBV. [Citado em: 38/05/2013] Disponível em: <http://www.qiagen.com/geneglobe/static/images/Pathways/HBV%20Replication%20Cycle.jpg>

Randriamina, F. Carod, JF; Ratsima E, Chrétien JB; Richard V; Talarmin A. 2008. Evaluation of the performace of four rapid tests for detection of hepatitis B surface antigen in Antananarivo, Madagascar. *J Virol Methods* 151: 294-297.

Rapicetta M, Ferrari C, Levrero M 2002. Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection. *J Med Virol* 67:454-457.

Reuben A. 2002. Landmarks in hepatology: the thin red line. *Hepato*l 36:770-773.

Robertson BH, Margolis HS. 2002. Primate hepatitis B viruses - genetic diversity, geography and evolution. *Rev Med Virol* 12(3): 133-41.

Santos GEO. Cálculo amostral: calculadora on-line. Available from: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acessado em: 19/12/2012.

Scalioni LP, Cruz HM, de Paula VS, Oliveira JC, Santos RT, Motta-Castro ARC, Murat PG, Villela-Nogueira CA, Lewis-Ximenez LL, Lampe E, Villar LM. 2013. Importance of Collection Methods and Stability of Oral Fluid Samples for Hepatitis B Surface Antigen Detection. *J. Clin. Lab. Anal* 00: 1–9

Schaefer S 2005. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 12: 111-124

Scheiblaue H, El-Nageh M, Diaz S, Nick S, Zeichhardt H, Grunert HP, Prince A, 2010. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. *Vox Sanguinis* 98, 403–414

Scimart.com [homepage on the Internet]. Etapas da coleta de saliva utilizando o coletos Salivette. [Citado em: 38/05/2013] Disponível em: <http://www.scimart.com/product/detail/salivette-cotton-swab-wo-prep-100pack>

Sherlock, S. 1990. Hepatitis B: the disease. *Vaccine*. 8 (suppl): S6-9

Schimid R. 1994. Viral hepatitis: Some Historical Perspectives. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, editors. *Viral Hepatitis and Liver Disease* p.1-7.

Seeff LB, Beebe GW, Hoofnagle JH, Norman JE, Buskell-Bales Z, Waggoner JG, et al. 1987. A serologic follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army. *New England J Med* 316: 965-970.

Seeger C, Ganem D, Varmus HE 1986. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232 (4749): 477-484.

Seeger C, Mason WS 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(1):51-68.

Seeger C & Zoulim F. 2007. Hepadnaviruses. In Fields, NB. *Virology*, 5^a ed. Philadelphia: Lincott Williams & Wilkins, 2977-3029 pp.

Sempretops.com [homepage on the Internet]. Usuários de crack. [Citado em: 28/08/2013] Disponível em: www.sempretops.com

Seremba E, Ocamá P, Opio CK, Kagimu M, Yuan HJ, Attar N, Thomas DL, Lee WM. 2010. Validity of the Rapid Strip Assay Test for Detecting HBsAg in Patients Admitted to Hospital in Uganda. *J. Med. Virol* 82:1334–1340

Sherlock S. Hepatitis B: the disease. 1990. *Vaccine*. 8(S6-9): 21-23.

Siedner M, Zapitz V, Ishida M, De La Roca R, Klausner JD. 2004. Performance of rapid syphilis tests in venous and fingerstick whole blood specimens. Performance of Rapid Syphilis Tests in Venous and Fingerstick Whole Blood Specimens. *Sex Transm Dis*. 31(9):557–560

Sinan. 2013. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/> acessado em: 01/12/2013.

Soeung SC, Rani M, Huong V, Sarath S, Chea Kimly, Kohei T. 2009. Results from Nationwide Hepatitis B Serosurvey in Cambodia using Simple and Rapid Laboratory Test: Implications for National Immunization Program. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 81(2): 252–257.

Souto, FJD. 1999. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *GED gastroenterol. endosc. dig* 18(4): 143-150.

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

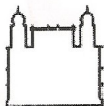
Tanaka Y, Esumi M, Shikata T. 1990. Persistence of hepatitis B virus DNA after serological clearance of hepatitis B virus. *Liver* 10:6-10.

- Tanaka, J. 2000. Hepatitis B epidemiology in Latin América. *Vaccine* 1: 17-9.
- Tavares-Neto, J, Almeida, D, Soares, M. C, Uchoa, R, Viana, S, Darub, R, Farias, E, Rocha, G, Vitvitski, L, Paraná, R. 2004. Seroprevalence of hepatitis B and C in the Western Brazilian Amazon region (Rio Branco, Acre): a pilot study carried out during a hepatitis B vaccination program. *Braz J Infect Dis* 8(2), 133-139.
- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A 1985. The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-495.
- Tourinho, RS. *Avaliação de diferentes coletores de fluido oral para detecção da resposta imune humoral contra o vírus da hepatite A e sua aplicação em estudo epidemiológico em áreas de difícil acesso*. 2001. 82f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, 2011.
- Turchi MD 2000. *Perfil de risco e estimativa de ocorrência de infecções de transmissão sanguínea ou sexual – HIV, hepatite B, hepatite C, HTLV-I/II e sífilis entre usuários de cocaína, em São Paulo*. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 152 p.
- Valente, VB.; Covas DT; Passos ADC. 2005. Marcadores sorológicos das hepatites B e C em doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, SP. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 38(6): 488-492.
- Viana S. 2005. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the Western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 73(4): 808-814.
- WHO. 2013 Hepatitis B. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> (acessado em: 03/Ago/2010).
- Who.org [homepage on the Internet]. Statistics on hepatitis B. [Citado em: 23/08/2013] Disponível em: www.who.int/immunization_monitoring/diseases/HepB_coverage.jpg
- Who.org [homepage on the Internet]. Statistics on hepatitis B. [Citado em: 23/08/2013] Disponível em: http://www.who.int/immunization_monitoring_surveillance/SlidesGlobalImmuneization

