



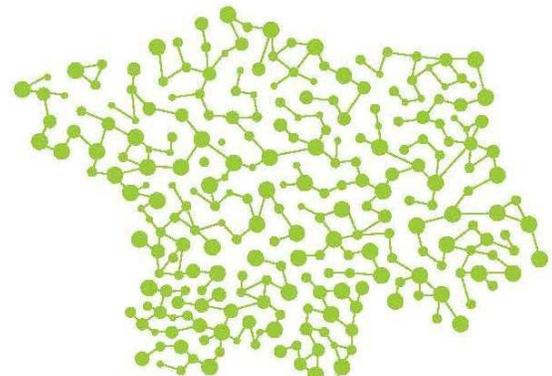
**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**ESTUDO DA RELAÇÃO DA CARGA VIRAL DO VÍRUS DA  
HEPATITE B (HBV) E DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) EM  
PLASMA E SANGUE SECO EM PAPEL FILTRO MEDIDA POR  
PCR EM TEMPO REAL (qPCR)**

**REINAN BROTAS FERREIRA**

**MANAUS  
2023**



**REINAN BROTAS FERREIRA**

**ESTUDO DA RELAÇÃO DA CARGA VIRAL DO VÍRUS DA  
HEPATITE B (HBV) E DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) EM  
PLASMA E SANGUE SECO EM PAPEL FILTRO MEDIDA POR  
PCR EM TEMPO REAL (qPCR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, como requisito para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

**Orientador:** Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy

**Coorientador:** Dr. Wornei Silva Miranda Braga

**MANAUS**

**2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

### Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

F383ee Ferreira, Reinan Brotas

Estudo da relação da carga viral do vírus da hepatite B (HBV) e do vírus da hepatite C (HCV) em plasma e sangue seco em papel filtro medido por PCR em tempo real (qPCR) / Reinan Brotas Ferreira. Manaus : [s.n], 2023.

81 f.: color.; 1 cm.

Dissertação - PGSS - Doenças Tropicais e Infecciosas (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Ramasawmy, Rajendranath  
Coorientador: Braga, Wornei Silva Miranda

1. HBV. 2. HCV. 3. DBS. 4. Amazônia Brasileira.

I. Ramasawmy, Rajendranath (Orient.). II. Braga, Wornei Silva Miranda (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Estudo da relação da carga viral do vírus da hepatite B (HBV) e do vírus da hepatite C (HCV) em plasma e sangue seco em papel filtro medido por PCR em tempo real (qPCR)

## FOLHA DE JULGAMENTO

### ESTUDO DA RELAÇÃO DA CARGA VIRAL DO VÍRUS DA HEPATITE B (HBV) E DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) EM PLASMA E SANGUE SECO EM PAPEL FILTRO MEDIDA POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

#### REINAN BROTAS FERREIRA

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

#### Banca Julgadora:

---

**Prof. Rajendranath Ramasawmy, Dr.**

**Presidente**

---

**Prof<sup>a</sup>. Cristina Melo Rocha, Dra.**

**Membro**

---

**Prof. Felipe Gomes Naveca, Dr**

**Membro**

## AGRADECIMENTOS

Neste momento especial, gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Primeiramente, quero agradecer à Deus por todas as oportunidades e pessoas que ele colocou no meu caminho, que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Agradeço também à minha família por ter me incentivado e lutado pela minha educação.

Aos meus orientadores Rajendranath Ramasamwy e Wornei Silva Miranda Braga, cuja orientação, paciência e apoio foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo, com suas sugestões e feedbacks para melhoria deste trabalho.

A Yonne Chehuan que desde o início me incentivou a fazer a inscrição no mestrado da PPGMT, que me deu todo suporte durante a execução do projeto e orientações que foram valiosas para crescimento pessoal e profissional.

Às amigas que fiz ao longo da pós-graduação, Karol Bentes, Ketlin Batista e Maianne Yasmin, quero expressar minha gratidão por todo o companheirismo, apoio e momentos de descontração que tornaram essa jornada mais leve significativa.

À Maianne Yasmin, não tenho palavras para agradecer a dedicação e o esforço de sempre me manter firme nos momentos mais difíceis, muitas das vezes sacrificando o seu tempo para estar ao meu lado.

A Márcia Castilho pelas orientações e informações sobre o assunto de hepatites virais, com sua expertise na área.

À Mariana Peniche, aluna do Programa de Apoio à Iniciação Científica, que foi uma pessoa primordial neste estudo, ambos crescemos juntos nessa trajetória.

A Luciana Giroto Gentil, suas contribuições e apoio foram inestimáveis ao longo deste processo, compartilhamos conhecimentos e troca de ideias. Suas perspectivas enriqueceram o trabalho.

Aos colegas do laboratório de carga viral, Heline Lira, Suellen Silva e Marcos Vinicius, que me ajudaram no planejamento e processo de execução do projeto.

Aos colegas da Gerência de IST/Aids e Hepatites Virais, Gabriel Rodrigues, Nilson Jesus, Thiago Freire e Francilia Siqueira, por todo apoio e paciência nos momentos de ausência e suporte do serviço.

A Patricia Jeane, que aceitou a participar do projeto e sempre se dispôs a me ajudar nessa caminhada.

Aos amigos, Dessana Chehuan, Francilia Siqueira, Natalie Tavares e Felipe Marco, que tiveram paciência comigo pelas reclamações e estresses do dia a dia.

A Abbott Laboratórios do Brasil Ltda por ter patrocinado e ao Ministério da Saúde do Brasil que financiou este estudo.

A equipe da PPGMT (professores, coordenação e secretaria), por toda orientação e conhecimento passado ao longo dessa caminhada.

A direção da Fundação de Medicina Tropical, em nome do Dr. Marcus Guerra e Dr. Antônio Magela, por ter me concedido a liberação para participar das atividades do mestrado e por ter a visão de valorização e crescimento profissional dos servidores.

Por fim, não poderia deixar de agradecer a todos os participantes desta pesquisa, cujas contribuições foram essenciais para a coleta de dados e o desenvolvimento deste estudo.

Obrigado!

**EPÍGRAFE**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

## RESUMO

As hepatites virais B e C são consideradas problemas de saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem como meta a eliminação dessas infecções como ameaça a saúde pública até 2030. Para atingir esse objetivo, estratégias como o desenvolvimento de testes de diagnósticos rápidos e acessíveis são essenciais. O objetivo do estudo foi analisar o desempenho de testes de biologia molecular para vírus da hepatite B (HBV) e vírus da hepatite C (HCV) em amostras de sangue seco em cartão de DBS, correlacionando com amostras de plasma. O estudo transversal prospectivo envolveu 244 amostras coletadas em dois municípios do Amazonas entre setembro de 2020 a março de 2022. Foram coletadas amostras de sangue venoso para plasma e amostras de sangue capilar em cartões Dried Blood Spot (DBS). Após a coleta, o cartão DBS passou pelo processo de secagem e envelopamento, sendo armazenado em temperatura ambiente. A carga viral de ambas as amostras foi quantificada pela técnica de PCR em tempo real (qPCR). As análises estatísticas mostraram uma alta concordância qualitativa (100%) entre as amostras de plasma e DBS para o HCV e 90% para o HBV. Os resultados mostraram uma alta correlação e sensibilidade para HCV quanto para HBV, indicando sua viabilidade para o diagnóstico e monitoramento do tratamento das hepatites virais. A implementação do DBS na rotina laboratorial é recomendada, visto que simplifica o processo, amplia o acesso ao diagnóstico e reduz os custos associadas a coleta, armazenamento e transporte de amostras. Estudos como estes são cruciais para a superação das barreiras no alcance da meta da OMS para eliminação das hepatites virais, especialmente em países de baixa renda.

**Palavras-chave:** HBV, HCV, DBS, Amazônia Brasileira

## ABSTRACT

Viral hepatitis B and C are considered a public health issue. The World Health Organization (WHO) aims to eliminate these infections by the year 2030. To achieve this goal, strategies such as the development of rapid and accessible diagnostic tests are essential. The aim of the study was to analyze the performance of molecular biology tests for hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) in dried blood samples on a DBS card, correlating with plasma samples. The prospective cross-sectional study involved 244 samples collected in two cities in Amazonas between September 2020 and March 2022. Venous blood samples were collected for plasma and capillary blood samples on Dried Blood Spot (DBS) cards. After collected, the DBS card went through the drying and wrapping process and it was stored at room temperature. The viral load of both samples was quantified using the real-time PCR (qPCR) technique. Statistical analyzes showed a high quality agreement (100%) between plasma and DBS samples for HCV and 90% for HBV. The results showed a high correlation and sensitivity for HCV and HBV, indicating it's feasibility for the diagnosis and for monitoring of the treatment of viral hepatitis. The implementation of DBS in the laboratory routine is recommended to simplify the process. It expands access to diagnosis and reduces costs associated with collecting, storing and transporting samples. Studies like these are crucial to overcome barriers to achieve the WHO goal of eliminate viral hepatitis, especially in low-income countries.

**Keywords:** HBV, HCV, DBS, Brazilian Amazon

## RESUMO LEIGO

As hepatites virais são consideradas problemas de saúde pública. A Organização Mundial de Saúde tem como meta a acabar com elas até 2030 e, para isso, é necessário o uso de testes laboratoriais simples, de fácil manuseio e acesso gratuito e rápido. O objetivo do estudo é analisar se a quantidade de vírus, do vírus da hepatite B e do vírus da hepatite C em plasma e em sangue seco em papel filtro pela medida do PCR em tempo real tem o mesmo resultado. O estudo foi realizado nas cidades de Manaus e Atalaia do Norte, no estado Amazonas. Os participantes com exame de sangue reagente para hepatite B e hepatite C, coletaram 8 mL de sangue venoso do braço, em seguida, foi realizada a coleta de sangue no dedo do paciente com ajuda de uma agulha, esse sangue foi pingado no cartão de papel filtro. Após a coleta, o cartão de papel filtro foi seco e embalado em um saquinho plástico, e armazenado em uma caixa que ficou na bancada do laboratório. Ambas as amostras passaram por teste que diz a quantidade vírus presente. No teste de estabilidade que avalia se houve perda do material durante o período que estava guardado, mostrou que não houve diferença nos resultados das amostras que ficaram na geladeira e na bancada. Na concordância das amostras de plasma e do sangue seco no cartão de papel filtro, as amostras de HBV apontou uma concordância de 90% e as amostras de HCV de 100%, na análise que compara os resultados do plasma e do sangue seco em papel filtro mostrou uma alta correlação nos resultados das amostras de HBV e o HCV. Os resultados mostram que o uso do DBS é ótimo no diagnóstico e monitoramento das hepatites virais B e C, apresentando uma forte correlação e alta sensibilidade, trazendo vantagens por ser barato e simples.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Vírus da hepatite B. Fonte: ViralZone.....	2
Figura 2. Ciclo de replicação do vírus da hepatite B. Fonte: ViralZone .....	4
Figura 3. Transmissão do HBV Fonte: Hepatitis B Foundation, 2020 (Adaptado).....	5
Figura 4. Vírus da hepatite C. Fonte: ViralZone.....	12
Figura 5. Ciclo replicativo do HCV .....	13
Figura 6. Cartão DBS.....	25
Figura 8. Modelo do preenchimento do DBS para teste de estabilidade do DNA do HBV .....	27

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Interpretação de marcadores sorológicos da hepatite B.....	7
Tabela 2. APRI (avaliação de fibrose hepática avançada) .....	17
Tabela 3. APRI (avaliação de cirrose hepática).....	18
Tabela 4. FIB4 (avaliação de fibrose hepática avançada ou cirrose) .....	18

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA**

**ALT** – Alanina aminotransferase

**Anti-HCV** – Anticorpo do vírus da hepatite C

**APRI** – Índice da relação aminotransferase sobre plaquetas

**AST** – Aspartato aminotransferase

**DAAs** – Antivirais de ação direta

**DBS** – Dried Blood Spot

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**cccDNA** – DNA circular covalentemente fechado

**CHC** – Carcinoma Hepatocelular

**dL**- Decilitro

**FIB4** – Índice de Fibrose 4

**FMT-HVD** – Fundação de Medicina Tropical – Dr Heitor Vieira Dourado

**HAV** – Vírus da hepatite A

**HBcAg** – Antígeno Central da hepatite B

**HBeAg** – Antígeno da proteína “e” do vírus da hepatite B

**HBsAg** – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

**HBV** – Vírus da hepatite B

**HCV** – Vírus da hepatite C

**HDV** – Vírus da hepatite D

**HEV** – Vírus da hepatite E

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana

**HNANB** – Hepatite não-A, não-B

**HSH** – Homens que fazer sexo com homens

**IGG** – Imunoglobulina G

**IGM** – Imunoglobulina M

**IFN-alfa** – Interferon-alfa

**kPa** - Kilopascal

**INR**- Razão Normalizada Internacional

**LSN** – Limite Superior Normal

**mg** - Miligrama

**mL** – Mililitro

**µL** - Microlitro

**MS** – Ministério da Saúde do Brasil

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PCDT** – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

**PCR** – Reação em Cadeia de Polimerase

**pSWE** – Point Shear Wave Elastography

**qPCR** – PCR em tempo real

**RNA** – Ácido nucleico

**RVS** – Resposta Viroológica Sustentada

**RT-PCR** - Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeira de polimerase

**Sinan** – Sistema de Informação de Agravos e Notificação

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

**TE** – Elastografia hepática

**UI** – Unidades Internacionais

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 O vírus da Hepatite B</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Características do Vírus e patogênese .....	2
1.1.2 Aspectos Clínicos .....	4
1.1.3 Transmissão .....	5
1.1.4 Epidemiologia.....	6
1.1.5 Diagnóstico.....	7
<b>1.1.5.1 HBsAg</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.5.2 HBeAg</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.5.3 Anti-HBc</b> .....	<b>8</b>
1.1.6 Tratamento .....	9
1.1.7 Prevenção .....	10
<b>1.2 O vírus da Hepatite C</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Características do vírus e patogênese.....	11
1.2.2 Aspectos Clínicos.....	13
1.2.3 Transmissão .....	14
1.2.4 Epidemiologia.....	15
1.2.5 Diagnóstico.....	15
1.2.6 Tratamento .....	18
1.2.7 Prevenção .....	19
<b>1.3 Reação em Cadeia De Polimerase</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4 Dried Blood Spot</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Justificativa</b> .....	<b>21</b>
<b>2. OBEJTIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Modelo de estudo</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 Plano Amostral</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3 Procedimentos</b> .....	<b>23</b>
3.3.1 Coleta de sangue venoso.....	23
3.3.2 Coleta de sangue capilar (Cartão DBS).....	24

3.3.3	Processo de extração e amplificação das amostras de plasma HBV .....	25
3.3.4	Processo de extração e amplificação das amostras de plasma HCV .....	26
3.3.5	Teste de estabilidade da carga viral em amostras de sangue seco em cartão DBS	26
3.3.5.1	Teste de estabilidade do DNA do HBV .....	26
3.3.6	Determinação do limite de detecção em amostras de sangue seco em cartão DBS	28
3.3.7	Processo de extração e amplificação das amostras de sangue seco em cartão DBS .....	30
3.4	<b>Questões éticas .....</b>	<b>30</b>
3.5	<b>Plano analítico.....</b>	<b>31</b>
4.	<b>PRODUTO DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>32</b>
5.	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
6.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
7.	<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>
7.1	<b>Parecer Consubstanciado do CEP da FMT-HVD .....</b>	<b>53</b>
8.	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>57</b>
8.1	<b>Procedimento Operacional Padrão (POP).....</b>	<b>57</b>
8.2	<b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b>	<b>59</b>
8.3	<b>Cronograma .....</b>	<b>64</b>
8.4	<b>Equipe de Trabalho .....</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A primeira descrição da hepatite, pode ter sido relatada por Hipócrates (460 – 375 AC), descrevendo a clínica de uma hepatite fulminante “O paciente logo delira, fica irritado, fala bobagens e late como um cachorro, suas unhas ficam vermelhas e ele perde a visão. A maioria dos pacientes morre num período de onze dias, poucos deles sobrevivem” (1).

As hepatites virais são doenças provocadas por diferentes agentes etiológicos, com tropismo pelos hepatócitos, que são: o vírus da hepatite A (HAV), o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV), o vírus da hepatite D (HDV) e o vírus da hepatite E (HEV) (2).

A OMS, tem como meta a eliminação da hepatite viral como ameaça a saúde pública até 2030. As metas visam reduzir a incidência de infecção crônica e as mortes anuais por hepatites virais. Para alcançar a eliminação várias medidas devem ser adotadas, como: sensibilização da população, o avanço dos medicamentos antivirais e o diagnóstico laboratorial. Priorizando o desenvolvimento de testes diagnóstico de tecnologia simples, que alcance áreas remotas e população de difícil acesso, permitindo orientar as decisões médicas (3)

O Brasil, vem construindo a linha de cuidado da assistência dos usuários com hepatite de acordo com a realidade local, a rede de recursos e a disponibilidade de dispositivos assistenciais. Para estruturação da rede, os sistemas logísticos e de apoio são essenciais, contribuindo para qualificação da linha de cuidado (4).

