

Artigo de Pesquisa

**ANÁLISE DOS MARCADORES SOROLÓGICOS E MOLECULARES DA
HEPATITE B EM DOADORES DE SANGUE ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO
HEMOPA, PARÁ, BRASIL.**

Marcelo Pereira Mota¹; Núbia Caroline Costa de Almeida²; Caio Cesar Henriques
Mendes²; Francisco Rosivaldo de Souza³; Lucimar Di Paula dos Santos Madeira⁴; Igor
Brasil Costa⁵; Carlos Eduardo de Melo Amaral²; Maurício Koury Palmeira²; Renata
Bezerra Hermes².

¹Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará – FSCMP.

²Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará – HEMOPA.

³Faculdade Metropolitana da Amazônia – FAMAZ.

⁴Universidade Federal do Pará – UFPA.

⁵Instituto Evandro Chagas – IEC.

Running title: Análise da Hepatite B em doadores de sangue.

Instituição de execução do trabalho:

Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará – HEMOPA.

Correspondência:

Renata Bezerra Hermes

Travessa Padre Eutíquio, n° 2109. Gerência de Triagem de Doenças Transmissíveis
pelo Sangue, Fundação HEMOPA. CEP 66033-000. Belém-Pará-Brasil.

Telefone: +55 91 31106532

email: renata.hermes@hemopa.pa.gov.br

INTRODUÇÃO

A hepatite B é um problema de saúde global e estima-se que 257 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo *Vírus da hepatite B* (HBV) no mundo¹. Este vírus pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*. No Brasil, foram notificados 196.701 casos entre os anos de 1999 e 2015, e é considerada a hepatite de maior prevalência entre todas as hepatites virais. A maioria dos casos se concentra nas regiões Sudeste (35,5%) e Sul (31,4%), seguidas das regiões Norte (14,3%), Nordeste (9,4%) e Centro-Oeste (9,3%). Contudo ao se comparar a proporção dos casos nos últimos três anos, observa-se um aumento da proporção de casos na região Norte². Muitos esforços têm sido empregados para o controle e erradicação da doença mundialmente, e nas Américas ocorreu progresso na vacinação para o controle e erradicação desta infecção³. Este vírus pode ser transmitido parenteralmente por diferentes mecanismos, incluindo exposição a fluidos biológicos através de acidente ocupacional⁴, compartilhamento de agulhas e seringas⁵, via transfusional⁶, assim como através de transplante de órgãos⁷, por contato sexual⁸ e transmissão vertical⁹. Evidências demonstraram que a transmissão do HBV pode ocorrer durante o período de janela imunológica, quando o HBsAg está ausente e o DNA viral está presente na circulação de indivíduos infectados^{10,11}.

O vírus da hepatite B possui três antígenos, Antígeno de Superfície (HBsAg), Antígeno *e* (HBeAg) e antígeno central (HBcAg) e, portanto, após a infecção, 3 anticorpos são produzidos pelo sistema imunológico: anti-HBs, anti-HBe e anti-HBc, respectivamente. Estes marcadores sorológicos, juntamente com a carga viral, são particularmente importantes no diagnóstico, assim como no seguimento da infecção viral, na avaliação do estado clínico do paciente e no monitoramento do tratamento específico^{12,13,14}.

O primeiro marcador a ser detectado no soro dos indivíduos infectados é o DNA, após alguns dias o antígeno HBsAg encontra-se presente no soro dos indivíduos. Poucos dias após o surgimento do HBsAg, formam-se os anticorpos Anti-HBc, do quais os de classe IgG permanecerão detectáveis indefinidamente^{15,16}. No caso de infecção aguda, o HBsAg desaparece em até 180 dias, quando dá lugar ao surgimento do Anti-HBs, marcador de cura e resolução da infecção^{17,18}. A persistência do marcador HBsAg por mais de 6 meses caracteriza a cronificação da infecção, a qual não apresenta cura até o momento¹⁹. O HBeAg é indicativo de replicação viral ativa e a presença do

marcador anti-HBe indica o fim do processo replicativo e portanto a inatividade viral^{20,21}.

Desde 1978, com a introdução da detecção do HBsAg na triagem laboratorial de doadores de sangue, o risco de transmissão de HBV por transfusão diminuiu significativamente graças ao desenvolvimento de testes HBsAg cada vez mais sensíveis, à adoção em alguns países da detecção de anticorpos anti-HBc e DNA do HBV através da triagem com teste de ácido nucléico (NAT – *Nucleic acid test*), bem como à triagem epidemiológica e melhoria da seleção de doadores voluntários²². Ainda assim, o risco de transmissão do HBV continua a ser maior que o *Vírus da hepatite C* (HCV) e o *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV), tanto antes quanto após triagem com ácido nucleico^{23,24}.

O teste NAT foi a última metodologia a ser implantada na triagem de HBV nos bancos de sangue, e contribuiu significativamente para a diminuição do risco de transmissão desta infecção por transfusão, devido permitir a detecção do HBV ainda na fase de janela imunológica, antes do aparecimento de anticorpos²⁵. No Brasil, atualmente é obrigatória a detecção dos marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc, assim como a detecção do DNA do HBV através do teste NAT na triagem laboratorial de todos os doadores de sangue²⁶.

A inclusão de diferentes marcadores, através de testes sorológicos e moleculares de alta sensibilidade, é de extrema importância para o aumento da segurança transfusional, contudo a realização de diversos testes na triagem laboratorial, naturalmente contribui para uma considerável taxa de descartes de hemocomponentes que não apresentam infecção, devido a reações cruzadas que ocorrem em testes de triagem²⁷. A implementação do teste NAT recentemente vem contribuindo para o esclarecimento desses casos, uma vez que é analisado em conjunto com os parâmetros sorológicos.

A região amazônica brasileira apresenta uma alta endemicidade à infecção pelo HBV²⁸ e este fato tem levado a um alto índice de descarte de hemocomponentes nos hemocentros da região^{29,30}. No Brasil, a taxa de descarte de bolsas de sangue para todos os agravos é de 3,5% e para a hepatite B é 3%, sendo o marcador anti-HBc o principal responsável por esta taxa³¹. Desta forma, é de extrema importância a avaliação concomitante dos diferentes marcadores, sorológicos e moleculares, a fim de que se possa esclarecer o real significado clínico desta elevada inaptidão nos bancos de sangue.

