

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS VÍRUS DE HEPATITE C E DE HEPATITE B
EM AMOSTRAS FIXADAS EM PAPEL FILTRO

Jamile Girardi Costenaro

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular do Centro de Biotecnologia da
UFRGS como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre

Orientadora: Maria Lucia Rosa Rossetti

Porto Alegre/RS

NOVEMBRO/2017

Instituições e Fontes Financiadoras:

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Departamento de Ações em Saúde, Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (CDCT/DAS/SES-RS)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

"In science, we must be interested in things, not in persons".

Marie Curie

Primeira mulher a ser premiada com um Nobel em Física (1903) e a primeira pessoa a ter dois prêmios Nobel (com o de Química, em 1911).

Agradeço à minha família, que me apoiou e oportunizou que eu fizesse esse mestrado. À família do Rodrigo, que me acolheu e me aceitou desde o primeiro instante. Ao Rodrigo, por todo o amor, apoio e motivação quando eu já não tinha mais forças pra aguentar. Obrigada também por me sugerir a seleção do SAJU, eu precisava desse motivador na minha vida. Lindo, precisamos de férias e descanso, viu? Ao AMO/SOU VCS, a família que me escolheu (é uma honra ser amiga de vocês), principalmente Fer Castro, Dudu Troian, Mastellão e Valdir (por serem da área e apoiarem todos os experimentos e escritas), Isabel Pitta, Bruno Armani, Dani Bettim e Henry (por me aguentarem falando termos extremamente técnicos por mais de dois anos). À Thaís Hain e Boo Nunes: as melhores pessoas (e revisores técnicos mais rápidos que existem) que a Biomedicina me apresentou. Aos participantes do SAJU, pelo trabalho lindo de assessoria jurídica que é feito e pelo melhor ambiente de trabalho que já vivenciei (é um lugar maravilhoso onde machismos, assédios e desrespeitos em geral são analisados e duramente reprimidos). Ao GAMAI, por serem o grupo mais amoroso (a cedência de vocês foi de um altruísmo gigantesco). Finalmente, ao GEIP, amor à primeira entrevista: com vocês pude transmitir todo o conhecimento que tenho e aprender muito mais do que imaginaria (e amedrontar pessoas com o uso de termos jurídicos!). Aprender a explicar termos complexos, que levei uma graduação para entender, de forma extremamente simples me faz crescer profissionalmente a cada acolhimento. Atuar defendendo selecionados pelo sistema penal é um trabalho extremamente árduo, cada pequena vitória é uma conquista fabulosa ao lado de vocês. A seguir os nomes dos que mais ouviram sobre HCV e HBV nestes dois anos (desculpa pelos desabafos semanais): Osmaravilha, Mozão,

Carolis, Bolsson, Isadhora (saudades, volta pro GEIP!!), Thomas, Renan, Ricardo (Castro), Régis (Nodari), Letícia, Luciana, Carina, Lara, Ana, Daphne, Raquel, Andressa, Dodô, Yordi, Gabinho, Vitória, Pedro (Gil), Martina, Jéssicas (Machado e Antônio), Luiza, Inaiara, Lucas, Mari. Desculpa, espero não ter esquecido de alguém! Aos amigos que a vida me trouxe: Marília Torres (que mesmo à distância permanece sempre presente), Raquel Zaccolo (a artista mais doida e sincera que existe!), Lu Moucachen (diva, um dia eu quero ter essa capacidade que tu tem de fazer as pessoas se sentirem bem ao teu lado), Lubi Ferreira (a mulher mais foda do universo!), Vitor Guimarães (tua paciência e tuas piadas horríveis), Bofill (teu humor, teus pães *-*), Luíza e Thiago (aquele findi na praia foi demais!), Giani Casanova (tua tranquilidade, PS: não esqueci do teu presente, ele só está bem guardado!), Erica (pela disponibilidade sem igual), Fiammi, Guilherme Fabrício, Michele, Régis Rafael, Giovana, Leonardo, Brandão (povo das humanas que eu adoro!), Gaio Monte, Samanta Gehart, Henri, Nicole e Carol Machado (obrigada pelos momentos de Just dance quando eu achava que não tinha mais energia para nada). Aos Baby Budas (Bruno Ruffier, Henrique Cardoni, Henrique Bordas e Humberto Mohr) por todas as músicas lindas (totalmente justificadas cientificamente!), a animação dos shows e pelos abraços mais apertados!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
<i>ABSTRACT</i>	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. O Vírus da Hepatite C.....	12
1.1.1. Genoma.....	13
1.1.2. Replicação.....	14
1.1.3. Aspectos Clínicos.....	15
1.1.4. Diagnóstico.....	20
1.2. O Vírus da Hepatite B.....	21
1.2.1. Genoma.....	23
1.2.2. Replicação.....	25
1.1.3. Aspectos Clínicos.....	26
1.2.4 Diagnóstico.....	32
1.3. Diagnóstico molecular das hepatites virais causadas pelo HCV e HBV.	33
1.4. Cartão filtro.....	35
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo Geral.....	41
2.2. Objetivos Específicos.....	41
3. ARTIGO.....	42
4. DISCUSSÃO.....	71
REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

anti-HBe – anticorpo antie

anti-HBc – anticorpo anticore

anti-HBs – anticorpo antissuperfície

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

b-DNA – *branched-DNA* (ensaio de DNA ramificado)

DBS – *dried blood spots* (manchas de sangue seco)

cDNA – DNA complementar

CCC DNA – DNA circular fechado covalentemente

CT – *Cycle Threshold* (ciclo da Real Time PCR em que a fluorescência ultrapassa o *threshold*)

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

fib-4 – índice de predição de fibrose hepática

HBeAg – antígeno e do vírus da hepatite B

HBcAg – antígeno do capsídeo do vírus da hepatite B

HBsAg – antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBV – vírus da hepatite B

HCV – vírus da hepatite C

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HPA – *hybridization protection assay* (ensaio de proteção de hibridização)

IgM – imunoglobulina da classe M

LDL – *low-density lipoprotein* (lipoproteína de densidade baixa)

MVPs – corpos multivesiculares

NAT – *nucleic acid tests* (teste de ácido nucléico)

ORFs – fases abertas de leitura

PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PgRNA – RNA pré-genoma

qPCR – PCR em tempo real ou quantitativa

qPCR-RNA-HCV – PCR quantitativa para detecção do RNA do vírus da hepatite

C

RC DNA – DNA circular relaxado

RNA – ácido ribonucleico

RT – transcriptase reversa

TMA – *Transcription-Mediated Amplification* (amplificação mediada por transcrição)

UI – unidades internacionais

VLDL – *Very-low-density lipoprotein* (lipoproteína de densidade muito baixa)

RESUMO

Os vírus da hepatite C (HCV) e da hepatite B (HBV) estão associados à cirrose e carcinoma hepatocelular. Amostras de sangue fixadas em papel filtro (ou *Dried Blood Spot*, DBS) têm sido utilizadas em análises clínicas devido à facilidade no envio e armazenamento e ao menor desconforto do paciente à coleta. Os objetivos deste trabalho foram validar testes moleculares para detecção de HCV e HBV, avaliar o uso de DBS (903 Whatman) na detecção de ambos os vírus e determinar os genótipos de amostras HCV. A validação foi realizada utilizando amostras de plasma com resultados conhecidos para os vírus e a avaliação do DBS empregou, também, amostras de plasma pareadas. Após a extração dos ácidos nucleicos, foram executadas as técnicas *in-house* de Real Time PCR para detecção de HBV, RT-Real Time PCR para HCV e sequenciamento para a genotipagem de HCV. Na validação do teste para HCV, foram utilizadas 120 amostras, obtendo resultados de *Kappa* (K), acurácia, sensibilidade e especificidade de 100%. Na avaliação do teste para HCV, utilizando DBS, com 128 amostras, os resultados de *Kappa*, acurácia, sensibilidade, especificidade também foram de 100%. Em 51 amostras, foram identificados os genótipos 1 (57%), 2 (10%) e 3 (33%). A validação do teste para HBV, com 54 amostras, obteve *Kappa* de 81%; acurácia, 91%; sensibilidade, 86%; e especificidade, 96%. A avaliação do uso de DBS para HBV, com 64 amostras, obteve *Kappa* de 74%; acurácia, 88%; sensibilidade, 82%; e especificidade, 100%. Todos os valores de *Kappa* possuem $p < 0,001$. Os resultados demonstram o potencial de utilização de DBS no diagnóstico molecular dos vírus das hepatites B e C.

ABSTRACT

The Hepatitis C virus (HCV) and the Hepatitis B virus (HBV) can develop to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Samples from Dried Blood Spot (DBS) are used in clinical analysis, due to facilitated shipment and storage and to less discomfort fingerstick causes to patients. The aims of this work were to validate HCV and HBV's molecular detection tests and evaluate the DBS (903 Whatman) use in both virus detection and determining HCV genotype. Validation was done using plasma samples with known results and for DBS evaluation paired plasma was also used. After nucleic acid extraction, in-house Real Time PCR assay to HBV detection, in-house RT-Real Time PCR assay to HCV detection, and in-house RT-PCR and sequencing assays to HCV genotyping were performed. In HCV test validation, 120 samples were used, getting results for *Kappa* (K), accuracy, sensibility, specificity of 100%. In HCV test evaluation, using 128 samples, the results for *Kappa*, accuracy, sensibility, specificity were also 100%. Testing 51 HCV samples, genotype 1 (57%), genotype 2 (10%) and genotype 3 (33%) were identified. In HBV test validation, with 54 samples, we got *Kappa*, 81%; accuracy, 91%; sensibility. 86%; and specificity, 96%. In use of DBS for HBV evaluation, with 64 samples, we got *Kappa*, 74%; accuracy, 88%; sensibility, 82%; and specificity, 100%. All values of *Kappa* have $p < 0.001$. Our results show the potential DBS use for HCV and HBV molecular diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

Os vírus das hepatites C (HCV) e B (HBV) possuem tropismo por células hepáticas (KNIPE & HOWLEY, 2013). Ambos podem causar doenças tanto agudas quanto crônicas e são potencialmente fatais por cirrose e carcinoma hepatocelular (GERLACH *et al.*, 2003; DOO & GHANY, 2010; THOMSON *et al.*, 2011; LY *et al.*, 2012; WHO, 2014b; WHO, 2015a; WHO, 2015b; WHO, 2015c).

Mundialmente, 130 a 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com HCV e, anualmente, entre 350 e 500 mil pessoas morrem em decorrência da hepatite C (WHO, 2015c). O HCV é transmitido pelo sangue (KNIPE & HOWLEY, 2013), mas apesar de não haver vacina para hepatite C, os medicamentos antivirais podem curar a infecção, embora o acesso ao diagnóstico e ao tratamento seja baixo (WHO, 2014b; WHO, 2015c).

Estima-se que 240 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas e aproximadamente 780 mil pessoas morram anualmente devido ao HBV (LOZANO *et al.*, 2012; OTT *et al.*, 2012), que é transmitido pelo sangue ou outros fluidos corporais (MAST *et al.*, 1999). O antígeno Australia é uma potente vacina com mais de 90% de eficiência na indução de resposta por anticorpos em adultos (LAVANCHY, 2004; KNIPE & HOWLEY, 2013; WHO, 2015a; WHO, 2015b), já o tratamento não cura a infecção, mas aumenta a sobrevida em longo prazo (WHO, 2015a; WHO, 2015b).

1.1. O Vírus da Hepatite C

O Vírus da Hepatite C (HCV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, espécie *Hepacivirus C* (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2016). Identificado por CHOO *et al.* (1989) por meio de métodos moleculares, atualmente o HCV é classificado em sete genótipos, segundo sua história evolutiva, nomeados de 1 a 7 (SIMMONDS *et al.*, 2005; MURPHY *et al.*, 2007; MURPHY *et al.*, 2014), os quais se diferenciam em ao menos 30% a nível nucleotídico. As variantes de HCV são ainda subdivididas em diversos subtipos, mas já foram descritos intersubtipos (ou intragenótipos) para o HCV. Os genótipos têm grande importância clínica, já que possuem distinta distribuição mundial, progressão da doença e susceptibilidade farmacológica (SIMMONDS *et al.*, 2005). No Brasil são mais prevalentes os genótipos 1, 3 e 2, nesta ordem (FOCACCIA, 2013). Os mesmos genótipos são encontrados no estado do Rio Grande do Sul e na Região Sul do Brasil. Entretanto, a taxa de prevalência do genótipo 3 na Região Sul é a mais elevada entre todas as regiões brasileiras e, no RS, esse genótipo é o mais encontrado (KRUG *et al.*, 1996; FOCACCIA *et al.*, 2004; CAMPIOTTO *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2007).

O vírion do HCV tem entre 30 e 80 nm de diâmetro. Os vírions consistem de um envelope – bicamada lipídica com glicoproteínas do envelope (E1 e E2) -- e de um nucleocapsídeo, que contém múltiplas unidades de proteínas virais do capsídeo (*core*, C) complexadas ao RNA (ácido ribonucleico) genômico de fita simples de polaridade positiva (MCLAUCHLAN *et al.*, 2002). O HCV apresenta uma baixa densidade, incomum quando comparada com outros vírus de tamanho semelhante. A densidade do HCV é inversamente proporcional à sua

infectividade, ou seja, as partículas menos densas são as mais infecciosas (LINDENBACH *et al.*, 2005; ZHONG *et al.*, 2005; YI *et al.*, 2006). Isso pode ser explicado pela ligação dos mais densos a imunoglobulinas, enquanto os menos densos se ligam a lipoproteínas séricas, tendo sido elaborada a hipótese de que essas lipoproteínas podem esconder os vírions de anticorpos neutralizantes (KNIPE & HOWLEY, 2013).

1.1.1. Genoma

Por tratar-se de RNA fita simples polaridade positiva, o genoma do HCV tem por papel, durante o ciclo celular, ser o RNA mensageiro para a tradução de todas as proteínas virais e o molde durante a replicação do RNA. Além disso, essa molécula de RNA também será copiada a fim de originar o material genético empacotado nas novas partículas virais. O genoma consiste de 9,6 mil pares de bases, com extremidades não codificantes 3' e 5' (3'NCR e 5'NCR) altamente estruturadas (Figura 1). A região 5'NCR é uma sequência bem conservada que se dobra em uma estrutura complexa que consiste em quatro domínios principais e um pseudo-nó, possuindo também um *internal ribosome entry site* (IRES, sítio interno de entrada do ribossomo). Já a região 3'NCR consiste de um domínio variável curto e um trato de poliuridina/polipirimidina (polyU/UC), seguido de um domínio 3'X altamente conservado, essencial para a replicação do RNA. Na tradução, o RNA dá origem a uma poliproteína de aproximadamente três mil aminoácidos que, após clivagem proteolítica, produz dez proteínas virais: três componentes estruturais (*core*, C; e glicoproteínas E1 e E2) e as proteínas p7,

NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (LINDENBACH *et al.*, 2005; KNIPE & HOWLEY, 2013).

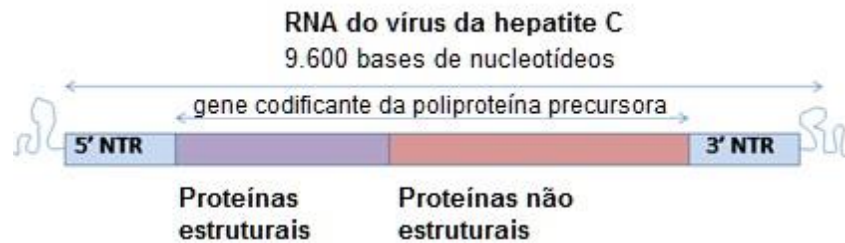


Figura 1: Organização genética do HBV. Modificado de HCV genome. In: Wikimedia Commons. English Wikipedia. 2007. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HCV_genome.png>. Acesso em: 04 de outubro de 2017.

1.1.2. Replicação

O ciclo de replicação do HCV inicia-se com a ligação do vírion ao hepatócito alvo por meio de diversas moléculas na superfície celular, incluindo glicoaminoglicanos e possivelmente o receptor de LDL (*low-density lipoprotein*, lipoproteína de densidade baixa, em inglês) (KNIPE & HOWLEY, 2013). Para entrar na célula, é necessária a interação da partícula viral com quatro mediadores de entrada específicos, o receptor *scavenger* classe B tipo I (SCARSELLI *et al.*, 2002), a proteína de membrana CD81 (PILERI *et al.*, 1998) e duas moléculas de junções oclusivas: claudina 1 (EVANS *et al.*, 2007) e ocludina (PLOSS *et al.*, 2009). A endocitose é mediada por clatrina (BLANCHARD *et al.*, 2006). A fusão das membranas plasmática e viral ocorre em um meio ácido, e o desnudamento do vírus libera a fita simples de RNA polaridade positiva no meio intracelular (KNIPE & HOWLEY, 2013).

Na sequência, ocorre a tradução do genoma viral, já que a fita de RNA é de polaridade positiva, em uma poliproteína que sofrerá clivagem co- e pós-traducional por proteases virais e do hospedeiro, dando origem a dez proteínas virais (KNIPE & HOWLEY, 2013). Já a replicação do RNA do HCV ocorre em uma matriz perinuclear densa, em vesículas derivadas do retículo endoplasmático, e induz a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico (BARTENSCHLAGER *et al.*, 2004). A fita de polaridade negativa que é sintetizada se torna molde para múltiplos ciclos de síntese da fita de polaridade positiva (LOHMANN *et al.*, 1999). Por fim, os novos vírus são empacotados dentro do retículo endoplasmático e associados à via de montagem das partículas VLDL (*very-low-density lipoprotein*, lipoproteína de densidade muito baixa, em inglês), transitam pela via secretória dos hepatócitos e são liberados na superfície celular (MCLAUCHLAN *et al.*, 2002).

1.1.3. Aspectos Clínicos

A Hepatite C tem distribuição mundial, sendo as regiões da Ásia central e oriental e do norte da África as mais afetadas (MOHD HANAFIAH *et al.*, 2013). Existem diversos genótipos do HCV, cujas distribuições variam de acordo com as regiões (SIMMONDS, 2001). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO), mundialmente, 185 milhões de pessoas estão infectadas pelo HCV; destas, entre 130 e 150 milhões estão cronicamente infectadas (LAVANCHY, 2009; MOHD HANAFIAH *et al.*, 2013; WHO, 2014b; WHO, 2015c). Um terço das pessoas cronicamente infectadas desenvolverá cirrose hepática ou câncer hepático (LY *et al.*, 2012; WHO, 2014b;

WHO, 2015c). A cada ano, entre 350 a 500 mil pessoas morrem de doenças hepáticas relacionadas à hepatite C (LAVANCHY, 2009; MOHD HANAFIAH *et al.*, 2013).

No ano de 1998, o sistema nacional de vigilância epidemiológica implantou a notificação compulsória para hepatites a fim de que as medidas de prevenção e controle e a avaliação do impacto possam ser executadas (BRASIL, 2016b). Em 2015, no Brasil, estimava-se a existência de um total de 1.450.000 casos de hepatite C (BRASIL, 2015a). Entre 1999 e 2015, foram detectados no Brasil 289.459 casos reagentes para anti-HCV ou RNA de HCV, sendo 144.024 casos reagentes para ambos os marcadores. O número total de casos confirmados é de 152.712, notificados desde 1999. Destes, 89.858 (58,8%) são homens e 62.796 (41,2%), mulheres. O Ministério da Saúde afirma que embora haja maior número de casos entre homens, esta proporção vem diminuindo ao longo dos anos e, atualmente, são notificados 30% mais de casos em homens que em mulheres, com a razão de sexos de 1,3 (BRASIL, 2016b).