### 1.1 O vírus da Hepatite B

Em 1963, o microbiologista Baruch S Blumberg (1925 – 2011) publicou a descoberta do antígeno da Austrália, com essa contribuição para identificação do HBV foi premiado com o Nobel de Medicina no ano de 1976. Durante estudos sobre marcadores genéticos de determinadas doenças, inclusive do câncer, foi observado que pessoas que receberam transfusão de hemoderivados, desenvolveram anticorpos contra proteínas séricas e evidências mostravam ligação com a hepatite (5). Posteriormente, Alfred Prince,

analisando amostras de pacientes hemofílicos e que desenvolveram hepatite sérica, detectou o antígeno SH. Postulando que o antígeno SH está localizado na partícula do vírus, sendo este o responsável pelos casos de hepatite sérica. O antígeno da Austrália e o antígeno SH foram considerados idênticos (1).

### 1.1.1 Características do Vírus e patogênese

O HBV é um vírus da família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus* (6), que consiste em uma partícula viral, que é composto pelo antígeno central do HBV (HBcAg) e dentro da partícula está presente o ácido desoxirribonucleico (DNA) circular parcialmente de fita dupla e a polimerase. A partícula viral é envelopada por uma bicamada lipídica e diferentes proteínas. Os antígenos S, pré-S1 e pré-S2, conhecidas coletivamente como antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), fazem partes da bicamada lipídica (Figura 1) (7).

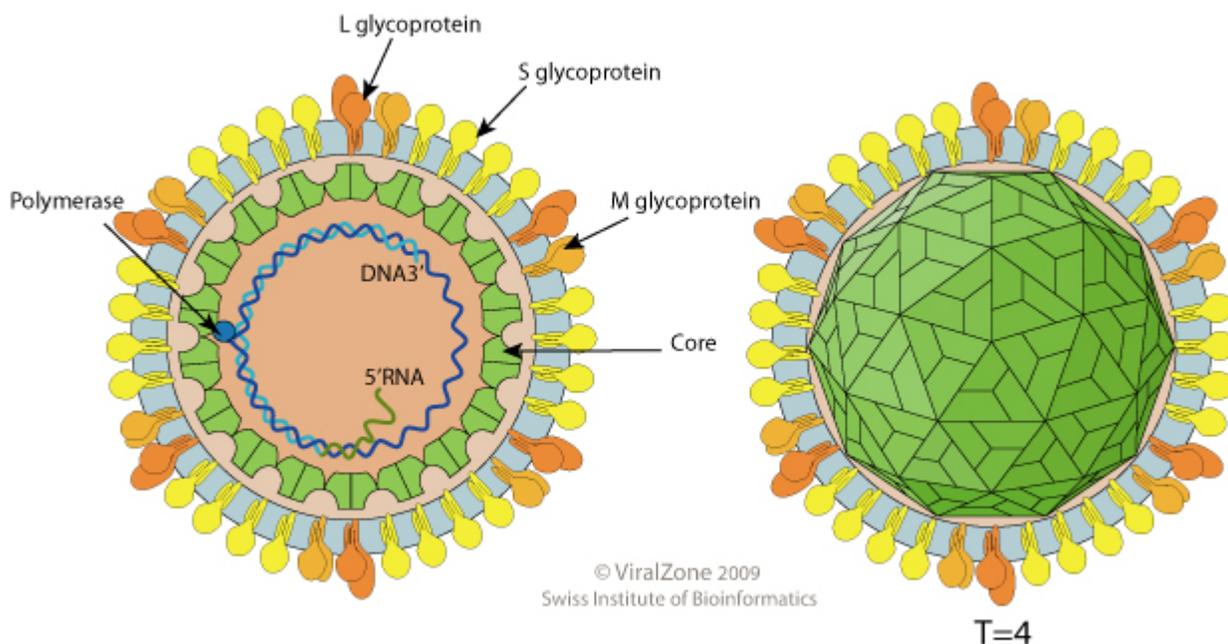


Figura 1. Vírus da hepatite B. Fonte: Viral Zone

O mecanismo de entrada do HBV nas células, acontece por 3 etapas, 1. Fixação de partículas de HBV à superfície da célula, 2. Entrada viral e 3. Escape viral de endossomo. 1. Ocorre a interação do HBV com o sulfato de heparano da superfície celular

do hepatócito, em seguida, liga-se ao receptor polipeptídeo cotransportador de taurocolato de sódio e ao receptor do fator de crescimento epidérmico coreceptor, levando a endocitose do HBV e transporte para o núcleo; 2. No núcleo, o DNA é convertido em DNA circular covalentemente fechado (cccDNA), é um molde para transcrição de todos os ácidos ribonucleicos (RNA) virais pré-genômicos e subgenômicos. Os RNAs são transportados para citoplasma para tradução de proteínas. Os dois RNAs subgenômicos são traduzidos no retículo endoplasmático, agrupam-se em partículas HBsAg subvirais e são secretados através do aparelho de Golgi. No citosol, os RNAs genômico são traduzidos na proteína central do HBV e a polimerase viral. No núcleo acontece a transcrição reversa do RNAs pré-genômico em DNA. As partículas maduras do núcleo podem migrar novamente para o complexo do poro nuclear ou são envolvidas pelas proteínas de superfície e secretadas através dos corpos multivesiculares (8).

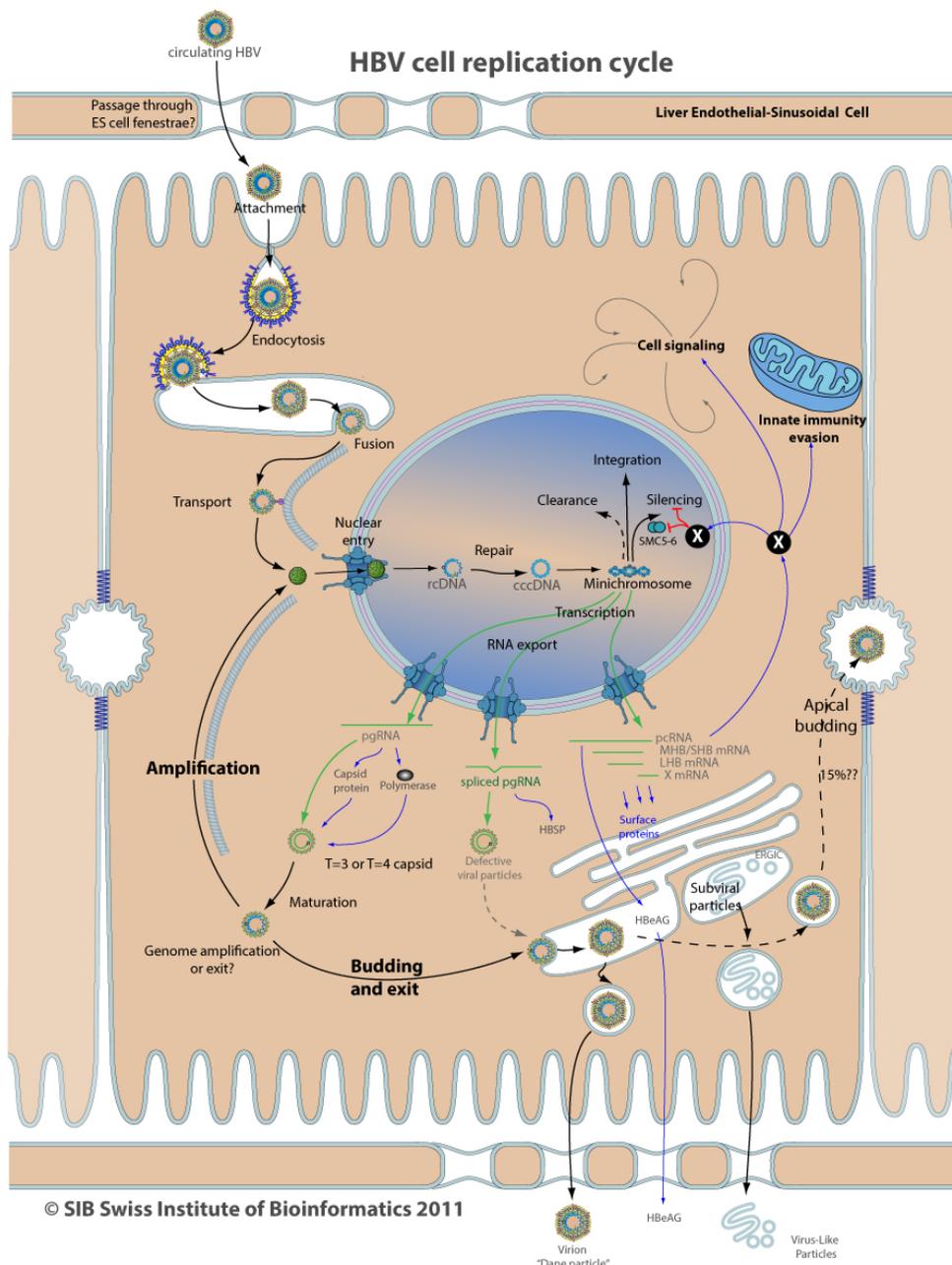


Figura 2. Ciclo de replicação do vírus da hepatite B. Fonte: Viral Zone

### 1.1.2 Aspectos Clínicos

A hepatite B é uma doença silenciosa, os pacientes podem apresentar sintomas como icterícia, fadiga, febre, perda de apetite, náuseas e vômitos. Outras manifestações clínicas incluem dor abdominal e hepatomegalia, que é o aumento do tamanho do fígado. Na forma crônica, o risco de complicações graves, como cirrose e carcinoma hepatocelular é aumentado (9).

Os pacientes com hepatite B crônica podem ser assintomáticos por longos períodos, mas a infecção persistente pode levar ao desenvolvimento de cirrose hepática, que é uma complicação grave que pode resultar em insuficiência hepática, hipertensão portal e outras complicações relacionadas ao fígado. Estando fortemente associada ao aumento do risco de carcinoma hepatocelular (10).

A fase 1 (imunotolerante) da hepatite B, ocorre em pacientes com infecção adquirida no período perinatal, com inflamação hepática mínima, podendo durar de 1 ano até décadas, onde os marcadores bioquímicos alanina aminotransferase (ALT) apresentam-se normais, mas com níveis elevados de DNA do HBV e os marcadores sorológicos positivos antígeno “e” do HBV (HBeAg) e HBsAg. A fase 2 (imunoreativa) apresenta níveis altos ou flutuantes dos níveis de ALT e do DNA do HBV, com danos hepáticos e marcadores positivos HBeAg, HBsAg e anticorpo contra antígeno “e” do HBV negativo (Anti-HBe). Na fase 3 (baixa replicação viral), a doença apresenta uma baixa progressão com hepatite e fibrose mínima, níveis baixos ou indetectáveis de DNA do HBV, normalidade dos marcadores bioquímicos hepáticos e marcadores HBsAg e Anti-HBe positivos e HBeAg negativo. Na fase 4 (reativação) os níveis de ALT e DNA do HBV são flutuantes, HBsAg e anti-HBe positivos e HBeAg negativo, geralmente em pacientes mais velhos em fase hepática mais avançada e a fase 5 (cura funcional) apresenta HBsAg negativo, DNA do HBV indetectável ou com baixa titulação e os valores de ALT normais (4)(10).

### 1.1.3 Transmissão

A transmissão do HBV se dá por via horizontal através dos compartimentos de itens pessoais a longo prazo, por via sexual nas relações desprotegidas e na transmissão vertical, de mãe para filho, sendo essa última via mais comum em regiões de baixa endemicidade e países desenvolvidos. Em países mais pobres também existem os casos de transmissão via instrumentos de saúde contaminados não esterilizados, além da transmissão durante o uso de drogas injetáveis e o a via sexual (11,12).

### 1.1.4 Epidemiologia

No mundo, em 2019, cerca de 296 milhões de pessoas vivem com o HBV e anualmente estima-se 1,5 milhões de casos novos (11). Segundo os dados do Ministério da Saúde do Brasil (MS), de 1999 a 2020, foram diagnosticadas 254.389 pessoas com o HBV. Sendo, que o HBV foi responsável por 21,3% dos casos de mortalidade por hepatites virais e o HCV por 76,2%, os outros 2,5% estão distribuídos entre o HAV e o HDV, no período de 2000 a 2019 (12).

Desde 1996, as hepatites virais são agravos de notificação compulsória, os casos confirmados devem ser notificados e registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) (13). Em 2021, a taxa de detecção do HBV no Brasil foi de 2,9 casos por 100 mil habitantes, sendo que o Amazonas e Manaus apresentaram uma taxa superior ao nacional de 9,9 e de 8,1 casos, respectivamente (12).

A África e algumas regiões do Pacífico Ocidental concentra 68% dos infectados por HBV. Os grupos com alta prevalência para as hepatites virais, incluem os: indígenas, prisioneiros, migrantes, homens que fazem sexo com homens, usuários de drogas e coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os indígenas da bacia amazônica é um grupo marginalizado, que tem dificuldade no acesso aos serviços de saúde, apresentando uma alta endemicidade pelo HBV de intermediária a alta, e uma superinfecção por HVD (14).

Foi considerado que residir em zona rural e não possuir qualquer escolaridade tem uma associação com a maior frequência de infecção pelo HBV, pode estar relacionado a fatores socioeconômicos, sanitários e de comportamentos de riscos, educação precária e baixa cobertura dos serviços de saúde (15). Isso também, foi observado em um estudo realizado na Amazonia Ocidental, onde a população ribeirinha está mais susceptível a infecção por HBV, devido à baixa cobertura vacinal (16).

Existem 10 genótipos de HBV, devido a diferença da sua distribuição geográfica, mutações genéticas e falta de revisão da transcriptase reversa, com o tempo essas características se tornaram barreiras que dificultam a sua eliminação (17). Na América do Sul são encontrados os genótipos A, D e F, sendo este último o mais comum, em relação a distribuição dos subgenótipos, o genótipo A inclui 1109 sequências de 26 países, originou-se antes do ano de 1300 e genótipo F inclui 225 sequências de 5 países e existe

há cerca de 1600 anos. Na América do Sul o genótipo F é prevalente, mas no Brasil o genótipo A representa 53,55% dos casos de hepatite B, sendo o subgenótipo A1 dominante (18).

### 1.1.5 Diagnóstico

Para o diagnóstico das hepatites virais e sua doença associada são utilizadas evidências clínicas, técnicas sorológicas para identificação de marcadores de antígenos virais ou anticorpos específicos, e/ou técnicas de biologia molecular que detectam ácido nucleico e exames histológicos e de imagem. A interpretação adequada dos resultados permite a correta identificação da fase clínica da infecção, conforme Tabela 1 (18).

Tabela 1. Interpretação de marcadores sorológicos da hepatite B

<b>Marcador</b>	<b>Interpretação</b>
<b>HBsAg</b>	Infecção aguda (menos de 6 meses) ou infecção crônica (mais de 6 meses).
<b>Anti-HBs</b>	Recuperação de infecção aguda ou imunidade por vacinação.
<b>HBeAg</b>	Principalmente associado à alta carga viral.
<b>Anti-HBe</b>	Baixa fase de replicação.
<b>Anti-HBc IgM</b>	A infecção aguda, único marcador presente no período de janela, pode estar presente durante a exacerbação da infecção crônica.
<b>Anti-HBc IgG</b>	Exposição a infecção, infecção crônica (se presente junto com HBsAg), recuperação de infecção aguda (se presente com anti-HBs), se presença isolada, pode representar infecção oculta

Fonte: Hepatitis B, 2023 (19).

A presença do HBsAg positivo por mais de 6 meses é a indicação de uma infecção crônica e a cura é definida quando o teste qualitativo para HBsAg tem resultado igual ou menor a 0,05 UI/ml no soro, com ou sem aparecimento de anticorpos (anti-HBs), é considerada uma cura funcional. A imunidade protetora é reconhecida quando o nível de anti-HBs é superior a 10 UI/ml (20,21).

#### 1.1.5.1 HBsAg

Os níveis de HBsAg mudam durante a Hepatite B crônica, na fase imuno-tolerante, as suas concentrações são elevadas e na fase inativa são baixas. A produção do HBsAg também muda, de cccDNA, que é um o reservatório para persistência viral escondida no núcleo, ocorrendo na transcrição de HBeAg de pacientes no início da infecção para pacientes HBeAg negativos. Níveis elevados de HBsAg podem significar menor probabilidade de auto resolução da doença, como resultado disso, o nível de HBsAg foi incorporado nas pontuações de risco de cirrose hepática (22,23).

#### 1.1.5.2 HBeAg

O marcador HBeAg é um indicador de replicação viral e infectividade, a definição da fase da hepatite B crônica do paciente é calculada pelos níveis de HBeAg, a soroconversão indica uma fase importante para a ablação deste antígeno da corrente sanguínea, que segue com o início de uma resposta do sistema imunológico. Não obstante, alguns pacientes HBeAg negativos podem ter altos níveis de DNA do HBV (17,24).