Assim, o presente estudo tem como objetivo analisar os marcadores sorológicos e moleculares da hepatite B em doadores de sangue inaptos atendidos em um Hemocentro da rede pública do estado do Pará, Brasil, determinando a prevalência da doença nos doadores de sangue inaptos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em conformidade com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde Brasileiro e com os padrões éticos da Declaração de Helsinque. Antes da sua realização o projeto foi autorizado pela Fundação HEMOPA e foi submetido para apreciação ética e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. Os indivíduos selecionados para a pesquisa foram informados sobre os objetivos da pesquisa e deram seu consentimento através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A população do presente estudo foi composta por demanda espontânea de doadores de sangue, atendidos no Hemocentro da rede pública do estado Pará (Fundação HEMOPA), com resultados reagentes na triagem sorológica para Hepatite B (HBsAg e/ou anti-HBc e/ou NAT-HBV). Conforme protocolo interno da Fundação HEMOPA, os doadores inaptos na triagem sorológica são convocados à retornar ao Hemocentro para coleta de segunda amostra a fim de confirmar a reatividade inicial observada. No momento do retorno, os indivíduos foram informados sobre os objetivos do presente estudo e convidados a participar, o aceite foi formalizado através da assinatura do TCLE.

O recrutamento dos doadores foi realizado no período de fevereiro de 2015 a junho de 2016 e neste período 272 doadores foram incluídos neste estudo.

ANÁLISE SOROLÓGICA E MOLECULAR

As amostras de soro foram submetidas a testes sorológicos através de imunoenaios quimioluminescentes para detecção do antígeno de superfície HBsAg (*Architect HbsAg Qualitative II, Abbott*), detecção de anticorpos totais anti-HBc (*Architect Anti-HBc II, Abbott*) e detecção de anticorpos totais Anti-HBs (*Architect Anti-HBs Quantitative, Abbott*). Todos os testes foram realizados na plataforma automatizada quimioluminescente *Architect® i2000*, no laboratório de Triagem de Doenças Transmissíveis pelo Sangue da Fundação HEMOPA, seguindo as recomendações do fabricante (*Abbott® Diagnostics, Illinois, USA*) a fim de confirmar a reatividade inicial detectada na triagem sorológica no ato da doação.

Para os testes de detecção de HBsAg e anti-HBc os resultados são emitidos em unidade relativa de luz (URL) e o *cut-off* (CO) do teste é 1,0. São consideradas não reagentes amostras com valor URL/CO menor que 0,8; as amostras com valores entre

0,8 e 1,2 são consideradas inconclusivas e aquelas com valor URL/CO maior que 1,2 são consideradas reagentes. O teste anti-HBs é quantitativo e o resultado é emitido em mIU/mL, sendo considerada não reagente as amostras com quantificação inferior a 8 mIU/mL; amostras com valores entre 8 e 12 mIU/mL são consideradas inconclusivas e as que apresentam resultado maior que 12 mIU/mL são consideradas reagentes.

Para detecção do DNA do HBV, as amostras de plasma dos doadores participantes do estudo foram submetidas ao teste NAT HIV/HCV/HBV BioManguinhos, baseado da metodologia de PCR em Tempo Real, utilizados na triagem molecular de doadores de sangue, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (*Bio-Manguinhos / Fiocruz, Brasil*).

ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados sorológicos e moleculares obtidos foram inseridos em um banco de dados no programa *Microsoft Excel* para posterior análise descritiva.

A análise dos resultados dos diferentes marcadores sorológicos da infecção pelo HBV foi realizada buscando associação com o marcador molecular. Doadores com DNA do VHB detectável foram considerados com infecção em curso. A presença concomitante dos marcadores anti-HBc e anti-HBs foi definido como infecção passada. Os resultados sorológicos mantidos como inconclusivos no retorno foram classificados como reação cruzada; e a presença isolada dos marcadores HBsAg e Anti-HBc foram interpretados de acordo com o valor de URL/CO.

RESULTADOS

No período de realização do estudo compareceram ao Hemocentro Coordenador da Fundação HEMOPA, localizado na capital do estado do Pará, 93.891 doadores de sangue e, deste total, 1.086 (1,15%) apresentaram pelo menos um marcador para a hepatite B reagente na triagem laboratorial. Destes, foram incluídos no presente estudo 272 doadores que retornaram ao hemocentro para coleta de segunda amostra a fim de confirmar a inaptidão sorológica, e aceitaram participar da pesquisa.

Foi observado que 10,6% (n=29) mostraram-se não reagentes nos testes realizados no retorno para confirmação do resultado inicial e ainda 2,2% (n=6) apresentaram reatividade para o marcador anti-HBs isoladamente, indicando imunidade vacinal. Os doadores que mantiveram resultados reagentes na segunda amostra foram classificados em diferentes interpretações, considerando os resultados dos diferentes marcadores laboratoriais da infecção, conforme apresentado na tabela I.

Foi possível observar que, do total de doadores inaptos para hepatite B que retornaram para repetição dos testes, 176 (64,71%) apresentaram infecção pelo vírus da hepatite B, sendo 165 classificados como infecção passada, devido a presença concomitante dos marcadores anti-HBc e anti-HBs; e 11 classificados como infecção ativa devido presença do DNA do HBV, marcador molecular da infecção. A análise dos marcadores sorológicos nos indivíduos classificados como infecção ativa revelou 1 caso de infecção oculta, devido presença do marcador anti-HBc e ausência do marcador HBsAg, e 1 caso de infecção em fase de janela imunológica devido ausência dos marcadores sorológicos. Vale ressaltar que ambos os resultados foram confirmados tanto na amostra de doação como amostra de retorno.

