

**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Ciências Médicas**

**CONCORDÂNCIA ENTRE DUAS TÉCNICAS DE
QUANTIFICAÇÃO DO HBVDNA E ASSOCIAÇÕES COM
FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES PORTADORES
DE INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS B DA HEPATITE
HBeAg NEGATIVOS**

Marcelo Abrahão Costa

**Brasília, DF
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcelo Abrahão Costa

**CONCORDÂNCIA ENTRE DUAS TÉCNICAS DE
QUANTIFICAÇÃO DO HBVDNA E ASSOCIAÇÕES COM
FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES PORTADORES
DE INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS B DA HEPATITE
HBeAg NEGATIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Medicina da Universidade
de Brasília, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Médicas

Orientadora: Prof^a. Dra. Elisabeth Carmen Duarte (UnB)
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco José Dutra Souto (UFMT)

**Brasília, DF
2010**

**CONCORDÂNCIA ENTRE DUAS TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DO
HBVDNA E ASSOCIAÇÕES COM FIBROSE HEPÁTICA EM PACIENTES
PORTADORES DE INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS B DA HEPATITE
HBeAg NEGATIVOS**

Marcelo Abrahão Costa

Orientadora: Prof^a. Dra. Elisabeth Carmen Duarte

Dissertação Submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em 29 de Setembro de 2010.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Elisabeth Carmen Duarte (Presidente)

Prof. Dr. Giovanni Faria Silva (UNESP – Botucatu)

Prof. Dr. Pedro Luiz Tauil

Brasília, DF

2010

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*

Chico Xavier

Agradecimentos

Aos pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) e seus familiares, pela participação voluntária no presente estudo. Sem seu consentimento nada do que está aqui seria possível.

A toda equipe da Unidade de Gastroenterologia do HBDF – secretárias, enfermagem, médicos residentes e demais staffs. O paciente em primeiro lugar, mesmo na adversidade.

Ao Dr. Columbano Junqueira Neto – amigo e Chefe da Unidade de Gastroenterologia do HBDF, pelo seu apoio e incentivo à pós-graduação.

À equipe do Laboratório Diagnóstico, em especial à Dra. Danielle e ao Dr. José Percival Rico.

À Bristol Myers Squibb (BMS) pela realização da quantificação das cargas virais (HBVDNA) no Centro de Genomas em São Paulo.

Aos docentes das disciplinas da Pós-Graduação em Ciências Médicas, pelos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Francisco José Dutra Souto, pela revisão crítica do trabalho e pela inestimável ajuda à sua conclusão.

Em especial, à Professora Dra. Elisabeth Carmen Duarte, minha orientadora, pela sólida e indispensável expertise. Por sua paciência, sua animação e sua disposição, que serviram de incentivo contínuo à finalização da tese.

Aos meus pais, Francisco Álvaro Barbosa Costa e Maria Amélia Abrahão Costa. Sua ética, sua moral, seu apoio incondicional e seu amor continuam presentes no meu dia-a-dia, mesmo após a vida adulta – indiscutivelmente, a sua maior herança.

À minha irmã, Andrea Abrahão Costa, pelos seus repetidos exemplos de lucidez, perseverança, dedicação e superação, tanto maternal quanto profissional.

À minha filha Marcella, que chegou muito cedo às nossas vidas, enchendo de alegria a monotonia da rotina. Minha maior força motriz nos últimos vinte anos de vida.

Ao meu filho Tales, pelo redescobrimento da paternidade e pela renovação da nossa rotina. Minha força motriz para os próximos vinte anos de vida.

À minha esposa Sandra, que me deu tudo de importante. Sem você nada mais teria sentido.

Resumo

INTRODUÇÃO: Para a infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) HBeAg negativo, a aplicabilidade clínica da quantificação do HBVDNA (carga viral) ficou mais clara nos últimos cinco anos, principalmente quanto ao diagnóstico, à evolução e ao tratamento da infecção, influenciando, sobremaneira, a decisão de tratar.

OBJETIVOS: Analisar a concordância dos títulos de carga viral quantificados por dois métodos distintos de biologia molecular e estimar as associações existentes entre carga viral e achados histológicos, ajustando por variáveis clínicas e laboratoriais selecionadas.