#### 1.1.5.3 Anti-HBc

Anticorpos totais contra o “core” (núcleo) da Hepatite B surgem no início dos sintomas e persistem por toda a vida, pode ser detectado por ensaios sorológicos para o anti-HBc total, que detecta o anti-HBc IgG e IgM. O anti-HBc IgM é um determinante para a fase aguda da Hepatite B e pode ser o único a ser detectado durante o período da hepatite B aguda quando o HBsAg está não indetectável, já o anti-HBc IgG pode indicar uma infecção crônica (25).

### 1.1.6 Tratamento

Os principais objetivos do tratamento de pacientes com infecção pelo HBV são aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida das pessoas vivendo com esse agravo, e o tratamento com antivirais é a estratégia terapêutica ideal, que suprime de forma eficaz a replicação do HBV, diminui a necrose inflamatória no fígado, reduz a incidência de cirrose hepática e complicações relacionadas e reduz a taxa de mortalidade associada ao carcinoma hepatocelular (CHC) e outras doenças hepáticas (26).

Como critérios para indicação de tratamento, a carga viral elevada ( $\geq 2.000$  UI/mL HBV-DNA) e persistência viral são fatores determinantes para a utilização de medicação, além disso, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) - Hepatite B e coinfeções, preconiza que para pacientes com hepatite B crônica, os resultados de ALT tenha limite superior de normalidade de 35 UI/mL, para homens, e 25 UI/mL, para mulheres, devido a possibilidade de pacientes com valores normais ou limítrofes de ALT estarem sob risco de doença hepática e suas complicações (27).

Segundo o PDCT 2023, outros critérios para indicação de tratamento ou profilaxia com antiviral são:

- Presença de HBeAg reagente em indivíduos com idade acima de 30 anos, independentemente dos níveis de ALT e gravidade da lesão histológica hepática;
- História familiar de CHC;
- Coinfecção HBV/HIV, HBV/HCV ou HBV/HDV;
- Manifestações extra-hepáticas, como artrite, vasculite, nefropatia, poliarterite nodosa, neuropatia periférica;
- Biópsia hepática  $\geq$  A2 e/ou F2, pela classificação METAVIR
- Elastografia hepática, de acordo com o método, com resultados: EHT  $>9$  kPa (para níveis normais de ALT) ou  $>12$  kPa (se ALT entre 1 e 5x LSN), ou pSWE/ARFI  $\geq 1,8$  m/seg, ou 2D-SWE  $>10$  kPa;
- Hepatite B aguda grave, definida por: presença de tempo de ativação de protrombina (TAP), demonstrada pela razão normalizada internacional (INR) maior que 1,5 ou sintomas e icterícia bilirrubina total maior que 3 mg/dL ou

bilirrubina direta maior que 1,5 mg/dL por mais de 4 semanas, ou encefalopatia ou ascite.

- Prevenção da transmissão por profissionais de saúde que realizam procedimentos com alto risco de exposição;
- Prevenção da transmissão vertical em gestantes com carga viral elevada;
- Indicação de terapia preemptiva ou profilaxia com antiviral para pacientes submetidos a transplantes e/ou quimioterapia;
- Paciente pediátrico com indicação de tratamento (27).

### 1.1.7 Prevenção

As primeiras vacinas produzidas em 1982, usavam plasma de pacientes infectados com o HBsAg inativado, a partir de 1986 começaram a utilizar DNA recombinante. A vacina tem uma boa imunogenicidade e com uma eficácia de proteção em mais de 90% dos adultos jovens e em lactantes sua proteção é superior, chegando a 95% (28). Desde 1998, o Programa Nacional de Imunizações recomenda a vacinação universal das crianças contra a hepatite B. O esquema vacinal, de maneira geral, é composto por três doses, sendo o intervalo entre as doses de 30 dias entre a primeira e a segunda doses e de seis meses entre a segunda e terceira doses (29).

A transmissão materna é a principal via de infecção em áreas endêmicas, resultando em uma taxa de 90% de infecção crônica, sendo o melhor momento para iniciar a imunização (30), portanto, recém-nascidos devem receber uma dose logo nas primeiras 24 horas do nascimento ou nos primeiros de 30 dias de vida, a continuidade do esquema vacinal será composta por quatro doses (29).

A vacinação para hepatite B também é recomendada a todas as pessoas que foram expostas ao vírus em decorrência de acidente de trabalho com material perfurocortantes, exposição sexual ou violência sexual, não previamente vacinada, sem carteira vacinal e sem indícios de infecção pelo HBV. É indicado que a vacina seja aplicada no primeiro atendimento na unidade de saúde ou dentro de 24 horas após a exposição (31).

A vacinação contra hepatite B é a ferramenta mais importante na luta para controlar o HBV, e o seu acesso é uma história de sucesso, que nas últimas décadas contribuiu

para diminuição de infecções por HBV. No entanto, ainda é necessário a expansão da dose oportuna para prevenção da transmissão de mãe para filho (32).

Outras medidas de prevenção são eficazes para diminuição dos indicadores, como: testes de triagem para hepatite B nas Unidades Básicas de Saúde e em Agências Transfusionais, técnica de assepsias e manuseio adequado de materiais perfurocortantes, uso de preservativos nas relações sexuais e abordagem de redução de danos (33).

Desde 1994, a redução de danos é uma estratégia de saúde, mas apenas em 2003 foi incorporada à Política do Ministério da Saúde para Atenção Integral a Usuários de Álcool e Outras Drogas. A redução de danos adota medidas preventivas para diminuir riscos e danos associadas a práticas do uso e dependência de drogas psicoativas, e na diminuição do risco de infecção por hepatites e HIV, ofertando insumos como: seringas e agulhas para o não compartilhamento de objetos, preservativos e lubrificantes que podem funcionar como barreiras a propagação das infecções sexualmente transmissíveis (34–36).

## 1.2 O vírus da Hepatite C

Em 1970, alguns casos de hepatite crônica associada a transfusão de sangue, que não podiam ser associados aos vírus conhecidos da hepatite A ou da hepatite B, nem a qualquer outra causa conhecida, foi chamada de hepatite não-A, não-B (HNANB), só após 20 anos que o agente causador da HNANB foi identificado e denominado o HCV. Essa descoberta foi alcançada pelos pesquisadores Choo e o grupo de Michael Houghton, que em 1989 publicaram esse grande avanço na ciência (37). No ano de 2020, Harvey J. Alter, Michael Houghton e Charles M. Arroz foram laureados com o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta do vírus da hepatite C (38).

### 1.2.1 Características do vírus e patogênese

O HCV é um membro da família *Flaviviridae* e pertence ao gênero *Hepacivirus* (39), é um vírus de RNA fita simples, suas proteínas estruturais são compostas por um núcleo capsídeo viral e as glicoproteínas E1 e E2 que compõem o envelope lipoprotéico (40).

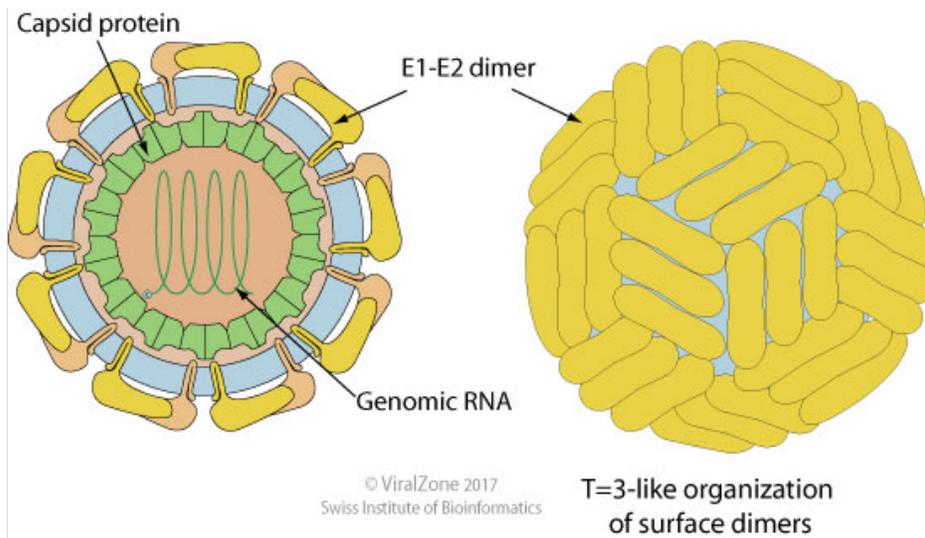


Figura 3. Vírus da hepatite C. Fonte: Viral Zone

A replicação do HCV começa com a ligação das glicoproteínas do envelope dos vírus receptores celulares do hospedeiro, incluindo claudina-1, EGFR, SRB1, CD81, LDLR e DC-SIGN. Essa ligação permite que o HCV se anexe e entre nas células hospedeiras por meio de endocitose mediada por clatrina. Após a entrada, o HCV libera seu RNA no citoplasma, onde fica exposto à resposta imunológica do hospedeiro (41).

O RNA do HCV é traduzido por meio de um sítio de ligação ao ribossomo interno no retículo endoplasmático rugoso resultando em uma grande poliproteína que é processada em proteínas estruturais e não estruturais. A proteína não estrutural NS4B induz a formação de uma teia de replicação membranosa, onde ocorre a replicação do RNA viral. Isso é feito por meio da ação da RNA polimerase dependente de RNA. O genoma de RNA de sentido positivo recém-sintetizado é usado para produzir mais proteínas virais, replicar o RNA adicionalmente ou formar novos vírions, completando assim o ciclo de replicação do HCV (41).

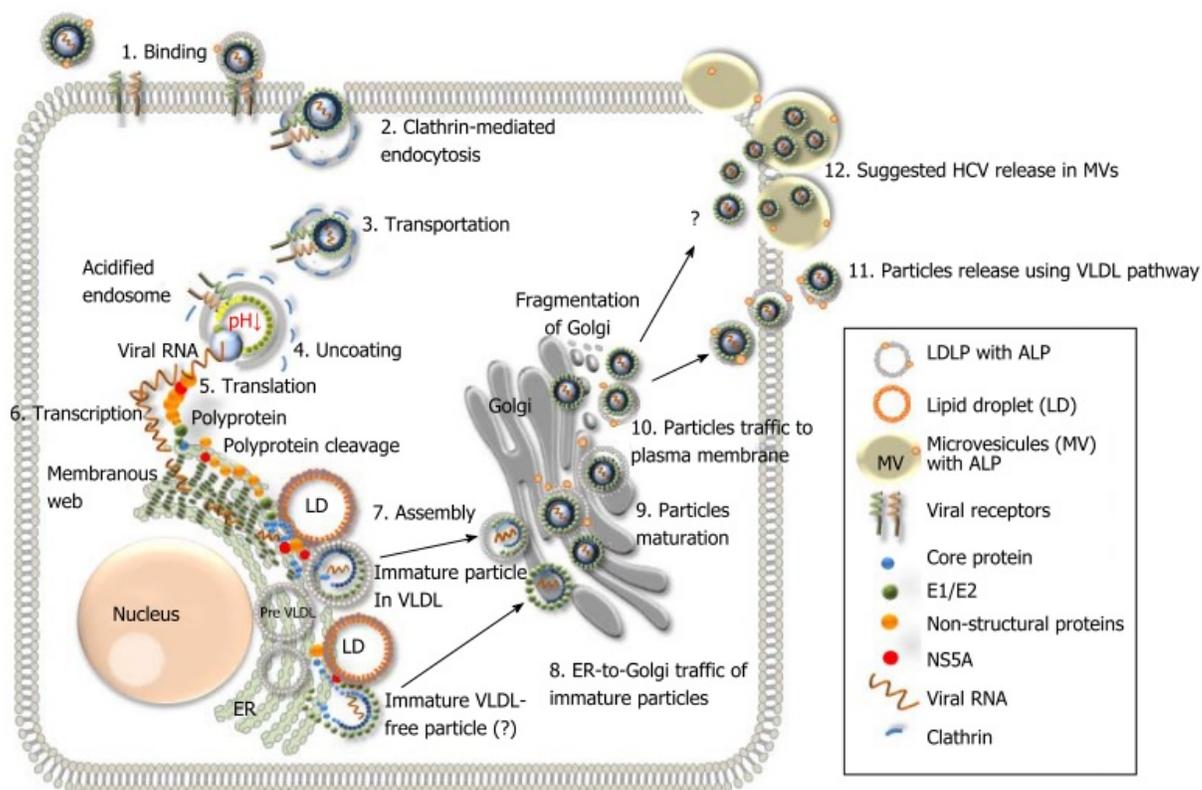


Figura 4. Ciclo replicativo do HCV

### 1.2.2 Aspectos Clínicos

O HCV tem uma afinidade pelos hepatócitos. Após uma infecção aguda, os níveis de HCV no sangue aumentam rapidamente até se estabilizarem. Embora a infecção pelo HCV não cause uma destruição direta das células hepáticas, desencadeia respostas do sistema imunológico tanto inatas quanto adaptativas. A liberação de várias citocinas citotóxicas pelo infiltrado inflamatório levam a destruição de hepatócitos infectados e não infectados. O resultado bioquímico observado é o aumento das transaminases no sangue, que é um marcador da destruição dos hepatócitos (42).

Clinicamente, a maioria dos casos de hepatite C aguda são assintomáticos ou caracterizados por sintomas leves e rotineiros, como fadiga ou desconforto abdominal, e podem passar despercebidos na avaliação clínica. A hepatite C grave, que requer hospitalização, não é tão frequente. A hepatite C crônica é uma doença hepática progressiva, que pode levar meses ou anos para fase mais grave, na forma clínica da

cirrose, descompensação hepática e/ou CHC. Essas complicações são responsáveis pela maior parte das doenças e mortes relacionadas ao fígado associadas ao HCV (42).

A descompensação clínica pode acontecer com 10% a 20% das pessoas com cirrose causada pelo HCV, em um período de cinco anos, com desenvolvimento de hipertensão portal, varizes esofágicas, ascite, coagulopatia, encefalopatia ou carcinoma hepatocelular. Nessa fase, podem apresentar sinais como angiomas de aranha, eritema palmar, asterix, anasarca, também podendo apresentar sinais e sintomas extra-hepáticos, como crioglobulinemia mista, glomerulonefrite membranoproliferativa, porfiria cutânea tardia, líquen plano, alterações neurocognitivas, resistência à insulina e distúrbios linfoproliferativos de células B (43).

### 1.2.3 Transmissão

Na hepatite C, a sua principal forma de transmissão acontece por via parenteral, a via sexual é pouco frequente e a transmissão vertical é considerada rara em relação a transmissão vertical pelo HBV, essa última variando de 0 a 4% (2,43). Em países de desenvolvidos o uso de drogas injetáveis é a principal forma de infecção pelo HCV, enquanto os procedimentos médicos são a principal fonte de infecção nos países em desenvolvimento. No mundo, 23% das infecções pelo HCV estão ligadas ao uso de drogas (44).

Na análise de fatores de risco associados à transmissão do HCV em uma população de homens que fazem sexo com homens (HSH) com HIV positivo no México, foram identificados: que o compartilhamento de canudos para inalação de cocaína, atividade sexual que envolva trauma anal, dilatação do tecido anal e micro-sangramento e o uso de brinquedos sexuais pode aumentar o risco de infecção pelo HCV (45).

Uma das populações alvo para rastreio do HCV, são pessoas que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993, período este que não eram realizados exame para triagem da hepatite C (2,33). No Brasil, os doadores de sangue e/ou hemoderivados passam por uma triagem clínica e laboratorial para investigação de infecções e/ou doenças, uma delas é a hepatite C. Os doadores com histórico de contato, clínica e/ou exame reagente para HCV, são considerados inapto para doação (46).

Das doações de sangue realizadas no período de 2010 a 2016, 4,04% dos doadores tiveram resultado reagente para alguma infecção transmissível por transfusão.

Destes, 48,11% eram HBV reagentes e 13,66% eram HCV reagentes. Sendo a taxa de prevalência do HBV de 0,4 a 1,6% e do HCV de 0,46% (47).

#### 1.2.4 Epidemiologia

A distribuição da infecção por HCV é de forma desigual no mundo, sendo os países da Europa e do Mediterrâneo Oriental as mais afetadas (14). Presume-se que 58 milhões de pessoas tenham a infecção crônica pelo HCV, anualmente ocorram 1,5 milhões de novos casos (11). Segundo os dados do MS, de 1999 a 2021, foram diagnosticadas 279.872 pessoas com o HCV. Em 2021, foram notificados 9.286 casos de HCV, com uma taxa de detecção de 5,2, no Brasil, no Amazonas de 3,6 e em Manaus de 5,5 (48).

O diagnóstico em homens se dá através de exame de rotina, representando 33,7% dos casos. Além disso, 24,4% dos diagnósticos em homens ocorreram durante doações de sangue. Por outro lado, nas mulheres, os diagnósticos mais comuns foram realizados durante check-ups, abrangendo 44,4% dos casos, ou durante investigações de alterações nas enzimas hepáticas, com 17,4% (49).

A distribuição de genótipos do HCV no Brasil foi de 40,1% do 1A, sendo o genótipo mais prevalente, seguido por 30,2% do genótipo 1B, 23,8% do genótipo 3, 3,8% do genótipo 2, 0,7% do genótipo 4, 0,1% do genótipo 5 e 0,6% com múltiplos genótipos. O genótipo 1A é mais prevalente em geral, com uma tendência crescente do genótipo G3, especialmente entre pessoas mais jovens, enquanto o G1B é mais comum nas regiões Norte do Brasil (50).