O doador que se encontrava no período de janela imunológica tratava-se de um doador co-infectado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), e que no momento do retorno, 08 dias após a primeira amostra, não apresentou soroconversão para os marcadores HBsAg e anti-HBc, contudo soroconverteu para o marcador anti-HBs, o qual apresentava resultado não reagente no momento da doação. Novas amostras deste doador foram coletadas 16 dias e 31 dias após a doação, as quais mantinham o resultado de NAT detectável, com ausência dos marcadores HBsAg e anti-HBc, contudo o marcador anti-HBs apresentava aumento significativo entre as diferentes amostras.

Tabela I - Diferentes categorias de interpretação dos resultados dos marcadores de hepatite B em doadores de sangue inaptos.

Interpretação	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs	DNA	n	%
Infecção em curso	(+)	(+)	(-)	(+)	09	3,30
Janela imunológica	(-)	(-)	(+)	(+)	01	0,36
Infecção oculta	(-)	(+)	(-)	(+)	01	0,36
Infecção passada	(-)	(+)	(+)	(-)	165	60,6
Falso-positivos	(+)*	(-)	(-)	(-)	02	0,73
	(+)*	(-)	(+)	(-)	01	0,36
	(i)	(-)	(-)	(-)	07	2,57
	(i)	(-)	(+)	(-)	03	1,10
	(-)	(i)	(i)	(-)	02	0,73
	(-)	(i)	(-)	(-)	16	5,88
	(-)	(i)	(+)	(-)	12	4,41
	(-)	(+)**	(-)	(-)	11	4,04
Anti-HBc isolado	(-)	(+)	(i)	(-)	02	0,73
	(-)	(+)	(-)	(-)	05	1,83
Soronegativos	(-)	(-)	(+)	(-)	06	2,20
	(-)	(-)	(-)	(-)	29	10,6
Total					272	100

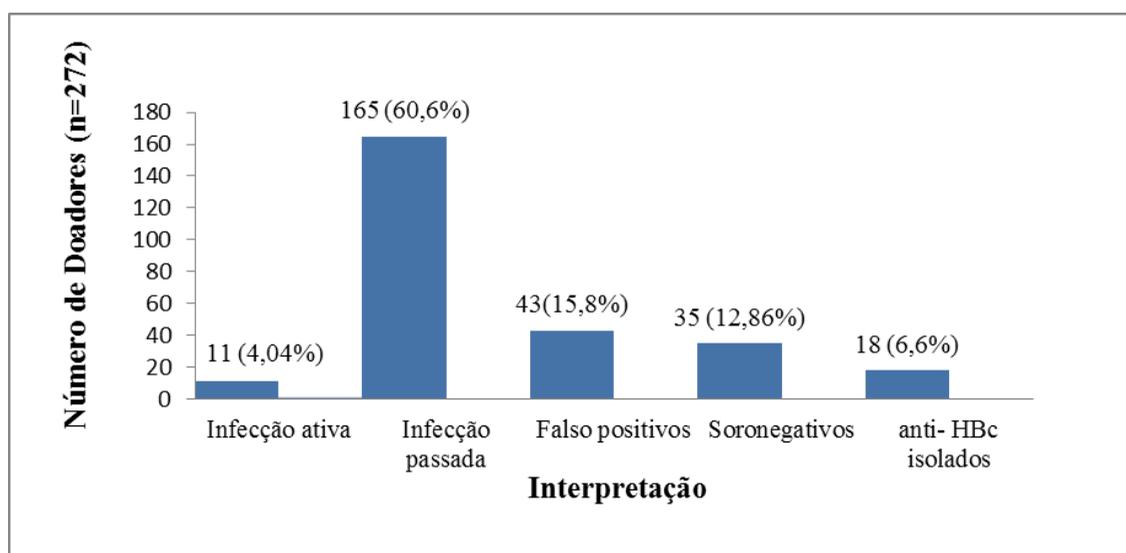
Legenda: n= número de indivíduos; (+) = Reagente; (-) = Não Reagente; (i) = inconclusivo; *URL/CO<10; ** URL/CO <4

O perfil de marcadores sorológicos de 43 (15,8%) doadores foram classificados como falso positivos. A maioria dos casos (n=16) representada por indivíduos que apresentaram anti-HBc inconclusivo na ausência de anti-HBs, seguido de indivíduos (n=12) que embora tenham apresentado anti-HBc inconclusivo apresentaram anti-HBs reagente, o que possivelmente se deve a imunidade vacinal, uma vez que em caso de imunidade por contato ao HBV o valor de URL/CO do teste anti-HBc já apresentaria valores reagentes. Neste contexto, foram classificados como Anti-HBc isolados 18 indivíduos, dos quais 11 apresentaram reatividade fraca para o anti-HBs com valores de URL/CO < 4, 5 valores reagentes e 2 com valores reagentes mas anti-HBs indeterminado.

Foram encontrados ainda 7 indivíduos com a presença do marcador anti-HBc em valores elevados (URL/CO >4,0), na ausência de reatividade para o marcador anti-HBs; os quais foram considerados como indeterminado. Vale ressaltar que estes indivíduos apresentaram este perfil tanto na amostra da doação, quanto na amostra do retorno, coletada em um intervalo mínimo de 15 dias.

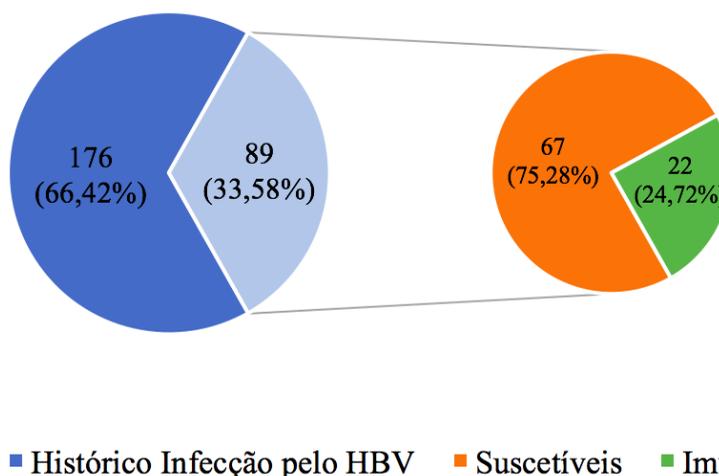
As diferentes interpretações da inaptidão apresentada, de acordo com o perfil de marcadores analisados nos participantes do presente estudo estão apresentadas na Figura I.