Do número de casos com os dois marcadores reagentes, 64,2% foram observados no Sudeste, 24,2% no Sul, 5,6% no Nordeste, 3,2% no Centro-Oeste e 2,7% no Norte. A taxa de detecção média nacional é de 13,3 casos por 100.000 habitantes. Em 2015, a região Sul liderou o *ranking* de taxa de detecção, com 14,1 casos para cada 100 mil habitantes. Já no *ranking* das capitais dos estados, Porto Alegre tem a maior taxa¹, 107,4 casos por 100 mil habitantes, seguida de

¹ Porto Alegre figura entre as capitais com as mais altas taxas de detecção para diversas doenças, possuindo liderança em relação às detecções de HCV e HIV e estando em terceiro lugar em relação à de HBV (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2016b). Quando se avalia apenas a epidemia por HIV, observa-se redução significativa da taxa de detecção, o que pode ser explicado por vários fatores. O primeiro é a ampliação do diagnóstico precoce em tempo oportuno, com a implantação

Porto Velho (75,4), Florianópolis (41,3), Curitiba (36,3), Rio Branco (35,1), São Paulo (30,5) e Boa Vista (15,6). Por outro lado, Natal possui a menor taxa de detecção entre as capitais, com 2,3 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2016b).

O HCV é transmitido pelo sangue e as formas mais comuns de transmissão são através de práticas inseguras de injeção, esterilização inadequada de equipamentos médicos em alguns locais de cuidados à saúde e por meio de sangue ou hemocomponentes não triados (FRANK *et al.*, 2000; CANDOTTI *et al.*, 2001; DE OLIVEIRA *et al.*, 2006). Menos comumente, também pode haver transmissão por via sexual ou vertical (mãe infectada para filho) (THOMAS *et al.*, 1998; MAST *et al.*, 2005).

A hepatite C é uma doença hepática, causada pelo HCV. A infecção pode ser tanto aguda quanto crônica, variando sua gravidade: de doença moderada, com algumas semanas de duração, a doença grave, por toda a vida. A infecção aguda é, em geral, assintomática, raramente associada com risco de vida. Entre 15 e 45% dos infectados eliminam o vírus espontaneamente dentro de seis meses após a infecção, sem qualquer tratamento. Os demais (55 a 85% das pessoas)

dos testes rápidos – testes sorológicos cujos resultados são liberados em aproximadamente 15 minutos –, que detectam diversas infecções, como HIV, HCV, HBV e sífilis, estando disponíveis gratuitamente na atenção básica do SUS. Segue-se a implantação e implementação das linhas de cuidado, que são a estratégia de articulação de recursos e de práticas de saúde envolvendo a rede de um determinado território, focando em diagnóstico e terapia em relação às necessidades epidemiológicas. Além disso, são executadas ações educativas e preventivas, com o incentivo a medidas individuais de proteção. Estima-se que 83,8% das pessoas infectadas pelo HIV, residentes no Rio Grande do Sul, já tiveram seu diagnóstico estabelecido, o que demonstra que as ações executadas pelo SUS estão sendo efetivas (SES/RS, 2014; SES/RS, 2017). Já pelo fato das infecções causadas por HIV compartilharem as mesmas vias de transmissão com o HCV e o HBV, estas se beneficiam das ações focadas primariamente em HIV e, muito provavelmente, justificam as altas taxas de detecção atingidas.

desenvolvem infecção crônica pelo HCV. Nestes, o risco de cirrose hepática é de 15 a 30%, dentro de 20 anos (GERLACH *et al.*, 2003; THOMSON *et al.*, 2011).

O período de incubação para a hepatite C é de 2 semanas a 6 meses. Após a infecção inicial, aproximadamente 80% das pessoas não apresentam qualquer sintoma. Os sujeitos agudamente sintomáticos podem apresentar febre, fadiga, diminuição do apetite, náuseas, vômitos, dor abdominal, urina escurecida, fezes acinzentadas, dores nas articulações e icterícia (coloração amarelada da pele e da esclera) (WHO, 2014b; WHO, 2015c).

Devido ao caráter geralmente assintomático da infecção aguda por HCV, o diagnóstico precoce da infecção é raro. Em geral, as pessoas que desenvolvem infecção crônica permanecem sem diagnóstico até que algum dano hepático sério tenha se desenvolvido (GERLACH *et al.*, 2003). O diagnóstico ocorre em duas etapas. A primeira consiste de triagem sorológica para anticorpos anti-HCV e identifica pessoas que tenham sido infectadas pelo vírus. Estes exames, em geral, são executados com outras finalidades, como na doação de sangue, durante o pré-natal ou em exames laborais (também ditos ocupacionais). Caso tenha resultado positivo, é necessário o teste confirmatório de ácido nucléico (NAT) para o RNA do HCV, já que as pessoas que eliminaram o vírus ainda apresentarão anticorpos anti-HCV (EASL, 2014; AASLD & IDSA, 2017).

Se esse segundo teste também for positivo, deve ser avaliado o grau de lesão hepática (fibrose ou cirrose). Isso pode ser feito por biópsia ou através de uma variedade de testes não invasivos, como o índice da relação aminotransferase/plaquetas (aminotransferase/platelet ratio index, APRI) ou FIB-4 (WHO, 2015c), índice de predição de fibrose hepática – cujos valores avaliados

são idade, contagem plaquetária, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (STERLING *et al.*, 2006; Figura 2). Além disso, deve ser identificado, por testes moleculares, o genótipo da cepa infectante, já que elas respondem diferentemente aos tratamentos e uma pessoa pode estar coinfetada com mais de um genótipo. Essas duas avaliações guiam a escolha do tratamento e o gerenciamento da doença (WHO, 2015c).

$$FIB - 4 = \frac{Idade(anos) \times Nível\ AST\left(\frac{U}{L}\right)}{Contagem\ Plaquetária\left(\frac{10^9}{L}\right) \times \sqrt{ALT\left(\frac{U}{L}\right)}}$$

Figura 2: Índice FIB-4. Modificado de STERLING *et al.*, 2006.

Ainda não há vacina para hepatite C. Por outro lado, medicamentos antivirais podem curar esta infecção, mas o acesso ao diagnóstico e ao tratamento é baixo. O tratamento antiviral é considerado efetivo quando a cura é atingida. Isso ocorre em 50 a 90% das pessoas tratadas e depende do tratamento utilizado e do genótipo viral, reduzindo o desenvolvimento de câncer hepático e cirrose. Por muitos anos, o tratamento padrão para hepatite C era uma terapia antiviral combinada com interferon alfa e ribavirina, eficaz contra vários genótipos, porém a adesão a esse tratamento era diminuída em função do interferon ser pouco tolerado por alguns pacientes (WHO, 2014b; WHO, 2015c).

Novas terapias, conhecidas como agente antiviral de ação direta por via oral (*oral direct-acting antiviral agent*, DAAs) são mais efetivas e melhor toleradas que as terapias existentes. As DAAs simplificam o tratamento para hepatite C ao diminuir significativamente os requisitos de acompanhamento e ao aumentar as

taxas de cura. Embora os custos de produção dos DAAs sejam baixos, os valores iniciais fixados pelas companhias são muito altos e propensos a dificultar o acesso a essas drogas mesmo em países de alta renda (WHO, 2014b; WHO, 2015c). Estes fármacos possuem diversos mecanismos de ação, como: inibidor da proteína NS5A do HCV (elbasvir, ledipasvir e ombitasvir); inibidor altamente seletivo da proteína NS5A do HCV no complexo de replicação (daclatasvir); substrato defeituoso para a proteína NS5A do HCV (velpatasvir); inibidor da serina protease NS3/4A do HCV (grazoprevir, paritaprevir e simeprevir); inibidor não nucleosídico da RNA polimerase dependente de RNA codificada pelo gene *NS5B* do HCV (dasabuvir) e inibidor analógico de nucleotídeos, da RNA polimerase dependente de RNA codificada pelo gene *NS5B* do HCV (sofosbuvir) (ALBERTA INNOVATES, CIHR & TMIC, 2017). Existem, atualmente, seis combinações de DAAs aprovados para uso clínico, que podem ainda estar associados à ribavirina, recomendadas para um tratamento de 12 semanas em pacientes com HCV de genótipos 1a, 1b, 2, 3, 4, 5 ou 6. (AASLD & IDSA, 2017).

1.1.4. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por HCV é feito em duas etapas: a primeira é a triagem sorológica (positividade para anticorpo anti-HCV); e a confirmação da infecção é feita através de detecção molecular do RNA viral, geralmente através de teste quantitativo (qPCR-RNA-HCV). Esse teste indica a presença do RNA viral e quantifica a carga viral (número de cópias do genoma viral) do paciente (SUS-LACEN/SC, 2015b; WHO, 2015c; FOCACCIA, 2013). Quando positivo, o dano hepático é avaliado através de biópsia ou FIB-4, o genótipo é identificado

por diversas metodologias de biologia molecular e o tratamento mais adequado é indicado. O qPCR-RNA-HCV também é utilizado para monitoramento do tratamento (SUS-LACEN/SC, 2015b; WHO, 2015c).

No Rio Grande do Sul, os testes diagnósticos realizados através do Sistema Único de Saúde (SUS) são executados no Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central do Estado (IPB-LACEN/RS), localizado em Porto Alegre, RS. Ali são utilizadas as metodologias Abbott Real Time™ HCV para a detecção qualitativa/quantitativa de HCV e Abbott Real Time HCV genotype II para a genotipagem de HCV.

A coleta de sangue para os testes moleculares é feita por punção venosa, em tubo contendo EDTA (anticoagulante). O tubo deve ser mantido refrigerado (2 °C a 8 °C), centrifugado em até 4 horas e o teste executado em até 24 horas após a coleta, devido à baixa estabilidade do HCV (SUS-LACEN/SC, 2015b; SES/RS, 2013). Em determinados locais do estado, cumprir este protocolo é bastante complexo, uma vez que muitos dos locais de coleta não possuem acesso a centrífugas e há uma grande distância a ser percorrida entre o local de coleta e o IPB-LACEN/RS.

1.2. O Vírus da Hepatite B

Os Vírus da Hepatite B (HBV) pertencem à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*, espécie *Hepatitis B virus* (ICTV, 2016). Já foram identificados oito genótipos de HBV, nomeados de A a H (AKUTA & KUMADA, 2005) com

diferenças de 8 a 17% entre os genótipos (KNIPE & HOWLEY, 2013). Os genótipos I e J já foram descritos, embora ainda não sejam totalmente aceitos (SUNBUL, 2014).

O vírion do HBV, também conhecido como partícula de Dane, é um vírus esférico com diâmetro externo de aproximadamente 42 nm. O capsídeo, de formato icosaédrico, tem um diâmetro de aproximadamente 22 nm e é composto por 120 dímeros da proteína *core*, também conhecida como HBcAg (CROWTHER *et al.*, 1994; DRYDEN *et al.*, 2006). HBeAg é uma variante de HBcAg pelo processo de *splice*. O capsídeo é coberto por uma membrana lipoprotéica constituída pelas três formas da proteína do envelope viral, também nomeadas como HBsAg: grande (L, *large*), média (M, *middle*) e pequena (S, *small*), adquirido juntamente com lipídios do hospedeiro durante o brotamento em corpos multivesiculares. No soro de infectados por HBV é comum encontrar-se partículas subvirais não infecciosas, esféricas ou filamentosas, com diâmetro de aproximadamente 22 nm. Já as partículas de Dane estão presentes em menor quantidade (DANE *et al.*, 1970; KNIPE & HOWLEY, 2013).

O capsídeo viral contém o DNA circular viral de aproximadamente 3000 pares de bases e uma transcriptase reversa (RT) viral com atividade de DNA polimerase (KAPLAN *et al.*, 1973). O círculo de DNA é parcialmente composto por fita dupla, sendo uma delas incompleta. A conformação circular do DNA é mantida por uma pequena sobreposição coesiva entre as duas extremidades 5' das fitas de DNA. Esta fita incompleta é estendida e a lacuna de fita simples é parcialmente preenchida pela ligação da RT na região 5' da fita completa (KNIPE & HOWLEY, 2013). Há, também, evidências da presença de mais proteínas

celulares no interior do vírus, por exemplo, uma ou mais serina cinases (ALBIN & ROBINSON, 1980).

O antígeno Australia, primeiro marcador descoberto para HBV, é componente tanto do capsídeo quanto do envelope viral (BLUMBERG *et al.*, 1965). Esse antígeno é uma potente vacina com mais de 90% de eficiência na indução de resposta por anticorpos em adultos (LAVANCHY, 2004; KNIPE & HOWLEY, 2013; WHO, 2015a; WHO, 2015b).

1.2.1. Genoma

O genoma de HBV está organizado em fases abertas de leitura (ORFs), estando todas na mesma direção, assim definindo as fitas de polaridade positiva e negativa do DNA viral. Dentro dos vírions, a fita negativa é completa e abrange todo o genoma. Já a fita positiva se estende por aproximadamente dois terços do comprimento do genoma, possuindo terminações 3' variáveis (LIEN *et al.*, 1987; KNIPE & HOWLEY 2013). Os *primers* para síntese das duas fitas de DNA se mantêm ligados por toda a maturação viral. A fita negativa está covalentemente ligada à transcriptase reversa viral através de uma ponte de fosfotirosina. A fita positiva contém um pequeno oligômero de RNA derivado da extremidade 5' do RNA pré-genômico, que serve como molde para a síntese de DNA da fita negativa (LIEN *et al.*, 1987; SEEGER *et al.*, 1986).

A organização genética do HBV é complexa (Figura 3) possuindo quatro promotores, dois elementos *enhancer*, um único sinal de poliadenilação para a regulação da transcrição do RNA viral, quatro ORFs e muitos sinais de ação-cis,

necessários para a replicação do DNA viral. Todos os transcritos virais são codificados pela fita negativa e recebem 5'cap e poliadenilação (KNIPE & HOWLEY, 2013).

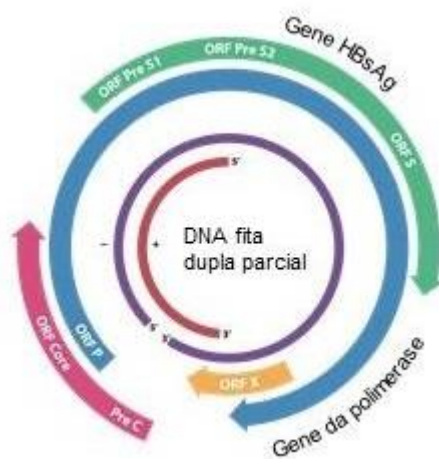


Figura 3: Organização genética do HBV. Modificado de HBV genome. In: Wikimedia Commons. English Wikipedia 2010. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HBV_Genome.svg>. Acesso em: 04 de outubro de 2017.

O genoma do HBV codifica as seguintes proteínas: *core*, DNA polimerase viral, S, M, L e X. A proteína pré-C, ou HBeAg, transcrita na mesma região genômica que *core*, é uma importante ferramenta no diagnóstico de HBV. A DNA polimerase viral é a única enzima codificada por hepadnavirus. S, M e L são glicoproteínas transmembrana do envelope que se diferem no domínio N-terminal (KNIPE & HOWLEY, 2013). Já a proteína X possui papel regulatório na replicação do HBV e é necessária para o estabelecimento da infecção viral. É uma proteína multifuncional, que atua por interação proteína-proteína, sendo transativadora de promotores e enhancers virais e celulares. Promove progressão do ciclo celular e inativa reguladores negativos de crescimento, como supressores de tumor (entre eles o gene da *p53*) e fatores relacionados à senescência (KEW, 2011).

1.2.2. Replicação

O ciclo viral do HBV inicia-se pela infecção dos hepatócitos, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre é pouco compreendido. Sabe-se que o domínio PreS1 da proteína L é extremamente importante para o processo. Após a entrada e desnudamento viral, os capsídeos devem ser transportados ao núcleo celular. No complexo do poro nuclear, o capsídeo desintegra-se, liberando o DNA circular relaxado (RC DNA) no núcleo, onde se converte a DNA circular fechado covalentemente (CCC DNA), molde para a transcrição dos RNAs virais, e se associa a histonas e outras proteínas, formando um mini-cromossomo. Os transcritos são enviados ao citoplasma, de modo regulado, onde ocorre a tradução das proteínas virais (NEWBOLD *et al.*, 1995, KNIPE & HOWLEY, 2013).

A montagem dos vírus de HBV ainda não é completamente compreendida, embora se saiba que acontece em, no mínimo, dois passos distintos:

a) formação dos capsídeos contendo RNA pré-genoma (PgRNA) e transcriptase reversa (RT) – O PgRNA é molde tanto para a tradução das proteínas *core* e RT quanto para a replicação do genoma do HBV, por meio da síntese do DNA viral através da transcrição reversa (STANDRING *et al.*, 1984).

b) formação das partículas virais envelopadas contendo o genoma viral de DNA – Nos capsídeos já montados ocorre a síntese do DNA, e os capsídeos se associam às proteínas do envelope em corpos multivesiculares (MVPs) (WATANABE *et al.*, 2007).

Por fim, a secreção das partículas virais ocorre pelo compartimento retículo endoplasmático-Golgi e é independente dos MVPs (KNIPE & HOWLEY 2013).

1.2.3. Aspectos Clínicos

A hepatite B é uma infecção viral hepática, causada pelo HBV, podendo ser uma doença tanto aguda quanto crônica e é potencialmente fatal por cirrose e câncer hepático (DOO & GHANY, 2010; WHO, 2015a; WHO, 2015b). É um importante problema de saúde mundial e um importante risco ocupacional para trabalhadores em saúde (WHO, 2009a). Estima-se que, mundialmente, 240 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas com hepatite B (OTT *et al.*, 2012), o que é definido por teste positivo para o antígeno de superfície da hepatite B por no mínimo seis meses (WHO, 2015b). Aproximadamente 780 mil pessoas morrem a cada ano por infecção por hepatite B: 650 mil de cirrose e câncer hepático devido à infecção crônica por hepatite B e outros 130 mil por hepatite B aguda (LOZANO *et al.*, 2012).

A prevalência da hepatite B é mais alta na África subsaariana e no leste da Ásia, onde entre 5 e 10% da população adulta está cronicamente infectada. Altas taxas de infecções crônicas também são encontradas na Amazônia e nas regiões sul da Europa central e oriental. No Oriente Médio e no subcontinente indiano, uma estimativa de 2 a 5% da população em geral está cronicamente infectada. Menos de 1% da população na Europa ocidental e América do Norte está cronicamente infectada (OTT *et al.*, 2012).

A hepatite B, assim como a hepatite C, tornou-se uma doença de notificação compulsória no ano de 1998. O sistema nacional de vigilância epidemiológica executa, com estes dados, medidas de prevenção e controle e avaliação do impacto da doença (BRASIL, 2016b). No Brasil, no período de 1999 a 2015, foram notificados 196.701 casos confirmados de hepatite B. Destes,

106.371 (54,1%) são homens. O Ministério da Saúde informa que a diferença entre o número de casos segundo sexo vem diminuindo ao longo dos anos e, atualmente, são 1,2 casos em homens para cada caso em mulheres. De todos os casos notificados, 88,7% possuem a informação sobre a forma clínica definida. Destes, a principal é a crônica (81,1%), seguida dos casos agudos (18,7%) e fulminantes (0,2%) (BRASIL, 2016b). A maior parte dos casos está na região Sudeste (35,5%), seguida das regiões Sul (31,4%), Norte (14,3%), Nordeste (9,4%) e Centro-Oeste (9,3%). Entre as regiões, a Sul apresenta a maior taxa de detecção. Em relação ao *ranking* de cidades, a maior taxa é de Porto Velho (122,5 casos por 100 mil habitantes), seguida por Rio Branco (33,5), Porto Alegre² (19,6), Curitiba (16,7), Florianópolis (16,4), Boa Vista (16,2) e Manaus (15,6). A menor taxa é de Natal, com 1,6 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2016b).