A prevalência de coinfeção HCV/HBV é de 9,88%, destes, 12,5% são negativos para o HBsAg e detectáveis para DNA do HBV, o que sugere a presença de uma infecção oculta pelo HBV. Os fatores de risco associado à coinfeção são: uso de drogas ilícitas, transfusão de sangue e presença de tatuagens e piercings (51).

#### 1.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico deve ser associado ao diagnóstico laboratorial e de imagem, uma vez que, 20% a 30% apresentam sintomas da infecção por HCV, que são geralmente

inespecíficos. A investigação é feita através de exames sorológicos, de biologia molecular e através dos exames de imagem (13).

### Anti-HCV e RNA-HCV

Os pacientes infectados pelo HCV terão anticorpos positivos, mas apenas a detecção de carga viral positiva confirma a presença da infecção ativa, uma vez que esses anticorpos persistem no corpo, os pacientes podem testar positivo para infecções passadas (resultantes de eliminação espontânea), infecções anteriormente relacionadas e tratadas ou até mesmo resultados falsos-positivos. Portanto, a confirmação da presença de infecção ativa por HCV ou de uma recidiva da infecção subjacente, só pode ser obtida através de um teste de PCR de RNA detectável (52).

Como protocolo, todos os pacientes com suspeita de infecção por HCV devem ser inicialmente testados para anticorpos. Se os anticorpos forem positivos, testes adicionais para detectar o RNA do HCV são necessários. É importante observar que pacientes com anticorpos positivos, mas com resultado negativo no teste de PCR de RNA, não estão protegidos contra a reinfeção, embora não tenham uma infecção ativa no momento (52).

### Elastografia Hepática

A elastografia transitória (TE) como uma técnica de ultrassom não invasiva é amplamente utilizada para aferição da rigidez do fígado e na avaliação da gravidade da fibrose e cirrose, sem os riscos e complicações associados à biópsia hepática. Ela é validada para pacientes com cirrose hepática compensada, com uma sensibilidade de 89% e especificidade de 91% no diagnóstico de cirrose. Significando que a TE é tem uma alta precisão na identificação da cirrose hepática, com confiabilidade e segurança (53).

Devido a diminuição do processo inflamatório, o uso de TE não está indicado em pacientes em tratamento ou após a resposta viral sustentada (RVS) (54).

### Biópsia Hepática

A biópsia foi considerada um exame padrão-ouro por muitos anos, mas em decorrência de algumas limitações de segurança, custo, por ser um procedimento invasivo

e a sua variabilidade na pontuação da fibrose, tornaram as avaliações histopatológicas impraticáveis, houve à busca de novas alternativas para avaliação da fibrose hepática (53,54). Este procedimento é raramente usado no diagnóstico ou monitoramento do HCV, a menos que haja necessidade de diagnósticos adicionais, como identificar doenças autoimunes do fígado ou a inclusão de pacientes em estudos (54).

O score da biópsia hepática mais comparável com as modalidades não invasivas é o Metavir, que tem cinco graus diferentes, F0 para sem fibrose, F1 para fibrose leve (expansão portal fibrosa), F2 para fibrose moderada (septos periportais), F3 para fibrose grave (septos portal-central) e F4 para cirrose (52).

#### APRI e FIB-4

Os testes biológicos não invasivos que são utilizados como alternativa na ausência da elastografia ou biópsia hepática são os biomarcadores indiretos que são pontuações simples e econômicas, os mais utilizados são o APRI (Índice de relação aspartato de aminotransferase sobre plaquetas) e o FIB4 (Índice de Fibrose baseado em 4 fatores) (13,54). São escores com boa especificidade e baixa sensibilidade, pacientes com classificação F0, F1 ou F2 devem utilizar exames complementares de imagem, pacientes com coinfeção podem ter interferências nos resultados (13).

([APRI = (AST/limite superior do normal) x 100/contagem de plaquetas])

([FIB4 = (idade x AST) / (plaquetas x  $\sqrt{\text{ALT}}$ ])

Tabela 2. APRI (avaliação de fibrose hepática avançada)

Resultado	<0,5	0,5- 1,9	≥1,5
<b>Interpretação</b>	Baixa Probabilidade de fibrose hepática F2, F3 ou F4	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade fibrose hepática F3 ou F4

Tabela 3. APRI (avaliação de cirrose hepática)

<b>Resultado</b>	<b>&lt;1,0</b>	<b>1,0- 1,9</b>	<b>≥2,0</b>
<b>Interpretação</b>	Baixa Probabilidade de cirrose	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de cirrose

Tabela 4. FIB4 (avaliação de fibrose hepática avançada ou cirrose)

<b>Resultado</b>	<b>&lt;1,45</b>	<b>1,45- 3,24</b>	<b>≥3,25</b>
<b>Interpretação</b>	Baixa Probabilidade de fibrose hepática F2, F3 ou F4	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade F3 ou F4

### 1.2.6 Tratamento

Na era pré-HCV, o IFN-alfa era utilizado como tratamento para uma doença crônica misteriosa, que mais tarde foi identificada como hepatite C. O IFN-alfa é uma proteína produzida naturalmente pelo sistema imunológico em resposta a infecções virais e outros estressores. Em 1984, em um estudo piloto, mostrou resultados importantes com melhoras significativas dos danos hepático, alguns pacientes tiveram uma baixa resposta terapêutica e a outra metade se tornaram os primeiros pacientes a serem curados da doença (55)

Estudos posteriores, mostraram uma baixa resposta viral sustentada (RVS) quando uso isolado do IFN-alfa, mas associado a outros antivirais como a ribavirina mostrou uma taxa de RVS de entre 30-40%. Outra melhoria foi a modificação química da IFN-alfa para prolongar a sua duração no corpo, com seu uso associado a ribavirina a taxa de RVS foi de 66% (55).

O tratamento da hepatite C está indicado na presença de Anti-HCV reagente e HCV-DNA detectável, na infecção aguda ou crônica, independente do estágio da fibrose hepática (13). A expansão da terapia com os agentes antivirais de ação direta (DAAs), demonstrou um imenso benefício aos pacientes, levando a cura da infecção crônica pelo HCV (33).

O uso dos DAAs tem como objetivo uma RVS definida com supressão viral de 12 semanas após o fim da terapia medicamentosa com os antivirais. Essa nova terapia tem maior adesão dos pacientes devido a tolerabilidade, menos efeitos adversos, menos interação medicamentosa e tratamento de curto tempo (56). Com esse perfil os DAAs se tornaram um marco na medicina atual por curar a infecção pelo HCV (57).

A terapia consiste na associação de duas classes de medicamentos com diferentes ações. Inicialmente, a decisão sobre a melhor terapia era baseada no genótipo do HCV, mas com o surgimento dos medicamentos sofosbuvir/velpatasvir e glecaprevir/pibrentasavir que são considerados esquemas pangenóticos, possibilitando seu uso em qualquer genótipo do HCV e estadiamento clínico foi outro marco na terapia antiviral. Com o alcance da cura da infecção do HCV é necessário que os DAAs seja prioridade nas políticas públicas, permitindo acesso e rapidez ao tratamento para trazer mais qualidade de vida ao paciente e permitindo a conclusão da meta de eliminação da hepatite C até 2030 (58).

### **1.2.7 Prevenção**

Determinados pacientes com infecção aguda por HCV são capazes de eliminar espontaneamente a infecção devido a uma imunidade antiviral robusta. Isso sugere a previsão de desenvolver uma vacina profilática contra o vírus (59). Mas até o momento, as abordagens tradicionais de desenvolvimento de vacinas não foram bem-sucedidas na luta contra a infecção do HCV. Entender os mecanismos pelos quais as células imunes específicas do antígeno conferem proteção a longo prazo é importante e fundamental para a eficácia de uma vacina. O HCV é conhecido por sua variabilidade genética, o que torna difícil desenvolver uma vacina que seja eficaz contra todas as suas cepas e devido a essa diversidade é necessária uma resposta imunitária ampla (60).

São necessários a condução de novos ensaios clínicos com base em uma melhor compreensão dos fatores que determinam a capacidade do sistema imunológico de combater a persistência viral em situações de exposição na vida real, bem como em indivíduos que foram curados com medicamentos antivirais de ação direta, como a compreensão da resposta imune humoral e dos fatores que podem aumentar a geração de anticorpos de ampla neutralização, que são particularmente eficazes contra o HCV. Desenvolvimento de novos adjuvantes (substâncias que aumentem a eficácia das

vacinas), vetores (meios de transporte para as vacinas) e regimes de vacinação inicial e reforço que possam tornar as vacinas mais específicas e aumentar sua capacidade de desencadear respostas imunes (61).

Uma vacina profilática contra o HCV é uma das estratégias global para controlar a doença, mesmo que seja um desafio, o seu desenvolvimento exige fontes de financiamento de iniciativas colaborativas entre governos, agências de financiamento em todo o mundo, a OMS e parcerias acadêmico-industriais (60,62).

### **1.3 Reação em Cadeia De Polimerase**

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica molecular, que utiliza sequências complementares de iniciação (primers de oligonucleotídeos), flanqueando um local de interesse do genoma, juntamente com polimerases. Cada ciclo de PCR envolve 3 etapas: 1. Desnaturação, o processo acontece em uma temperatura de 90 a 95C, as duas fitas da hélice do DNA são desenroladas e separadas; 2. Hibridização, à medida que ocorre um declínio na temperatura, os primers oligonucleotídeos se ligam as bases complementares do DNA de fita simples; e 3. Polimerização, é a etapa de leitura da fita molde, combinando os nucleotídeos, resultando em novas fitas de duas hélices. Esse processo de amplificação exponencial acontece repetida vezes. A PCR também permite amplificar fitas de RNA, técnica conhecida como PCR com transcriptase reversa (RT-PCR). Com a enzima transcriptase reversa a sequência de RNA alvo é convertido em cDNA, após a etapa de desnaturação do produto cDNA-RNA, o prime hibridiza-se na cadeia de CDNA, sendo prolongada pela DNA polimerase (63,64).

Durante a marcação dos primers as sondas se ligam na extremidade 5', permitindo a quantificação em tempo real a cada ciclo de amplificação, através da detecção por fluorescência. A Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR) tem vantagens, por permitir uma quantificação rápida e menos propenso à contaminação, pois todo processo ocorre em um único tubo selado (63,64).

## 1.4 Dried Blood Spot

Ivar Cristian Bang (1869 a 1918) é considerado o idealizador de coletar sangue em papel filtro de celulose, seu primeiro uso foi para determinação dos níveis de glicose no sangue (65). Em 1960, o Dr. Robert Guthrie usou o papel filtro como método de triagem neonatal para fenilcetonúria, uma doença progressiva e fatal para crianças (66).

O uso de Dried Blood Spot (DBS) oferece mais conveniência e simplificação na logística para coleta, armazenamento e transporte, trazendo mais segurança no manuseio das amostras, volume menores de material biológico (sangue e soro), mão de obra reduzida, punção direta capilar com uso de lanceta e biobanco simplificado (67)(68). É utilizada na prática de diagnóstico biológico quantitativo e qualitativo, na análise de ácido nucléico, antígeno e anticorpos (69), seu uso vai além da triagem neonatal, podendo ser usados em todas as faixas etárias (70).

O DBS é uma alternativa de coleta para diagnóstico molecular, tendo sua aplicabilidade para regiões de difícil acesso e longínquo dos grandes centros (71), podendo ser realizado por outras pessoas, além de profissionais de saúde e em ambientes não clínicos (72).

## 1.5 Justificativa

A OMS recomenda a utilização de técnicas capazes de identificar e quantificar a presença do genoma do vírus HBV e HCV no paciente, antes, durante e após o tratamento. O uso do DBS vem sendo utilizado amplamente para diagnóstico de infecções, marcadores imunológicos e bioquímicos, devido a sua estabilidade, viabilidade, simplicidade e custo. A Região Amazônica, por ter um perfil endêmico para as hepatites virais B e C, ter a logística de insumos realizada via fluvial e sua população periférica e interiorana por ser composta por indígenas e ribeirinhos, foi o cenário ideal para aplicabilidade desse estudo.

## **2. OBEJTIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar a relação da carga viral da hepatite B e da hepatite C, medida no plasma com a medida no sangue seco em papel filtro

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Descrever o perfil epidemiológico dos pacientes;
- Verificar a estabilidade da carga viral em amostras de sangue seco em cartão de DBS;
- Determinar o limite de detecção em amostras de sangue seco em cartão DBS;
- Analisar a correlação da carga viral medida no plasma com a medida no sangue seco em cartão DBS;
- Avaliar os procedimentos de coleta e transporte das amostras de sangue seco em cartão DBS.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Modelo de estudo**

Esse foi um estudo transversal prospectivo, realizado em dois municípios do Amazonas, Manaus e Atalaia do Norte, no período de 12 de setembro de 2020 a 22 de março de 2022.

#### **3.2 Plano Amostral**

Para o estudo foram analisadas as amostras de sangue de voluntários, com idade mínima de 18 anos de idade, ambos os gêneros, com sorologia reagente HBsAg ou sorologia reagente Anti-HCV, sem uso de tratamento antivirais, assistidos em Unidades de Saúde dos municípios de Atalaia do Norte e Manaus na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Após entrevista e aceite do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), os pacientes concordaram em fornecer seu material biológico (sangue) para o estudo. Foram excluídas amostras insuficientes, mal identificadas, úmidas e/ou danificadas ou violação de embalagem, identificadas pelo laboratório executor dos testes.

#### **3.3 Procedimentos**

##### **3.3.1 Coleta de sangue venoso**

Para a coleta de amostras de sangue por punção venosa, o voluntário foi acomodado na poltrona e o braço suspenso com ajuda de uma braçadeira de coleta, o garrote foi preso acima do local escolhido da coleta, foram feitos os procedimentos da assepsia local com algodão embebido com álcool 70%, a veia foi puncionada com um canhão de coleta a vácuo, foram coletados dois tubos de EDTA K3 com sangue venoso. Os tubos foram homogeneizados suavemente, posteriormente foi feito a centrifugação

conforme a recomendação do fabricante, o plasma foi separado e armazenado em um tubo de coleta.

### 3.3.2 Coleta de sangue capilar (Cartão DBS)

Os cartões DBS (AHLSTROM) possuem 5 círculos que são projetados para amostragem de microvolumes, transporte e armazenamento ambiente de amostras biológicas (proteínas, ácidos nucleicos ou vitaminas). São produzidos com fibras absorventes puras e não contêm aditivos ou produtos químicos de resistência à umidade, garantido uma coleta reproduzível e baixa interferência que possa interferir na confiabilidade da análise de analitos, como pequenas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos ou vitaminas.

Para a coleta de amostras de sangue por punção digital, foram feitos os procedimentos da assepsia local com algodão embebido com álcool 70%, aguardamos a secagem completa, e realizamos a coleta com auxílio de uma lanceta, desprezamos a primeira gota e procedeu à coleta impregnando os 05 círculos de 1,0 cm de diâmetro (~80µL) cada, no Cartão DBS. Este procedimento foi executado imediatamente, após a coleta da punção venosa. Após a coleta, o cartão DBS foi colocado no suporte para secagem total da amostra no cartão, durante a noite ou em até 24 horas, para armazenamento em saco plástico com sachê dessecante e selado, guardados à temperatura ambiente, e envelopados para postagem e/ou remessa. (Seguindo as orientações do Procedimento Operacional Padrão de Coleta, elaborado e revisado pela equipe do laboratório de carga viral da FMT-HVD (anexo).



Figura 5. Cartão DBS

### 3.3.3 Processo de extração e amplificação das amostras de plasma HBV

Foi utilizado o protocolo de ensaio Abbott RealTime HBV, onde a preparação de amostras concebido para utilizar processos de micropartículas magnéticas para a purificação dos ácidos nucleicos das amostras. Os reagentes do Abbott *mSample Preparation SystemDNA* efetuam a lise do vírion, capturam os ácidos nucleicos e lavam as partículas para remover componentes não ligados das amostras. A proteinase K está incluída na etapa de lise para digerir proteínas associadas aos ácidos nucleicos. Os ácidos nucleicos ligados são eluídos e transferidos para uma placa de 96 cavidades fundas. Os ácidos nucleicos ficam assim prontos para a amplificação. O CI é utilizado em todo o procedimento de preparação da amostra e é processado juntamente com os calibradores, controles e amostras.

O equipamento Abbott *m2000sp* combina os componentes do reagente de amplificação Abbott RealTime HBV (reagente de oligonucleotídeos do HBV, enzima Amplitaq Gold e reagente de ativação).

Durante a reação de amplificação/detecção no Abbott *m2000rt*, o DNA alvo é amplificado pela enzima Amplitaq Gold na presença de desoxinucleotídeos trifosfatos e magnésio (73).