MÉTODOS: Portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo foram estudados quanto às suas características clínicas, laboratoriais, ecográficas e histológicas. Análises de correlação entre essas variáveis e as cargas virais – quantificadas com Amplicor (AMPL) e Taqman (TQM) foram realizadas. As concordâncias brutas e ajustadas por chance (índice Kappa) entre cargas virais obtidas pelas técnicas baseadas na reação de cadeia de polimerase (PCR) foram analisadas.

RESULTADOS: Avaliados 54 pacientes (homens=33, 61,1%), a média de idade foi de 41,22 anos. Consumo de etanol era nulo em 66,7% (36/54). TGO estava aumentada em 48% (26/54) dos pacientes, com média de 30,83 ui/ml. TGP apresentava-se aumentada em aproximadamente 60% (32/54) dos pacientes estudados, com valor médio de 39,17 ui/mL. Quando os dois testes foram simultâneos em amostras pareadas, a média das cargas virais aferidas pelo TQM foi superior à média daquelas aferidas pelo AMPL ($p<0,0001$). AMPL detectou cargas virais < 2.000 ui/ml em 74% dos pacientes (37/50). Para esse grupo, TQM detectou cargas virais ≥ 2.000 ui/ml em 46% (17/37) dos pacientes. As variáveis independentes associadas à fibrose foram: idade, plaquetas, bilirrubina total e carga viral TQM.

CONCLUSÃO: A concordância Kappa=0,31 entre os dois testes quantitativos de carga viral foi considerável ($p<0,0001$). Sem os resultados do teste TQM, mais da metade (54,8%) dos pacientes que tivessem sua avaliação limitada ao teste AMPL não seriam considerados candidatos a tratamento.

Palavras-chave: vírus da hepatite B; pré-core mutante; quantificação da carga viral; tratamento;

Abstract

INTRODUCTION: In chronic hepatitis B virus (HBV) infected patients with hepatitis B e antigen (HBeAg) negative strand, the clinical relevance of serum HBV DNA measurement became clearer in the past five years regarding diagnosis, evolution and treatment. Starting therapy is directly influenced by quantitative evaluation of HBV viral load among other relevant variables. **AIM:** evaluate HBVDNA quantification concordance using two distinct PCR assays, Amplicor (AMPL) and Taqman (TQM), and estimate associations between viral load and biopsy findings, adjusting for clinical and laboratory variables. **METHODS:** 54 patients with HBeAg-negative chronic HBV infection were studied. Correlations between demographic, clinical, laboratory and HBVDNA variables were estimated. Serum HBV DNA quantification was obtained using two distinct assays. The concordance between these tests was estimated by Kappa index. **RESULTS:** Mean age was 41,9years, male patients predominant (61,1%). Ethanol use was absent in 36 individuals (66,7%), and less than 40g/day for all subjects enrolled. AST activity and ALT activity were abnormal at baseline in 48% (26/54) and in 60% (32/54), with mean values of 30,83 iu/ml and 39,17 iu/ml, respectively. For simultaneous quantification of HBVDNA, the mean viral load obtained with TQM assay was greater compared to AMPL assay ($p<0,0001$). Viral load obtained with AMPL was less than 2,000 iu/ml in 74% of patients (37/50). The TQM assay was able to detect HBVDNA levels greater than 2,000 iu/ml in 46% (17/37) of patients in this group. Independent variables associated with fibrosis were: age, platelets, total bilirubin and TQM viral load. **CONCLUSION:** The concordance of 0.31 between TQM and AMPL quantitative tests estimated by Kappa was considered considerable ($p<0,0001$). However, without simultaneous testing using TQM assay approximately half of patients with their evaluation limited to AMPL testing would not be adequately considered candidates for therapy.

Keywords: Hepatitis B virus; pre-core mutant; HBVDNA quantification; treatment;

Sumário

Sumário	8
Lista de figuras	11
Lista de Tabelas	11
Lista de Abreviaturas	12
Introdução	13
<i>Diagnóstico da Hepatite B crônica ativa</i>	14
<i>O papel da biópsia hepática no diagnóstico da hepatite B crônica ...</i>	17
<i>O manejo da hepatite B crônica HBeAg negativo</i>	18
Justificativa	19
Objetivos	21
<i>Objetivo geral</i>	21
<i>Objetivos específicos</i>	21
Artigo 1	22
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	25
Métodos	27
<i>Tipo de estudo</i>	27
<i>População alvo</i>	27
<i>Procedimentos de coleta de dados</i>	27
<i>Dados secundários</i>	27
<i>Dados primários</i>	28
<i>Variáveis do estudo</i>	29
<i>Desfecho</i>	30
<i>Análise dos dados</i>	30
i) <i>Concordância dos métodos de aferição de cargas virais</i>	30
ii) <i>Associações das cargas virais com fibrose hepática</i>	31
Aspectos éticos	32