O HBV é transmitido, por diversas vias, através de contato com sangue ou outros fluidos corporais de uma pessoa infectada (MAST *et al.*, 1999). O vírus pode sobreviver no ambiente por pelo menos sete dias, durante os quais ainda pode causar infecção em uma pessoa não vacinada ao entrar no seu corpo. O período de incubação do HBV é, em média, de 75 dias, mas pode variar de 30 a 180 dias. O vírus pode ser detectado entre 30 e 60 dias após a infecção e pode persistir no organismo, evoluindo para hepatite B crônica (WHO, 2015b).

Em regiões altamente endêmicas, a hepatite B é mais comumente transmitida de mãe para filho durante o parto (transmissão vertical) ou por exposição a sangue infectado (transmissão horizontal), principalmente de uma criança infectada a uma não infectada durante os primeiros cinco anos de vida. O

² Cf. *supra*, p. 17.

desenvolvimento da infecção crônica é muito comum em crianças infectadas pelas mães ou antes dos cinco anos de idade (SZMUNESS, 1975; BEASLEY *et al.*, 1983; MCMAHON *et al.*, 1985; MAST *et al.*, 1999).

A hepatite B é transmitida por exposição percutânea ou mucosa a sangue e vários fluidos corporais, como saliva e os fluidos menstrual, vaginal e seminal (MAST *et al.*, 1999; WHO, 2015a). A transmissão sexual também pode ocorrer, principalmente em homens não vacinados que praticam sexo com outros homens, pessoas heterossexuais com múltiplos parceiros sexuais e pelo contato com profissionais do sexo (WHO, 2014a; WHO, 2012b). Outras vias de transmissão incluem a reutilização de agulhas e seringas tanto em locais de cuidado à saúde quanto entre usuários de drogas injetáveis ou durante procedimentos médicos, cirúrgicos e dentários, tatuagem e pelo uso de navalhas e objetos assemelhados que estejam contaminados com sangue infectado (WHO, 2008; WHO, 2009b; WHO, 2010). A infecção na fase adulta leva à hepatite crônica em menos de 5% dos casos (MCMAHON *et al.*, 1985; HOOFNAGLE *et al.*, 2007; WHO, 2015b).

Ademais, a implementação de estratégias de segurança para transfusões, incluindo triagem com qualidade assegurada de todos os doadores de sangue e de hemocomponentes utilizados em transfusão pode prevenir a transmissão do HBV (WHO, 2012a). Práticas seguras de injeção, eliminando injeções desnecessárias e inseguras, podem ser estratégias efetivas para proteger contra a transmissão do HBV. Para mais além, práticas sexuais mais seguras, incluindo a diminuição de parceiros e o uso de preservativos também protegem contra a transmissão (WHO, 2015b).

A maioria das pessoas não apresenta nenhum sintoma durante a fase aguda, no entanto algumas pessoas apresentam sintomas por muitas semanas, incluindo icterícia, urina escurecida, fadiga extrema, náusea, vômitos e dores abdominais. Dentre as pessoas que manifestam hepatite aguda, um pequeno grupo pode desenvolver falência hepática, podendo levar à morte (LAVANCHY, 2004). A evolução para cirrose e câncer hepático decorre da infecção hepática crônica, causada pelo HBV (LOK & MCMAHON, 2007; WHO, 2015b).

A probabilidade da infecção se tornar crônica depende da idade na qual a pessoa é infectada. Enquanto 80-90% das crianças infectadas durante o primeiro ano de vida desenvolvem infecções crônicas, o mesmo ocorre com apenas 30-50% das crianças infectadas antes dos 6 anos de idade. Já em relação aos adultos saudáveis que se contaminam com HBV, mais de 90% se recuperam naturalmente do vírus dentro de um ano, menos de 5% deles irão desenvolver infecção crônica e destes, 20-30% irão desenvolver cirrose e/ou câncer hepático (HOOFNAGLE *et al.*, 2007; MCMAHON, 2009).

É impossível diferenciar, com bases clínicas, a hepatite B de hepatites causadas por outros agentes virais e, por isso, a confirmação laboratorial do diagnóstico é essencial. Muitos testes sorológicos são capazes de diagnosticar e monitorar pessoas com hepatite B, e podem ser usados para diferenciar infecções agudas e crônicas (WHO, 2015b).

Os diagnósticos laboratoriais da infecção por hepatite B focam na detecção do HBsAg, o antígeno de superfície do HBV (WHO, 2015a). A OMS recomenda que todas as doações de sangue sejam testadas para hepatite B para garantir a

segurança do sangue e evitar transmissão acidental às pessoas que receberem hemocomponentes (WHO, 2012a; WHO, 2015b).

A infecção aguda pelo HBV é caracterizada pela presença de HBsAg e anticorpo imunoglobulina da classe M (IgM) contra o antígeno do capsídeo, HBcAg. Durante a fase inicial da infecção, os pacientes também são soropositivos para o antígeno “e” da hepatite B (HBeAg) que é, geralmente, um marcador de altos níveis de replicação do vírus. A presença do HBeAg indica que sangue e fluidos corporais da pessoa infectada são altamente contagiosos (WHO, 2015a; WHO, 2015b).

A infecção crônica é caracterizada pela persistência do HBsAg por pelo menos seis meses, com ou sem HBeAg concomitante. A persistência do HBsAg é o principal marcador para o desenvolvimento de doença hepática crônica e câncer hepático (carcinoma hepatocelular) em uma idade mais avançada (WHO, 2015a; WHO, 2015b).

Ainda há acesso limitado ao diagnóstico e tratamento da hepatite B em muitos locais com restrições de recursos, e muitas pessoas são diagnosticadas apenas quando já têm doença hepática avançada. O câncer hepático progride rapidamente e, como as opções de tratamento são limitadas, o desfecho em geral é ruim. Em locais com restrições de recursos, a maioria das pessoas com câncer hepático morre em poucos meses após o diagnóstico. Em países de alta renda, cirurgia e quimioterapia podem prolongar a vida por até alguns anos, e o transplante hepático é utilizado algumas vezes em pessoas com cirrose (WHO, 2015a; WHO, 2015b).

A hepatite B pode ser prevenida por uma vacina segura e efetiva. O antígeno Australia, purificado do soro de indivíduos infectados, provou ser uma vacina efetiva, com 95% de eficácia na indução de resposta por anticorpos em adultos, prevenindo a infecção e o desenvolvimento de doença crônica e câncer hepático devido ao HBV. Atualmente, no Brasil, a vacinação contra o HBV se dá através de uma vacina recombinante (única deste tipo contra um vírus). Esta vacina é parte da Vacina Pentavalente, vacina combinada que imuniza contra *Corynebacterium diphtheriae* (agente causador da difteria), *Clostridium tetani* (agente causador do tétano), *Bordetella pertussis* (agente causador da coqueluche), HBV (agente causador da hepatite B) e *Haemophilus influenzae* tipo b (agente causador de meningite e diversas outras infecções) e é administrada em crianças (SCHMID, MACURA-BIEGUN & RAUSCHER, 2012; SHARMA *et al.*, 2013). Embora a vacinação universal ainda seja um objetivo e não um fato consumado, estima-se que, em 2013, 81% de todas as crianças foram vacinadas contra o HBV (LAVANCHY, 2004; KNIPE & HOWLEY, 2013; WHO, 2015a; WHO, 2015b). A OMS recomenda que todas as crianças recebam a primeira dose dentro de 24 horas após o parto, seguidas de mais duas ou três doses (série de imunização primária). A proteção dura por, no mínimo, 20 anos (LAVANCHY, 2004; DUMOLARD, 2008; WHO, 2015b).

Não existe tratamento específico para hepatite B aguda, portanto o cuidado visa à manutenção do conforto e equilíbrio nutricional adequado, incluindo reposição hídrica se houver vômitos e diarreia. A hepatite B crônica pode ser tratada farmacologicamente, incluindo agentes antivirais orais, como os análogos de nucleos(t)ídeos tenofovir e entecavir. O tratamento não cura a infecção, mas

pode atrasar a progressão para cirrose, reduzindo a incidência de câncer hepático e aumentar a sobrevida em longo prazo (WHO, 2015a; WHO, 2015b).

1.2.4 Diagnóstico

No diagnóstico sorológico para HBV, detecta-se: o antígeno de superfície ou anticorpo antissuperfície (HBsAg/anti-HBs); o antígeno e ou anticorpo antie (HBeAg/anti-HBe); e o antígeno total do núcleo em IgG ou anticorpo anticore (HBcAg/anti-HBc). Esses marcadores positivam-se em fases distintas da doença, sendo utilizados para a obtenção desta informação. O monitoramento da doença e do tratamento é feito através do marcador de replicação viral DNA de HBV, por meio de PCR qualitativa ou quantitativa (FOCACIA, 2013). No IPB-LACEN/RS utiliza-se o kit comercial Abbott Real Time HBV para a detecção quantitativa de HBV.

A coleta de sangue para os testes moleculares é feita em tubo contendo EDTA (anticoagulante). O tubo deve ser mantido refrigerado (de 2 °C a 8 °C) e a amostra deve ser centrifugada em até 20 horas após a coleta (SUS-LACEN/SC, 2015a; SES, s.d.). Como já explicitado para as amostras de HCV, este protocolo pode ser de difícil cumprimento, já que a centrifugação muitas vezes só ocorrerá no IPB-LACEN/RS e, muitas vezes, há uma grande distância a ser percorrida desde o local de coleta.

1.3. Diagnóstico molecular das hepatites virais causadas pelo HCV e HBV

O diagnóstico molecular dos HCV e HBV tem grande importância para o tratamento das infecções e no controle da transmissão, por exemplo, quando essa detecção é feita na triagem das doações de sangue. Diversas técnicas baseadas na detecção de ácidos nucleicos (NAT, *nucleic acid tests*) são utilizadas na detecção de infecções virais. Entre elas, destacam-se a Amplificação Mediada por Transcrição (TMA, *Transcription-Mediated Amplification*), o ensaio de DNA ramificado (b-DNA, *branched-DNA*) e as muitas variantes da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) (ALBERTONI *et al.*, 2014).

Na TMA, o RNA viral isolado do soro do paciente, é amplificado pelas enzimas transcriptase reversa e RNA polimerase T7. Estes amplicons são detectados pelo ensaio de proteção de hibridização (HPA, *hybridization protection assay*), que hibridiza apenas as sondas que permanecem quimioluminescentes e as detecta em um luminômetro (FIRDAUS *et al.*, 2015).

O ensaio de DNA ramificado (bDNA) também baseia-se na detecção de sinal. Consiste de sondas, que são moléculas de DNA fita-simples, e da adição de uma molécula de DNA extensora. Quando a sonda e a molécula extensora estiverem nos lugares corretos, ocorre a hibridização e a amostra é adicionada (FIRDAUS *et al.*, 2015).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) amplifica fragmentos do DNA alvo de maneira simples, robusta, rápida e flexível. Quando a PCR amplifica cópias de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA, é chamada de PCR transcriptase reversa (RT-PCR). Este método, versátil e sensível, ocorre em

dois passos: o primeiro utiliza uma DNA polimerase dependente de RNA para reação de transcrição reversa, e é associado a outras PCRs, como a PCR em tempo real, para a amplificação e quantificação do cDNA gerado (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

A PCR em tempo real (também conhecida por PCR quantitativa ou qPCR) é uma variação do método, onde a medição da quantidade das sequências controle e referência é feita em ciclos consecutivos no decurso da fase exponencial da PCR por termocicladores que detectam a fluorescência da reação. Para a quantificação dos produtos da PCR, são comparadas as medições obtidas. As sequências controle podem ser padrões endógenos (geralmente genes *housekeeping*) ou moldes de referência (fitas de DNA construídas e clonadas em vetores). A qPCR é uma técnica muito sensível e capaz de processar e medir várias amostras simultaneamente, fornecendo informações imediatas a respeito da cinética da PCR (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

A ferramenta de qPCR TaqMan[®] é uma metodologia que utiliza uma sonda (oligonucleotídeo de 20 a 24 bases) que anela-se a uma sequência interna do fragmento de DNA a ser amplificado. Essa sonda é marcada na extremidade 5' com um grupo fluorescente (Fam<Hex ou Tet) e grupo bloqueador de fluorescência (*quencher*, Tamra ou Dabcyl) na extremidade 3'. Quando ambos os grupos estão presentes e contíguos na sonda de hibridização intacta, toda emissão do fluoróforo é absorvida pelo bloqueador, sendo baixa a fluorescência captada pelo termociclador. Com a progressão da reação e o aumento da quantidade de DNA alvo, mais sondas hibridizam ao DNA alvo desnaturado. Porém, durante a fase de extensão da PCR, a atividade de exonuclease 5' → 3'

da polimerase termoestável cliva o fluoróforo da sonda, aumentando a distância entre ele e o bloqueador, bem como a fluorescência captada. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo sintetizado ao longo da PCR (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

Embora a técnica de PCR em tempo real ainda seja considerada cara, o teste confirmatório de diversas infecções é feito através desta metodologia, sendo este o caso das infecções causadas pelo HCV e HIV. Em relação às infecções causadas pelo HBV, o teste confirmatório é o sorológico. Apesar disto, a técnica de PCR em tempo real é muito importante no monitoramento do paciente e para avaliar se o tratamento está sendo efetivo (com a diminuição da carga viral). Isso se aplica tanto a nível nacional, no Brasil, quanto a nível global. Assim, devido a sua capacidade de medir a presença e a abundância de sequências de DNA e RNA em amostras clínicas, fazendo o diagnóstico de infecções virais, quantificação da carga viral e identificação de genótipos (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), essa foi a metodologia escolhida para este estudo.

1.4. Cartão filtro

As amostras de sangue coletadas em papel filtro (DBS, *dried blood spots*, ou manchas de sangue seco) são utilizadas em análises clínicas, tanto sorológicas quanto por PCR e sequenciamento, devido ao menor desconforto que a punção digital causa ao paciente. Laboratorialmente, as amostras não precisam ser centrifugadas para separação do plasma, e o soro não precisa ser congelado

imediatamente após a amostragem. Outra vantagem consiste do fato de que as amostras dissecadas podem ser armazenadas como material não perigoso para transporte por correio (TUAILLON *et al.*, 2010; MOHAMED *et al.*, 2013), principalmente quando as amostras são coletadas em áreas distintas e enviadas à um laboratório central (JARDI *et al.*, 2004; TUAILLON *et al.*, 2010). A coleta das amostras em DBS é uma alternativa precisa, confiável, conveniente e custo efetivo, muito útil para triagem em larga escala, diagnóstico e monitoramento dos pacientes (JARDI *et al.*, 2004; TUAILLON *et al.*, 2010; MOHAMED *et al.*, 2013).

Há mais de 50 anos, utilizam-se os cartões filtro para triagem neonatal de erros inatos do metabolismo. Atualmente, tantos testes sorológicos quanto moleculares são realizados em DBS (SNIJDEWIND *et al.*, 2012). Convenientemente, mais de um marcador pode ser analisado utilizando-se o mesmo cartão, por exemplo, amplificação e sequenciamento de regiões gênicas dos vírus HBV ou HCV ou, ainda, do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (TUAILLON *et al.*, 2010; MOHAMED *et al.*, 2013).

Apesar de todos os benefícios, as amostras em DBS possuem algumas desvantagens em relação às amostras de plasma ou soro, como a presença de eritrócitos e a grande quantidade de hemoglobina, que pode interferir nos testes de PCR. O processamento das amostras com um perfurador e sua eluição é trabalhosa e exige limpeza cuidadosa para evitar a contaminação por transferência de uma amostra a outra. Isto pode ser resolvido com a automação do puncionamento com limpeza extensiva, embora essas máquinas encareçam o preço relativamente baixo do processamento dos cartões (SNIJDEWIND *et al.*, 2012).

Dois dos principais tipos de cartões filtro utilizados laboratorialmente são o FTA e o 903. Segundo o fabricante, a principal diferença entre eles é o fato de que o cartão FTA preserva apenas os ácidos nucleicos das amostras (protegendo-os de nucleases, enquanto as células são lisadas e as proteínas, desnaturadas), enquanto o cartão 903 preserva a amostra inteira, isto é, tanto os ácidos nucleicos quanto as proteínas (GE Healthcare Life Sciences, 2017). Por isso, pode ser vantajoso o uso do cartão filtro 903 para diagnóstico de doenças infecciosas pelo SUS, uma vez que tanto testes sorológicos quanto moleculares podem ser realizados no mesmo cartão.

Neste trabalho, utilizamos o cartão filtro 903 *Proteinsaver Cards*, GE Healthcare's Whatman, assim como TUAILLON *et al.* (2010), KANIA *et al.* (2013), VEDIO *et al.* (2013), SOULIER *et al.* (2015) e VINIKOOR *et al.* (2015). Já SOLMONE *et al.* (2002), JARDI *et al.* (2004), SANTOS *et al.* (2012), BOA-SORTE *et al.* (2014), utilizaram o cartão 903 fabricado por Schleicher & Schuell. Por sua vez, ROSS *et al.* (2013), utilizou ambos os cartões 903. E apenas MOHAMED *et al.* (2013) não fez uso de cartões do tipo 903, tendo utilizado cartões FTA.

Muitos são os estudos que demonstram que a amostragem em cartões filtros é altamente confiável e tem utilidade na clínica. Em relação à sorologia, TUAILLON *et al.* (2010) detectaram anti-HCV. KANIA *et al.* (2013) detectaram HBsAg, anti-HBc, antígeno de HCV e anti-HCV. MOHAMED *et al.* (2013) detectaram HBsAg, anti-HBs e HBeAg. ROSS *et al.* (2013) detectaram HBsAg, anti-HBc, anti-HBs e anti-HCV. VEDIO *et al.* (2013) detectaram HBsAg, anti-HBc total e anti-HCV. BOA-SORTE *et al.* (2014) detectaram apenas HBsAg, embora

tenham testado anti-HCV e todas as amostras foram negativas. SOULIER *et al.* (2015) detectaram anti-HCV e o antígeno do capsídeo de HCV.

Já em relação às análises moleculares, JARDI *et al.* (2004) quantificaram o DNA de HBV, detectando-o em 72/82 (88%) das amostras de DBS e em 77/82 (93,9%) nas amostras de soro pareadas. TUAILLON *et al.* (2010) detectaram RNA de HCV em 60/62 (97%) e quantificaram RNA de HCV em 55 (89%) das amostras de DBS. SANTOS *et al.* (2012) quantificaram o RNA de HCV, encontrando sensibilidade de 98%, especificidade de 94,3%, valor preditivo positivo de 96,1% e valor preditivo negativo de 96,9% quando comparando a detecção do RNA de HCV em amostras de DBS e de plasma. MOHAMED *et al.* (2013) detectaram DNA de HBV, encontrando sensibilidade de 98% e especificidade de 100% para a detecção de DNA de HBV. ROSS *et al.* (2013) detectaram DNA de HBV e RNA de HCV, com sensibilidade de 93% para o RNA de HCV e 100% para o DNA de HBV e especificidade de 100% para ambos. SOULIER *et al.* (2015) detectaram RNA de HCV com especificidade de 100% e sensibilidade de 97,1 a 98,1%. VINIKOOR *et al.* (2015) observaram forte concordância entre cargas virais de DBS e plasma e alta sensibilidade em DBS quando a carga viral em plasma era ≥ 2.000 UI/ml.

Além das detecções dos ácidos nucléicos, ao realizarem a genotipagem do RNA de HCV, SOLMONE *et al.* (2002) e TUAILLON *et al.* (2010) encontraram total concordância entre amostras HCV DBS e soro pareadas (genótipos 1 a 4). Já MOHAMED *et al.* (2013) encontraram concordância total entre amostras em DBS e plasma, pareadas, ao genotipar HBV e detectar a mutação L180M. Por fim, JARDI *et al.* (2004) encontrou resultados idênticos para o mutante *precore* G1896A, genótipos do HBV similares (concordância de 90%) e resultados ótimos

para mutações no motivo YMDD (concordância de 97%), quando comparando amostras de DBS e soro positivos para HBV.