### 3.3.4 Processo de extração e amplificação das amostras de plasma HCV

Foi utilizado o protocolo de ensaio Abbott RealTime HCV, na qual as amostras são preparadas utilizando o Abbott mSample Preparation System, que é um sistema que utiliza a tecnologia de partículas magnéticas para capturar ácidos nucleicos e lava as partículas para remover os componentes não ligados das amostras. Os ácidos nucleicos ligados são eluídos e transferidos para tubos de saída ou para uma placa de 96 poços profundos. Os ácidos nucleicos ficam assim prontos para a amplificação, com a combinação dos componentes do reagente de amplificação Abbott RealTime HCV (reagente de oligonucleotídeos do HCV, enzima rTth polimerase termoestável e reagente de ativação) (64).

### 3.3.5 Teste de estabilidade da carga viral em amostras de sangue seco em cartão DBS

Amostras de plasma remanescentes de três pacientes (P1, P2, P3) foram diluídas em sangue total para uma concentração de aproximadamente 1.000 UI/mL. Adicionamos 80 µL de sangue total em cada círculo do cartão DBS, o qual colocamos no suporte para secagem total da amostra no cartão e estocados a temperatura ambiente de 25 °C e refrigerados (2-8 °C) durante diferentes períodos. Nos dias 0 (dia seguinte à preparação), 3, 7, 10 e 14, as amostras foram submetidas aos testes de Carga Viral da hepatite B ou da hepatite C para a verificação da estabilidade das amostras dos três pacientes nas diferentes condições de armazenamento.

#### 3.3.5.1 Teste de estabilidade do DNA do HBV

- Três amostras clínicas foram selecionadas, com uma concentração inicial de 4,95 (P1); 4,52 (P2) e 4,64 (P3) log UI/mL;
- O soro de cada paciente foi diluído em sangue total (Anti-HCV não reagente) para atingir uma concentração-alvo de ~ 3,2 log UI/mL (1.500 UI/mL);
- 80 µL de sangue total foi adicionado aos cartões DBS e seco em temperatura ambiente durante a noite, ensacado pela manhã;

- As amostras foram submetidas ao teste de carga viral, de acordo com o

DIA	DBS estabilidade
1	1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)
4	1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)
7	1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)
11	1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)
14	1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)

cronograma;

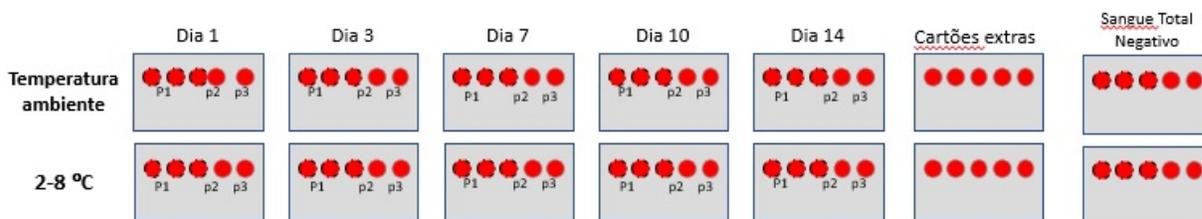
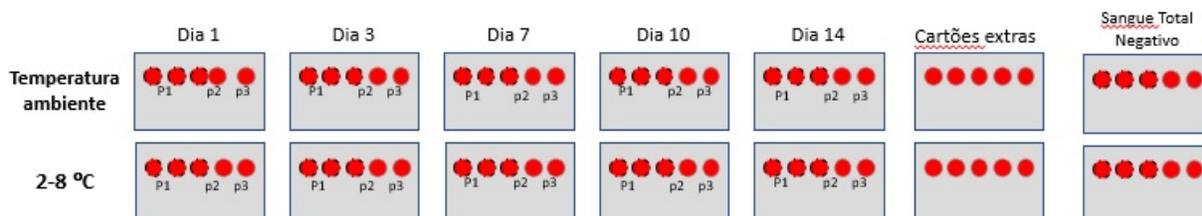


Figura 6. Modelo do preenchimento do DBS para teste de estabilidade do DNA do HBV

### 3.3.5.2 Teste de estabilidade do RNA do HCV

- Três amostras clínicas foram selecionadas, com uma concentração inicial de 5,44 (P1); 5,26 (P2) e 5,09 (P3) log UI/mL;
- O soro de cada paciente foi diluído em sangue total (Anti-HCV não reagente) para atingir uma concentração-alvo de ~ 3,2 log UI/mL (1.500 UI/mL);

- 80 µL de sangue total foi adicionado aos cartões DBS e seco em temperatura ambiente durante a noite, ensacado pela manhã;



As amostras foram submetidas ao teste de carga viral, de acordo com o cronograma:

DIA	DBS estabilidade
1	1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)
4	1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)
7	1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)
11	1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)
14	1spot p1, 1 spot p2, 1 spot p3, 1 spot sangue negativo (temperatura ambiente) 1spot P1, 1 spot P2, 1 spot P3, 1 spot sangue negativo (2-8°C)

### 3.3.6 Determinação do limite de detecção em amostras de sangue seco em cartão DBS

O limite de detecção foi determinado pela análise de diluições em sangue total de carga viral do HBV e HCV a partir dos controles ou calibradores dos próprios ensaios. Foram analisadas de 5 a 20 amostras em cada nível de concentração em dois processamentos utilizando dois lotes de reagentes de amplificação de cada ensaio. Foram testadas as concentrações 125, 500, 250 e 1000 UI/mL para cada ensaio.

Aproximadamente 80 µL de sangue total foram adicionados em cada círculo do cartão DBS, o qual foi colocado no suporte para secagem total da amostra no cartão, durante a noite ou em até 24 horas, antes da testagem.

### 3.3.6.1 Teste de determinação do limite de detecção do DNA do HBV

- O controle do HBV HIPOS de concentração foi diluído em sangue total (negativo para HBV) para atingir uma concentração de 125, 250, 500, 1000 UI/mL;
- 80 µL de sangue total foi adicionado aos cartões Ahlstrom e seco em temperatura ambiente durante a noite, ensacado pela manhã;
- Foram feitos 10 spots de 125 UI/mL, 20 spots de 500 UI/mL, 10 spots de 500 UI/mL e 5 spots de 1.000 UI/mL;
- As amostras foram submetidas ao teste de carga viral, de acordo com o cronograma;

DIA	DBS limite de detecção
<b>4</b>	5spots de 125 UI/mL, 10 spots de 250 UI/mL, 5 spots de 500 UI/mL e 2 spots de 1.000 UI/mL
<b>7</b>	5spots de 125 UI/mL, 10 spots de 250 UI/mL, 5 spots de 500 UI/mL e 3 spots de 1.000 UI/mL

### 3.3.6.2 Teste de determinação do limite de detecção do RNA do HCV

- O controle do HCV HIPOS de concentração foi diluído em sangue total (negativo para HCV) para atingir uma concentração de 125, 250, 500, 1000 UI/mL;
- 80 µL de sangue total foi adicionado aos cartões Ahlstrom e seco em temperatura ambiente durante a noite, ensacado pela manhã;
- Foram feitos 10 spots de 125 UI/mL, 20 spots de 500 UI/mL, 10 spots de 500 UI/mL e 5 spots de 1.000 UI/mL;

- As amostras foram submetidas ao teste de carga viral, de acordo com o cronograma.

DIA	DBS limite de detecção
4	5spots de 125 UI/mL, 10 spots de 250 UI/mL, 5 spots de 500 UI/mL e 2 spots de 1.000 UI/mL
7	5spots de 125 UI/mL, 10 spots de 250 UI/mL, 5 spots de 500 UI/mL e 3 spots de 1.000 UI/mL

### 3.3.7 Processo de extração e amplificação das amostras de sangue seco em cartão DBS

O protocolo padrão de pré-tratamento consiste em adicionar 1,3 mL de Tampão DBS (09N02-001) em cada Tubo de Mistura Principal a ser utilizado com as amostras de DBS, destacar um círculo inteiro de DBS do cartão com o auxílio de uma pipeta, em direção ao fundo do Tubo de Mistura Principal, até que fique totalmente imerso no tampão DBS; incubar a mistura a temperatura ambiente, por 30 minutos, homogeneizar os tubos com as amostras e colocar no suporte de amostras no sistema automatizado Abbott m2000sp, após a extração, os ácidos nucleicos são eluídos e transferidos para uma placa de 96 cavidades fundas. Os ácidos nucleicos ficam assim prontos para a amplificação.

O equipamento Abbott *m2000sp* combina os componentes do reagente de amplificação Abbott RealTime (reagente de oligonucleotídeos do HBV/HCV, enzima Amplitaq Gold e reagente de ativação). Durante a reação de amplificação/detecção no Abbott *m2000rt*, o DNA/RNA alvo é amplificado pela enzima Amplitaq Gold na presença de desoxinucleotídeos trifosfatos e magnésio, para mais informações sobre o processo consultar o POP em anexo.

## 3.4 Questões éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD, sob o seguinte Nº do parecer 2.976.805 em 23 de outubro de 2018, atendendo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, pelo CAAE 00541118.3.0000.0005.

### **3.5 Plano analítico**

Os dados da carga viral do vírus da Hepatite B ou da hepatite C, do mesmo paciente, em diferentes tipos de obtenção da amostra biológica, pelo Sistema em tempo real Abbott m2000sp foram tabulados numa base de dados em EPIINFO, e analisados através de cálculo de sensibilidade e especificidade para discriminar cargas virais detectáveis, além de testarmos a diferença entre os tipos de obtenção da amostra, através da análise de correlação de Pearson. Foi construído um gráfico de correlação para cálculo de coeficientes de correlação e curvas de regressão linear (Curva Roc) onde os parâmetros de reta foram calculados.

#### **4. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO**

Manuscrito científico redigido conforme normas da revista Pan American Journal of Public Health, no qual será submetido:

#### **O USO DO DBS NO DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DE INFECÇÃO POR HBV E HCV NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Reinan Brotas Ferreira<sup>1,2</sup>, Wornei Silva Miranda Braga<sup>2</sup>, Luciana Girotto Gentil<sup>3</sup>, Jose do Espírito Santo Junior<sup>2</sup>, Maianne Yasmin Oliveira Dias<sup>1</sup>, Yonne Francis Chehuan Melo<sup>2</sup>, Marcia Costa Castilho<sup>2</sup>, Mariana Paiva Peniche de Miranda<sup>4</sup>, Patricia Jeane de Oliveira Costa<sup>2</sup> e Rajendranath Ramasamwy<sup>1,5</sup>

1. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical/Universidade do Estado do Amazonas
2. Fundação de Medicina Tropical – Dr Heitor Vieira Dourado
3. Abbott Laboratories de Chile Ltda
4. Programa de Iniciação Científica/Fundação de Medicina Tropical – Dr. Heitor Vieira Dourado
5. Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas

#### **Resumo**

As hepatites virais são consideradas problemas de saúde pública, a Organização Mundial de Saúde tem como meta a eliminação até 2030 e para isso, uma das estratégias é o uso de testes de diagnóstico simples e de fácil acesso. O objetivo do estudo é analisar a relação da carga viral do vírus da hepatite B e do vírus da hepatite C em plasma e em sangue seco em papel filtro pela medida do PCR em tempo real. É do tipo transversal prospectivo, foi realizado em dois municípios do Amazonas. Os participantes com sorologia reagente para HBsAg ou anti-HCV, coletaram 8 mL de sangue venoso, em seguida, foi realizada a coleta de amostras de sangue capilar por punção digital impregnando no cartão DBS. Após a coleta, o cartão DBS passou pelo processo de secagem e

envolvimento, sendo armazenado em temperatura ambiente. Ambas as amostras passaram por processo de PCR em tempo real. No teste de estabilidade, nenhuma diferença significativa foi observada entre as amostras de cartão DBS armazenadas em temperatura refrigerada e ambiente. Na concordância de plasma e cartão DBS, as amostras de HBV foi de 90% e as amostras de HCV foi de 100%, na análise de regressão linear foi observado uma alta correlação nos resultados do HBV com um  $r^2=0,932$  e o HCV com um  $r^2=0,746$ . Os resultados mostram que o uso do DBS é satisfatório no diagnóstico molecular das hepatites virais B e C, apresentando uma forte correlação e alta sensibilidade, além disso o seu uso pode reduzir os custos associados a coleta, armazenamento e transporte.

No Mundo em 2019, presume-se que 58 milhões de pessoas tenham a infecção crônica pelo HCV, anualmente ocorram 1,5 milhões de novos casos. Cerca de 296 milhões de pessoas vivem com o HBV e anualmente estima-se 1,5 milhões de casos novos (1,2).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), tem como meta a eliminação das hepatites virais como ameaça a saúde pública até 2030. As metas visam reduzir em 90% a incidência de infecção crônica e em 65% as mortes anuais. Para alcançar os objetivos devem ser adotadas estratégias que explorem novas oportunidades, como sensibilização da população e o avanço nos medicamentos antivirais e diagnóstico. Dando prioridade ao desenvolvimento de testes diagnóstico de tecnologia simples, que alcance áreas remotas e população de difícil acesso, permitindo orientar as decisões médicas (3).

Grupos com alta prevalência para as hepatites virais que incluem indígenas, prisioneiros, migrantes, homens que fazem sexo com homens, usuários de drogas e coinfectados por HIV precisam de abordagens específicas e oferta dos serviços de saúde.

O uso de Dried Blood Spot (DBS) oferece mais conveniência e simplificação na logística para coleta, armazenamento e transporte, trazendo mais segurança no manuseio das amostras, volumes menores de material biológico, mão de obra reduzida, punção direta capilar com uso de

lanceta e baixo custo. É utilizada na prática de diagnóstico biológico quantitativo e qualitativo, na análise de ácido nucléico, antígeno e anticorpos (4,5). O DBS é uma alternativa de coleta para diagnóstico molecular, tendo sua aplicabilidade para regiões de difícil acesso e longínquo dos grandes centros (6).

A Região Amazônica, por ter um perfil endêmico para as hepatites Virais B e C, e ter uma logística de pessoas e insumos feitos por via fluvial e sua população periférica e interiorana ser composta por indígenas e ribeirinhos, foi o cenário ideal para aplicabilidade desse estudo.

## **OBJETIVO**

Nesse estudo, foi analisado o desempenho dos testes Abbott RealTime HCV e Abbott RealTime HBV (Sistema m2000) para detectar e quantificar a carga viral em amostras de sangue seco em papel filtro em comparação com amostras de plasma de pacientes infectados com HCV e HCV, respectivamente. Também foi verificada a estabilidade das amostras em DBS.

## **MATERIAIS e MÉTODOS**

### **Tipo, local e população do estudo**

Este foi um estudo transversal prospectivo, as amostras foram coletadas em dois municípios do Amazonas, nas Unidades de Saúde Básica do município de Atalaia do Norte e na Fundação de Medicina Tropical – Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) em Manaus, no período de 12 de setembro de 2020 a 22 de março de 2022. A execução das amostras aconteceu no Laboratório de Carga Viral HIV/HBV/HCV da FMT-HVD.

Os participantes tinham idade mínima de 18 anos, ambos os gêneros, com sorologia reagentes para antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) ou sorologia reagentes anti-HCV, sem uso de tratamento antivirais, após entrevista pelo aceite do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) concordaram em fornecer seu material biológico. O protocolo do estudo foi

aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMT-HVD, atendendo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, pelo número do parecer 4.456.866 e CAAE 00541118.3.0000.0005.

### **Coleta**

Para cada paciente foi realizada coleta de 8 mL de sangue venoso destinadas para quantificação da carga viral da hepatite B e C em plasma utilizando o protocolo de extração de 0.5 mL no Sistema m2000. Em seguida, foi realizada a coleta de amostras de sangue capilar por punção digital impregnando o sangue nos círculos de 1,0 cm de diâmetro ( $\approx 80 \mu\text{L}$ ) cada, no cartão DBS (AHLSTROM). Após a coleta, o cartão foi seco durante a noite ou em até 24 horas, armazenado e selado à temperatura ambiente em saco plástico com sachê dessecante, e envelopados. No laboratório, os cartões DBS ficaram armazenadas a temperatura de  $23^{\circ}\text{C}$  até o momento da testagem.

Os cartões DBS possuem 5 círculos que são projetados para amostragem de microvolumes, transporte e armazenamento ambiente de amostras biológicas. São produzidos com fibras absorventes puras e não contêm aditivos ou produtos químicos de resistência à umidade, garantido uma coleta reproduzível e baixa interferência que possa interferir na confiabilidade da análise de analitos, como pequenas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos ou vitaminas.

### **Teste laboratorial**

Cada círculo de amostras de DBS foi pré-tratado com 1,3mL de tampão DBS (Abbott mSample Preparation System DBS Buffer) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram processadas utilizando os protocolos de modo aberto para extração e amplificação no Sistema m2000. Os protocolos utilizam um volume de amostras DBS 1mL.

## **Análises estatísticas**

A correlação entre DBS e plasma foi verificada e determinada por análise de regressão linear e representadas pelo gráfico do tipo scatter plot. As diferenças de cargas virais entre os tipos de amostras foram representadas em gráficos do tipo Band-Altman plot.