Resultados	33
1. Características demográficas e epidemiológicas	33
2. Características clínicas e laboratoriais	34
3. Quantificação dos títulos de cargas virais por dois testes de biologia molecular	36
4. Análise de concordância dos resultados de quantificação da carga viral por meio de dois testes de biologia molecular	38
5. Correlações entre títulos de cargas virais e achados clínicos e laboratoriais selecionados	40
6. Associações existentes entre os títulos de cargas virais e fibrose, ajustando por variáveis clínicas e laboratoriais selecionadas	41
 Discussão	 44
1. Relevância da população estudada	44
2. Motivação para o estudo de pacientes portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo e da concordância entre dois testes de biologia molecular	44
3. Principais resultados das análises de concordância	45
4. Principais aspectos que influenciam a indicação de tratamento da hepatite B crônica HBeAg negativo e a avaliação da eficácia terapêutica: transaminases, achados histológicos e cargas virais	45
4.1. <i>Transaminase glutâmico pirúvica (TGP)</i>	45
4.2. <i>Achados histológicos de necroinflamação/fibrose....</i>	46
4.3. <i>Cargas virais</i>	48
4.3.1. <i>Relevância das cargas virais para apoio à decisão terapêutica e monitoramento da eficácia terapêutica</i>	48
4.3.2. <i>Cargas virais aferidas pelos métodos AMPL e TQM</i>	49

4.3.3. Importância da capacidade dos testes em discriminar indivíduos apresentando carga viral em níveis clinicamente significativos HBVDNA ≥ 2.000 ui/ml	51
4.3.4. Importância em discriminar cargas virais acima do limite de 38.000ui/ml imposto pela metodologia AMPL.....	51
4.3.5. Associações entre fibrose e cargas virais e outras variáveis explicativas.....	53
Referências Bibliográficas	56
Limitações	60
1. Erros (viés) de aferição	60
2. Erros (viés) de seleção	61
3. Erros de temporalidade	61
4. Precisão e tamanho amostral	61
Conclusões / Recomendações	62
Anexos	65
Aprovação do projeto no Comitê de Ética	66
Ficha de entrevista e coleta de dados	67

Lista de figuras

Figura 1	37
----------------	----

Lista de Tabelas

Tabela 1	35
Tabela 2	36
Tabela 3	39
Tabela 4	40
Tabela 5	41
Tabela 6	42
Tabela 7	43

Abreviaturas

AMPL	Amplicor
anti HBc	anticorpo contra o antígeno “c” (core) do vírus B da hepatite
anti HBe	anticorpo contra o antígeno “e” do vírus B da hepatite
APRI	AST/platelets ratio index
HBeAg	antígeno “e” do HBV
HBsAg	antígeno de superfície do HBV
HBV	Vírus B da hepatite
HBVDNA	ácido desoxirribonucleico do HBV (carga viral)
HCV	Vírus C da hepatite
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IMC	índice de massa corporal
LSN	limite superior da normalidade
PCR	reação em cadeia de polimerase
TGO	transaminase glutâmico oxalacética
TGP	transaminase glutâmico pirúvica
TQM	Taqman
ui/ml	unidades internacionais por mililitro

INTRODUÇÃO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) é um importante problema de saúde pública e uma das principais causas de doença hepática no mundo. Há aproximadamente 350 milhões de portadores crônicos, que estão permanentemente expostos ao risco de desenvolvimento das complicações mais temidas desta forma crônica de hepatite – a cirrose hepática e o carcinoma hepatocelular.^{1,2} Em regiões de alta prevalência da infecção, o óbito pelo câncer de fígado ocupa a terceira posição em frequência de óbitos por neoplasias.³

A exposição percutânea e de mucosas aos fluidos corpóreos, ou a sangue contaminado é a via de transmissão mais conhecida para o HBV. As principais formas de transmissão são: perinatal, relações sexuais, transfusão de sangue e derivados, uso de drogas endovenosas, transplante de órgãos e tecidos, e acidentes pérfuro-cortantes com material contaminado. O HBsAg, antígeno de superfície do HBV, mas não o vírion intacto (partícula viral íntegra infectante), já foi isolado em outros fluidos corporais como saliva, lágrimas, suor, urina, fezes, leite materno, líquido cefalorraquiano e líquido sinovial. Por esse motivo, esses fluidos não têm sido associados ao risco de transmissão.