Figura I – Interpretação da inaptidão apresentada, de acordo com perfil sorológico e molecular para a hepatite B.



No presente estudo foi observado que dos 265 doadores que apresentaram conclusão sorológica definida, um total de 176 indivíduos (66,42%) apresentam histórico de infecção pelo HBV, seja infecção ativa ou passada. Por outro lado, 89 indivíduos (33,58%) não apresentaram evidência de infecção pelo HBV. A análise do marcador anti-HBs dos 89 indivíduos com ausência de infecção pelo HBV, revelou que apenas 22 doadores (24,72%) estavam imunes por vacinação, devido presença do marcador anti-HBs, e, portanto 75,28% dos doadores sem histórico de infecção HBV estão suscetíveis à infecção (Figura II).

Figura II – Interpretação da inaptidão apresentada, de acordo com perfil sorológico e molecular para a hepatite B



A grande maioria (70,59%) dos doadores inaptos participantes do presente estudo apresentou reatividade para o marcador anti-HBc no momento do retorno, em associação ou não com outros marcadores; contudo o DNA do HBV foi detectado em apenas 10 dos indivíduos com anti-HBc reagente, os quais todos apresentaram URL/CO de anti-HBc com valor $\geq 5,44$. O marcador HBsAg, por sua vez, apresentou reatividade em apenas 12 indivíduos. A análise do valor URL/CO dos indivíduos que apresentaram HBsAg reagente estão apresentados na Tabela 2, onde é possível observar que em todas as amostras que o DNA apresenta resultado detectável, o valor de HBsAg apresenta URL/CO elevado, com valor $\geq 14,0$ (Tabela II).

É interessante ressaltar que o indivíduo que apresentou HBsAg com valor URL/CO 14,0, apresentou evidências laboratoriais compatíveis com as fases de infecção aguda recente, no momento da doação, e de resolução da infecção no momento do retorno, uma vez que foi observado diminuição significativa do valor de URL/CO HBsAg do momento da doação para a segunda amostra analisada no presente estudo, o qual compreendeu um intervalo de 40 dias; e além disso no momento da doação ainda não apresentava marcador anti-HBc reagente, o qual soroconverteu no momento do retorno (Tabela III) , indicando uma provável soroconversão recente, o que justifica o menor valor de anti-HBc encontrado nos indivíduos com DNA detectável.

Tabela II - Resultados laboratoriais dos indivíduos reagentes para o marcador HBsAg.

HBsAg (URL/CO)	Anti-HBc (URL/CO)	DNA	Anti-HBs	Interpretação
3747,0	11,05	D	NR	Infecção em curso
4299,0	11,24	D	NR	Infecção em curso
2119,0	10,11	D	NR	Infecção em curso
1487,0	10,36	D	NR	Infecção em curso
3191,0	10,05	D	NR	Infecção em curso
2678,0	8,87	D	NR	Infecção em curso
3042,0	10,1	D	NR	Infecção em curso
4397,2	11,05	D	NR	Infecção em curso
14,0	5,44	D	R	Infecção em resolução
7,0	NR	I	NR	Falso positivo
3,05	NR	I	NR	Falso positivo
1,57	NR	I	R	Falso positivo

Legenda: D= Detectável; I= Indetectável; NR= Não reagente; R=Reagente.

Tabela III - Resultados laboratoriais do indivíduo com valor de URL/CO de HBsAg de RLU/CO 14,0 no retorno.

Doação				Retorno			
HBsAg (URL/CO)	Anti-HBc (URL/CO)	Anti-HBs	NAT	HBsAg (URL/CO)	Anti-HBc (URL/CO)	Anti-HBs	NAT
105	NR	NR	D	14,0	5,44	R	D

Legenda: NR= Não reagente; D= Detectável.

DISCUSSÃO

Os recentes avanços no uso dos marcadores virais para a hepatite B na triagem dos doadores de sangue tem diminuído a possibilidade de infecção durante a transfusão nos bancos de sangue. Nosso estudo procurou analisar os marcadores sorológicos e moleculares da hepatite B em doadores de sangue inaptos atendidos em um Hemocentro da rede pública do estado do Pará, Brasil, determinando a prevalência desta doença neste grupo populacional.

A região Norte do Brasil é considerada uma área de alta endemicidade para a hepatite B, o que tem levado a um elevado índice de descarte de bolsas de sangue nos testes de triagem sorológica. No presente trabalho, 1,15% do total de doadores que compareceram ao Hemocentro apresentaram algum marcador reagente para a hepatite B, representando um descarte de 1.086 bolsas de sangue, semelhantemente a outros estudos realizados em Maringá, Paraná, obteve-se uma taxa de 1,87% de inaptidão para este agente ³², Joinville com 1,18% ³³ e no Amazonas 1,67% ³⁴. Em países africanos as taxas são mais elevadas, com 4,8% na Etiópia, 18,6% na Nigéria, 2,68% no Paquistão ^{35,36,37}.

Apresentamos no presente estudo diferentes categorias de interpretações dos resultados dos marcadores para hepatite B em doadores de sangue inaptos para esta infecção viral. Como se pode observar, 11 doadores apresentavam a infecção ativa, com possibilidade de transmissão ao receptor, caso fosse transfundida, pois apresentavam o DNA do HBV detectável. Destes, nove doadores apresentavam a conclusão sorológica clássica, com resultados reagentes para o HBsAg, anti-HBc com DNA detectável no teste NAT. Entretanto, 1 caso foi classificado como hepatite B oculta, devido ausência de reatividade do marcador sorológico HBsAg, reatividade para o marcador anti-HBc e detecção do DNA no teste NAT, apresentando prevalência de 0,36% de todos os doadores considerados inaptos para hepatite B.