## **RESULTADOS**

### **Perfil das amostras**

O estudo teve a participação de 244 pessoas, sendo 67 no grupo da hepatite C e 177 no grupo da hepatite B. Dos 67 participantes do grupo da hepatite C, a idade média foi de aproximadamente 54 anos, 52% (35/67) era do sexo feminino e 48% (32/67) pessoas do sexo masculino, as 67 amostras foram coletadas em Manaus. As amostras de HCV foram classificadas de acordo com o genótipo, sendo o genótipo 1b predominante com 34% (20/59), seguido do genótipo 1a com 27% (16/59), genótipo 3 com 14% (8/59), genótipo 2 com 5% (3/59) e um participante apresentou dois genótipos 2 e 3 com 1% (1/59), 19% (11/59) das amostras com resultado indeterminado. Dos 177 participantes rastreados para hepatite B, a idade média foi de aproximadamente de 44 anos, 53% (93/177) eram do sexo masculino e 47% (84/177) do sexo feminino, em relação a coleta das amostras 83% (147/177) foram coletadas em Manaus e 17% (33/177) em Atalaia do Norte.

### **Estabilidade das amostras**

No teste de estabilidade e no período de execução das amostras de DBS, nenhuma diferença significativa foi observada, no armazenamento das amostras que ficaram em temperatura ambiente.

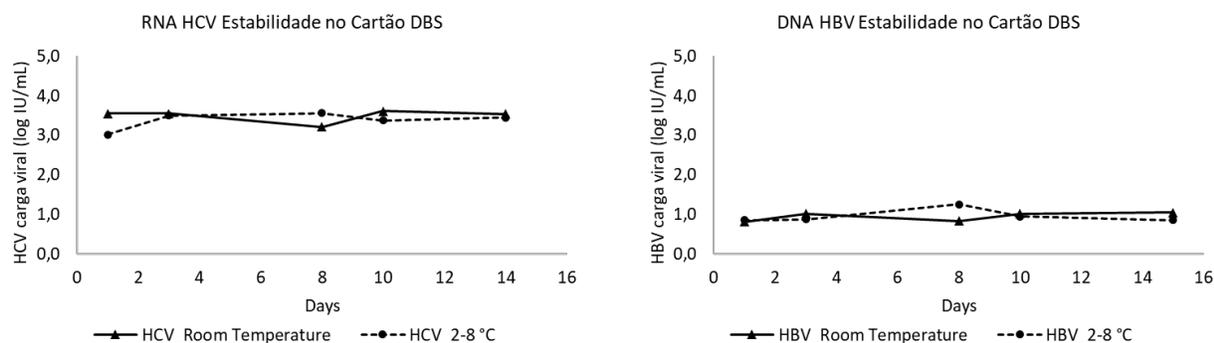


Figura 1. Estabilidade de HCV RNA (A) e HBV DNA (B) em cartão de papel Ahlstrom-Munktell TFN armazenado em temperatura ambiente e 2-8 °C por até 2 semanas. Cada ponto representa a carga viral média de três amostras clínicas diferentes na concentração alvo de 3,2 UI/mL (1.500 UI/mL)

### Detecção e quantificação de RNA de HCV e DNA de HBV em amostras de plasma e DBS

Um total de 67 amostras pareadas de plasma e DBS capilar foram coletadas de pacientes, sendo que dessas, 8 amostras deram negativa para RNA de HCV e 59 amostras foram positiva em plasma e DBS capilar, resultando em uma concordância qualitativa geral de 100% (Tabela 2A). A carga viral de RNA do HCV em amostras de plasma variou de 76 UI/mL (1,88 log UI/ML) a 9.263.355 UI/mL (6,97 log UI/mL).

Um total de 177 amostras pareadas de plasma e DBS capilar foram coletadas de pacientes HBsAg reagente (134/177) ou com status de reatividade desconhecido (43/177). Noventa e sete amostras tiveram um resultado de DNA de HBV detectado no plasma e um resultado de DNA de HBV não detectado em DBS capilar, mostrando uma alta correlação discordante entre essas amostras. A análise desses resultados mostrou que 93% (90/97) apresentavam concentração de carga viral abaixo dessa concentração, todos os 105 resultados abaixo de 3 log UI/mL no plasma e DBS foram excluídos da análise a seguir. A concordância qualitativa geral entre o DNA do HBV no plasma e DBS capilar foi de 90% (Tabela 2B). A carga viral de DBS do HBV em amostras de plasma variou de 1.001 UI/ml (3 log UI/mL) a 108.639.191 (8,04 log UI/mL).

Tabela 1. Correlação qualitativa entre plasma e capilar DBS.

HCV (n= 67)	Plasma		HBV (n= 72)	Plasma		
	RNA-HCV Detectado	RNA-HCV Não detectado		DNA-HBV Detectado	DNA-HBV Não detectado	
DBS	RNA-HCV Detectado	59	0	DNA-HBV Detectado	37	0
	RNA-HCV Não detectado	0	8	DNA-HBV Não detectado	7	28

Um gráfico de dispersão, comparando as cargas virais plasmáticas de RNA do HCV e as cargas virais capilares DBS, mostrou o  $R^2 = 0,746$  (Fig. 2A). A diferença média de polarização entre o capilar DBS e o plasma foi de  $-0,068$  Log UI/mL (IC 95%:  $-0,056$   $0,192$ ) conforme no gráfico de Bland-Altman (Fig. 2B). Noventa e três por cento de todas as amostras mostraram uma diferença entre os tipos de amostra inferior a 1 log UI/mL.

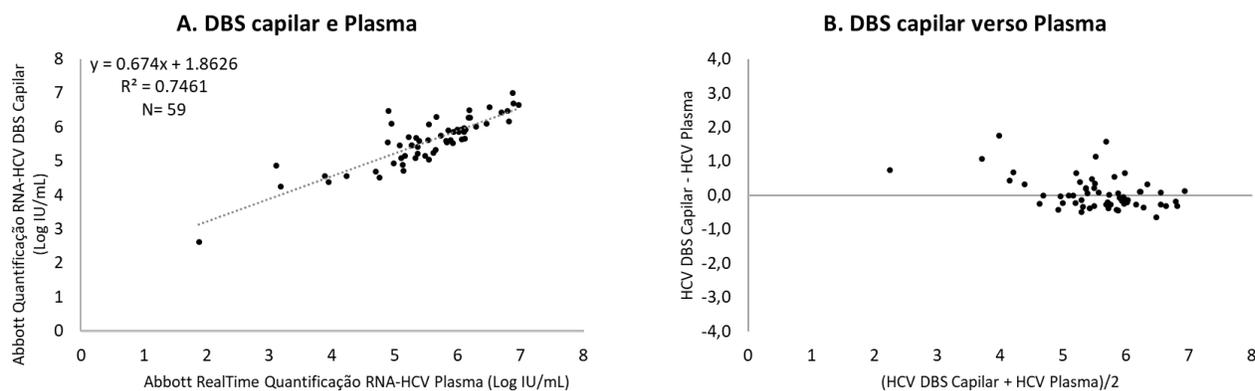


Figura 2. 7(A) Regressão linear dos níveis de RNA do HCV medidos pelo ensaio RealTime HCV em 59 amostras pareadas de plasma e capilares DBS. (B) Análise do gráfico de Bland-Altman das mesmas 59 amostras pareadas mostrando o viés médio (IC 95%) entre os dois tipos de amostra

Uma alta correlação foi observada entre as cargas virais de DNA do HBV em 37 plasmas pareados e capilar DBS ( $r^2 = 0,932$ ), com um fator de conversão estimado de  $+2,77$  log UI/mL (Fig. 3) O fator

de conversão foi determinado pela subtração da carga viral do plasma pela carga viral do DBS em cada uma das 37 amostras. Ao final, foi calculada a média dessas diferenças.

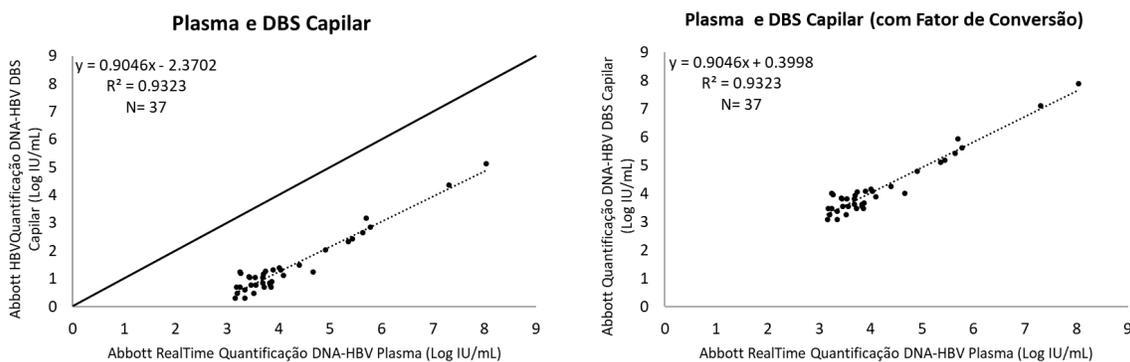


Figura 3. Regressão linear dos níveis de DNA do HBV medidos pelo ensaio RealTime HBV em 37 amostras pareadas de plasma e capilar DBS, antes (A) e depois (B) da aplicação do fator de conversão (2,77 log UI/mL).

Para a análise do gráfico de Bland-Altman, o fator de conversão foi aplicado aos resultados do DBS para melhor mostrar as diferenças entre os tipos de amostra (Fig. 4). A diferença média de polarização entre os níveis de DNA do HBV no DBS capilar e no plasma foi de  $-0,002$  log UI/mL (IC 95%:  $-0,094$   $0,099$ ). Todas as amostras exibiram uma variação média de  $0,75$  log UI/mL.

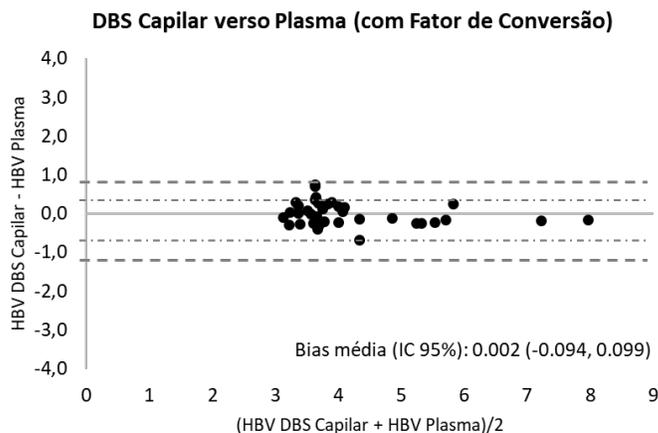


Figura 4. Bland-Altman. Análise das 37 amostras pareadas de HBV mostrando o viés médio (IC95%) entre os tipos de amostra.

## DISCUSSÃO

O estudo revela uma alta correlação da carga viral da hepatite B, bem como uma boa correlação da carga viral da hepatite C, tanto em plasma quanto em sangue coletado em cartão DBS, o estudo tem diferenciais por ter sido realizado em vida real na região amazônica ocidental brasileira, local escolhido, por ser uma região endêmica para hepatites virais e, por sua extensão geográfica que exerce uma importante influência na logística de insumos e acesso da população aos serviços de saúde.

Essa metodologia de coleta é simples e de fácil manuseio, conforme estudo de validação na Zâmbia, a coleta de DBS pode ser realizada por pessoal não treinado em medicina, observou-se um grau de competência de 86% na pontuação média e na qualidade dos cartões DBS. Sendo uma alternativa para as localidades de difícil acesso e sem profissionais de saúde (7). Em pacientes com HCV, foi realizado uma comparação dos resultados de autocoleta do DBS com as amostras de plasmas que foram coletadas em laboratório, demonstrando uma forte correlação dos resultados de carga viral e manuseio dos pacientes com kit de autocoleta e na qualidade das amostras (9).

No protocolo desse estudo, o armazenamento dos cartões DBS foi em temperatura ambiente, simulando a realidade de países de baixa e média renda. De acordo com a metanálise realizada em 2018, os protocolos dos estudos de DBS não avaliam e nem simulam o impacto das condições ambientais sobre as amostras (11), mesma observação foi citado em uma revisão sistemática e metanálise realizada em 2017 (10).

O nosso estudo em relação a avaliação dos resultados da carga viral do HCV em plasma e em DBS, mostrou uma alta correlação. Além disso, apresentou uma boa concordância, sendo a sensibilidade e especificidade de 100%, mostrando uma boa acurácia diagnóstica e para o monitoramento do tratamento, RVS.

O que foi observado em outros lugares, como um estudo realizado em um instituto terciários de cuidados hepáticos em 2016, mostrando boa linearidade e uma concordância de 93,5% entre os

resultados do plasma e DBS (11). Em um estudo realizado na Holanda, onde os participantes auto coletavam as amostras por picada de dedo em cartão DBS, o resultado da regressão linear encontrado foi semelhante (8).

A análise de Bland-Altman de nossos resultados, mostrou que 89% (33/37) das amostras estavam dentro do intervalo de confiança de 95% entre as variações dos resultados da carga viral, o mesmo observado em um estudo realizado com usuários de drogas no Vietnã, 97% (36/37) estavam dentro do intervalo de confiança de 95% e com uma alta correlação (12).

Já na análise dos resultados das amostras do HBV, o uso do DBS mostrou uma alta sensibilidade para amostras com resultados igual ou superior a 3,0 log UI/ml, mas seu uso em amostras abaixo de 3,0 log UI/ml não é indicado, devido a sua baixa sensibilidade e chances de resultados falso-negativos. Um estudo realizado em um laboratório de hepatites, no Rio de Janeiro, testou amostras de DBS de 10 participantes com quatro métodos de extração de DNA, todas as amostras com carga viral superior a 1.556 UI/ml foram detectadas (13).

Nossa análise da regressão linear entre a carga viral do HBV obtida no plasma e sangue seco em DBS, observou-se uma forte correlação, resultado similar encontrado em outros estudos, como em um estudo na França, onde o sangue total venoso foi impregnado no cartão DBS (14) e em um estudo na Etiópia, que também usou sangue total venoso no cartão DBS (15). No Brasil, entre 2011 a 2015, pesquisadores parearam amostras de soro e sangue total venoso em DBS, resultando em uma forte correlação, e os testes de reprodutibilidade e repetibilidade não apresentaram diferença significativa (6). No gráfico de Bland-Aftman, a diferença máxima da carga viral foi de 0,75 log UI/ml, menor ou igual em DBS em comparação com o plasma.

Portanto, os resultados da carga viral de amostras de sangue seco em DBS, mostrou dados importantes. Seu uso pode ser indicado para tratamento inicial de tratamento ou falha virológica de pacientes portadores de hepatite B crônica, conforme diretrizes internacionais que recomendam o uso de tratamento antiviral para pacientes com carga viral de 2.000 a 20.000 UI/ml. Nos casos de

pacientes com carga viral abaixo de 2.000 UI/mL para diagnóstico, o seu uso não irá interferir na conduta médica (7,15).