Em indivíduos adultos que desenvolvem infecção aguda sintomática ou assintomática, o risco de progressão para hepatite crônica é de aproximadamente 5-10%. Nos recém-nascidos de mães portadoras do HBV, a cronificação pode se dar em 90% dos casos.

Os relatos da prevalência dos marcadores sorológicos para o HBV no Brasil têm variado sobremaneira dependendo da região estudada.⁴ Mais recentemente, estudo coordenado pelo Ministério da Saúde resultou no Inquérito de Prevalência de Base Populacional dos marcadores das hepatites A, B e C, nas capitais do Brasil, com o

¹ Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:47-58.

² McMahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2005; 25 (Suppl.1):3-8.

³ Manno M, Cammà C, Schepis F, Bassi F, Gelmini R, Giannini F, Miselli F, Grottola A, Ferretti I, Vecchi C, De Palma M, Villa E. Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: morbidity and mortality after 30 years. *Gastroenterology*. 2004 Sep;127(3):756-63.

⁴ Focaccia R. Hepatite B, Epidemiologia. In: *Tratado de Hepatites Virais*, 2ª Ed. São Paulo: Atheneu 2007; 115-120.

intuito de estimar a prevalência desses marcadores na população brasileira.⁵ Até o presente momento, as regiões Nordeste (NE), Centro-Oeste (CO) e o Distrito Federal (DF) concluíram sua participação naquele estudo e as prevalências estimadas do anti HBc para faixa etária de 10 a 19 anos e 20 a 69 anos, respectivamente, foram: NE = 2.12%, 11.62%; CO = 1.3%, 12.7%; DF = 1.1%, 8.3%. As prevalências estimadas do HBsAg para faixa etária de 10 a 19 anos e 20 a 69 anos, respectivamente, foram: NE = 0.11%, 0.48%; CO = 0.2%, 0.7%; DF = 0.2%, 0.4%. Além disso, foram identificados os genótipos D, A e F como mais prevalentes nas regiões estudadas.

Fatores virais e do hospedeiro são associados à evolução para formas crônicas ativas da hepatite B, para cirrose hepática e para o carcinoma hepatocelular, tais como: a idade, os níveis séricos de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), a persistência de sintomas clínicos, o grau de atividade histológica (necroinflamação e fibrose), o genótipo do HBV, o estado de portador do HBV mutante pré-core ou da região *core promoter*, e os níveis séricos persistentemente elevados de carga viral do HBV (quantificação do HBV DNA).⁶

Outros fatores são marcadores da efetividade do tratamento da hepatite crônica B: a diminuição ou a regressão dos sintomas, a negativação do HBeAg e a seroconversão para antiHBe, a negativação sustentada ou a redução dos níveis séricos de carga viral (HBV DNA quantitativo), a normalização das transaminases, e a reversão ou a diminuição da necroinflamação e da fibrose hepáticas.

Diagnóstico da Hepatite B crônica

A infecção crônica pelo HBV é caracterizada pela presença da sorologia positiva para o HBsAg por mais de 6 meses. Além disso, estão presentes títulos elevados do HBV DNA no soro, comumente acompanhados de elevação persistente ou intermitente de transaminases e achados histológicos de necroinflamação na biópsia hepática.

⁵ Leila M. M. B. Pereira ; Celina M. T. Martelli ; Edgar Merchán-Hamann ; Ulisses R. Montarroyos ; Maria C. Braga ; Maria L. C. de Lima et al. Population Based Multicentric Survey of Hepatitis B Infection and risk factor differences among three regions in Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 81, p. 240-247, 2009.

⁶ Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. Hepatology 2006; 43(S1):73–181.

As formas típicas de infecção ativa pelo HBV são: (1) hepatite B crônica HBeAg positivo, (2) hepatite B crônica HBeAg negativo.