TUAILLON *et al.* (2010) observaram boa correlação entre a concentração do RNA de HCV em DBS e os níveis séricos. A genotipagem do HCV foi realizada com sucesso em amostras DBS e teve concordância total na comparação entre DBS e séricas. Os cartões (903, Whatman, cartão também utilizado por JARDI *et al.* (2004)) secaram por 18 horas em temperatura ambiente e foram armazenados a -20°C de uma a oito semanas, até o uso. A estabilidade foi investigada variando-se a exposição à temperatura ambiente de 2 a 12 dias antes do armazenamento a -20°C. A extração de RNA a partir da amostra em DBS foi feita após os dias 2, 3 e 6 e não houve variação nos níveis de RNA de HCV nas amostras armazenadas a -20°C, porém as amostras em temperatura ambiente demonstraram uma queda dramática nos níveis de RNA de HCV no sexto dia. Observaram-se boas concordância e correlação entre o RNA de HCV detectado em DBS e soro (TUAILLON *et al.*, 2010). Deste modo, o autor recomenda que os cartões filtro devem ser guardados a -20°C em até 48 horas após a coleta para que a recuperação do RNA de HCV seja ótima. Assim, o transporte do cartão filtro dentro de dois dias sem refrigeração é realizável, bem como é indicado que o transporte após 48 horas seja feito com gelo seco (TUAILLON *et al.*, 2010).

Observa-se aqui uma vantagem em relação ao transporte de sangue total, plasma ou soro. No Brasil, estas amostras são classificadas como “substância biológica da categoria B”. Para envio terrestre (e refrigerado), que é o caso das amostras que chegam ao LACEN, estas amostras precisam ser acondicionadas em embalagens de boa qualidade, que suportem impactos e carregamentos

comuns ao transporte. O sistema de embalagens é constituído por três componentes: a embalagem primária que é acondicionada na embalagem secundária e estas, por sua vez, na embalagem externa. A embalagem primária é o próprio tudo de coleta da amostra. Já a embalagem secundária pode ser um saco ou caixa que envolva e contenha as embalagens primárias transportadas, sem romper, ser perfurada ou vazar o conteúdo interno para a embalagem externa. Por fim, a embalagem externa é uma caixa com rigidez adequada. Além do sistema de embalagens, há a necessidade de material refrigerante (podendo ser gelo reutilizável ou gelo seco) e de material absorvente (que deve ser capaz de absorver todo o conteúdo das embalagens primárias, em caso de vazamento) (ANVISA, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Validar testes moleculares para detecção de HCV e HBV e avaliar o uso de DBS (903 Whatman) na detecção de ambos os vírus e determinação dos genótipos do HCV.

2.2. Objetivos Específicos

a) Validar os métodos de PCR em tempo real *in-house* utilizados no CDCT para o diagnóstico molecular do vírus da hepatite C e do vírus da hepatite B, comparando com os métodos comerciais (Abbott Real Time HBV e Abbott Real Time HCV);

b) Utilizar os métodos validados para avaliar o uso do cartão como fonte de armazenamento de amostras sanguíneas, comparando os resultados obtidos com amostras de plasma;

c) Genotipar o vírus da hepatite C, utilizando amostras de DBS, comparando com os métodos comerciais (Abbott Real Time HCV genotype II).

3. ARTIGO

O manuscrito do artigo, apresentado a seguir, detalha a análise da possibilidade do uso de DBS para o diagnóstico molecular dos HCV e HBV, bem como a genotipagem do HCV. Para isso, primeiramente, foi realizada a validação de metodologias *in house*, já descritas na literatura, comparando seus resultados com os das metodologias comerciais. Para isso, foram utilizadas apenas amostras de plasma. Posteriormente, foi feita uma comparação entre os resultados obtidos a partir de amostras de DBS pareadas com amostras de plasma, através das Real Time PCRs *in house* validadas. Quanto à genotipagem do HCV, a comparação foi feita entre os resultados obtidos por sequenciamento, em amostras de DBS, e os obtidos por meio de metodologia comercial, em amostras de plasma.

Todo o trabalho realizado nesse mestrado é apresentado no artigo, de maneira detalhada. Isto inclui a análise da literatura, a coleta das amostras, as metodologias utilizadas, a obtenção dos resultados, bem como a discussão destes e a comparação com resultados obtidos por outros grupos.

Pretende-se submeter este artigo à revista *Journal of Clinical Virology* (JCV) da editora Elsevier. A JCV publica artigos que abordem a virologia humana e tenham uma relação direta com condições clínicas induzidas por vírus. Essa revista possui fator de impacto 2015/2016 de 2,647 e tem classificação B1 na área de Ciências Biológicas I, na plataforma Sucupira. Desse modo, o presente artigo encontra-se no formato que a revista exige para submissão. Isto inclui o artigo propriamente dito e as duas tabelas suplementares.

1 **Validation of hepatitis C and B non-commercial molecular tests and their**
2 **evaluation on dried blood spot samples**

3 Jamile Girardi COSTENARO^{a,b} (jamil_girardi@yahoo.com.br); Cíntia COSTI^{a,b}
4 (cintiacosti@hotmail.com); Carolina de Souza GUSATTI^{a,b}
5 (caroligusatti@gmail.com); Dimas Alexandre KLIEMANN^c
6 (dimaskliemann@gmail.com); Juliana Ferraz DE CORREA^d
7 (juferraz_17@hotmail.com); Maria Inês Gonzalez SOLARI^d
8 (misolari@gmail.com); Patrícia Groli ARDENGHI^d (pardenghi@yahoo.com.br);
9 Maria Lúcia Rosa ROSSETTI^{a,b,e} (mrossett@terra.com.br, corresponding
10 author)

11

12 ^aPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS;
13 Address: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Campus do Vale - Prédio
14 43421. Av. Bento Gonçalves 9500. Caixa Postal 15005 - CEP 91501-970. Porto
15 Alegre, RS, Brasil

16 ^bCentro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Secretaria Estadual da
17 Saúde do Rio Grande do Sul (CDCT/SES-RS); Address: Av. Ipiranga, 5400.
18 Bairro Jardim Botânico. CEP 90610-000. Porto Alegre, RS, Brasil

19 ^cHospital Nossa Senhora da Conceição; Address: Av, Francisco Trein, 596.
20 Bairro Cristo Redentor. CEP 91350-200. Porto Alegre, RS, Brasil

21 ^dSeção de Virologia – IPB-LACEN/SES; Address: Av. Ipiranga, 5400. Bairro
22 Jardim Botânico. CEP 90610-000. Porto Alegre, RS, Brasil

23 ^ePrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à
24 Saúde, ULBRA Canoas; Adress: Av. Farroupilha, 8001. Bairro São José. CEP
25 92425-900. Canoas, RS, Brasil.

26 Abstract

27 Background: Hepatitis C Virus (HCV) and Hepatitis B Virus (HBV) can induce
28 cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Dried blood spot (DBS) are used on
29 serology, molecular detection, quantification and genotyping tests. DBS has
30 simpler sampling, shipment and storage.

31 Objectives: The principal aim was to evaluate DBS use as blood samples
32 storage to detect HCV and HBV, comparing the results from in-house tests and
33 commercial methods.

34 Study design: To validate HCV and HBV molecular tests we compared in-house
35 results with the results from Abbott Real Time HCV or HBV. In order to evaluate
36 DBS as blood sample storage, we compared DBS and paired plasma samples
37 results obtained from in-house methods. HCV genotyping was also performed.
38 Statistical analysis was performed using IBM SPSS Software v.21.

39 Results: Molecular HCV detection. RT-PCR Validation: 60/60 positive and 60/60
40 negative plasma samples; $\kappa(1.000)$; accuracy, sensibility, specificity (100%).
41 DBS Evaluation: 73/73 positive and 53/53 negative paired samples; $\kappa(1.000)$;
42 accuracy, sensibility, specificity (100%); total concordance in HCV genotypes in
43 51 tested samples.

44 Molecular HBV detection. PCR Validation: 24/28 positive and 25/26 negative
45 plasma samples; $\kappa(0.815)$; accuracy (90.7%), sensibility (85.7%), specificity
46 (96.2%). DBS Evaluation: 28/34 positive and 17/17 negative paired samples;
47 $\kappa(0.757)$; accuracy (88.2%), sensibility (82.4%), specificity (100%).

48 Conclusions: Our results show DBS as a reliable sampling method and both
49 HCV and HBV Real Time PCRs as sensible and specific detection assays, and
50 have potential use on Brazilian Health System (Sistema Único de Saúde) with
51 significant advantages for users from different social classes.

52

53

54 Keywords: Hepatitis C Virus; Hepatitis B Virus, Dried Blood Spot, molecular
55 detection.

56

57

58

59 Highlights:

- 60 • Sensible and specific in-house qPCR methods detect HCV and HBV
61 from plasma or DBS.
- 62 • In-house qPCR has high accuracy, sensibility and specificity detecting
63 HCV and HBV.
- 64 • DBS is reliable sample storage when kept at -20°C in zipped bags with
65 desiccants.
- 66 • Molecular detection of HCV and HBV occur months after its DBS
67 collection.

68

69

70 Background

71 Hepatitis C Virus (HCV) and Hepatitis B Virus (HBV) have a worldwide
72 distribution [1,2]. It was estimated that HCV infects 184 million persons (positive
73 to anti-HCV) in 2005 [2]. Although Brazil is a low prevalence region [2], there
74 are 1,450,000 HCV estimated cases [3] and 152,712 confirmed cases were
75 notified between 1999 and 2016 [4]. Brazil South and Southeast regions
76 represent 86% of the country's notified cases of hepatitis C [3]. This research
77 was performed in Porto Alegre - RS, southern Brazil, the state capital with the
78 highest detection rate among state capitals (107.4 cases/100,000 persons) [4].

79 It is estimated that HBV globally infects 240 million people (HBsAg
80 positive) [1]. Although Brazil is a region of low prevalence of HBV [1], 196,701
81 confirmed cases were notified from 1999 to 2015 and the South region has
82 31.4% of these notified cases. Porto Alegre has the third highest detection rate
83 among the state capitals [4].

84 Both HCV and HBV can induce cirrhosis and hepatocellular carcinoma.
85 Perz et al. [5] also estimate 446,000 deaths from cirrhosis (HBV: 235,000; HCV:
86 211,000) and 483,000 from primary liver cancer (HBV: 328,000; HCV: 155,000).

87 American Association for the Study of Liver Diseases and Infectious
88 Diseases Society of America (AASLD-IDSA) [6] recommends HCV tests (anti-
89 HCV, HCV RNA and HCV genotype) and AASLD [7] recommends HBV
90 serology and molecular tests (HBsAg, total HBc, HBV DNA quantification and
91 HBV genotyping) for evaluating, confirming and monitoring therapy in both
92 chronic diseases.

93 Although all these tests are usually performed through venipuncture,
94 dried blood spot (DBS) sampling and tests are being standardized by some
95 groups. DBS is less specific when compared to serum or plasma, probably due
96 to a higher endpoint detection limit [8]. Nevertheless, DBS sampling is simpler,
97 because it involves less training and less blood collected. Moreover, it facilitates
98 shipment and storage [8–10]. Also, DBS testing is an important technology for
99 countries with small or centralized laboratories [8,11,12]. DBS is largely used for
100 neonatal screening and, nowadays, for serology, molecular tests and
101 genotyping [13]. Its use has been reported on HBV, HCV and HIV serology,
102 molecular detection, quantification and genotyping [8–12,14–20].

103

104 Objectives

105 The aims of this study were to standardize in-house HCV and HBV
106 molecular diagnosis from samples with known results (from commercial
107 assays), and evaluate the use of DBS as blood samples storage, comparing
108 with the results obtained from paired plasma samples.

109

110 Study design

111 The sample size calculation was based on disease prevalence (P,
112 hepatitis B: 0,48%; hepatitis C: 1,19%) on the study population and assuming
113 95% confidence interval (“ α ” value: 0,05; “Z” value: 1,96) and precision “d”: 2%.
114 Using the equation $N = Z^2.P.(1-P)/d^2$, 120 HCV samples and 50 HBV samples
115 were required in this study.

116 To validate HCV and HBV molecular tests, developed at Centro de
117 Desenvolvimento Científico e Tecnológico of the Secretaria Estadual da Saúde
118 (CDCT-SES), Southern Brazil, we compared the results from in-house and
119 Abbott Real Time HCV or HBV. We tested 120 HCV (60 positive, 60 negative)
120 and 54 HBV (28 positive, 26 negative) plasma samples provided from the
121 routine of Instituto de Pesquisas Biológicas Laboratório Central do Estado do
122 Rio Grande do Sul (IPB-LACEN-SES).

123 To evaluate the DBS storage for blood samples, DBS and paired plasma
124 samples results were compared using the HCV and HBV validated tests. HCV
125 genotyping was also performed.

126 Blood samples in Vacutainer[®] tubes containing EDTA were kindly
127 provided by IPB-LACEN-SES. We have collected 146 HCV and 88 HBV
128 samples from July 2015 to January 2016. Samples with viral load below the
129 detection limit of Abbott Real Time were excluded from the tests, remaining the
130 126 HCV and 51 HBV samples used.

131 The blood tubes were homogenized and 50 μ L of blood were dropped in
132 each DBS card spot (903 Proteinsaver Cards, GE Healthcare's Whatman). The
133 cards were dried at room temperature for 16-18 hours and stored in zipped
134 bags at -20°C until use, as described [10], with silica gel desiccant sachets. The
135 remaining blood in the tube was centrifuged (4000 rpm, 5 min) and plasma was
136 collected and stored at -20°C until use.

137 Plasma samples (200 μ L) were extracted according to the manufacturer's
138 instructions. The following adjustments were made for better DBS elution: use
139 of 500 μ L of Viral Lysis Buffer; HBV samples with Viral Lysis Buffer were

140 incubated at 85°C for 10 min; and all DBS lysate were incubate at 56°C for 30
141 minutes. DNA/RNA was extracted with PureLink[®] Viral RNA/DNA Mini Kit
142 (Thermo Fisher Scientific), to a final volume of 34 µL. Forty units of RNase
143 inhibitor or RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, CA) were
144 added to the extracted RNA.

145 1.2 mm and 3 mm punchers (Harris Uni-Core[™]) and different quantities
146 of chads were tested. Two chads of 3 mm were chosen. Working with 1.2 mm
147 puncher required approximately 20 chads and a PCR inhibition were observed
148 with the use of three or more 3 mm chads. In order to avoid contamination
149 between samples, clean parts of DBS card were punched three times before
150 cutting the next sample. After the daily operation, puncher and cutting mat were
151 cleaned as recommended by manufacturer.

152 Real-Time PCR reactions were performed at ABI 7500 platform (Termo
153 Fisher Scientific). Tests were done in duplicates to each sample. For the HCV
154 qualitative detection, a Real Time RT-PCR with TaqMan[®] was performed using
155 SuperScript[®] III Platinum[®] One-Step Quantitative RT-PCR System (Termo
156 Fisher Scientific). The 30 µL mix reaction consisted of 2X Reaction Mix, 20 pmol
157 of each primer, 5 pmol of probe, 41.67 nM of Rox, 0.5 µL SuperScript[®] III
158 RT/Platinum[®] Taq Mix and 13 µL of RNA. Primers XTF5 and HCMgR2 and
159 probe HCVMGB2 anneal to a highly conserved region at HCV X-tail and
160 amplified a 54 bp [21]. Amplification had an initial reverse transcription stage
161 (50°C, 30 min), a denaturation stage (95°C, 2 min) and 55 cycles (95°C, 20 sec;
162 55°C, 45 sec).

163 For the HBV qualitative detection, a Real Time-PCR with TaqMan[®] was
164 performed as described [22], with an initial hot-start (50°C, 2 min), a
165 denaturation stage (95°C, 10 min) and 55 cycles (95°C, 15 sec; 60°C, 1 min)
166 and amplified a 72 bp product from a highly conserved region at HBV gene S.

167 HCV genotyping was performed by a conventional PCR, product
168 purification and sequencing, as described [23]. For the PCR, an antisense
169 primer 5'-GGAAGTACTGTCTTCACGCAGA-3' and a sense primer 5'-
170 TCGCAAGCACCTATCAGGCAG-3' were used, which anneal to 5'NCR region
171 [24] and generate a product of 260 bp. After sequencing, HCV genotypes were
172 determined using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm
173 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). All 51 samples genotyped by IPB-
174 LACEN-SES (through the Abbott Real Time HCV genotype II assay) were
175 sequenced.

176 Statistical analysis was performed using IBM SPSS Software v.21, which
177 provided Pearson's Chi-square (2-sided) and Kappa agreement. Accuracy,
178 sensitivity, specificity, median, mean and 95% confidence interval (95% CI)
179 were calculated using Microsoft Excel 2010.

180 Research Ethics Committee of Fundação Estadual de Produção e
181 Pesquisa em Saúde (CEP/FEPPS) approved the use of the samples
182 (Registration number: 453.100).

183

184

185

186 Results

187 The validation of in-house HCV molecular detection was performed using
 188 120 plasma samples (Table 1) and Abbott's and in-house's results were
 189 compared (Table 5).

		Abbott Real Time HCV		
		Negative	Positive	Total
HCV in-house test	Negative	60	0	60
	Positive	0	60	60
Total		60	60	120

190 Table 1: Comparison between positive and negative results of HCV plasma samples, obtained
 191 from in-house test versus gold standard (Abbott Real Time HCV). False-positive and false-
 192 negative were not found.

193 The evaluation of molecular HCV detection was performed using 126
 194 DBS and plasma paired samples (Table 2) and its results were compared
 195 (Table 5). A comparison between amplification CTs from DBS and plasma
 196 samples and viral load (from Abbott Real Time HCV) is available in
 197 Supplementary Table 1.

198 The lowest viral load was 440 IU/mL, and highest, 7,200,216 IU/mL
 199 (results from Abbott Real Time HCV). The median viral load was 42,477 IU/mL,
 200 and the mean, 615,684 IU/mL.

		HCV plasma		
		Negative	Positive	Total
HCV DBS	Negative	53	0	53
	Positive	0	73	73
Total		53	73	126

201 Table 2: Comparison between positive and negative results of HCV DBS and plasma samples,
 202 obtained from in-house test. False-positive and false-negative were not found.

203 For the DBS samples, median time between collection and extraction
 204 was 162 days; mean, 165 days; the shorter was 94 days for a positive sample
 205 and 99 days for a negative sample; the longer, 189 days for a positive sample
 206 and 218 days for a negative sample.

207 In relation to HCV DBS samples, we observed a good relation between
 208 CTs from different extractions of the same sample, which required several
 209 freeze-thaw cycles. A DBS sample of 4,103 IU/mL had been extracted nine
 210 times (CTs ranging from 31.09 and 36.70); a DBS sample of 11,833 IU/mL,
 211 eight times (CTs ranging from 35.69 and 39.54); a DBS sample of 14,938
 212 IU/mL, three times (CTs ranging from 34.82 and 38.97); and a DBS sample of
 213 19,953 IU/mL, four times (CTs ranging from 30.91 and 35.17).

214 HCV genotyping were performed in 51 DBS samples and its results were
 215 compared with paired samples genotyped by Abbott Real Time HCV genotype
 216 II assay. We found total concordance: 29 samples as genotype 1; 5 samples as
 217 genotype 2; and 17 samples as genotype 3.

218 The validation of molecular HBV detection was performed using 54
 219 plasma samples (Table 3) and Abbott's and in-house's results were compared
 220 (Table 5). A comparison between amplification CTs from DBS and plasma
 221 samples and viral load (from Abbott Real Time HBV) is available in
 222 Supplementary Table 2.