Nosso estudo mostrou que amostras DBS tem uma alta sensibilidade e correlação em ambas as análises de carga viral das hepatites B e C, sua viabilidade e economia trazem uma alternativa para o aumento do acesso a exames laboratoriais para o diagnóstico das hepatites virais em regiões de difícil acesso ou que tenham dificuldade no transporte e armazenamentos de amostras biológicas. Já existem testes de RNA-HCV em DBS registrados e comercializados no mundo, mas ainda não temos para ensaios de DNA-HBV (14). Estudos como este, trazem evidências para validação de testes DBS DNA-HBV. Já que o acesso ao diagnóstico em países de baixa renda é uma das barreiras, que pode interferir no alcance da meta da OMS até 2030 (16,17)

Os resultados evidenciam que o uso do DBS é satisfatório no diagnóstico molecular e no monitoramento das hepatites virais B e C, apresentando uma forte correlação e alta sensibilidade, além disso o seu uso pode reduzir os custos associados a coleta, armazenamento e transporte. Assim, faz-se imprescindível a reestruturação e adaptação da rede laboratorial para a implementação do DBS na rotina, superando o processo tradicional da coleta por punção venosa. O uso de DBS não apenas simplifica o processo, ampliando o acesso da população a diagnósticos rápidos, mas também resulta em menor impacto nos custos do orçamento de saúde.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Hepatitis C [Internet]. 2022 [cited 2022 May 13]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
2. World Health Organization. Hepatitis B [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
3. World Health Organization. Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016-2021, Towards Ending Viral Hepatitis. 2016 [cited 2023 Jan 21]; Available from:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246177/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

4. Lim MD. Dried blood spots for global health diagnostics and surveillance: Opportunities and challenges [Internet]. Vol. 99, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2018 [cited 2023 Mar 4]. p. 256–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6090344/>
5. Bibi S, Siddiqui TR, Alam SE, Ahmed W, Qureshi H. Comparison of dried blood spots with conventional blood sampling for diagnosis of hepatitis b & c through serological and molecular technique; a pilot study. In: Journal of the Pakistan Medical Association [Internet]. Pakistan Medical Association; 2020 [cited 2023 Mar 4]. p. 1214–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32799276/>
6. Bezerra CS, Portilho MM, Barbosa JR, de Azevedo CP, Mendonça AC da F, da Cruz JNM, et al. Dried blood spot sampling for hepatitis B virus quantification, sequencing and mutation detection. Sci Rep [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Mar 4];12(1):2–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-05264-1>
7. Vinikoor MJ, Zürcher S, Musukuma K, Kachuwaire O, Rauch A, Chi BH, et al. Hepatitis B viral load in dried blood spots: A validation study in Zambia. Journal of Clinical Virology [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2023 Mar 7];72:20–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4959444/>
8. Prinsenber T, Rebers S, Boyd A, Zuure F, Prins M, Van Der Valk M, et al. Dried blood spot self-sampling at home is a feasible technique for hepatitis C RNA detection. PLoS One [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2023 Mar 4];15(4):1–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7156069/>
9. Vázquez-Morón sonia, Ardizzone Jiménez B, Jiménez-sousa MA, Bellón JM, Ryan pablo, Resino salvador. evaluation of the diagnostic accuracy of laboratory-based screening for hepatitis C in dried blood spot samples: A systematic review and meta-analysis. Sci Rep [Internet]. 2019;9(7316). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41139-8>
10. Lange B, Roberts T, Cohn J, Greenman J, Camp J, Ishizaki A, et al. Diagnostic accuracy of detection and quantification of HBV-DNA and HCV-RNA using dried blood spot (DBS) samples - a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Mar 11];17:71–85. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5688458/pdf/12879\\_2017\\_Article\\_2776.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5688458/pdf/12879_2017_Article_2776.pdf)

11. Mahajan S, Choudhary MC, Kumar G, Gupta E. Evaluation of dried blood spot as an alternative sample collection method for hepatitis C virus RNA quantitation and genotyping using a commercial system. *Virusdisease* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2023 Mar 5];29(2):141–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29911146/>
12. Nguyen TT, Lemee V, Bollore K, Vu HV, Lacombe K, Thi XLT, et al. Confirmation of HCV viremia using HCV RNA and core antigen testing on dried blood spot in HIV infected peoples who inject drugs in Vietnam. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018 Dec 4 [cited 2023 Mar 11];18(1). Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6280470/pdf/12879\\_2018\\_Article\\_3529.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6280470/pdf/12879_2018_Article_3529.pdf)
13. Bezerra CS, Portilho MM, Frota CC, Villar LM. Comparison of four extraction methods for the detection of hepatitis B virus DNA in dried blood spot samples. *Microbiologyopen* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Mar 8];10(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8107022/>
14. Ortonne V, Lucas Q, Garrigou O, Soulier A, Challine D, Pawlotsky JM, et al. Alinity m, a Random-Access System, for Hepatitis B Virus DNA Quantification in Plasma and Whole Blood Collected on Dried Blood Spots. *mSphere* [Internet]. 2022 Jun 29 [cited 2023 Mar 6];7(3):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9241498/>
15. Stene-Johansen K, Yaqoob N, Overbo J, Abera H, Desalegn H, Berhe N, et al. Dry blood spots a reliable method for measurement of Hepatitis B viral load in resource-limited settings. *PLoS One* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 Mar 6];11(11):1–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5098817/>
16. Carrasco T, Barquín D, Ndarabu A, Fernández-Alonso M, Rubio-Garrido M, Carlos S, et al. Hcv diagnosis and sequencing using dried blood spots from patients in kinshasa (Drc): A tool to achieve who 2030 targets. *Diagnostics* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Mar 7];11(3):1–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8002119/#B26-diagnostics-11-00522>
17. Tuailon E, Kania D, Pisoni A, Bollore K, Taieb F, Ontsira Ngoyi EN, et al. Dried Blood Spot Tests for the Diagnosis and Therapeutic Monitoring of HIV and Viral Hepatitis B and C [Internet]. Vol. 11, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2023 Mar 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075356/>

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que o uso do DBS é satisfatório no diagnóstico molecular das hepatites virais B e C, apresentando uma forte correlação e alta sensibilidade, além disso o seu uso pode reduzir os custos associados a coleta, armazenamento e transporte. Mostrou alta performance na sua utilização em uma população indígena e ribeirinha, no município de Atalia do Norte, devido a sua praticidade.

Portanto, é necessário uma reestruturação e adaptação na rede laboratorial para implantação do DBS na rotina, quebrando assim, o paradigma da coleta tradicional através da punção venosa.

Este estudo reforça que o uso de materiais e tecnologia simples no processo de diagnóstico e monitoramento das hepatites virais pode contribuir para que a meta da eliminação seja alcançada e contribui para que novos estudos sejam realizados nas populações chave e em países que tem dificuldade no acesso a serviços de saúde e laboratórios especializados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khuroo MS, Sofi AA. The Discovery of Hepatitis Viruses: Agents and Disease. Vol. 10, Journal of Clinical and Experimental Hepatology. Elsevier B.V.; 2020. p. 391–401.
2. Ministério da Saúde. MANUAL TÉCNICO PARA O DIAGNÓSTICO DAS HEPATITES VIRAIS [Internet]. 2018. Available from: <http://www.aids.gov.br>
3. World Health Organization. Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016-2021, Towards Ending Viral Hepatitis. 2016 [cited 2023 Jan 21]; Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246177/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Saúde M da. HEPATITE B PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS DE E COINFECÇÕES [Internet]. 2023. Available from: <http://conitec.gov.br/>
5. Gerlich WH. Medical Virology of Hepatitis B: How it began and where we are now [Internet]. Vol. 10, Virology Journal. 2013 [cited 2023 Apr 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3729363/pdf/1743-422X-10-239.pdf>
6. International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV. Species: Hepatitis B virus [Internet]. 2023 [cited 2023 Jan 31]. Available from: [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202103653](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202103653)
7. Jiang Y, Han Q, Zhao H, Zhang J. The Mechanisms of HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. J Hepatocell Carcinoma. 2021 May; Volume 8:435–50.
8. Herrscher C, Roingard P, Blanchard E. Hepatitis B Virus Entry into Cells. Vol. 9, Cells. NLM (Medline); 2020.
9. World Health Organization. Hepatitis B [Internet]. [cited 2023 Oct 14]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
10. Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH, et al. AASLD Guidelines for Treatment of Chronic Hepatitis B Objectives and Guiding Principles Guiding Principles HHS Public Access. Hepatology. 2016;63(1):261–83.
11. World Health Organization. Hepatitis C [Internet]. 2022 [cited 2022 May 13]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
12. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais. 2021.

13. Saúde M da. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. 2018.
14. World Health Organization. Global Hepatitis Report, 2017. 2017 [cited 2023 Jan 23]; Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1082592/retrieve>
15. Dias JA, Cerutti Júnior C, Falqueto A. Fatores associados à infecção pelo vírus da hepatite B: um estudo caso-controle no município de São Mateus, Espírito Santo. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2014 Dec;23(4):683–90.
16. de Oliveira CSF, Vilar e Silva A, dos Santos KN, Fecury AA, de Almeida MKC, Fernandes AP, et al. Infecção pelo vírus da hepatite B e C em ribeirinhos da amazônia Brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011 Sep;44(5):546–50.
17. Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy [Internet]. 2020. Available from: <https://doi.org/10>
18. Liu Z, Zhang Y, Xu M, Li X, Zhang Z. Distribution of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. *Medicine (United States)*. 2021 Dec 17;100(50):E27941.
19. Tripathi N, Mousa OY. Hepatitis B. 2023.
20. Papatheodoridis G, Buti M, Cornberg M, Janssen H, Mutimer D, Pol S, et al. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. Vol. 57, *Journal of Hepatology*. Elsevier B.V.; 2012. p. 167–85.
21. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HLY, Chen CJ, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. Vol. 10, *Hepatology International*. Springer; 2016. p. 1–98.
22. Lee MH, Yang HI, Liu J, Batrla-Utermann R, Jen CL, Iloeje UH, et al. Prediction models of long-term Cirrhosis and hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B patients: Risk scores integrating host and virus profiles. *Hepatology*. 2013 Aug;58(2):546–54.
23. Chan HLY, Wong GLH, Tse CH, Chan HY, Wong VWS. Viral determinants of hepatitis B surface antigen seroclearance in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients. *Journal of Infectious Diseases*. 2011 Aug 1;204(3):408–14.
24. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2014 Dec;384(9959):2053–63.

25. Wong VW, Chan HL. Severe acute exacerbation of chronic hepatitis B: A unique presentation of a common disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Jul 29;24(7):1179–86.
26. Zhu M, Wang H, Lou T, Xiong P, Zhang J, Li L, et al. Current treatment of chronic hepatitis B: Clinical aspects and future directions. *Front Microbiol*. 2022 Sep 8;13.
27. HEPATITE B PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS DE E COINFECCÕES [Internet]. Available from: <http://conitec.gov.br/>
28. Vacina contra hepatite B Hepatitis B vaccine.
29. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis B. Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação [Internet]. Available from: <http://editora.saude.gov.br>
30. Chang MH, Chen DS. Prevention of hepatitis B. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2015 [cited 2023 Apr 9];5(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4355249/>
31. Saúde M DA. PROFILAXIA PÓS-EXPOSIÇÃO (PEP) DE RISCO À INFECÇÃO PELO HIV, IST E HEPATITES VIRAIS PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA [Internet]. Available from: [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br)
32. Pattyn J, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. Hepatitis B Vaccines. *Journal of Infectious Diseases*. 2021 Oct 1;224:S343–51.
33. Wang Y, Cheng G, Lau G. Achieving WHO target of HCV control in Hong Kong: challenges and strategies. *Glob Health Med*. 2021 Oct 31;3(5):276–82.
34. Ministério da Saúde. Guia Instrucional Viva Melhor Sabendo [Internet]. 2021 [cited 2023 Feb 1]. Available from: [https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/2021/guia-instrucional-viva-melhor-sabendo/@@download/file/058\\_guia\\_instrucional\\_viva\\_melhor\\_sabendo\\_2021\\_final\\_17.11.21.pdf](https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/2021/guia-instrucional-viva-melhor-sabendo/@@download/file/058_guia_instrucional_viva_melhor_sabendo_2021_final_17.11.21.pdf)
35. Ministério da Saúde. Política do Ministério da Saúde para Atenção Integral a Usuários de Álcool e Outras Drogas [Internet]. 2003 [cited 2023 Feb 1]. Available from: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pns\\_alcool\\_drogas.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pns_alcool_drogas.pdf)
36. Coutinho C, Bastos LS, da Mota JC, Toledo L, Costa K, Bertoni N, et al. The risks of HCV infection among Brazilian crack cocaine users: incorporating diagnostic test uncertainty. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).

37. Manns MP, Maasoumy B. Breakthroughs in hepatitis C research: from discovery to cure. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022 Aug 1;19(8):533–50.
38. All Nobel Prizes in Physiology or Medicine [Internet]. 2024 [cited 2024 Jan 18]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-laureates-in-physiology-or-medicine/>
39. Taxonomia HCV [Internet]. 2023 [cited 2023 Sep 25]. Available from: [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202103127](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202103127)
40. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural Biology of Hepatitis C Virus. Vol. 39, *Hepatology*. 2004. p. 5–19.
41. Chigbu DI, Loonawat R, Sehgal M, Patel D, Jain P. Hepatitis c virus infection: Host-virus interaction and mechanisms of viral persistence. *Cells*. 2019 Apr 1;8(4).
42. Negro F. Natural history of hepatic and extrahepatic hepatitis C virus diseases and impact of interferon-free HCV therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020 Apr 1;10(4).
43. Basit H, Tyagi I, Koirala J. Hepatitis C. 2023.
44. Gobran ST, Ancuta P, Shoukry NH. A Tale of Two Viruses: Immunological Insights Into HCV/HIV Coinfection. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
45. Mata-Marín JA, de Pablos-Leal AA, Mauss S, Arroyo-Anduiza CI, Rodríguez-Evaristo MS, Uribe-Noguéz LA, et al. Risk factors for HCV transmission in HIVpositive men who have sex with men in México. *PLoS One*. 2022 Jul 1;17(7 July).
46. Ministério da Saúde Gabinete do Ministro PORTARIA Nº 158, DE 4 DE FEVEREIRO DE 2016 [Internet]. Available from: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0158\\_04\\_02\\_2016.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0158_04_02_2016.html)
47. Pessoni LL, Aquino EC de, Alcântara KC de. Prevalence and trends in transfusion-transmissible infections among blood donors in Brazil from 2010 to 2016. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019 Oct 1;41(4):310–5.
48. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde Hepatites Virais | 2022 Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico.
49. Portari-Filho LH, Álvares-da-Silva MR, Gonzalez A, Ferreira AP, Nogueira C V., Mendes-Correa MC, et al. How are HCV-infected patients being identified in Brazil: a multicenter study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2019 Jan 1;23(1):34–9.

50. Nutini MFR, Hunter J, Giron L, Pires AFNPC, Kohiyama IM, Camargo M, et al. HCV genotype profile in Brazil of monoinfected and HIV co-infected individuals: A survey representative of an entire country. *PLoS One*. 2020 Jan 1;15(1).
51. Sampaio RMA, Dantas PEF, da Silva MIC, da Silva JR, Nunes PF, Gomes AC, et al. Comparison of Patients Monoinfected with Hepatitis C Virus and Coinfected with Hepatitis B/C in the Amazon Region of Brazil. *Viruses*. 2022 May 1;14(5).
52. Abu-Freha N, Mathew Jacob B, Elhoashla A, Afawi Z, Abu-Hammad T, Elsana F, et al. Chronic hepatitis C: Diagnosis and treatment made easy. Vol. 28, *European Journal of General Practice*. Taylor and Francis Ltd.; 2022. p. 102–8.
53. Mezina A, Krishnan A, Woreta TA, Rubenstein KB, Watson E, Chen PH, et al. Longitudinal assessment of liver stiffness by transient elastography for chronic hepatitis C patients. *World J Clin Cases*. 2022 Jun 16;10(17):5566–76.
54. Cardoso AC, Figueiredo-Mendes C, Villela-Nogueira CA, Marcellin P. Staging Fibrosis in Chronic Viral Hepatitis. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
55. Bernal LA, Soti V. Hepatitis C Virus: Insights Into Its History, Treatment, Challenges, and Future Directions. *Cureus*. 2023 Aug 22;
56. Di Marco L, La Mantia C, Di Marco V. Hepatitis C: Standard of Treatment and What to Do for Global Elimination. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
57. Dietz C, Maasoumy B. Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Virus Infection—From Drug Discovery to Successful Implementation in Clinical Practice. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
58. Di Marco L, La Mantia C, Di Marco V. Hepatitis C: Standard of Treatment and What to Do for Global Elimination. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
59. Halliday J, Klenerman P, Barnes E. Vaccination for hepatitis C virus: Closing in on an evasive target. Vol. 10, *Expert Review of Vaccines*. 2011. p. 659–72.
60. Bailey JR, Barnes E, Cox AL. Approaches, Progress, and Challenges to Hepatitis C Vaccine Development. *Gastroenterology*. 2019 Jan;156(2):418–30.
61. Shoukry NH. Hepatitis C Vaccines, Antibodies, and T Cells. *Front Immunol*. 2018;9:1480.
62. Fu L, Song T, Zhang W, Zhang J, Lu Y. Stimulatory effect of magnetite nanoparticles on a highly enriched butyrate-oxidizing consortium. *Front Microbiol*. 2018 Jul 5;9(JUL).

63. Netto G, Saad R, Dysert II P. Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I. BUMC PROCEEDINGS. 2003;16:379–83.
64. Abbott Molecular Inc. Abbott RealTime HCV [Internet]. [cited 2023 Oct 25]. Available from: <https://www.molecular.abbott/content/dam/add/molecular/products/infectious-disease/realtime-hcv-viral-load/realtime-hcv-package-insert.pdf>
65. Grüner N, Stambouli O, Ross RS. Dried blood spots - Preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *Journal of Visualized Experiments*. 2015 Mar 13;2015(97).
66. Gonzalez J, Willis MS. Robert Guthrie, MD, PhD. *Lab Med*. 2009 Dec;40(12):748–9.
67. Lim MD. Dried blood spots for global health diagnostics and surveillance: Opportunities and challenges [Internet]. Vol. 99, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2018 [cited 2023 Mar 4]. p. 256–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6090344/>
68. Bibi S, Siddiqui TR, Alam SE, Ahmed W, Qureshi H. Comparison of dried blood spots with conventional blood sampling for diagnosis of hepatitis b & c through serological and molecular technique; a pilot study. In: *Journal of the Pakistan Medical Association* [Internet]. Pakistan Medical Association; 2020 [cited 2023 Mar 4]. p. 1214–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32799276/>
69. Ortonne V, Lucas Q, Garrigou O, Soulier A, Challine D, Pawlotsky JM, et al. Alinity m, a Random-Access System, for Hepatitis B Virus DNA Quantification in Plasma and Whole Blood Collected on Dried Blood Spots. *mSphere* [Internet]. 2022 Jun 29 [cited 2023 Mar 6];7(3):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9241498/>
70. McClendon-Weary B, Putnick DL, Robinson S, Yeung E. Little to Give, Much to Gain—What Can You Do With a Dried Blood Spot? Vol. 7, *Current Environmental Health Reports*. Springer; 2020. p. 211–21.
71. Bezerra CS, Portilho MM, Barbosa JR, de Azevedo CP, Mendonça AC da F, da Cruz JNM, et al. Dried blood spot sampling for hepatitis B virus quantification, sequencing and mutation detection. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Mar 4];12(1):2–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-05264-1>
72. Young J, Ablona A, Klassen BJ, Higgins R, Kim J, Lavoie S, et al. Implementing community-based Dried Blood Spot (DBS) testing for HIV and hepatitis C: a

qualitative analysis of key facilitators and ongoing challenges. BMC Public Health. 2022 Dec 1;22(1).