Os casos de hepatite B oculta são bem descritos na literatura e se constituem em uma grande ameaça global. A prevalência deste perfil de infecção e é variável nas diferentes localidades do mundo. Em um estudo realizado na Malásia com 1000 amostras HBsAg negativas, encontrou-se uma prevalência de 5,5% de hepatite B oculta em doadores com anti-HBc positivos³⁸. Makvand, 2016, em sua revisão sobre atualização da infecção oculta pelo HBV, relata que a prevalência em doadores de sangue varia bastante em todo o mundo, dependendo da endemicidade da região, da

sensibilidade dos ensaios de detecção do DNA do HBV, do encontro do DNA do HBV no tecido hepático e o uso da PCR em Tempo Real. Na Coreia do Sul relatou-se 0,016% de prevalência, Índia (0,15%), Turquia (0%), Egito (22,7%)^{39,40}. Em um estudo realizado no Amazonas, a prevalência desta infecção esteve entre 2 a 7%, dependendo da localidade⁴¹.

Foi observado no presente estudo um caso de infecção detectada na fase de janela imunológica, com DNA do HBV detectável no teste NAT e nenhum outro marcador reagente, representando um rendimento do teste NAT de 1:93.891 no estado do Pará. Em um estudo realizado no estado de Minas Gerais encontrou rendimento semelhante, de 1:125.000⁴²; e em uma análise de mais de 10 milhões de doações realizadas na África do Sul, Egito, Mediterrâneo, Europa do Norte e Central, Sudeste Asiático e Oceania, o rendimento do teste NAT variou de 1:7700 a 1:294.000⁴³. Desde a introdução do teste NAT para o HBV como obrigatório no Brasil, a partir de 2015 na rede pública e da obrigatoriedade de realização em todos os hemocentros do país, de acordo com a Portaria 158/2016, o risco de transmissão de hepatite B por transfusão sanguínea no período de janela imunológica diminuiu consideravelmente. As taxas de detecção da infecção na fase de janela imunológica são variadas de acordo com a epidemiologia local; e os resultados encontrados em nosso estudo demonstram a importância da introdução no teste no Brasil, onde o rendimento é bastante elevado quando comparado aos países desenvolvidos por exemplo.

O perfil diferenciado observado no doador que se apresentava em fase de janela imunológica, é semelhante ao descrito em outro estudo por Levi e colaboradores⁴⁴, onde não foi observado soroconversão para os marcadores HBsAg e anti-HBc e o doador apresentou soroconversão para anti-HBs após vacinação relatada. No presente estudo, a soroconversão detectada para o marcador anti-HBs sugere que o doador tenha sido vacinado, embora o mesmo tenha relatado não saber esta informação e sugere-se então que a infecção em questão tenha ocorrido com uma cepa mutante para o qual a vacina não confere proteção^{45,46}. Ademais, a ausência de soroconversão para os marcadores HBsAg e anti-HBc pode ser justificado pela data de coleta da última amostra, que possivelmente ainda se encontra na fase de janela imunológica, de cerca de 59 dias para o marcador HBsAg; contudo deve ser considerado ainda a co-infecção com o vírus HIV, que pode interferir diretamente na soroconversão tardia para os marcadores sorológicos.

A grande maioria dos doadores inaptos para hepatite B incluídos no presente estudo apresentou reatividade para o marcador anti-HBc, sendo este considerado o principal marcador associado ao descarte de hemocomponentes. Isto é corroborado por demais estudos em todo o mundo^{47, 48,49} e a presença do anti-HBc é a segunda linha de investigação para casos de hepatite B oculta, com DNA do HBV detectável e sem HBsAg⁵⁰. O marcador anti-HBc não é utilizado em todos os países como marcador obrigatório na triagem sorológica, como na Itália, considerada um país de baixa endemicidade para o vírus^{51,52}. No Brasil o uso deste marcador é obrigatório de acordo com a Portaria 158/2016 e é necessário, considerando que nosso país possui alta endemicidade para esta infecção.

Dentre os doadores que apresentaram o marcador anti-HBc reagente, 32 apresentaram este de forma isolada, sem associação com os demais marcadores analisados. Pondé e colaboradores sugerem diferentes mecanismos para isto ocorrer, como: Infecção crônica com baixa carga viral e HBsAg indetectável, infecção por mutantes no gene S, co-infecção com outras hepatovirose, formação de imunocomplexos HBsAg-anti-HBs, baixos níveis de anti-HBs, apesar da imunidade ao HBV e falsa-positividade⁵³. Quando este perfil sorológico de anti-HBc isolado é encontrado, também é necessário excluir a falsa-positividade avaliando o anticorpo anti-HBe, que caso positivo pode sugerir contato prévio e cura com títulos indetectáveis de anti-HBs⁵⁴. Vinte e oito destes doadores apresentaram este marcador inconclusivo ou reagente com valor baixo tanto na doação como no retorno, o que sugere resultado falso-positivo devido à reação cruzada, não sendo resultantes de soroconversão em curso. Contudo 7 dos doadores analisados apresentaram valor de anti-HBc elevado, não sendo possível concluir o significado da presença deste marcador nos doadores. Em dois casos, o marcador anti-HBs apresentou resultado reagente, sendo possível se tratar de uma resolução e infecção em curso em fase de soroconversão do marcador anti-HBs.

Muitos resultados falso-positivos para o anti-HBc nos testes de triagem sorológica relacionam-se a baixos títulos de anticorpos, acarretando em um grande problema nos hemocentros, uma vez que todas as bolsas são descartadas. Não existe na atualidade um teste confirmatório para este marcador laboratorial. Uma medida alternativa a ser proposta, poderia ser a utilização de metodologia diferente da utilizada no teste de triagem, ou ainda um teste de outro fabricante. Desta forma, hemocomponentes de doadores com anti-HBc reagentes ou inconclusivos com resultado

de outro teste laboratorial não reagente para anti-HBc poderiam ser utilizados, uma vez que a não confirmação por outro método evidenciaria falso-positivos devido inespecificidade do primeiro teste utilizado. Esta proposta reduziria o descarte de hemocomponentes, o que no presente estudo representaria o aproveitamento de pelo menos 12,87% dos hemocomponentes descartados, uma vez que 35 doadores apresentaram resultado não reagente na segunda amostra coletada.