		Abbott Real Time HBV		
		Negative	Positive	Total
HBV in-house test	Negative	25	4	29
	Positive	1	24	25

	Total	26	28	54
--	-------	----	----	----

223 Table 3: Comparison between positive and negative results of HBV plasma samples, obtained
 224 from in-house test versus gold standard (Abbott Real Time HBV). There are one false-positive
 225 and four false-negative results.

226 We found five discordant samples when compared to Abbott's results.
 227 Four were negative when they should have been positive, probably due to low
 228 viral load (57, 79, 125 and 384 IU/mL) and one were positive when it should
 229 have been negative (cross-contamination).

230 The evaluation of molecular HBV detection was performed using 51 DBS
 231 and plasma paired samples (Table 4) and its results were compared (Table 5).

		PCR plasma		
		Negative	Positive	Total
PCR DBS	Negative	17	6	23
	Positive	0	28	28
Total		17	34	51

232 Table 4: Comparison between positive and negative results of HBV DBS and plasma samples,
 233 obtained from in-house test. There are 6 false-negative results, although none false-positive
 234 result was found.

235 Still, 6 samples were discordant when compared to plasma results: all of
 236 them tested negative when they should have been positive (in some, due to low
 237 viral load; samples 16, 17, 20, 39, 46 and 56 in Supplementary Table 2).

238 The lowest viral load was 53 IU/mL, and highest, 660,202,899 IU/mL
 239 (results from Abbott Real Time HBV). The median viral load was 385 IU/mL,
 240 and the mean, 16,363,043 IU/mL. For the DBS samples, median time between
 241 collection and extraction was 327 days; mean, 360 days; the shorter was 109
 242 days for a positive sample and 311 days for a negative sample; the longer, 496
 243 days for a positive sample and 476 days for a negative sample.

Test	Negative Results	Positive Results	κ (95% CI)	Accuracy (95% CI)	Sensibility (95% CI)	Specificity (95% CI)
Validated test (HCV plasma vs. Abbott Real Time HCV)	60/60	60/60	1.000 (1.000 - 1.000)*	100% (100% - 100%)	100% (100% - 100%)	100% (100% - 100%)
Evaluated test (HCV DBS vs. plasma)	53/53	73/73	1.000 (1.000 - 1.000)*	100% (100% - 100%)	100% (100% - 100%)	100% (100% - 100%)
Validated test (HBV plasma vs. Abbott Real Time HBV)	25/26	24/28	0.815 (0.711 - 0.919)*	90.7% (83% - 98.5%)	85.7% (76.4% - 95%)	96.2% (91% - 100%)
Evaluated test (HBV DBS vs. plasma)	17/17	28/34	0.757 (0.639 - 0.875)*	88.2% (79.4% - 97.1%)	82.4% (71.9% - 92.8%)	100% (100% - 100%)

244 Table 5: Results of validated and evaluated of the tests (plasma vs. Abbott Real Time HCV or
 245 HBV, or DBS vs. plasma) and its calculated κ , accuracy, sensibility and specificity. * $p < 0.001$

246 Discussion

247 Anti-HCV is the recommend test at the screening of the HCV infection
 248 [6,25,26]. If this result is reagent, it may be due to an active HCV infection
 249 (acute or chronic), past resolved infection, or a false-positive test result [26,27]
 250 and current infection should be confirmed by a sensitive HCV RNA test. Also,
 251 the quantitative HCV-RNA testing detects viremia, which guides clinical
 252 management, including initiation of HCV and duration of treatment. The HCV
 253 RNA test is recommended to detect reinfection in anti-HCV–positive persons
 254 after previous viral clearance (spontaneous or treatment-related). Moreover,

255 testing for HCV genotype is recommended to guide the selection of the most
256 appropriate antiviral regimen [6].

257 The serological markers of HBV infections are HBsAg and HBeAg/anti-
258 HBe [28], however markers tested on Brazil are HBsAg, total anti-HBc and anti-
259 HBs [29]. Its results are a varied and complex serological pattern, indicated as
260 'never infected (and susceptible)', 'vaccinated subject', 'early infection', 'acute
261 infection', 'resolved past infection (and immune to a new one)' or 'chronic
262 disease' [29,30]. HBV DNA is an important marker to confirm the disease, it
263 indicates the risk of progression to cirrhosis and to hepatocellular carcinoma,
264 determines the need of treatment, and its suppression is one of the indicators of
265 cure [7,29].

266 DBS sampling is widely used in clinical analysis for serological and
267 molecular diagnosis and could be used on Brazilian Health System (Sistema
268 Único de Saúde) with significant advantages for users from different social
269 classes. Fingerstick causes less discomfort to patients, samples do not require
270 to be centrifuged to plasma separation neither serum needs to be immediately
271 frozen and more tests (serological or molecular) can be done with only one
272 card, instead of various blood tubes. Moreover, samples can be stocked as
273 non-hazardous material for mail shipping [10,16], especially when they are
274 collected in different places, as suburb of big cities or the country, and send to a
275 central laboratory [9,10].

276 It used to be advisable for the extractions from DBS samples to be made
277 within two months [10], although our results show that even when DBS
278 extraction is done after this time, both Real Time PCR can be highly sensible

279 and specific. It is controversial whether the levels of nucleic acids decrease at
280 room temperature [9,10,12,14,16]. Thus, a decrease associated to freeze-thaw
281 could occur as well; even so, a significant degradation was not observed in our
282 experiments, possibly due to the use of desiccants.

283 We had six cross-contaminations in HCV DBS samples and one in HBV
284 DBS samples, during standardization of DBS use. These negative samples had,
285 at first, positive results, and negative results when repeated. It was expected, as
286 the sample-containing region is physically touched by punching devices during
287 the extraction, and nucleic acids can be carried over from a positive sample and
288 cause a false-positive result [31]. We also had eleven false negative results in
289 HBV DBS samples. When repeated, five of these samples showed target
290 amplification; the other six probably did not due to their low viral load
291 (Supplementary Table 2). Though commercial kits improve the quality of the
292 nucleic acid extracted and the molecular results [16], extraction was done by
293 manual methods, which are laborious and have a high risk of cross-
294 contamination [32]. This could be solved retesting positive samples to confirm
295 the result or through extraction automation. Although at a higher cost,
296 automation can reduce the possibility of manual error, risk of cross-
297 contamination and deviation from protocol [32–34]. A laser cutting DBS method
298 that eliminates the cross-contamination and reduces repetitive hand movements
299 required during manual punching has been reported [31].

300 Some authors had described the DBS use for serological assays to
301 detect various infectious agents, as HTLV, HIV, *Treponema pallidum*,
302 *Toxoplasma gondii*, HBV and HCV [8,10–12,17–19,35–39]. Also, there are
303 authors who describe the DBS use for molecular biological assays, with good

304 results [9,10,12,15–17,20,40]. On the validation (plasma vs plasma) and
305 evaluation (plasma vs. DBS) of in-house test for HCV, we found perfect
306 agreement ($\kappa = 1.000$) and accuracy, sensibility and specificity of 100%. On the
307 validation (plasma vs. plasma) of in-house test for HBV, we found almost
308 perfect agreement ($\kappa = 0.815$), accuracy of 90.7%, sensibility of 85.7% and
309 specificity of 96.2%. On the evaluation (plasma vs. DBS) of in-house test for
310 HBV, we found substantial agreement ($\kappa = 0.757$), accuracy of 88.2%,
311 sensibility of 82.4% and specificity of 100%. We found total concordance in
312 HCV genotypes, as was also found by other authors [10,14].

313 The major difficulty for the availability of DBS tests in the clinic is the
314 detection of low viral loads. Therefore, our perspective is to improve extractions
315 and Real Time PCRs to detect lower viral loads of both viruses.

316

317 Acknowledgements

318 Fer Luz de Castro and Valdir Barth Junior for providing technical support and
319 language help.

320

321 Funding: PPSUS - FAPERGS/MS/CNPq/SESRS [grant number 002/2013,
322 process 1257-2551/13-8]. Costenaro, J. G. received a CAPES scholarship for
323 12 months.

324 Competing interests: None declared

325 Ethical approval: Research Ethics Committee of Fundação Estadual de
326 Produção e Pesquisa em Saúde (CEP/FEPPS), Registration number: 453.100.

327 Competing interests: None declared

328

329

330 References

- 331 [1] J.J. Ott, G.A. Stevens, J. Groeger, S.T. Wiersma, Global epidemiology of
332 hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg
333 seroprevalence and endemicity, *Vaccine*. 30 (2012) 2212–2219.
334 doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.116.
- 335 [2] K. Mohd Hanafiah, J. Groeger, A.D. Flaxman, S.T. Wiersma, Global
336 epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific
337 antibody to HCV seroprevalence, *Hepatology*. 57 (2013) 1333–1342.
338 doi:10.1002/hep.26141.
- 339 [3] Brasil, Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais, 2015.
340 doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- 341 [4] Brasil. Ministério da Saúde, Boeltim Epidemiológico - Hepatites virais, 15
342 (2016) 1–72.
- 343 [5] J.F. Perz, G.L. Armstrong, L.A. Farrington, Y.J.F. Hutin, B.P. Bell, The
344 contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to
345 cirrhosis and primary liver cancer worldwide, *J. Hepatol*. 45 (2006) 529–
346 538. doi:10.1016/j.jhep.2006.05.013.
- 347 [6] AASLD, Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis
348 C, 2016. <http://hcvguidelines.org/sites/default/files/HCV->

349 Guidance_July_2016_b.pdf.

350 [7] N.A. Terrault, N.H. Bzowej, K.-M. Chang, J.P. Hwang, M.M. Jonas, M.H.

351 Murad, AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B,

352 Hepatology. 63 (2015) 261–283. doi:10.1002/hep.28156.

353 [8] J. Greenman, T. Roberts, J. Cohn, L. Messac, Dried blood spot in the

354 genotyping, quantification and storage of HCV RNA: A systematic

355 literature review, J. Viral Hepat. 22 (2015) 353–361.

356 doi:10.1111/jvh.12345.

357 [9] R. Jardi, F. Rodriguez-Frias, M. Buti, M. Schaper, A. Valdes, M. Martinez,

358 R. Esteban, J. Guardia, Usefulness of dried samples for quantification

359 and molecular characterization of HBV-DNA, Hepatology. 40 (2004) 133–

360 139. doi:10.1002/hep.20275.

361 [10] E. Tuaille, A.-M. Mondain, F. Meroueh, L. Ottomani, M.-C. Picot, N.

362 Nagot, P. Van de Perre, J. Ducos, Dried blood spot for hepatitis C virus

363 serology and molecular testing, Hepatology. 51 (2010) 752–758.

364 doi:10.1002/hep.23407.

365 [11] D. Kania, A.M. Bekalé, N. Nagot, A.M. Mondain, L. Ottomani, N. Meda, M.

366 Traoré, J.B. Ouédraogo, J. Ducos, P. Van de Perre, E. Tuaille,

367 Combining rapid diagnostic tests and dried blood spot assays for point-of-

368 care testing of human immunodeficiency virus, hepatitis B and hepatitis C

369 infections in burkina faso, west africa, Clin. Microbiol. Infect. 19 (2013)

370 12–18. doi:10.1111/1469-0691.12292.

371 [12] A. Soulier, L. Poiteau, I. Rosa, C. Hézode, F. Roudot-Thoraval, J.M.

- 372 Pawlotsky, S. Chevaliez, Dried blood spots: A tool to ensure broad
373 access to hepatitis C screening, diagnosis, and treatment monitoring, *J.*
374 *Infect. Dis.* 213 (2016) 1087–1095. doi:10.1093/infdis/jiv423.
- 375 [13] I.J.M. Snijdewind, J.J.A. Van Kampen, P.L.A. Fraaij, M.E. Van der Ende,
376 A.D.M.E. Osterhaus, R.A. Gruters, Current and future applications of
377 dried blood spots in viral disease management, *Antiviral Res.* 93 (2012)
378 309–321. doi:10.1016/j.antiviral.2011.12.011.
- 379 [14] M. Solmone, E. Girardi, F. Costa, L. Pucillo, G. Ippolito, M.R.
380 Capobianchi, Simple and reliable method for detection and genotyping of
381 hepatitis C virus RNA in dried blood spots stored at room temperature, *J*
382 *Clin Microbiol.* 40 (2002) 3512–3514. doi:10.1128/JCM.40.9.3512.
- 383 [15] C. Santos, A. Reis, C.V. dos Santos, C. Damas, M.H. Silva, M.V. Viana,
384 M.L. Ferraz, D. Carnauba, F. El-Far, F. Serra, R.S. Diaz, The use of real-
385 time PCR to detect hepatitis C virus RNA in dried blood spots from
386 Brazilian patients infected chronically, *J. Virol. Methods.* 179 (2012) 17–
387 20. doi:10.1016/j.jviromet.2011.06.012.
- 388 [16] S. Mohamed, A. Raimondo, G. Pénaranda, C. Camus, D. Ouzan, S.
389 Ravet, M. Bourlière, H. Khiri, P. Dukan, D. Olive, P. Halfon, Dried Blood
390 Spot Sampling for Hepatitis B Virus Serology and Molecular Testing,
391 *PLoS One.* 8 (2013) 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0061077.
- 392 [17] R.S. Ross, O. Stambouli, N. Grüner, U. Marcus, W. Cai, W. Zhang, R.
393 Zimmermann, M. Roggendorf, Detection of infections with hepatitis B
394 virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus by analyses of
395 dried blood spots--performance characteristics of the ARCHITECT

- 396 system and two commercial assays for nucleic acid amplification., *Viol. J.*
397 10 (2013) 72. doi:10.1186/1743-422X-10-72.
- 398 [18] A.B. Vedio, H. Ellam, F. Rayner, B. Stone, G. Kudesia, M.W. McKendrick,
399 S.T. Green, Hepatitis B: Report of prevalence and access to healthcare
400 among Chinese residents in Sheffield UK, *J. Infect. Public Health.* 6
401 (2013) 448–455. doi:10.1016/j.jiph.2013.05.004.
- 402 [19] N. Boa-Sorte, A. Purificação, T. Amorim, L. Assunção, A. Reis, B.
403 Galvão-Castro, Dried blood spot testing for the antenatal screening of
404 HTLV, HIV, syphilis, toxoplasmosis and hepatitis B and C: Prevalence,
405 accuracy and operational aspects, *Brazilian J. Infect. Dis.* 18 (2014) 618–
406 624. doi:10.1016/j.bjid.2014.05.009.
- 407 [20] M.J. Vinikoor, S. Zürcher, K. Musukuma, O. Kachuwaire, A. Rauch, B.H.
408 Chi, M. Gorgievski, M. Zwahlen, G. Wandeler, Hepatitis B viral load in
409 dried blood spots: A validation study in Zambia., *J. Clin. Virol.* 72 (2015)
410 20–4. doi:10.1016/j.jcv.2015.08.019.
- 411 [21] J.F. Drexler, B. Kupfer, N. Petersen, R.M. Grotto, S.M. Rodrigues, K.
412 Grywna, M. Panning, A. Annan, G.F. Silva, J. Douglas, E.S. Koay, H.
413 Smuts, E.M. Netto, P. Simmonds, M.I. Pardini, W.K. Roth, C. Drosten, A
414 novel diagnostic target in the hepatitis C virus genome, *PLoS Med.* 6
415 (2009) e31. doi:10.1371/journal.pmed.1000031.
- 416 [22] C.S. Gusatti, C. Costi, M.L. Halon, T. Grandi, A.F.R. Medeiros, C.M.D.
417 Silva, S.A. Gomes, M.S.N. Silva, C. Niel, M.L.R. Rossetti, Hepatitis B
418 Virus Genotype D Isolates Circulating in Chapeco, Southern Brazil,
419 Originate from Italy., *PLoS One.* 10 (2015) e0135816.

420 <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=pem&NE>
421 [WS=N&AN=26275046](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=pem&NE).

422 [23] C. Costi, T. Grandi, M.L. Halon, M.S.N. Silva, C.M.D. da Silva, T.S.
423 Gregianini, L.G. Possuelo, C.A. Jarczewski, C. Niel, M.L.R. Rossetti,
424 Prevalence of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus in a
425 group of patients newly diagnosed with active tuberculosis in Porto
426 Alegre, Southern Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 112 (2017) 255–259.
427 doi:10.1590/0074-02760160352.

428 [24] L.P. Krug, V.R. Lunge, N. Ikuta, A.S. Fonseca, H. Cheinquer, L.S. Ozaki,
429 S.G. Barros, Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil., *Brazilian J.*
430 *Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 29 (1996) 1629–32.
431 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9222423>.

432 [25] M. Alter, W. Kuhnert, L. Finelli, Guidelines for Laboratory Testing and
433 Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus, *MMWR Recomm*
434 *Rep.*;52(RR-3). (2003) 1–13, 15–14.
435 <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5203a1.htm>.

436 [26] Centers for Disease Control and Prevention, Testing for HCV Infection:
437 An Update of Guidance for Clinicians and Laboratories, *Morb. Mortal.*
438 *Wkly. Rep.* 62 (2013) 362–365. doi:mm6218a1 [pii].

439 [27] J.M. Pawlotsky, Use and interpretation of virological tests for hepatitis C,
440 *Hepatology.* 36 (2002) 65–73. doi:10.1053/jhep.2002.36815.

441 [28] P. Lampertico, K. Agarwal, T. Berg, M. Buti, H.L.A. Janssen, G.
442 Papatheodoridis, F. Zoulim, F. Tacke, *EASL 2017 Clinical Practice*

- 443 Guidelines on the management of hepatitis B virus infection, *J. Hepatol.*
444 67 (2017). doi:10.1016/j.jhep.2017.03.021.
- 445 [29] Brasil, Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais, Ministério
446 da Saúde Secr. Vigilância em Saúde Dep. DST, Aids e Hepatites Virais.
447 (2015) 68.
- 448 [30] C.M. Weinbaum, E.E. Mast, J.W. Ward, Recommendations for
449 identification and public health management of persons with chronic
450 hepatitis B virus infection, *Hepatology.* 49 (2009) 35–44.
451 doi:10.1002/hep.22882.
- 452 [31] S.C. Murphy, G. Daza, M. Chang, R. Coombsa, Laser cutting eliminates
453 nucleic acid cross-contamination in dried-blood-spot processing, *J. Clin.*
454 *Microbiol.* 50 (2012) 4128–4130. doi:10.1128/JCM.02549-12.
- 455 [32] A. Wozniak, E. Geoffroy, C. Miranda, C. Castillo, F. Sanhueza, P. García,
456 Comparison of manual and automated nucleic acid extraction methods
457 from clinical specimens for microbial diagnosis purposes., *Diagn.*
458 *Microbiol. Infect. Dis.* 86 (2016) 268–269.
459 doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.008.
- 460 [33] N. Dundas, N.K. Leos, M. Mitui, P. Revell, B.B. Rogers, Comparison of
461 automated nucleic acid extraction methods with manual extraction., *J.*
462 *Mol. Diagn.* 10 (2008) 311–6. doi:10.2353/jmoldx.2008.070149.
- 463 [34] M.K. Sellin Jeffries, A.J. Kiss, A.W. Smith, J.T. Oris, A comparison of
464 commercially-available automated and manual extraction kits for the
465 isolation of total RNA from small tissue samples, *BMC Biotechnol.* 14

- 466 (2014) 94. doi:10.1186/s12896-014-0094-8.
- 467 [35] B.L.C. Marques, C.U. Brandão, E.F. Silva, V.A. Marques, C.A. Villela-
468 Nogueira, K.M.R. Do Ó, M.T. de Paula, L.L. Lewis-Ximenez, E. Lampe,
469 L.M. Villar, Dried blood spot samples: Optimization of commercial EIAs for
470 hepatitis C antibody detection and stability under different storage
471 conditions, *J. Med. Virol.* 84 (2012) 1600–1607. doi:10.1002/jmv.23379.
- 472 [36] C.P.U. Brandão, B.L.C. Marques, V.A. Marques, C.A. Villela-Nogueira,
473 K.M.R. Do Ó, M.T. de Paula, L.L. Lewis-Ximenez, E. Lampe, J.A. Sá
474 Ferreira, L.M. Villar, Simultaneous detection of hepatitis c virus antigen
475 and antibodies in dried blood spots, *J. Clin. Virol.* 57 (2013) 98–102.
476 doi:10.1016/j.jcv.2013.02.014.
- 477 [37] G.L. Flores, H.M. Cruz, D.V. Potech, S.B. May, C.E. Brandão-Mello,
478 M.M.A. Pires, J.H. Pilotto, L.L. Lewis-Ximenez, E. Lampe, L.M. Villar,
479 Evaluation of HBsAg and anti-HBc assays in saliva and dried blood spot
480 samples according HIV status, *J. Virol. Methods.* 247 (2017) 32–37.
481 doi:10.1016/j.jviromet.2017.05.004.
- 482 [38] G.L. Flores, H.M. Cruz, V.A. Marques, C.A. Villela-Nogueira, D.V. Potech,
483 S.B. May, C.E. Brandão-Mello, M.M.A. Pires, J.H. Pilotto, P. Pollo-Flores,
484 E.B.C. Esberard, C. Ivantes, L.L. Lewis-Ximenez, E. Lampe, L.M. Villar,
485 Performance of ANTI-HCV testing in dried blood spots and saliva
486 according to HIV status, *J. Med. Virol.* 89 (2017) 1435–1441.
487 doi:10.1002/jmv.24777.
- 488 [39] L.M. Villar, J.C. de Oliveira, H.M. Cruz, C.F.T. Yoshida, E. Lampe, L.L.
489 Lewis-Ximenez, Assessment of dried blood spot samples as a simple

490 method for detection of hepatitis B virus markers., J Med Virol. (2011).
491 doi:10.1002/jmv.22138.