A hepatite B crônica HBeAg positivo é caracterizada pela presença dos marcadores HBsAg e HBeAg, ausência do marcador anti-HBe, níveis séricos de HBV DNA acima de 20.000 ui/ml (10^5 cópias/ml) e transaminases persistentemente aumentadas ($>2x$ limite superior da normalidade – LSN). A maioria dos pacientes submetidos à biópsia hepática nessa situação clínica apresenta achados histológicos significativos de necroinflamação.

A hepatite B crônica HBeAg negativo é caracterizada pela presença dos marcadores HBsAg e anti-HBe, ausência do marcador HBeAg, e pelos níveis séricos elevados de HBV DNA acima de 2.000 ui/ml (10^4 cópias/ml). Nesse grupo de pacientes há elevação persistente ou intermitente de transaminases ($>2x$ LSN). Esta forma está geralmente relacionada à infecção crônica pela variante do HBV denominada mutante da região pré-core ou do *core promoter*, com ausência ou redução da secreção de HBeAg no soro, mas com níveis séricos detectáveis de replicação viral.⁷

É imprescindível a adequada definição deste perfil clínico-sorológico, que pode ser ocasionalmente confundido com o perfil do portador inativo, cujas características principais são HBsAg positivo, HBeAg negativo, níveis séricos de HBV DNA inferiores a 2.000 ui/ml (10^4 cópias/ml) e transaminases persistentemente normais, por um período superior a 6 meses. Muitas vezes a distinção entre essas formas clínicas é inadequada, principalmente quando não há disponibilidade e acesso aos marcadores ou exames de biologia molecular na sua integralidade.

O diagnóstico de portador inativo é estabelecido após determinações sucessivas da carga viral e da bioquímica ao longo de 12 meses, já que a hepatite B crônica HBeAg negativo pode apresentar, de forma intermitente, níveis séricos baixos de HBV DNA, dificultando o diagnóstico diferencial.⁸

⁷ Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. J Viral Hepat. 2000 Jul;7(4):258-67.

⁸ Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. Hepatology 2002;36:1408-1415.

Aproximadamente um terço dos pacientes portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo, cursam com aumento evidente da carga viral, apresentando, entretanto, transaminases normais ou flutuações dos seus valores abaixo de 2 vezes o valor superior da normalidade ($<2 \times \text{LSN}$). Quando submetidos à biópsia hepática ambulatorial, podem apresentar, inclusive, achados histológicos significativos de necroinflamação.⁹

Após investigação clínica mais detalhada, esses pacientes, aparentemente saudáveis, poderão ser considerados candidatos a tratamento, pois podem evoluir para a cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular, com probabilidades semelhantes aos dos pacientes que têm elevação persistente das transaminases ($>2 \times \text{LSN}$).^{10,11} Dessa forma, acredita-se que a avaliação adequada da carga viral pode auxiliar na tomada de decisão terapêutica, assim como seu valor aumentado pode representar importante fator preditivo positivo para o risco de uma evolução desfavorável.¹²

A infecção crônica pelo HBV pode se dever a genótipos diferentes do vírus.^{13,14} Uma vez que genótipos específicos do HBV podem ter impacto direto na evolução natural da doença para cirrose e carcinoma hepatocelular, é importante estabelecer o diagnóstico adequado nos pacientes portadores da infecção.¹⁵ Assim, com a adequada quantificação da carga viral, e eventual identificação do genótipo do vírus da hepatite B, pode-se considerar pacientes candidatos a tratamento, inclusive, subsidiando-se a decisão pela droga a ser utilizada.¹⁶

⁹ Manesis EK, Papatheodoridis GV, Sevastianos V, Cholongitas E, Papaioannou C, Hadziyannis SJ. Significance of hepatitis B viremia levels determined by a quantitative polymerase chain reaction assay in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol*. 2003 Oct;98(10):2261-7.

¹⁰ Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130:678-686.

¹¹ Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65-73.

¹² Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Perez RM, Ceci L, Pannain VL, Nogueira CM, Segadas-Soares JA, Coelho HS. HBV-DNA levels in HBsAg-positive blood donors and its relationship with liver histology. *J Clin Gastroenterol*. 2007 Feb;41(2):194-8.

¹³ Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-559.

¹⁴ Kao JH, WuNH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000;33:998-1002.

¹⁵ Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(-) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002;36:1425-1430.