73. Abbott Molecular Inc. Abbott RealTime HBV. [cited 2023 Oct 25]; Available from: <https://csvlab.com.br/HBV-Bula-Abbott.pdf>

## 7. ANEXOS

### 7.1 Parecer Consubstanciado do CEP da FMT-HVD

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Análise de correlação da carga viral da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) em plasma sanguíneo e no sangue seco em papel de filtro medida pelo PCR em tempo real (qPCR)

**Pesquisador:** Wornei Silva Miranda Braga

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 00541118.3.0000.0005

**Instituição Proponente:** Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/MT/AM

**Patrocinador Principal:** Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/MT/AM

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.456.866

##### Apresentação do Projeto:

No documento intitulado "Carta\_CEP.pdf, postada em 04/12/2020, o pesquisador principal do estudo, comunica o seguinte: Eu, Wornei Silva Miranda Braga, Médico e Pesquisador, venho por meio deste instrumento comunicar a este CEP, que não foram recrutados pacientes voluntários para o projeto intitulado "Análise de correlação da carga viral da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) em plasma sanguíneo e no sangue seco em papel de filtro medida pelo PCR em tempo real (qPCR), com cronograma de atividade e início das coletas de amostras biológicas previsto para 01/11/2018. Devido a fatores externos como importação do material para extração do RNA-HCV e DNA-HBV, treinamento dos profissionais envolvidos na execução dos testes laboratoriais, a suspensão do contrato de passagens aéreas e de pagamento de diárias pela Coordenação Estadual de IST/Aids e Hepatites Virais do Amazonas, o que tornaram as viagens para os municípios de Eirunepé e Coari inviáveis e, por último, a pandemia do SARS-Cov-2.

E apresenta uma emenda para o referido projeto que contemplará o ajuste do cronograma de atividades e adequação da equipe executora.

Trata-se da Pesquisa: Análise de correlação da carga viral da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) em plasma sanguíneo e no sangue seco em papel de filtro medida pelo PCR em tempo real

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
 Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.456.886

(qPCR).

Projeto Aprovado neste CEP sob o n. 2.976.805 em 23/10/2018.

CAAE: 00541118.3.0000.0005

**Objetivo da Pesquisa:**

Vide Projeto Aprovado neste CEP sob o n. 2.976.805 em 23/10/2018 e

CAAE: 00541118.3.0000.0005

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Vide Projeto Aprovado neste CEP sob o n. 2.976.805 em 23/10/2018 e

CAAE: 00541118.3.0000.0005

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nesta emenda estão sendo atualizados os membro da equipe; remanejado os locais de coletadas das amostras, o cronograma de execução da pesquisa e despesas. Em anexo, foi anexado uma carta (Carta\_CEP.pdf, postado em 04/12/2020) do pesquisador responsável informando sobre o andamento do projeto, com a não inclusão de voluntários na pesquisa.,

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Constatei que todas as alterações propostas na Carta\_CEP.pdf, postado em 04/12/2020) foram

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fnt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.456.866

apresentadas de forma adequada nos seguintes documentos:

1-PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1674953\_E1.pdf postado em 04/12/2020;

2-DBS\_projeto\_2.docx, postado em 04/12/2020.

**Recomendações:**

Vide conclusão

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto, o meu parecer é pela APROVAÇÃO da Emenda (E1) versão 2, apresentada de forma adequada à regulamentação ética vigente definidas na Resolução n. 466 de 2012 e suas complementares

S. M. J é o parecer.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A presente EMENDA 1 (E1) está APROVADA e os interessados ficam informados de dar continuidade em apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS n° 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1674953_E1.pdf	04/12/2020 13:28:52		Aceito
Outros	Carta_CEP.pdf	04/12/2020 13:22:03	Wornei Silva Miranda Braga	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	DBS_projeto_2.docx	04/12/2020 13:20:54	Wornei Silva Miranda Braga	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	04/10/2018 16:52:02	Wornei Silva Miranda Braga	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Tabatinga.pdf	26/09/2018 23:59:18	Wornei Silva Miranda Braga	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_lacfmt.pdf	26/09/2018 23:58:54	Wornei Silva Miranda Braga	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_fmt.pdf	26/09/2018 23:58:37	Wornei Silva Miranda Braga	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.456.886

(qPCR).

Projeto Aprovado neste CEP sob o n. 2.976.805 em 23/10/2018.

CAAE: 00541118.3.0000.0005

**Objetivo da Pesquisa:**

Vide Projeto Aprovado neste CEP sob o n. 2.976.805 em 23/10/2018 e

CAAE: 00541118.3.0000.0005

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Vide Projeto Aprovado neste CEP sob o n. 2.976.805 em 23/10/2018 e

CAAE: 00541118.3.0000.0005

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nesta emenda estão sendo atualizados os membro da equipe; remanejado os locais de coletadas das amostras, o cronograma de execução da pesquisa e despesas. Em anexo, foi anexado uma carta (Carta\_CEP.pdf, postado em 04/12/2020) do pesquisador responsável informando sobre o andamento do projeto, com a não inclusão de voluntários na pesquisa.,

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Constatei que todas as alterações propostas na Carta\_CEP.pdf, postado em 04/12/2020) foram

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fnt.am.gov.br

## 8. APÊNDICES

### 8.1 Procedimento Operacional Padrão (POP)

<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>		
<b>COLETA DE SANGUE VENOSO E SANGUE SECO EM PAPEL FILTRO</b>		
<b>EMISSÃO:</b> 12 de agosto de 2020	<b>VERSÃO:</b> 1.0	<b>PÁGINA:</b> 1/2
	<b>ELABORADO:</b> Reinan Brotas Ferreira	<b>APROVADO:</b> Yonne Francis Chehuan Melo
<p>1. OBJETIVO</p> <p>Padronizar o procedimento de coleta de sangue venoso e sangue seco em papel filtro.</p>		
<p>2. MATERIAL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipamento de proteção individual (EPI);</li> <li>• Algodão Hidrófilo;</li> <li>• Álcool Etílico a 70%;</li> <li>• Agulha e seringa descartável;</li> <li>• Sistema a vácuo;</li> <li>• Tubo com EDTA K2 ou K3;</li> <li>• Etiqueta para identificação;</li> <li>• Papel filtro;</li> <li>• Lenço com álcool etílico a 70%;</li> <li>• Lanceta;</li> <li>• Garrote;</li> <li>• Caixa descartável;</li> <li>• Estante para tubo;</li> <li>• Curativo;</li> </ul>		
<p>3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS</p>		

- Lavar as mãos com água e sabão, secar em papel toalha;
- Reunir o material da coleta numa bandeja;
- Identificar o tubo e o papel filtro;
- Conferir o nome completo do paciente;
- Explicar ao paciente e ao acompanhante o procedimento
- Posicionar o paciente de modo a facilitar a localização da veia para punção;
- Calçar as luvas de procedimento;
- Solicitar que o paciente feche a mão;
- Aplicar o torniquete acima do local da punção, para evitar a contaminação do local;
- Proceder a assepsia da pele com álcool a 70%;
- Introduzir a agulha no local escolhido com o bisel posicionado para cima;
- Aspirar à quantidade de sangue necessária (2 tubos com EDTA K2 ou K3);
- Soltar o garrote e solicitar o cliente que abra a mão;
- Comprimir o local da punção sem dobrar o braço, colocar o curativo;
- Assepsia da ponta do dedo;
- Prefurar a lateral do dedo com a lanceta:
- Desprezar a primeira gota de sangue;
- Preencher os círculos do papel filtro com sangue;

#### 4. REFERÊNCIAS

Procedimento Operacional Padrão, Hospital Universitário Lauro Wanderley, 2020. Disponível em :< <https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-nordeste/hulw-ufpb/aceso-a-informacao/gestao-documental/pop-procedimento-operacional-padrao/2021/ulac-unidade-de-laboratorio-de-analises-clinicas/pop-ulac-019-coleta-de-sangue-venoso-ambulatorial.pdf/@@download/file/POP.ULAC.019%20-%20COLETA%20DE%20SANGUE%20VENOSO%20AMBULATORIAL.pdf>>. Acesso em: 10 de agosto de 2020.

## 8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “**Análise de correlação da carga viral da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) em plasma sanguíneo e no sangue seco em papel de filtro medida pelo PCR em tempo real (qPCR)**” na qual iremos comparar dois métodos de coleta de sangue para o exame de carga viral das Hepatites B e C: sangue seco em papel de filtro e outro que já é usado nos Laboratórios de Referência do Ministério da Saúde do Brasil.

O objetivo deste projeto é analisar a correlação a carga viral da hepatite B e C, medida no plasma, com a medida no sangue seco em papel de filtro, pelo Sistema M2000 Real Time da Abbott, metodologia utilizada nos Laboratórios da Rede Nacional de carga viral das hepatites virais, do Departamento de IST/AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde. Você está sendo convidado a participar do estudo porque faz acompanhamento médico nesta unidade de saúde. A sua participação estará limitada a uma única coleta de sangue da ponta do dedo para o papel de filtro e de 8mL de sangue separados em dois tubos de tampa roxa, coletadas por profissionais participantes da pesquisa treinados, para realizarem o procedimento com segurança e usarão material descartável. O material coletado (sangue) será encaminhado e testado na Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado (FMT/HVD). Caso haja coleta de sangue para exames de rotina, faremos a coleta pela equipe do estudo e os resultados ficaram à disposição do seu médico. Os resultados dos exames feitos para a pesquisa não serão entregues a você.

**Participação Voluntária:** A participação neste estudo é voluntária. Isso quer dizer que a escolha em participar ou não participar só cabe a você, assim como a decisão de sair do estudo em qualquer momento. Por isso esclareceremos alguns detalhes importantes antes de começarmos:

**Liberdade de recusa:** Caso você decida não participar, não precisa nos dizer o motivo pela sua escolha. Da mesma maneira, sua opção por não participar não afetará seu

tratamento ou seu direito à assistência prestada pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A decisão de não participar do estudo neste momento não o impede de participar de outros estudos no futuro.

**Liberdade de retirada:** Caso você decida participar, você terá o direito de se retirar do estudo a qualquer momento e isso não irá acarretar qualquer prejuízo ou mudança no seu tratamento na Instituição. Ao sair do estudo, suas amostras de sangue e partes dele (soro e plasma) serão descartadas.

**GARANTIA DE SIGILO:** Todas as suas informações serão mantidas confidenciais. Seu nome não será divulgado, e os resultados da pesquisa serão apresentados sem revelar a identidade de qualquer um dos participantes. As amostras de sangue receberão um código que não permitirá identificar o participante. Também pedimos sua permissão para acessar os resultados dos exames para Hepatites virais B e C. As informações coletadas são confidenciais e de uso exclusivo para a pesquisa, ficando guardadas em arquivos protegidos e com acesso somente pela equipe da pesquisa. Todos os dados da pesquisa são sigilosos. A pesquisa não envolve aplicação de medicamento.

**RISCOS:** No local da coleta, pode aparecer hematoma (manchasroxas) que desaparecerão em alguns dias. Para que isso não aconteça, todas as etapas do estudo serão realizadas por profissionais treinados e em local apropriado. A documentação será guardada em local fechado e apenas a equipe da pesquisa terá acesso.

**TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS:** Se ocorrer qualquer dano relacionado, diretamente ou não, à sua participação neste estudo, o atendimento médico para diagnóstico e tratamento, se necessário, será feito na unidade de saúde onde foi atendido. Caso seja necessário um tratamento médico mais especializado, o médico pesquisador responsável fará o encaminhamento para um serviço de saúde específico. O pesquisador responsável do estudo, e o Laboratório Abbott, participante do estudo, proporcionarão assistência imediata, bem como, se responsabilizarão pela assistência integral e gratuita em caso de danos diretos ou indiretos e imediatos ou tardios, pelo tempo que for necessário decorrentes da pesquisa.

**RESSARCIMENTO DE DESPESAS:** caso você tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento de todas as despesas decorrentes da participação no estudo.

**ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS COLETADAS:** As amostras de sangue seco/papel de filtro e plasma coletadas neste estudo serão utilizadas somente para os exames previstos neste projeto de pesquisa e ficarão guardadas sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Wornei Braga em local apropriado na Gerência de Diagnóstico/FMT HVD, por 10 anos. Após o fim desse projeto, estas amostras poderão permanecer guardadas para uso em pesquisas futuras, caso você autorize. O pesquisador responsável assume os compromissos de enviar, no futuro, qualquer novo projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e em decorrência disto, poderemos entrar em contato novamente para uma nova autorização de uso dessas amostras já coletada por meio de novo TCLE, a critério do CEP.

**BENEFÍCIOS:** Os resultados obtidos nas análises de sangue seco/papel de filtro poderão ser úteis para serem utilizados na nos exames de quantificação da Carga Viral da Hepatite B e C, pelo teste disponibilizado na Rede de Laboratórios de Carga Viral do Ministério da Saúde, armazenamento e transporte visando a implementação futura em áreas geográficas remotas e de difícil acesso.

Este termo é preenchido em duas vias. Você e o profissional responsável pela aplicação do TCLE deverão rubricar todas as folhas do mesmo e assinar na última página, em ambas as vias. Você ficará com uma das vias e a outra ficará com os responsáveis pelo Estudo.

Salientamos que as informações serão mantidas sob a responsabilidade do pesquisador responsável, Dr. Wornei Braga, que estará disponível a

Qualquer momento, para esclarecimento de quaisquer dúvidas ou questionamentos de qualquer conduta adotada pela equipe de pesquisa.

## **DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

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

(nome por extenso),

- Confirmando ter lido as informações por escrito (ou que me foram lidas) referentes ao estudo e que os procedimentos foram explicados a mim pela equipe durante o processo de consentimento.
- Confirmando que tive a oportunidade de fazer perguntas a respeito e que estou satisfeito com as respostas e explicações fornecidas.
- Compreendo que autorizo o acesso aos meus dados às pessoas autorizadas descritas nesta ficha de informações.
- Sei o que acontecerá com as amostras do meu sangue.
- Tive tempo e oportunidade para refletir sobre a minha participação.
- Concordo em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_ |\_\_|\_|/|\_\_|\_|/|\_2\_|\_0\_|\_|\_|  
 Data: dd/mm/aaaa

Confirmando que realizei o processo de consentimento de acordo com a legislação aplicável.

Nome por extenso do profissional que conduziu o consentimento:

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do profissional que conduziu o consentimento:

\_\_\_\_\_ |\_\_|\_|/|\_\_|\_|/|\_2\_|\_0\_|\_|\_| |Data:  
 dd/mm/aaaa

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Análise de correlação da carga viral da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) em plasma sanguíneo e no sangue seco em papel de filtro medida pelo PCR em tempo real (qPCR)”

Rubrica Profissional conduziu o consentimento: \_\_\_\_\_

Rubrica Participante/RL1: \_\_\_\_\_

Rubrica/RL2, se aplicável: \_\_\_\_\_

Rubrica Testemunha Imparcial, se aplicável: \_\_\_\_\_

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD. O Comitê de Ética tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma o Comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os

princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade”.

**CEP da Fundação de Medicina Tropical “Doutor Heitor Vieira Dourado” Endereço:**

Av. Pedro Teixeira, 25 – D. Pedro I, Manaus – AM

CEP: 69.040-000 **Telefone:** (92) 2127-3572 **Email:** cep@fmt.am.gov.br

Confirmo que sou independente do estudo, que participei do processo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que li as informações por escrito sobre o estudo.

\*Nome \_\_\_\_\_ por \_\_\_\_\_ extenso \_\_\_\_\_ da \_\_\_\_\_ testemunha:

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

|\_|\_|/|\_|\_|/|\_2\_|\_0\_|\_|\_| Data: dd/mm/aaaa



#### 8.4 Equipe de Trabalho

<b>NOME</b>	<b>OCUPAÇÃO</b>	<b>FUNÇÃO</b>
Reinan Brotas Ferreira	Farmacêutico	Mestrando/Executor
Rajendranath Ramasamwty	Biólogo	Orientador
Wornei Silva Miranda Braga	Médico	Co-orientador
Luciana Giroto Gentil	Bióloga	Colaboradora
Maianne Yasmin Oliveira Dias	Biomédica	Colaboradora
Yonne Francis Chehuan Melo	Farmacêutica-Bioquímica	Colaboradora
Patricia Jeane de Oliveira Costa	Enfermeira	Colaboradora
Mariana Paiva Peniche de Miranda	Ac. Biomedicina	Colaboradora
Heline Lira Vasconcelos	Farmacêutica-Bioquímica	Colaboradora
Suellen Silva	Biomédica	Colaboradora
Marcia Costa Castilho	Bióloga	Colaboradora