492 [40] B.L.C. Marques, M.P. do Espírito-Santo, V.A. Marques, J.C. Miguel, E.F.
493 da Silva, C.A. Villela-Nogueira, L.L. Lewis-Ximenez, E. Lampe, L.M.
494 Villar, Evaluation of dried blood spot samples for hepatitis C virus
495 detection and quantification, J. Clin. Virol. 82 (2016) 139–144.
496 doi:10.1016/j.jcv.2016.07.009.

Supplementary Table 1: Comparison between Amplification CTs in DBS and plasma HCV samples obtained from in house test.

Sample Number	Viral load (from Abbott Real Time HCV, IU/mL)	Results from In house test (Amplification CT)	
		DBS	Plasma
5	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
9	331,131	28.42; 29.26	29.16; 29.43
10	1,071,513	30.54; 30.92	25.25; 25.42
11	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND
14	1,577,894	28.73; 28.76	22.84; 22.85
15	7,200,216	29.53; 30.02	23.22; 23.29
16	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND
21	4,103	31.09; 31.52	26.94; 26.99
22	ND	ND	ND
23	1,116,416	30.72; 30.80	27.59; 27.95
24	ND	ND	ND
25	ND	ND	ND
26	630,160	29.08; 29.10	23.16; 23.35
27	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND
31	ND	ND	ND
32	368,474	33.64; 34.14	29.85; 30.36
33	ND	ND	ND
35	1,181,291	29.82; 29.90	25.14; 25.27
36	249,895	30.33; 32.79	28.98; 29.05
37	ND	ND	ND
38	387,143	30.00; 30.13	25.19; 25.23
39	ND	ND	ND
40	ND	ND	ND
41	58,770	32.95; 36.22	28.32; 28.41
42	164,756	31.63; 31.97	27.17; 27.25
43	ND	ND	ND
44	71,616	33.26; 33.49	29.15; 29.28
45	ND	ND	ND
46	14,938	34.82; 35.06	31.07; 31.08
47	19,953	30.91; 35.17	28.16; 28.21
48	ND	ND	ND
49	ND	ND	ND

50	3,174,297	27.38; 27.54	23.34; 23.53
51	205,069	31.72; 32.06	25.06; 25.07
52	258,874	33.94; 34.09	25.49; 25.64
53	ND	ND	ND
54	163,597	31.95; 32.13	23.91; 23.99
56	5,544,855	27.18; 27.28	23.08; 23.12
57	ND	ND	ND
58	1,843,053	30.31; 30.60	23.39; 23.44
59	5,544,855	27.25; 27.27	23.46; 23.51
60	99,098	32.64; 33.34	28.39; 28.51
61	ND	ND	ND
62	ND	ND	ND
63	ND	ND	ND
64	ND	ND	ND
66	ND	ND	ND
67	ND	ND	ND
68	ND	ND	ND
73	ND	ND	ND
74	392,649	32.76; 32.92	24.61; 24.79
75	ND	ND	ND
76	197,955	32.39; 32.94	28.96; 28.98
77	ND	ND	ND
78	ND	ND	ND
79	1,439,511	31.24; 31.61	26.15; 26.18
80	1,085,327	31.45; 31.52	27.12; 27.25
81	82,478	31.36; 31.42	26.44; 26.72
82	ND	ND	ND
83	903,307	30.44; 30.45	28.03; 28.37
84	106,348	30.69; 31.11	27.32; 27.41
85	23,306	32.83; 32.92	29.42; 29.67
86	ND	ND	ND
88	ND	ND	ND
89	35,599	33.46; 33.92	32.55; 32.68
90	ND	ND	ND
92	475,112	29.37; 29.45	26.79; 26.82
93	131,437	32.29; 32.55	29.25; 29.59
94	51,756	29.64; 29.66	27.44; 27.51
95	336,159	27.72; 27.82	24.68; 24.76
96	ND	ND	ND
97	1,047,680	29.14; 29.15	25.89; 26.05
98	350,706	31.97; 32.22	28.29; 28.31
99	4,373	31.97; 32.02	30.76; 30.88
100	652,804	28.65; 28.68	34.17; 35.08
101	2,359,720	28.55; 28.78	26.39; 26.54
102	197,955	31.76; 31.94	31.31; 31.97

103	185,768	29.81; 30.53	26.86; 26.90
104	ND	ND	ND
105	31,130	31.01; 31.08	27.04; 27.15
109	162,446	29.04; 29.23	22.85; 22.86
110	ND	ND	ND
111	997,159	27.96; 27.96	20.68; 20.71
112	85,442	33.40; 33.53	26.97; 27.05
113	2,461,833	29.01; 29.15	26.01; 26.04
114	ND	ND	ND
115	199,358	31.61; 31.87	27.45; 27.68
116	ND	ND	ND
117	ND	ND	ND
118	507,816	31.80; 32.50	29.65; 29.66
119	881	40.70; ND	38.43; 38.83
120	1,463,301	30.52; 30.90	27.20; 27.28
121	ND	ND	ND
122	49,354	35.62; 36.09	33.56; 33.68
123	2,765,099	31.23; 31.25	23.54; 23.69
124	31,049	33.33; 33.47	27.56; 27.66
125	1,668,828	30.91; 31.09	26.18; 26.21
126	2,216,050	28.70; 29.05	22.39; 22.43
127	3,004,415	32.26; 32.27	24.26; 24.37
128	ND	ND	ND
129	448,366	33.60; 33.88	27.17; 27.19
130	2,294,035	30.42; 30.64	25.28; 25.43
131	483,813	30.60; 30.80	27.35; 27.48
132	ND	ND	ND
133	2,039,531	30.11; 34.09	22.86; 22.87
134	78,451	32.46; 32.47	27.36; 27.43
135	31,265	36.04; 36.39	27.42; 27.64
136	818,444	32.69; 33.19	25.38; 25.35
137	ND	ND	ND
138	3,426,398	29.92; 30.03	22.13; 22.19
139	ND	ND	ND
140	4,775,674	29.00; 29.16	23.64; 23.76
141	2,882,275	30.65; 30.99	24.56; 24.72
142	312,910	32.56; 32.66	27.43; 27.52
143	364,342	29.59; 29.68	24.37; 24.43
144	2,458,335	29.44; 29.85	24.59; 24.67
145	ND	ND	ND
146	176,230	34.64; 35.11	28.43; 28.61

Supplementary Table 2: Comparison between Amplification CTs in DBS and plasma HBV samples obtained from in house test. Every sample was tested in duplicate. ND: not detected.

Sample Number	Viral load (from Abbott Real Time HBV, IU/mL)	Results from In house test (Amplification CT)	
		DBS	Plasma
1	ND	ND	ND
7	14.108	36.04; 36.09	30.97; 31.20
14	4.956	37.93; ND	28.90; 29.01
15	40.139	33.18; 33.45	25.80; 26.20
16	ND	ND	36.97; ND
17	616	ND	37.77; 38.01
18	53	37.46; ND	31.00; 31.06
20	ND	ND	36.41; 37.00
21	9.335	33.07; 34.25	31.48; 32.22
22	538.755	27.29; 27.32	24.37; 24.40
23	ND	ND	ND
26	3.375	43.84; 44.31	32.60; 34.13
27	3.280	33.19; 34.25	31.73; 32.09
28	ND	ND	ND
29	10.687	32.06; 32.26	29.64; 29.74
31	ND	ND	ND
34	ND	ND	ND
35	ND	ND	ND
39	131	ND	35.14; 36.75
40	ND	ND	ND
43	527	38.19; ND	36.53; 36.79
44	2.596.989	24.77; 25.26	22.11; 22.14
45	414	36.79; ND	33.36; 36.35
46	ND	ND	35.41; ND
47	1.575	36.39; 36.69	34.06; 34.14
48	112.942	28.85; 29.26	26.88; 26.95
49	1.940.351	25.61; 26.62	21.69; 21.71
50	2.138	34.06; 37.14	29.61; 30.36
51	152.630.231	19.87; 21.20	15.37; 15.41
53	ND	ND	ND
54	118	36.75; 37.57	37.35; 37.41
55	ND	ND	ND
56	356	ND	36.62; 37.51
57	ND	ND	ND
58	164	ND	ND
59	ND	ND	ND
60	660.202.899	19.80; 19.87	15.98; 16.00
61	ND	ND	ND
62	ND	ND	ND
64	ND	ND	ND

65	ND	ND	ND
69	29.675	31.62; 32.96	32.46; 32.75
70	ND	ND	ND
71	1.752	38.34; 38.71	35.36; 35.39
72	2.063	32.75; 32.98	34.07; 34.75
75	268	35.39; ND	34.20; 35.82
76	115	38.84; ND	33.35; 34.54
85	705	35.68; ND	32.31; 32.76
86	1.935	34.84; ND	32.16; 33.28
87	546	36.15; ND	34.64; 38.25
88	957	35.66; 36.11	30.84; 31.11

4. DISCUSSÃO

As infecções virais causadas por HCV, HBV e HIV são, mundialmente, as três principais causas de doenças crônicas. Elas compartilham algumas vias de transmissão, epidemiologia, barreiras iniciais no acesso ao tratamento e em estratégias para uma resposta global em saúde pública. Também por estes motivos, muitas vezes, o HIV está presente em coinfeção com HCV ou HBV (EASTERBROOK *et al.*, 2016). O Ministério da Saúde relata que 5,2% dos infectados por HBV também estão infectados com o HIV, nos casos notificados de 2007 a 2015. Em relação à coinfeção com HCV, 10,0% dos infectados por HCV também estão infectados por HIV (BRASIL, 2016b). A testagem e o diagnóstico de HIV, HCV e HBV são os primeiros passos para o acesso à prevenção, ao cuidado e ao tratamento dos indivíduos infectados, seus parceiros e familiares. Para, deste modo, alcançar a redução da mortalidade associada ao HIV, ao HCV e ao HBV, através das terapias antivirais disponíveis para cada vírus (EASTERBROOK *et al.*, 2016).

As recomendações dos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC; ALTER *et al.*, 2003 e CDC, 2013) e das *American Association for the Study of Liver Diseases* e *Infectious Diseases Society of America* (AASLD & IDSA, 2017) são de que o teste do anti-HCV seja utilizado na triagem da hepatite C. Quando esse teste é positivo, pode ser devido a uma infecção ativa pelo HCV, aguda ou crônica, ou a uma infecção passada já resolvida, ou, ainda, a um teste falso-positivo (PAWLOTSKY, 2002; CDC, 2013). No caso do teste anti-HCV ser reagente, a possível infecção ativa deve ser confirmada através de um teste sensível para o RNA de HCV, já que o HCV possui mecanismos para evadir dos

anticorpos neutralizantes do hospedeiro (KNIPE & HOWLEY, 2013; AASLD & IDSA, 2017). O teste quantitativo para o RNA de HCV quantifica também a viremia, informação que guia o manejo clínico do paciente, incluindo tanto o início do tratamento para o HCV quanto sua duração. O teste RNA de HCV também é recomendado para a detecção de uma reinfecção em pessoas reagentes para o anti-HCV após uma *clearence* (ou depuração) viral, que pode ter sido espontânea ou após tratamento. Além disso, o teste para o genótipo do HCV é recomendado para guiar a seleção da combinação medicamentosa mais apropriada para aquele paciente (AASLD & IDSA, 2017).

Os marcadores sorológicos das infecções por HBV testados no Brasil são HBsAg, anti-HBc total e anti-HBs (BRASIL, 2015b). Seus resultados formam um padrão sorológico complexo e variado, conforme tabela abaixo (Tabela 1; WEINBAUM *et al.*, 2009; BRASIL, 2015b). Já o DNA de HBV é um importante marcador para confirmação da doença, pois indica o risco de progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular, determina a necessidade de tratamento e a sua supressão é um dos indicadores de cura (BRASIL, 2015b; TERRAULT *et al.*, 2016). Apenas o genótipo C está relacionado a complicações relacionadas ao fígado (TERRAULT *et al.*, 2016), mas o teste de genotipagem para o HBV não é considerado um teste necessário na avaliação inicial pela EASL (LAMPERTICO *et al.*, 2017) e não é recomendado pelo Ministério da Saúde Brasileiro (BRASIL, 2015b).

Tabela 1: Perfil sorológico para infecções pelo Vírus da hepatite B.

Diagnóstico	Marcadores sorológicos			
	HBsAg	anti-HBc total	IgM anti-HBc	anti-HBs
Nunca infectado (e suscetível)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Indivíduo vacinado	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Infecção aguda recente				
Infecção aguda	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
Infecção passada já resolvida (e imune a uma nova)	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Infecção crônica	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

Inicialmente, DBS era utilizado apenas na triagem de doenças metabólicas em recém-nascidos, porém, com o desenvolvimento de novas técnicas, o número de doenças e possíveis usos do DBS ampliaram-se (SNIJDEWIND *et al.*, 2012). Já foi descrito o uso de DBS em testes sorológicos para detectar vários agentes infecciosos, como HTLV, HIV, *Treponema pallidum* (causadora da sífilis), *Toxoplasma gondii*, (causador da toxoplasmose) e os vírus das hepatites B e C (TUAILLON *et al.*, 2010; KANIA *et al.*, 2013; ROSS *et al.*, 2013; VEDIO *et al.*, 2013; BOA-SORTE *et al.*, 2014; GREENMAN *et al.*, 2014; SOULIER *et al.*, 2015).

No nosso estudo, na validação da RT-PCR em tempo real para detecção do RNA de HCV, comparando com o resultado do método Abbott Real Time HCV, identificamos 60/60 amostras negativas e 60/60 amostras positivas, $\kappa = 100\%$ (concordância perfeita), acurácia de 100%, sensibilidade de 100% e especificidade de 100%. Na avaliação do uso do DBS para detecção molecular do HCV, comparando com plasma, identificamos 53/53 amostras negativas e 73/73

amostras positivas, $\kappa = 100\%$ (concordância perfeita), acurácia de 100%, sensibilidade de 100% e especificidade de 100%.

Já na validação da PCR em tempo real para detecção do DNA de HBV, comparando com o resultado do método Abbott Real Time HBV, identificamos 25/26 amostras negativas e 24/28 amostras positivas, $\kappa = 81,5\%$ (concordância quase perfeita), acurácia de 90,7%, sensibilidade de 85,7% e especificidade de 96,2%. Na avaliação do uso do DBS para detecção molecular do HBV, comparando com plasma, identificamos 17/17 amostras negativas e 28/34 amostras positivas, $\kappa = 75,7\%$ (concordância considerável), acurácia de 88,2%, sensibilidade de 82,4% e especificidade de 100%.

Assim como na literatura, nossos resultados em relação ao uso do DBS na genotipagem do HCV foram de total concordância com as 51 amostras também genotipadas pelo método comercial Abbott Real Time HCV genotype II. Destas, 29 amostras foram identificadas como genótipo 1, 5 amostras como genótipo 2 e 17 amostras como genótipo 3.

Na literatura, não foi observado decréscimo significativo dos níveis de HBV-DNA *in vitro*, nem degradação do DNA em análise em gel no estudo da estabilidade do DBS (cartão filtro 903, Whatman, o mesmo utilizado no presente estudo), em amostras armazenadas em temperatura ambiente por uma semana ou nos três ensaios semanais das amostras armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A comparação entre amostras em DBS e em plasma revelou uma estreita correlação entre os resultados. Os achados indicam que o DNA de HBV absorvido elui bem a partir do papel filtro, é altamente puro e não apresenta perda mensurável significativa durante a eluição (JARDI *et al.*, 2004).

Outro grupo avaliou a amplificação do DNA de HBV em diferentes condições de armazenamento do cartão filtro FTA DMPK-C, Whatman, em temperatura ambiente por 1, 3, 7 ou 14 dias. Esta avaliação demonstrou um pequeno decréscimo no dia 3, mas sem variação significativa na titulação (UI/mL). Na comparação dos resultados por DBS com os obtidos por plasma, detectou o DNA viral em todas as amostras DBS, com boa correlação entre as medidas, e completa concordância entre amostras de plasma e DBS para genotipagem e mutações (MOHAMED *et al.*, 2013). Em ambos os estudos não foram encontradas diferenças significativas em amostras de DNA de HBV armazenadas em temperatura ambiente (JARDI *et al.*, 2004; MOHAMED *et al.*, 2013). Isto pode ser causado pela resistência natural do vírus HBV à degradação.

SOLMONE *et al.* (2002) testaram a estabilidade do RNA de HCV em amostras de DBS positivas para o HCV, armazenadas em temperatura ambiente. Seus testes foram executados em intervalos de duas a quatro semanas durante um período de onze meses: todas as amostras mantiveram seus resultados positivos.

O fato de TUAILLON *et al.* (2010) apresentarem um grande decréscimo nos níveis de RNA de HCV quando o cartão filtro é armazenado em temperatura ambiente, pode sugerir que um decréscimo associado à repetição de procedimentos de congelamento-descongelamento também poderia ocorrer. Ainda assim, nossos resultados continuam sendo positivos mesmo após vários congelamentos e descongelamentos. Outro fator que pode estar envolvido é a utilização de dissecantes no armazenamento dos cartões, diferente de TUAILLON *et al.* (2010), que não os utilizaram). Apesar disso, SOULIER *et al.* (2015)

observaram níveis estáveis de RNA de HCV quando os cartões filtro eram armazenados em temperatura ambiente por mais de um ano.

Embora TUAILLON *et al.* (2010) tenham feito suas extrações de amostras HCV em DBS dentro de dois meses após a amostragem, nossos resultados, com amostras também HCV, mostram que mesmo quando a extração das amostras DBS é feita após este tempo, a PCR em tempo real pode ser altamente sensível e específica.

A amostra DBS HCV com menor carga viral, coletada neste estudo, possui 440 UI/mL e a mais alta, 7.200.216 UI/mL (resultados do Abbott Real Time HCV, testado em plasma). A carga viral média para as amostras HCV foi 42.477 UI/mL e a mediana, 615.684 UI/mL. Para as amostras em cartão filtro, o tempo médio entre a amostragem e a extração do RNA viral foi de 162 dias e a mediana, 165 dias. O tempo mais curto foi 94 dias para uma amostra positiva e 99 dias para uma amostra negativa. O mais longo foi 189 dias para uma amostra positiva e 218 dias para uma amostra negativa.