¹⁶ Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, et al. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005;54: 1009-1013.

A detecção da replicação viral, e sua subsequente quantificação, subsidiam o diagnóstico, a decisão de tratar e o monitoramento dos pacientes em tratamento. A utilização de métodos de quantificação com reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real é recomendada pelas diretrizes internacionais de acompanhamento dos portadores de hepatite B crônica por apresentarem sensibilidade, especificidade, acurácia e grande amplitude de quantificação.¹⁷ A Organização Mundial de Saúde definiu padrão de normalização internacional para expressão das concentrações de HBVDNA aferidas pelos vários métodos amplamente usados na clínica diária, determinando que os resultados sejam expressos em ui/ml.¹⁸

O papel da biópsia hepática no diagnóstico da hepatite B crônica

A avaliação histopatológica do tecido hepático pela biópsia hepática é a forma mais específica de avaliar os danos resultantes da infecção crônica pelo HBV. Ela permite a graduação da atividade necroinflamatória, estadiamento do grau de fibrose e a detecção de eventuais doenças associadas.

Entretanto, a relação entre os níveis séricos de carga viral, as transaminases e as alterações histológicas não é bem estabelecida nos casos de hepatite crônica. Além disso, ainda não há consenso quanto à indicação universal desse procedimento invasivo que pode apresentar complicações em até 1% dos pacientes.¹⁷

Em recente reunião de consenso patrocinada e coordenada pela Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH), a indicação de biópsia hepática para pacientes portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo, com transaminases persistentemente normais e níveis séricos elevados de HBV DNA acima de 2.000 ui/ml, foi consensual entre os especialistas, devendo ser realizada preferencialmente por via percutânea, com ou sem o auxílio da ultrassonografia.¹⁹

¹⁷ Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology* 2008;134:405–415.

¹⁸ Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 2001;80:63–71.

¹⁹ Consenso SBH sobre condutas nas hepatites virais B e C: Hepatite B.; GED. 2005, v. 24, n.1.

A biópsia habitualmente é dispensada quando houver contra-indicação ao procedimento, quando houver evidências clínicas, laboratoriais e radiológicas de cirrose hepática, ou quando houver recusa do paciente em aceitar a realização do mesmo, apesar dos esclarecimentos médicos.

O manejo da hepatite B crônica HBeAg negativo

Uma parte dos portadores da infecção crônica pelo HBV HBeAg positivo apresenta desenvolvimento de cepas mutantes chamadas pré-core ou *core promoter*. Essas cepas perdem a capacidade de expressar o antígeno “e”, que funciona como mecanismo de escape do vírus ao sistema imune. Essas mutações se tornam mais frequentes em infecções mais antigas, pela maior chance temporal de ocorrerem, ou em determinados genótipos. Atualmente, essa forma de infecção vem se tornando mais frequente, suplantando o número de indivíduos infectados pela cepa selvagem HBeAg positivo. A presença das cepas pré-core ou *core promoter* impossibilita a definição do objetivo terapêutico usual (seroconversão HBeAg/antiHBe). Assim, os objetivos a serem alcançados durante o tratamento da hepatite B crônica HBeAg negativo são: a) resposta bioquímica com normalização das transaminases; b) resposta virológica sustentada com redução aos menores níveis possíveis de carga viral ou negatificação persistente da mesma; c) resposta histológica com melhora da atividade necroinflamatória.²⁰

Para a hepatite B crônica HBeAg negativo as opções terapêuticas são variadas e incluem os mesmos medicamentos usados no tratamento da hepatite crônica HBeAg positivo. Interferon alfa, Interferon peguilado, Lamivudina, Adefovir dipivoxil, Entecavir e Tenofovir disoproxil fumarato são drogas utilizadas no tratamento do portador de hepatite B crônica HBeAg negativo com níveis séricos elevados de HBV DNA acima de 2.000 ui/ml (10^4 cópias/ml) e TGP > 2x LSN.^{21,22,23}

²⁰ Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007 Feb;45(2):507-39.

²¹ Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, Fleischer R, Lok AS. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):1056-75.

²² Degertekin B, Lok AS. When to start and stop hepatitis B treatment: can one set of criteria apply to all patients regardless of age at infection? *Ann Intern Med*. 2007 Jul 3;147(1):62-4.