Yoshida CFT, Gaspar AMC, Lewis-Ximenes LL, Oliveira JM. 2005. Hepatites de transmissão parenteral B, Delta e C. In: Coura JR, organizador. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1725-34

ANEXO A

Protocolo de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (Parecer 498/08).



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

Rio de Janeiro, 13 de JULHO de 2009.

Carta: 063 /09

De: CEP/FIOCRUZ

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

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **498/08** intitulado **"Avaliação da performance de testes rápidos para o diagnóstico de marcadores das infecções pelos vírus das Hepatites B e C "** com a deliberação de **APROVADO**.

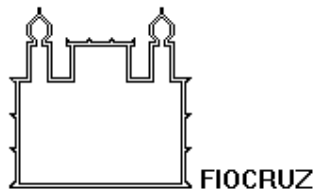
Atenciosamente


Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br

ANEXO B

Termo de consentimento Livre e esclarecido



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Projeto de Pesquisa: Padronização De Testes De Diagnóstico Da Infecção Pelos Vírus Das Hepatites B e C Em Amostras De Saliva

Pesquisador: Dra. Livia Melo Villar

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

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

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

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

Exames e procedimentos que serão realizados: o voluntário será submetido à coleta de sangue e saliva. Serão coletados 8 ml de sangue por punção venosa periférica e 1 ml de saliva utilizando um coletor comercial pelos técnicos especializados do Grupo de Atendimento para Hepatites Virais (IOC/FIOCRUZ). Também serão coletadas amostras de sangue em papel de filtro que serão coletadas por punção digital com lanceta e aplicadas em papel de filtro Whatmann 903. Alternativamente, as amostras de sangue total obtidas por punção venosa serão aplicadas em papel de filtro Whatmann 903.

Benefícios: Obter resultado de exames laboratoriais para Hepatite B e C que serão entregues acompanhados de esclarecimentos sobre o significado dos resultados de maneira confidencial. O (a) Sr. (a) também será encaminhado para unidades de saúde do Estado do Rio de Janeiro, nos casos em que o tratamento da hepatite se fizer necessário. Esta pesquisa poderá não trazer benefícios imediatos para o meu acompanhamento clínico, mas poderá auxiliar no desenvolvimento de métodos inovadores para o diagnóstico da infecção pelos vírus das hepatites B e C.

Inconvenientes: Caso seja necessário, o (a) Sr. (a) será contatado por um dos membros da pesquisa que irá perguntar se o (a) Sr. (a) está disposto a doar nova amostra de sangue. O (a) Sr. (a) estará livre para recusar esta solicitação.

Riscos potenciais conhecidos até o dia de hoje: Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou rouidão no local que serão controladas por uma coleta de sangue realizada dentro das normas de biossegurança.

Garantia de esclarecimentos: Todos os esclarecimentos sobre a metodologia da pesquisa antes e durante o desenvolvimento da mesma serão realizados pela equipe da Pesquisa.

Utilização para estudos futuros: O material biológico coletado, após exames, será estocado, podendo ser usado posteriormente, em outras pesquisas com fins semelhantes, mas somente após a avaliação, pelo Comitê de Ética em Pesquisa, que poderá dispensar a assinatura de um novo Termo de Consentimento, todavia mantendo sempre a identidade do doador em sigilo;

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

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

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

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

Assim, declaro que:

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

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

() Autorizo a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico coletado.

() Não autorizo o armazenamento da minha amostra para estudos futuros.

Os novos exames que podem ser realizados levarão mais informações sobre as hepatites virais e aspectos relacionados. Além disto, o Sr. (a) tem o direito de receber os resultados destes novos exames, caso tenha interesse, pedimos que deixe um telefone de contato: _____

Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP);

Paciente: _____ RG do paciente: _____

Sexo do paciente: () Masculino () Feminino Idade: _____ Telefone: () _____

Endereço: _____ Cidade: _____ CEP: _____ - _____

Responsável legal (quando for o caso): _____

RG do responsável legal: _____

Assinatura do paciente ou do responsável legal: _____

Pesquisador Responsável: Livia Melo Villar

RG:11403613-0/IFP

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

Laboratório de Hepatites Virais, fone 2562-1918.

(local e data)

Testemunha: _____ (nome completo)

(assinatura)

Assinatura do pesquisador responsável.