Em relação às amostras DBS HCV, observamos uma boa relação entre os resultados, mesmo com muitos descongelamentos. Uma amostra em DBS com 4.103 UI/mL foi extraída nove vezes (CTs das qPCRs variaram entre 31,09 e 36,70); uma amostra em DBS com 11.833 UI/mL, oito vezes (CTs das qPCRs variaram entre 35,69 e 39,54); uma amostra em DBS com 14.938 UI/mL, três vezes (CTs das qPCRs variaram entre 34,82 e 38,97); e uma amostra em DBS com 19.953 UI/mL, quatro vezes (CTs das qPCRs variaram entre 30,91 e 35,17).

Quanto às amostras DBS HBV coletadas para este estudo, a amostra de carga viral mais baixa possuía 53 UI/mL, e a mais alta, 660.202.899 UI/mL (resultados do Abbott Real Time HBV, testado em plasma). A carga viral média foi 385 UI/mL e a mediana, 16.363.043 UI/mL. Para as amostras em DBS, o tempo médio entre amostragem e extração do DNA viral foi de 327 dias, a mediana foi 360 dias. O tempo mais curto foi 109 dias para uma amostra positiva e 311 dias para uma amostra negativa. O tempo mais longo foi de 496 dias para uma amostra positiva e 476 dias para uma amostra negativa.

No início das padronizações da utilização das amostras fixadas em papel filtro, houveram seis contaminações cruzadas em amostras HCV e uma em HBV. Todas estas sete amostras tiveram resultado positivo, como primeiro resultado, e resultado negativo quando repetidas. Isto pode ser explicado pelo método como os cortes foram feitos, já que a região do cartão que contém a amostra é fisicamente tocada pelo dispositivo de corte durante a extração, o que pode acarretar na transferência dos ácidos nucleicos a partir de uma amostra positiva e ter como consequência um resultado falso-positivo na amostra seguinte (MURPHY *et al.*, 2012). Nós também tivemos seis amostras HBV positivas, fixadas em cartão filtro, que não amplificaram. Possivelmente, estas seis amostras não amplificaram devido às suas baixas cargas virais (na grandeza de 10^2 UI/mL). Embora kits comerciais melhorem a qualidade dos ácidos nucleicos extraídos e dos resultados moleculares (MOHAMED *et al.*, 2013), as extrações foram executadas por métodos manuais, que são trabalhosos e possuem risco de contaminação-cruzada (WOZNIAK *et al.*, 2016). Isto poderia ser resolvido através de automatização da extração, embora com um custo elevado, mas que reduz a

possibilidade de erros manuais, o risco de contaminação-cruzada e desvios do protocolo (DUNDAS *et al.*, 2008; JEFFRIES *et al.*, 2014; WOZNIAK *et al.*, 2016). MURPHY *et al.* (2012) também relatam um método de corte de DBS a laser que elimina a contaminação cruzada e reduz os movimentos repetitivos de mão, necessários durante o corte manual.

A amostragem em DBS pode ser utilizada no Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro com vantagens significativas para os usuários de diversas camadas sociais, pois além de sua amostragem ser mais simples, a punção digital é menos dolorosa que a punção venosa e a coleta pode ocorrer em locais de difícil acesso ou com poucos recursos, como periferias das grandes cidades e interior do país. Há também a facilidade no transporte dos cartões filtro, em comparação às amostras de plasma ou sangue total, já que estas são consideradas amostras infectantes e precisam ser enviadas em temperaturas baixas (em um complexo sistema de caixas e materiais para controle da temperatura), condição não necessária para transporte de DBS, tornando a carga menos frágil e sem risco de infecção à pessoa que fará o transporte. Em adição às facilidades de amostragem, mais testes (tanto sorológicos quanto moleculares) podem ser realizados com apenas um cartão filtro. Por exemplo, o 903 Whatman, utilizado nesse estudo, é comercializado com 4 ou 5 spots de coleta, cada um podendo ser utilizado em um teste distinto, como alternativa à coleta por punção venosa de vários tubos de sangue.

No Brasil, há grupos de pesquisa utilizando DBS em contraponto à coleta de tubos de sangue, visando principalmente o bem-estar do paciente. Alguns deles avaliam o uso do DBS no diagnóstico sorológico de HCV (MARQUES *et al.*

2012; BRANDÃO *et al.*, 2013; FLORES *et al.*, 2017a) e HBV (VILLAR *et al.*, 2011; FLORES *et al.*, 2017b). Também há grupos que estão avaliando métodos alternativos (ou *in house*) aos testes comerciais existentes, com a proposta de redução de custos, uma vez que PCR em tempo real é uma metodologia cara, mas fundamental ao diagnóstico de HCV e HBV para uso em larga escala no SUS. Em relação aos trabalhos publicados com diagnóstico de HCV por PCR em tempo real em amostras de DBS, SANTOS *et al.* (2012) e MARQUES *et al.* (2016) apresentam resultados promissores. Até onde conseguimos investigar, não há publicações brasileiras envolvendo avaliação de testes moleculares para detecção de HBV em DBS.

A grande dificuldade para a disponibilização destes testes na clínica é a detecção de baixas cargas virais de ambos os vírus. Em relação às amostras HBV, conseguimos detectar uma amostra de 53 UI/mL (resultado obtido com Abbott Real Time HBV), porém tivemos algumas outras amostras de baixa carga viral que não foram detectadas. Já nas amostras HCV, a mais baixa tinha carga viral de 881 UI/mL (resultado obtido com Abbott Real Time HCV) e foi detectada com a utilização de apenas um confete de 3 mm. A grande dificuldade de se obter baixas cargas virais em amostras HCV se deve ao fato de que os pacientes iniciam o tratamento pouco tempo após o diagnóstico (que, em geral, detecta cargas virais altíssimas, na grandeza de 10^6 UI/mL) e em pouco tempo do início do tratamento, a carga viral deste paciente passa a ser indetectável. Isso não ocorre com os pacientes HBV positivos, pois o tratamento não cura a infecção, mas diminui a carga viral. Infelizmente, é comum que estes pacientes abandonem o tratamento por conta dos efeitos adversos. Assim, nossa perspectiva é

aperfeiçoar as extrações e as PCRs em tempo real para detectar cargas virais mais baixas em ambos os vírus, para que os testes possam ser aprovados para uso na clínica.

REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Manual de vigilância sanitária para o transporte de sangue e componentes no âmbito da hemoterapia*. 2ª edição. 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2818756/Manual+para+Transporte+de+Sangue+e+Componentes/206314ad-e41b-492a-9246-9e368ad9eb59>>. Acesso em: 09 de outubro de 2017.
2. ALBERTA INNOVATES; CANADIAN INSTITUTES OF HEALTH RESEARCH (CIHR) & METABOLOMICS INNOVATION CENTRE (TMIC). *DrugBank*. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 27 de setembro de 2017.
3. ALBERTONI, G.; GIRÃO, M. J. B. C. & SCHOR, N. Mini review: Current molecular methods for the detection and quantification of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. *International Journal of Infectious Diseases*, 25: 145-149, 2014.
4. ALTER, M. J.; KUHNERT, W. L. & FINELLI, L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR (The Morbidity and Mortality Weekly Report) Recommendations and Reports*. 52(RR-3): 1-13, 15, 2003.
5. AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES (AASLD) & INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA (IDSA). Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. Disponível em <<http://www.hcvguidelines.org>>. Acesso em: 30 de maio de 2017.
6. ALBIN, C. & ROBINSON, W. S. Protein Kinase Activity in Hepatitis B Virus. *Journal of Virology*, 34(1): 297-302, 1980.
7. AKUTA, N. & KUMADA, H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 139-142, 2005.
8. BARTENSCHLAGER, R.; FRESE, M. & PIETSCHMANN, T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Advances in Virus Research*, 63(71-180), 2004 apud KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. (ed.). *Fields Virology*. 6ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
9. BLANCHARD, E.; BELOUZARD, S.; GOUESLAIN, L.; WAKITA, T.; DUBUISSON, J.; WYCHOWSKI, C. & ROUILLE, Y. Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*, 80(14): 6964-6972, 2006.
10. BEASLEY, R. P.; LEE, G. C-Y.; ROAN, C-H.; HWANG, L-Y.; LAN, C-C.; HUANG, F-Y. & CHEN, C-L. Prevention of perinatally transmitted Hepatitis B Virus infections with Hepatitis B immune globulin and Hepatitis B vaccine. *The Lancet*, 2(8359): 1099-1102, 1983.

11. BLUMBERG, B.; ALTER, H.J. & VISNICH, S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Journal of the American Medical Association*, 191(7): 541, 1965 apud KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. (ed.). *Fields Virology*. 6ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
12. BOA-SORTE, N.; PURIFICAÇÃO, A.; AMORIM, T.; ASSUNÇÃO, L.; REIS, A. & GALVÃO-CASTRO, B. Dried blood spot testing for the antenatal screening of HTLV, HIV, syphilis, toxoplasmosis and hepatitis B and C: prevalence, accuracy and operational aspects. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(6): 618-624, 2014.
13. BRANDÃO, C. P.; MARQUES, B. L.; MARQUES, V. A.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; DO Ó, K. M.; DE PAULA, M. T.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; LAMPE, E.; SÁ FERREIRA, J. A. & VILLAR, L. M. Simultaneous detection of hepatitis c virus antigen and antibodies in dried blood spots. *Journal of Clinical Virology*, 57(2): 98-102, 2013.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. *Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais*. Ano IV, n.1, 2015.
15. _____. *O Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais*. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das DST, Aids e Hepatites Virais. *Boletim Epidemiológico – Aids e DST*. Ano V, n. 01, 2016
17. _____. *Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais*. Ano V, n. 01, 2016
18. CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.; CARRILHO, F.; DA SILVA, L.; SOUTO, F.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.; COELHO, H.; SILVA, A.; FONSECA, J.; ROSA, H.; LACET, C. & BERNARDINI, A. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 38(1): 41-49, 2005.
19. CANDOTTI, D.; SARKODIE, F. & ALLAIN, J. P. Residual risk of transfusion in Ghana. *British Journal of Haematology*, 113(1): 37-39, 2001.
20. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians. *MMWR (The Morbidity and Mortality Weekly Report) Recommendations and Reports*, 62(18): 362-365, 2013.
21. CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W. & HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902): 359-362, 1989.
22. CROWTHER, R. A.; KISELEV, N. A.; BÖTTCHER, B.; BERRIMAN, J. A.; BORISOVA, G. P.; OSE, V. & PUMPENS, P. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, 77(6): 943-950, 1994.

23. DANE, D. S.; CAMERON, C. H. & BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-Antigen-Associated Hepatitis. *The Lancet*, 295(7649): 695-698, 1970.
24. DA SILVA, C. M. D.; COSTI, C.; KRUG, L. P.; RAMOS, A. B.; GRANDI, T.; GANDOLFI, V. L.; MENEZES, M. E.; OCAMPOS, M.; NIEL, C. & ROSSETTI, M. L. R. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7): 867-870, 2007.
25. DE OLIVEIRA, T.; PYBUS, O. G.; RAMBAUT, A.; SALEMI, M.; CASSOL, S.; CICCOCCHI, M.; REZZA, G.; GATTINARA, G. C.; D'ARRIGO, R.; AMICOSANTE, M.; PERRIN, L.; COLIZZI, V.; PERNO, C. F. & BENGHAZI STUDY GROUP. MOLECULAR. Epidemiology: HIV-1 and HCV sequences from Libyan outbreak. *Nature*, 444(7121): 836-837, 2006.
26. DOO, E. C. & GHANY, M. G. Hepatitis B Virology for Clinicians. *Clinical Liver Disease*, 14: 397-408, 2010.
27. DRYDEN, K. A.; WIELAND, S. F.; WHITTEN-BAUER, C.; GERIN, J. L.; CHISARI, F. V. & YEAGER, M. Native Hepatitis B Virions and Capsids Visualized by Electron Cryomicroscopy. *Molecular Cell*, 22(6): 843-850, 2006.
28. DUMOLARD L. Implementation of newborn hepatitis B vaccination - worldwide, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57: 1249-52, 2008.
29. DUNDAS, N.; LEOS, N. K.; MITUI, M.; REVELL, P. & ROGERS, B. B. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 10: 311-316, 2008.
30. EASTERBROOK, P.; JOHNSON, C.; FIGUEROA, C. & BAGGALEY, R. HIV and hepatitis testing: Global progress, challenges and future directions. *AIDS Reviews*, 18: 3-14, 2016.
31. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 60(2): 392-420, 2014.
32. EVANS, M. J.; VON HAHN, T.; TSCHERNE, D. M.; SYDER, A. J.; PANIS, M.; WÖLK, B.; HATZIOANNOU, T.; MCKEATING, J. A.; BIENIASZ, P. D. & RICE, C. M. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446(7137): 801-805, 2007.
33. FIRDAUS, R.; SAHA, K.; BISWAS, A. & SADHUKHAN, P. C. Current molecular methods for the detection of hepatitis C virus in high risk group population: A systematic review. *World Journal of Virology*, 4(1): 25-32, 2015.
34. FLORES, G. L.; CRUZ, H. M.; MARQUES, V. A.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; POTSCH, D. V.; MAY, S. B.; BRANDÃO-MELLO, C. E.; PIRES, M. M. A.; PILOTTO, J. H.; POLLO-FLORES, P.; ESBERARD, E. B. C.; IVANTES, C.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; LAMPE, E. & VILLAR, L. M. Performance of ANTI-HCV testing in dried blood spots and saliva according to HIV status. *Journal of Medical Virology*, 89(8): 1435-1441, 2017.

35. FLORES, G. L.; CRUZ, H. M.; POTSCHE, D. V.; MAY, S. B.; BRANDÃO-MELLO, C. E.; PIRES, M. M. A.; PILOTTO, J. H.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; LAMPE, E. & VILLAR, L. M. Evaluation of HBsAg and anti-HBc assays in saliva and dried blood spot samples according HIV status. *Journal of Virological Methods*, 247: 32-37, 2017.
36. FOCACCIA, R.; BARALDO, D. C. M.; FERRAZ, M. L. G.; MARTINELLI, A. L. C.; CARRILHO, F. J.; GONÇALES Jr., F. L.; PEDROSO, M. L. A.; COELHO, H. S. M.; LACERDA, M. A.; BRANDÃO, C. E.; MATTOS, A. A.; LIRA, L. G. C.; ZAMIN Jr., I.; PINHEIRO, J. O. P.; TOVO, C. V.; BOTH, C. T.; SOARES, J. A. S. & DITTRICH, S. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. *Brazilian Journal Infectious Diseases*, 8(5): 348-355, 2004.
37. FOCACCIA, R. (ed). *Tratado de hepatites virais e doenças associadas*. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.
38. FRANK, C.; MOHAMED, M. K.; STRICKLAND, G. T.; LAVANCHY, D.; ARTHUR, R. R.; MAGDER, L. S.; EL KHOBY, T.; ABDEL-WAHAB, Y.; ALY OHN, E. S.; ANWAR, W. & SALLAM, I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *The Lancet*, 355(9207): 887-891, 2000.
39. GE Healthcare Life Sciences. *Sample Collection Cards & Kits*. Disponível em: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-br/products/AlternativeProductStructure_21465/>. Acesso em: 9 de outubro de 2017.
40. GERLACH, J. T.; DIEPOLDER, H. M.; ZACHOVAL, R.; GRUENER, N. H.; JUNG, M. C.; ULSENHEIMER, A.; SCHRAUT, W. W.; SCHIRREN, C.A.; WAECHTLER, M.; BACKMUND, M. & PAPE, G. M. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*, 125(1): 80-88, 2003.
41. GREENMAN, J.; ROBERTS, T.; COHN, J.; MESSAC, L. Dried blood spot in the genotyping, quantification and storage of HCV RNA: a systematic literature review. *Journal of Viral Hepatitis*, 22(4): 353-361, 2014.
42. HOOFNAGLE, J. H.; DOO, E.; LIANG, T. J.; FLEISCHER, R. & LOK, A. S. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology*, 45(4): 1056-1075, 2007.
43. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). *Virus Taxonomy*. 2016 Release. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 19 de maio de 2017.
44. JARDI, R.; RODRIGUEZ-FRIAS, F.; BUTI, M.; SCHAPER, M.; VALDES, A.; MARTINEZ, M.; ESTEBAN, R. & GUARDIA, J. Usefulness of dried blood samples for quantification and molecular characterization of HBV-DNA. *Hepatology*, 40(1): 133-139, 2004.

45. JEFFRIES, M. K. S.; KISS, A. J.; SMITH, A. W. & ORIS, J.T. A comparison of commercially available automated and manual extraction kits for the isolation of total RNA from small tissue samples. *BMC Biotechnology*, 14: 94, 2014.
46. KAPLAN, P. M.; GREENMAN, R. L.; GERIN, J. L.; PURCELL, R. H. & ROBINSON, W. S. DNA Polymerase Associated with Human Hepatitis B Antigen. *Journal of Virology*, 12(5): 995-1005, 1973.
47. KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. (ed.). *Fields Virology*. 6^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
48. KRUG, L. P.; LUNGE, V. R.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S.; CHEINQUER, H.; OZAKI, L. S. & BARROS, S. G. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 29(12): 1629-1632, 1996.
49. LAMPERTICO, P. ; AGARWAL, K. ; BERG, T. ; BUTI, M. ; JANSSEN, H. L. ; PAPTAEODORIDIS, G. ; ZOULIM, F. & TACKE, F. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 67(2): 370-398, 2017.
50. LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis*, 11(2): 97-107, 2004.
51. LAVANCHY, D. The global burden of hepatitis C. *Liver International*, 29: 74-81, 2009.
52. LIEN, J. M.; PETCU, D. J.; ALDRICH, C. E. & MASON, W. S. Initiation and Termination of Duck Hepatitis B Virus DNA Synthesis during Virus Maturation. *Journal of Virology*, 61(12): 3832-3840, 1987.
53. LINDENBACH, B. D.; EVANS, M. J.; SYDER, A. J.; WÖLK, B.; TELLINGHUISEN, T. L.; LIU, C. C.; MARUYAMA, T.; HYNES, R. O.; BURTON, D. R.; MCKEATING, J. A. & RICE, C. M. Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science*, 309(5734): 623-626, 2005.
54. LOHMANN, V.; KÖRNER, F.; KOCH, J.; HERIAN, U.; THEILMANN, L. & BARTENSCHLAGER, R. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science*, 285(5424): 110-113, 1999.
55. LOK, A. S. & MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 45(2): 507-539, 2007.
56. LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FOREMAN, K.; LIM, S.; SHIBUYA, K.; ABOYANS, V.; ABRAHAM, J.; ADAIR, T.; AGGARWAL, R.; AHN, S. Y.; ALMAZROA, M. A.; ALVARADO, M.; ANDERSON, H. R.; ANDERSON, L. M.; ANDREWS, K. G.; ATKINSON, C.; BADDOUR, L. M.; BARKER-COLLO, S.; BARTELS, D. H.; BELL, M. L.; BENJAMIN, E. J.; BENNETT, D.; BHALLA, K.; BIKBOV, B.; ABDULHAK, A. B.; BIRBECK, G.; BLYTH, F.; BOLLIGER, I.; BOUFOUS, S. A.; BUCELLO, C.; BURCH, M.; BURNEY, P.; CARAPETIS, J.; CHEN, H.; CHOU, D.; CHUGH, S. S.; ENG, L. E. C.; COLAN, S. D.; COLQUHOUN, S.; COLSON, K. E.; CONDON, J.; CONNOR, M. D.; COOPER, L. T.; CORRIERE, M.; CORTINOVIS, M.; DE VACCARO, K. C.; COUSER, W.;