A maioria dos casos de resultados falso-positivos observados no presente estudo se deve ao marcador anti-HBc inconclusivo ou com valor de URL/CO baixo, o qual neste estudo os valores abaixo que 4,0 foram considerados reações inespecíficas, uma vez que em um dos doadores inaptos, representado na tabela III, demonstrou soroconversão recente com valor de URL/CO de 5,44. Possivelmente, em uma coleta posterior o valor de URL/CO da amostra em questão seria ainda maior. Foi observado que todos os indivíduos com NAT detectável apresentavam valor de URL/CO para o anti-HBc $\geq 5,44$. Em um estudo realizado no México, os autores realizaram duas estratificações, com valores de anti-HBc maiores e menores que 4,0 URL/CO em comparação à detecção do DNA do HBV, em que 88,9% dos doadores NAT detectáveis estiveram no grupo $>4,0$ URL/CO e 11,1% em valores entre 1,0 e 4,0 URL/CO⁵⁵.

Os resultados observados neste estudo sugerem que os valores de anti-HBc baixos, próximos ao *cut-off*, ainda que reagentes sejam reações inespecíficas, tal como já demonstrado para detecção do anticorpo anti-HCV na infecção pelo vírus da hepatite C⁵⁶ e demonstra a necessidade de estudos que determinem a partir de que valor de URL/CO há elevado valor preditivo positivo, uma vez que este valor poderá orientar a interpretação do significado clínico deste marcador laboratorial frequentemente reagente em indivíduos saudáveis. Vale ressaltar que dos 165 indivíduos classificados como infecção passada, 53 apresentaram anti-HBc com URL/CO menor que 4,0, sendo assim há ainda a possibilidade destes se tratarem de doadores vacinados com reação cruzada para o marcador anti-HBc, reforçando ainda mais a necessidade da determinação do valor de URL/CO do anti-HBc com elevado valor preditivo positivo, tal como existente para o anti-HCV^{57,58}.

Com relação ao marcador HBsAg, doze indivíduos mostram-se reagentes e destes, três foram classificados como Reação Cruzada (Tabela II), devido ao valor baixo de URL/CO, menor que 10,0. A análise do valor de URL/CO é importante e possui bom valor preditivo para a avaliação da infecção pelo vírus da hepatite B⁵⁹. No presente

estudo, todos os doadores que apresentaram o marcador HBsAg na ausência dos demais marcadores, não apresentaram evidência de infecção pelo vírus, sendo classificado como reação cruzada, o que levanta uma reflexão a respeito da necessidade do teste HBsAg na triagem de doadores após a introdução do teste NAT. Alguns pesquisadores defendem que o teste NAT HBV pode substituir com vantagens o teste HBsAg na triagem laboratorial de doadores de sangue ⁶⁰. Contudo, para Pandei e colaboradores, o HBsAg é considerado necessário na triagem sorológica uma vez que em seu estudo observou casos de doadores de sangue portadores crônicos que apresentaram HBsAg reagentes e NAT indetectáveis, mas com HBeAg reagentes ⁶¹. Os casos de portadores crônicos observados no estudo de Pandei podem ser detectados através do teste anti-HBc, contudo, considerando a grande variabilidade genética do HBV, é possível que ocorra casos de doadores com infecção aguda com níveis indetectáveis de anti-HBc, cujo teste NAT seja indetectável devido mutações em sítios de ligação de primer ou sonda, por exemplo, e que, portanto seriam detectados somente pelo marcador HBsAg.

Embora todos os casos de infecção pelo HBV neste estudo permaneceriam detectados na ausência da realização do teste HBsAg, a manutenção dos testes HBsAg e anti-HBc, além do teste NAT, é necessária na triagem laboratorial de doadores, principalmente em regiões de alta endemicidade.

Quando consideramos somente os indivíduos com conclusão definida a partir do perfil de marcadores sorológicos e moleculares, observamos que a maioria dos doadores de sangue inaptos para hepatite B apresentou histórico de infecção pelo vírus; contudo cerca de 1/3 dos doadores com conclusão definida não apresentam histórico de infecção pelo HBV. A análise do marcador anti-HBs destes revelou que 75,28% dos doadores de sangue sem histórico de infecção pelo HBV estão suscetíveis à infecção, ainda que uma vacina esteja disponível para a população. Em um estudo recente com doadores de sangue no Irã, 84,8% dos doadores estavam suscetíveis à infecção ⁶² e estes resultados reforçam a necessidade de instituição de políticas públicas a fim de ampliar a cobertura vacinal para a população em geral, haja vista que durante muitos anos esta vacina esteve restrita a determinados grupos populacionais, como profissionais da saúde, por exemplo ⁶³.

Após a análise dos marcadores de hepatite B no presente trabalho, concluímos que existe uma elevada taxa de descarte de bolsas devido à inaptidão laboratorial para os marcadores desta infecção, e embora 64,70% dos casos se devam à infecção pelo

vírus, um grande percentual de doadores inaptos se deve a resultados falso-positivos, especialmente para o marcador anti-HBc. Apesar do uso de métodos de elevada sensibilidade, atualmente é de extrema importância o uso de testes mais específicos na triagem de bancos de sangue, no sentido de evitar o descarte de bolsas desnecessárias e evitar o “stress” do doador por um eventual resultado reagente nos testes de triagem, quando recebe um resultado reagente na doação. A implementação do teste de ácido nucléico NAT na triagem dos bancos de sangue tem contribuído significativamente para o aumento da segurança transfusional, através da detecção de infecções em fases iniciais na fase de janela imunológica, bem como possíveis casos de hepatite B oculta. A realização do exame anti-HBs no momento do retorno do doador inapto, conjuntamente aos outros marcadores sorológicos e moleculares de triagem, contribui para o entendimento do significado da inaptidão observada nos doadores de sangue.

Por fim, a Hepatite B, embora seja uma doença prevenível por vacina e curável, se apresenta de forma frequente na população de doadores de sangue, a qual no presente estudo apresentou elevado percentual de doadores ainda suscetíveis, o que chama a atenção para a cobertura vacinal e necessidade de instituição políticas de prevenção e conscientização na população.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro e à Fundação HEMOPA e seus colaboradores pelo apoio na execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Hepatitis B fact sheet. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en>
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais. 2016 a e b.
3. Ropero Álvarez AM, Pérez-Vilar S, Pacis-Tirso C, et al. Progress in vaccination towards hepatitis B control and elimination in the Region of the Americas . BMC Public Health . 2017; 17: 325.
4. Tomohiro I, Wada K, Smith D. A consensus for occupational health management of healthcare workers infected with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and / or hepatitis C vírus. J Occup Health 2017; 59: 304-308.
5. Goniewicz M, Włoszczak A, Niemcewicz M, et al. Injuries caused by sharp instruments among healthcare workers – international and Polish perspectives. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 2012, Vol 19, N° 3, 523-527
6. Namululi B.A, Guerrieri C, Dramaix M.W. Prévalence et incidence du VIH et de l'hépatite B chez les donneurs de sang et estimation du risque résiduel de transmission du virus VIH et du virus VHB par la transfusion sanguine. Une étude a l'hôpital provincial général de référence de Bukavu, République démocratique du Congo. Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique 61 (2013) 139–144.
7. Martin CW, Frankie WT, Kin H. Hepatitis B infection acquired after haematopoietic stem cell transplant through horizontal mode. Journal of Medical Virology 2017.
8. Inoue T, Tanaka, Y. Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection - an update. [Microb Cell](#) V.3 (9); 2016.
9. Zhoua S, Li T, Allain J.P. Low occurrence of HBsAg but high frequency of transient occult HBV infection in vaccinated and HBIG-administered infants born to HBsAg positive mothers. Journal of Medical Virology 2017.
10. Allain, J.P. Occult Hepatitis B Virus Infection: Implications in transfusion. Vox Sanguinis, 86: 83-91, 2004b.

11. Candotti, D. &Allain, J.P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 51: 798-809, 2009.
12. Raven, S, Hautvast, J, Steenbergen, J. Diagnostic performance of serological assays for anti-HBs testing: Results from a quality assessment program. *Journal of Clinical Virology* 87 (2017) 17–22
13. Hee Kim, M, Young S, and Lee, W. Occult HBV among Anti-HBc Alone: Mutation Analysis of an HBV Surface Gene and Pre-S Gene. *Yonsei Medical Journal* 2017.
14. Mahoney, FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 351-66
15. Mc Pherson RA. Laboratory diagnosis of human hepatitis viruses. *J Clin Lab Analysis* 1994;8:369-77.
16. Gonçalves, N. S. L, Cavaleiro, N. P. Marcadores Sorológicos da Hepatite B e sua Interpretação. *Braz. J. infect. Dis.*, Salvador, v. 10, n. 1, p. 19-22, ago. 2006.
17. Ferreira, Simão, M. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2000 vol.33, n.4.
18. Payne, Brendan. et al. Hepatitis B Virus Seroprevalence among Men Who Have Sex with Men, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases* 19 (2), 333-334 (2013)
19. Sablon, E., Shapiro, F., Advances in Molecular Diagnosis of HBV Infection and Drug Resistance. *Int Journal of Med Sci*, 2, 8-16 (2005)
20. Lok, A.S, Hadziyannis, S.J., Weller, I.V. et al. Contribution of low level HBV replication to continuing inflammatory activity in patients with anti-HBe positive chronic hepatitis B virus infection. *Gut*, v. 25, n.11, p. 1283-7, 1984
21. Realdi, G., Alberti, A., Rugge, M. et al. Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-Hbe in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*, v. 79, n. 2, 195-9, 1980
22. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. A, B, C, D, E de Hepatites para Comunicadores. Brasília/ DF 2005.
23. Price,H, Dunn, D, Zachary, T, et al. Hepatitis B serological markers and plasma DNA concentrations. *AIDS* 2017, 31:1109–1117.

24. Christoph, S, William S. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, v. 479, p. 672-686, 2015.
25. Easterbrook ,P, Roberts, T, Sands, A, et. al. Diagnosis of viral hepatitis. *Curr Opin HIV AIDS* 2017, 12:302–314.
26. Ministério da Saúde. Portaria 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/imagens/pdf/2016>.
27. Carrazone, C.F., Brito, A.M e GOMES, Y.M. Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2004, vol.26, n.2.
28. Souto, F. J. D. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2016, vol.49.
29. Almeida, N.C. C et al. Avaliação dos marcadores sorológicos e moleculares da hepatite B em doadores de sangue atendidos na fundação Hemopa, Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 37, p. 316, 2015.
30. Moresco, M.N, Virgolino, A.H, Morais, M.P. et al. Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. *Vox Sanguinis* (2014).
31. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 4º Boletim de Produção Hemoterápica. Hemoprod 2014 e 2015. Brasília, 2017
32. Borelli, S, Mazzola, C, Matta, A, et. al. Blood discard rate and the prevalence of infectious and contagious diseases in blood donors from provincial towns of the state of Paraná, Brazil. *Rev Bras Hematologia e Hemoterapia.* 2013; 35(6): 395-9.
33. Souza V, Araújo D, Prudêncio A, Sb. Prevalência de soropositividade de doenças Hemotransmissíveis em doadores de sangue do Hemocentro regional de Joinville (SC). Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016.
34. Carneiro JMH, Abrahim CMM, Souza RM, Souza MIS, Castro MNS, Gato CM, Santos MDSFD. Implantação do teste de ácido nucleico (NAT) na pesquisa do vírus da hepatite B (VHB) na triagem das doações de sangue realizadas no

hemocentro do Amazonas HEMOAM). Congresso Brasileiro de Hematologia , Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016