- COWIE, B. C.; CRIQUI, M. H.; CROSS, M.; DABHADKAR, K. C.; DAHODWALA, N.; DE LEO, D.; DEGENHARDT, L.; DELOSSANTOS, A.; DENENBERG, J.; DES JARLAIS, D. C.; DHARMARATNE, S. D.; DORSEY, E. R.; DRISCOLL, T.; DUBER, H.; EBEL, B.; ERWIN, P. J.; ESPINDOLA, P.; EZZATI, M.; FEIGIN, V.; FLAXMAN, A. D.; FOROUZANFAR, M. H.; FOWKES, F. G. R.; FRANKLIN, R.; FRANSEN, M.; FREEMAN, M. K.; GABRIEL, S. E.; GAKIDOU, E.; GASPARI, F.; GILLUM, R. F.; GONZALEZ-MEDINA, D.; HALASA, Y. A.; HARING, D.; HARRISON, J. E.; HAVMOELLER, R.; HAY, R. J.; HOEN, B.; HOTEZ, P. J.; HOY, D.; JACOBSEN, K. H.; JAMES, S. L.; JASRASARIA, R.; JAYARAMAN, S.; JOHNS, N.; KARTHIKEYAN, G.; KASSEBAUM, N.; KEREN, A.; KHOO, J-P.; KNOWLTON, L. M.; KOBUSINGYE, O.; KORANTENG, A.; KRISHNAMURTHI, R.; LIPNICK, M.; LIPSHULTZ, S. E.; OHNO, S. L.; MABWEIJANO, J.; MACINTYRE, M. F.; MALLINGER, L.; MARCH, L.; MARKS, G. B.; MARKS, R.; MATSUMORI, A.; MATZOPOULOS, R.; MAYOSI, B. M.; MCANULTY, J. H.; MCDERMOTT, M. M.; MCGRATH, J.; MEMISH, Z. A.; MENSAH, G. A.; MERRIMAN, T. R.; MICHAUD, C.; MILLER, M.; MILLER, T. R.; MOCK, C.; MOCUMBI, A. O.; MOKDAD, A. A.; MORAN, A.; MULHOLLAND, K.; NAIR, M. N.; NALDI, L.; NARAYAN, K. M. V.; NASSERI, K.; NORMAN, P.; O'DONNELL, M.; OMER, S. B.; ORTBLAD, K.; OSBORNE, R.; OZGEDIZ, D.; PAHARI, B.; PANDIAN, J. D.; RIVERO, A. P.; PADILLA, R. P.; PEREZ-RUIZ, F.; PERICO, N.; PHILLIPS, D.; PIERCE, K.; POPE III, C. A.; PORRINI, E.; POURMALEK, F.; RAJU, M.; RANGANATHAN, D.; REHM, J. T.; REIN, D. B.; REMUZZI, G.; RIVARA, F. P.; ROBERTS, T.; DE LEÓN, F. R.; ROSENFELD, L. C.; RUSHTON, L.; SACCO, R. L.; SALOMON, J. A.; SAMPSON, U.; SANMAN, E.; SCHWEBEL, D. C.; SEGUI-GOMEZ, M.; SHEPARD, D.S.; SINGH, D.; SINGLETON, J.; SLIWA, K.; SMITH, E.; STEER, A.; TAYLOR, J. A.; THOMAS, B.; TLEYJEH, I. M.; TOWBIN, J. R. A.; TRUELSEN, T.; UNDURRAGA, E. A.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; VIJAYAKUMAR, L.; VOS, T.; WAGNER, G. R.; WANG, M.; WANG, W.; WATT, K.; WEINSTOCK, M. A.; WEINTRAUB, R.; WILKINSON, J. D.; WOOLF, A. D.; WULF, S.; YEH, P-H.; YIP, P.; ZABETIAN, A.; ZHENG, Z-J.; LOPEZ, A. D. & MURRAY, C. J. L. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380:2095-2128, 2012.
57. LY, K. N.; XING, J.; KLEVENS, R. M.; JILES, R. B.; WARD, J. W. & HOLMBERG, S. D. The Increasing Burden of Mortality From Viral Hepatitis in the United States Between 1999 and 2007. *Annals of Internal Medicine*, 156(4): 74-81, 2012. apud WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Guidelines for the Screening Care and Treatment of Persons with Hepatitis C Infection*. Geneva: World Health Organization, 2014.
58. KANIA, D.; BEKAL, A. M.; NAGOT, N.; MONDAIN, A-M.; OTTOMANI, L.; MEDA, N.; TRAORÉ, M.; OUÉDRAOGO, J. B.; DUCOS, J.; VAN DE PERRE, P. & TUAILLON, E. Combining rapid diagnostic tests and dried blood spot assays for point-of-care testing of human immunodeficiency virus, hepatitis B and hepatitis C infections in Burkina Faso, West Africa. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(12): E533 - E541, 2013.

59. KEW, M. C. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26: 144-152, 2011.
60. MARQUES, B. L. C.; BRANDÃO, C. U.; SILVA, E. F.; MARQUES, V. A.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; DO Ó, K. M. R.; DE PAULA, M. T.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; LAMPE, E. & VILLAR, L. M. Dried blood spot samples: Optimization of commercial EIAs for hepatitis C antibody detection and stability under different storage conditions. *Journal of Medical Virology*, 84(10): 1600-1607, 2012.
61. MARQUES, B. L. C.; DO ESPÍRITO-SANTO, M. P.; MARQUES, V. A.; MIGUEL, J. C.; DA SILVA, E. F.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; LAMPE, E. & VILLAR, L. M. Evaluation of dried blood spot samples for hepatitis C virus detection and quantification. *Journal of Clinical Virology*, 82: 139-144, 2016.
62. MAST, E. E.; ALTER, M. J. & MARGOLIS, H. S. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine*, 17: 1730-1733, 1999.
63. MAST, E. E.; HWANG, L. Y.; SETO, D. S.; NOLTE, F. S.; NAINAN, O. V.; WURTZEL, H. & ALTER, M. J. Risk Factors for Perinatal Transmission of Hepatitis C Virus (HCV) and the Natural History of HCV Infection Acquired in Infancy. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(11):1880-1889, 2005.
64. MCLAUCHLAN, J.; LEMBERG, M. K.; HOPE, G. & MARTOGGIO, B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO Journal*, 21(15): 3980-3988, 2002.
65. MCMAHON, B. J. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 49(5): suppl., 2009.
66. MCMAHON, B. J.; ALWARD, W. L. M.; HALL, D. B.; HEYWARD, W. L.; BENDER, T. R.; FRANCIS, D. P. & MAYNAR, J. E. Acute Hepatitis B Virus infection: Relation of Age to the Clinical Expression of Disease and Subsequent Development of the Carrier State. *The Journal of Infectious Diseases*, 151(4): 599-603, 1985.
67. MOHAMED, S.; RAIMONDO, A.; PÉNARANDA, G.; CAMUS, C.; OUZAN, D.; RAVET, S.; BOURLIÈRE, M.; KHIRI, H.; DUKAN, P.; OLIVE, D. & HALFON, P. Dried Blood Spot Sampling for Hepatitis B Virus Serology and Molecular Testing. *PLOS ONE*, 8(4): E61077, 2013.
68. MOHD HANAFIAH, K.; GROEGER, J.; FLAXMAN, A. D. & WIERSMA, S. T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, 57(4): 1333-1342, 2013.
69. MURPHY, D. G.; SABLON, E.; CHAMBERLAND, J.; FOURNIER, E.; DANDAVINO, R. & TREMBLAY, C. L. Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3): 967-972, 2014.
70. MURPHY, D. G.; WILLEMS, B.; DESCHENES, M.; HILZENRAT, N.; MOUSSEAU, R. & SABBAH, S. Use of Sequence Analysis of the NS5B

- Region for Routine Genotyping of Hepatitis C Virus with Reference to C/E1 and 5' Untranslated Region Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4): 1102-1112, 2007.
71. MURPHY, S. C.; DAZA, G.; CHANG, M.; COOMBS, R. Laser cutting eliminates nucleic acid cross-contamination in dried-blood-spot processing. *Journal of Clinical Microbiology*, 50: 4128-30, 2012.
 72. NEWBOLD, J. E.; XIN, H.; TENCZA, M.; SHERMAN, G.; DEAN, J.; BOWDEN, S. & LOCARNINI, S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *Journal of Virology*, 69(6): 3350-3357, 1995.
 73. OTT, J. J.; STEVENS, G. A.; GROEGER, J. & WIERSMA, S. T. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine*, 30: 2212-2219, 2012.
 74. PAWLOTSKY, J. M. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. 36(5 Suppl 1): S65-S73, 2002.
 75. PILERI, P.; UEMATSU, Y.; CAMPAGNOLI, S.; GALLI, G.; FALUGI, F.; PETRACCA, R.; WEINER, A. J.; HOUGHTON, M.; ROSA, D.; GRANDI, G. & ABRIGNANI, S. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science*, 282(5390): 938-941, 1998.
 76. PLOSS, A.; EVANS, M. J.; GAYSINSKAYA, V. A.; PANIS, M.; YOU, H.; DE JONG, Y. P. & RICE, C. M. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, 457(7231): 882-886, 2009.
 77. RIO GRANDE DO SUL. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE (SES/RS). CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE & COORDENAÇÃO DA POLÍTICA DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA. Anexo 5 à *Nota Técnica Conjunta Nº 01/2013*. INSTITUTO DE PESQUISAS BIOLÓGICAS. LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA. SEÇÃO DE VIROLOGIA. *Normas para coleta, transporte, armazenamento e envio de amostras para Hepatite "C" biologia Molecular*. 2013.
 78. _____. COORDENAÇÃO ESTADUAL DE DST/AIDS & COORDENAÇÃO ESTADUAL DE ATENÇÃO BÁSICA. *Linha de Cuidado para Pessoas Vivendo com HIV/Aids (PVHA) e outras DST*. 2014.
 79. _____. DEPARTAMENTO DE AÇÕES EM SAÚDE. SEÇÃO ESTADUAL DE CONTROLE DAS DST/AIDS. *Boletim epidemiológico: HIV/Aids*. 2017.
 80. _____. INSTITUTO DE PESQUISAS BIOLÓGICAS. LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA. *Normas para coleta, transporte e armazenamento de amostras para Carga Viral da Hepatite B (HBV)*. [s.d.]
 81. ROSS, R. S.; STAMBOULI, O.; GRÜNER, N.; MARCUS, U.; CAI, W.; ZHANG, W.; ZIMMERMANN, R. & ROGGENDORF, M. Detection of infections with hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus by analyses of dried blood spots - performance characteristics of the ARCHITECT

- system and two commercial assays for nucleic acid amplification. *Virology Journal*, 10: 72, 2013.
82. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning*. 3^a ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
83. SANTA CATARINA. SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS). SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA (LACEN/SC). *Normas para coleta, transporte e armazenamento de amostras para carga viral da hepatite B (HBV)*. Disponível em: <http://lacen.saude.sc.gov.br/arquivos/COLETA_HBV.pdf>. Acesso em: 5 de setembro de 2015.
84. _____. *Normas para coleta, transporte e armazenamento de amostras para carga viral da hepatite C (HCV-quantitativo) e genotipagem do HCV*. Disponível em <http://lacen.saude.sc.gov.br/Norma_HCV.php>. Acesso em: 03 de agosto de 2015.
85. SANTOS, C.; REIS, A.; VILHENA, C.; SANTOS, D.; DAMAS, C.; SILVA, H.; VIANA, M.; FERRAZ, M.; CARNAUBA, D.; EL-FAR, F.; SERRA, F. & DIAZ, R. The use of real-time PCR to detect hepatitis C virus RNA in dried blood spots from Brazilian patients infected chronically. *Journal of Virological Methods*, 179 (1): 17-20, 2012.
86. SCARSELLI, E.; ANSUINI, H.; CERINO, R.; ROCCASECCA, R. M.; ACALI, S.; FILOCAMO, G.; TRABONI, C.; NICOSIA, A.; CORTESE, R. & VITELLI, A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal*, 21(19): 5017-5025, 2002.
87. SCHMID, D.; MACURA-BIEGUN, A. & RAUSCHER, M. Development and introduction of a ready-to-use pediatric pentavalent vaccine to meet and sustain the needs of developing countries – Quinvaxem[®]: The first 5 years. *Vaccine*, 30(44): 6241-6248, 2012.
88. SEEGER, C.; GANEM, D. & VARMUS, H. E. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*, 232(4749): 477-484, 1986.
89. SHARMA, H.; YADAV, S.; LALWANI, S.; KAPRE, S.; JADHAV, S.; PAREKH, S.; PALKAR, S.; RAVETKAR, S.; BAHL, S.; KUMAR, R. & SHEWALE, S. Antibody persistence of two pentavalent DTwP–HB–Hib vaccines to the age of 15–18 months, and response to the booster dose of quadrivalent DTwP–Hib vaccine. *Vaccine*, 31(3): 444-447, 2013.
90. SIMMONDS, P. Reconstructing the origins of human hepatitis viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1411): 1013-1026, 2001.
91. SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELÉAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON, P.; INCHAUSPÉ, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D. G.; OKAMOTO, H.; PAWLITSKY, J. M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN-I, T.; STUYVER, L. J.; THIEL, H. J.; VIAZOV, S.; WEINER, A. J. & WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of

- nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42(4): 962-973, 2005.
92. SNIJDEWIND, I. J. M.; VAN KAMPEN, J. J. A.; FRAAIJ, P. L. A.; VAN DER ENDE, M. E.; OSTERHAUS, A. D. M. E. & GRUTERS, R. A. Current and future applications of dried blood spots in viral disease management. *Antiviral Research*, 93: 309-321, 2012.
93. SOLMONE, M.; GIRARDI, E.; COSTA, F.; PUCILLO, L.; IPPOLITO, G. & CAPOBIANCHI, M. R. Simple and reliable method for detection and genotyping of Hepatitis C virus RNA in dried blood spots stored at room temperature. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9): 3512, 2002.
94. SOULIER, A.; POITEAU, L.; ROSA, I.; HÉZODE, C.; ROUDOT-THORAVAL, F.; PAWLOTSKY, J-M. & CHEVALIEZ, S. Dried Blood Spots: A Tool to Ensure Broad Access to Hepatitis C Screening, Diagnosis, and Treatment Monitoring. *Journal of Infectious Diseases*, 213(7): 1087-1095, 2015.
95. STANDRING, D. N.; RUTTER, W. J.; VARMUS, H. E. & GANEM, D. Transcription of the Hepatitis B Surface Antigen Gene in Cultured Murine Cells Initiates Within the Presurface Region. *Journal of Virology*, 50(2): 563-571, 1984.
96. STERLING, R. K.; LISSEN, E.; CLUMECK, N.; SOLA, R.; CORREA, M. C.; MONTANER, J.; S. SULKOWSKI, M.; TORRIANI, F. J.; DIETERICH, D. T.; THOMAS, D. L.; MESSINGER, D. & NELSON, M. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*, 43(6): 1317-1325, 2006.
97. SUNBUL, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World Journal of Gastroenterology*, 20(18): 5427-5434, 2014.
98. SZMUNESS, W. Recent Advances in the Study of the Epidemiology of Hepatitis B. *American Journal of Pathology*, 81: 629-650, 1975.
99. TERRAULT, N. A.; BZOWEJ, N. H.; CHANG, K-M.; HWANG, J. P.; JONAS, M. M. & MURAD, M. H. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology*, 63: 261-283, 2016.
100. THOMAS, D. L.; VILLANO, S. A.; RIESTER, K. A.; HERSHOW, R.; MOFFENSON, L. M.; LANDESMAN, S. H.; HOLLINGER, F. B.; DAVENNY, K.; RILEY, L.; DIAZ, C.; TANG, H. B. & QUINN, T. C. Perinatal Transmission of Hepatitis C Virus from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Mothers. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(6): 1480-1488, 1998.
101. THOMSON, E. C.; FLEMING, V. M.; MAIN, J.; KLENERMAN, P.; WEBER, J.; ELIAHOO, J.; SMITH, J.; MCCLURE, M. O. & KARAYIANNIS, P. Predicting spontaneous clearance of acute hepatitis C virus in a large cohort of HIV-1-infected men. *Gut*, 60(6): 837-845, 2011.
102. TUAILLON, E.; MONDAIN, A.; MEROUEH, F.; OTTOMANI, L.; PICOT, M.; NAGOT, N.; VAN DE PERRE, P. & DUCOS, J. Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing. *Hepatology*, 51(3): 752-758, 2010.
103. VEDIO, A. B.; ELLAM, H.; RAYNER, F.; STONE, B., KUDESIA, G.;

- MCKENDRICK, M. W. & GREEN, S. T. Hepatitis B: report of prevalence and access to healthcare among chinese residents in Sheffield UK. *Journal of Infection and Public Health*, 6(6): 448-55, 2013.
104. VILLAR, L. M.; DE OLIVEIRA, J. C.; CRUZ, H. M.; YOSHIDA, C. F. T.; LAMPE, E. & LEWIS-XIMENEZ, L. L. Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers. *Journal of Medical Virology*, 83(9): 1522-1529, 2011.
105. VINIKOOR, M. J.; ZÜRCHER, S.; MUSUKUMA, K.; KACHUWAIRE, O.; RAUCH, A., CHI, B. H., GORGIEVSKI, M.; ZWAHLEN, M. & WANDELER, G. Hepatitis B viral load in dried blood spots: A validation study in Zambia. *Journal of Clinical Virology*, 72: 20-24, 2015.
106. WOZNIAK, A.; GEOFFROY, E.; MIRANDA, C.; CASTILLO, C.; SANHUEZA, F. & GARCÍA, P. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction methods from clinical specimens for microbial diagnosis purposes, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(3): 268-269, 2016.
107. WATANABE, T.; SORENSEN, E. M.; NAITO, A.; SCHOTT, M.; KIM, S. & AHLQUIST, P. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24): 10205-10210, 2007.
108. WEINBAUM, C. M.; MAST, E. E. & WARD, J. W. Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 49: S35-S44, 2009.
109. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Blood donor selection: guidelines on assessing donor suitability for blood donation*. Geneva: World Health Organization; 2012.
110. _____. *Consolidated guidelines on HIV prevention, diagnosis, treatment and care for key populations*. Geneva: World Health Organization; 2014
111. _____. *Guidelines for the Prevention Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection*. Geneva: World Health Organization, 2015.
112. _____. *Guidelines for the Screening Care and Treatment of Persons with Hepatitis C Infection*. Geneva: World Health Organization, 2014
113. _____. *Hepatitis B*. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204_Jul2014/en/>. Acesso em: 12 de agosto de 2015.
114. _____. Hepatitis B vaccines. *Weekly Epidemiological Record*, 84(40): 405-420, 2009.
115. _____. *Hepatitis C*. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164_apr2014/en/>. Acesso em: 1 de agosto de 2015.

116. _____. *Prevention and treatment of HIV and other sexually transmitted infections for sex workers in low- and middle-income countries: recommendations for a public health approach*. Geneva: World Health Organization, 2012.
117. _____. *Universal access to safe blood transfusion*. Geneva: World Health Organization, 2008.
118. _____. *WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy*. Geneva: World Health Organization, 2010.
119. _____. *WHO guidelines on hand hygiene in health care*. Geneva: World Health Organization, 2009.
120. YI, M.; VILLANUEVA, R. A.; THOMAS, D. L.; WAKITA, T. & LEMON, S. M. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7): 2310-2315, 2006.
121. ZHONG, J.; GASTAMINZA, P.; CHENG, G.; KAPADIA, S.; KATO, T.; BURTON, D. R.; WIELAND, S. F.; UPRICHARD, S. L.; WAKITA, T. & CHISARI, F. V. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26): 9294-9299, 2005.