35. Birhaneslassie M. Prevalence of Transfusion-Transmissible Infections in Donors to an Ethiopian Blood Bank Between 2009 and 2013 and Donation Factors That Would Improve the Safety of the Blood Supply in Underdeveloped Countries. *Lab Med* (2016) 47 (2): 134-139.
36. [Buseri FI](#), [Muhibi MA](#), [Jeremiah ZA](#). Sero-epidemiology of transfusion-transmissible infectious diseases among blood donors in Osogbo, south-west Nigeria. [Transfus de sangue](#). 2009 Oct; 7 (4): 293-9.
37. Attaullah S, Khan S, Khan J. Trend of transfusion transmitted infections frequency in blood donors: provide a road map for its prevention and control. *J Transl Med*. 2012;10:20.
38. Hudu, S, Harmal, S, et.al. Molecular and serological detection of occult hepatitis B virus among healthy hepatitis B surface antigen-negative blood donors in Malaysia. *African Health Sciences* 2016. Vol 16 Issue 3.
39. Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, Zhang M, et. al. Occult hepatitis B virus infection in a population of the North American community. *J. Hepatol*. 2005; 42: 480-485.
40. Makvandi, M. Update on occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2016 October 21; 22(39): 8720-8734.
41. [Moresco MN](#), [Virgolino, H](#), [Morais, M](#). Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. *Vox Sang*. 2014 Jul; 107 (1): 19-25.
42. Oliveira, MB, Souza, FCB, Borges, BE. Meia Década de Teste NAT: Resultados e Expectativas. Congresso Brasileiro de Hematologia , Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016.
43. Lelie N, Bruhn R, Busch M. Detection of different categories of hepatitis B virus (HBV) infection in a multi-regional study comparing the clinical sensitivity of hepatitis B surface antigen and HBV-DNA testing. *Transfusion*. 2017 January, 57(1).

44. [Levi JE](#), Polite, M. One window-period donation in two years of individual donor-nucleic acid test screening for hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus. [Rev Bras Hematol Hemoter](#) . 2013; 35 (3): 167-170.
45. Chang C, Crane,M, Ling, Z et. al. HIV and co-infections. *Immunol Rev*. 2013 Jul; 254 (1): 114-142.
46. Samal,J., Kandpal, M., Vivekanandan, P. Molecular Mechanisms Underlying Occult Hepatitis B Virus Infection. [Clin Microbiol Rev](#) . 2012 Jan; 25 (1): 142-163.
47. Kim, M, Kang, S, Lee, W. Occult HBV among Anti-HBc Alone: Mutation Analysis of an HBV Surface Gene and Pre-S Gene. *Yonsei Med J* 2017 May;58(3):557-563.
48. Beggio,S, Barin,P, Favarato,M. et al. Significance of anti-HBc only in blood donors: a serological and virological study after hepatitis B vaccination. *Blood Transfus* . 2014 january; 12: s63-s68.
49. [Karimi](#), G, [Zadsar](#), M, [Vafaein](#) N. et. al. Prevalence of antibody to Hepatitis B core antigen and Hepatitis B virus DNA in HBsAg negative healthy blood donors. [Virol J](#) . 2016; 13: 36.
50. Kang SY, Kim MH, Lee WI. The prevalence of “anti-HBc alone” and HBV DNA detection among anti-HBc alone in Korea. *J Med Virol* 2010; 82: 1508-1514.
51. Ministry of Health of Italy. Decree of the Minister of Greeting March 3, 2005. Caratteristiche and modalità by donazione del blood and degli componenti: *Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana* n ° 85, 2005.
52. Velati C, Formiatti L, Baruffi L, et al. Criteria for screening for hepatitis B virus and validation of blood components in Italy: the position of the SIMTI-HBV working group SIMTI-HBV. *Blood Transfus*. 2011;9 : 455-61
53. Ponde´, A, Cardoso, DDP, Ferro, MO. The underlying mechanisms for the ‘anti-HBc alone’ serological profile. *Arch Virol* (2010) 155:149–158.
54. Cruz CFN. Estudo de doadores de sangue com presença do anticorpo anti-HBc sérico como marcador isolado de infecção pelo vírus da hepatite B [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 1997.

55. Jurado,F, Murrieta,N, Flores, B, et. al. Prevalence of Serologic Hepatitis B Markers in Blood Donors From Puebla, Mexico: The Association of Relatively High Levels of Anti-Core Antibodies With the Detection of Surface Antigen and Genomic DNA. *Hepat Mon.* 2016 June; 16(6):36942.
56. De Paschale M, Manco MT, Arpino O, et al. Threshold value of LIAISON XL anti-HCV screening assay predicting positive immunoblotting results. [J Med Virol.](#) 2017 12 of april.
57. [López-Fabal M](#), [Pérez-Rivilla A](#), [Gómez-Garcés JL](#). Evaluation of sera with a low signal to cut-off ratio using two chemiluminescent assays for detecting Hepatitis C Virus, and their correlation with the detection of Viral RNA. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017 Feb 23.
58. [Kim B](#), [Ahn HJ](#), [Choi MH](#), [Park Y](#). Retrospective analysis on the diagnostic performances and signal-to-cut-off ratios of the Elecsys Anti-HCV II assay. [J Clin Lab Anal.](#) 2017 Feb 10.
59. Wang, L, Zou, S, Wang, K, et. al. Role of serum hepatitis B virus marker quantitation to differentiate natural history phases of HBV infection. *Hepatol Int* 2015.
60. Busch MP. Should HBVDNA/NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors? [Transfus Clin Biol.](#) 2004 Feb; 11 (1): 26-32.
61. Tiwari,A, Ravi C., Aggarwal, D. et al. A comprehensive serological and supplemental evaluation of hepatitis B “seroyield” blood donors: A cross-sectional study from a tertiary healthcare center in India. *Asian J Transfus Sci.* 2015 Jul-Dez; 9 (2): 189-194.
62. [Karimi](#) ,G, [Zadsar](#) ,M, [Sharifi](#),Z, et. al. Prevalence of antibody to Hepatitis B core antigen and Hepatitis B virus DNA in HBsAg negative healthy blood donors. [Virol J](#) . 2016; 13: 36.
63. PETRY, Andrea, KUPEK, Emil J. Effectiveness of anti-HBV vaccines (recombinant DNA) In blood donors from an endemic region for hepatitis B in southern Brazil. *Magazine of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 2006. v. 39, n. 5, p. 462-6.