²³ Wong SN, Lok AS. Tenofovir disoproxil fumarate: role in hepatitis B treatment. *Hepatology*. 2006 Aug;44(2):309-13.

JUSTIFICATIVA

A hepatite B crônica HBeAg negativo é caracterizada pela presença dos marcadores HBsAg e anti-HBe, ausência do marcador HBeAg, pelos níveis séricos elevados de HBVDNA acima de 2.000 ui/ml (10^4 cópias/ml) e pela elevação persistente ou intermitente de transaminases (TGP > 2x LSN). Seu perfil clínico-sorológico pode ser ocasionalmente confundido com o perfil do portador inativo, cujas características principais são HBsAg positivo, HBeAg negativo, níveis séricos de HBVDNA inferiores a 2.000 ui/ml (10^4 cópias/ml) e transaminases persistentemente normais, por um período superior a 6 meses. Muitas vezes a distinção entre as duas formas clínicas é difícil, sobretudo quando não estão disponíveis os marcadores ou exames de biologia molecular na sua integralidade.

Aproximadamente um terço dos pacientes portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo, cursa com aumento evidente da carga viral, mesmo apresentando transaminases normais ou flutuações dos seus valores abaixo de 2 vezes o valor superior da normalidade (< 2xLSN). Esta forma representa infecção crônica pela variante do HBV denominada mutante da região pré-core ou do *core promoter*, com ausência ou redução da secreção de HBeAg no soro, mas com níveis séricos detectáveis de replicação viral – HBVDNA quantitativo presente. Quando submetidos à biópsia hepática ambulatorial, os pacientes podem apresentar achados histológicos significativos de necroinflamação e fibrose. Porém, a relação entre os níveis séricos de carga viral, as transaminases e as alterações histológicas não é bem estabelecida nos casos de hepatite crônica. Dessa forma, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar as associações existentes entre a quantificação do HBVDNA (carga viral) – aferida por métodos distintos de biologia molecular, e marcadores de fibrose, enquanto ajustando achados clínicos, laboratoriais e histológicos selecionados, que poderiam contribuir para identificar valor preditivo para evolução desfavorável da doença das variáveis analisadas.

Uma vez confirmadas as alterações das variáveis descritas acima, os portadores crônicos deverão ser considerados candidatos a tratamento, já que podem evoluir para a cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular. Particularmente, a quantificação do HBVDNA em níveis persistentemente elevados ≥ 2.000 ui/ml representa importante

fator preditivo positivo para evolução clínica desfavorável devendo, portanto, ser considerada determinante para a instituição de tratamento.⁹ Nesse sentido, a quantificação da carga viral de maneira válida e reprodutível pode auxiliar sobremaneira na tomada de decisão terapêutica desses indivíduos.

O uso de exames de biologia molecular para adequada quantificação da carga viral do HBV foi incorporado de maneira definitiva na prática clínica visando ao acompanhamento dos portadores crônicos de hepatite B. Estudos que buscaram avaliar as técnicas de biologia molecular comparando sua capacidade em detectar adequadamente a replicação viral do HBV apontaram pela superioridade de um método sobre outros, mas particularmente para as técnicas TAQMAN por PCR em tempo real e PCR Amplicor HBV Monitor Roche®. Todavia, a concordância dos seus resultados ainda não foi claramente estabelecida. Portanto, constituiu em um segundo objetivo do presente estudo avaliar a concordância dos títulos de carga viral na população alvo estimados segundo essas duas técnicas de biologia molecular a fim de avaliar a confiabilidade/reprodutibilidade de seus resultados.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar a concordância de títulos de carga viral estimados pela quantificação do HBVDNA pelos métodos de biologia molecular PCR Taqman em tempo real e PCR Amplicor HBV Monitor Roche®. Estimar as associações existentes entre cargas virais e achadas histológicas (fibrose hepática) na população de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus da hepatite B, HBeAg negativo, atendidos no ambulatório de Hepatologia do Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) no período de 1º de março de 2008 a 30 de agosto de 2009 (população alvo), quando os testes de quantificação do HBDNA ficaram disponíveis para análise pareada.

Objetivos específicos

1 – descrever a população alvo quanto às suas características demográficas, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais;

2 – quantificar os títulos de carga viral na população alvo por meio de dois testes de biologia molecular (PCR Taqman em tempo real e PCR Amplicor HBV Monitor Roche®) e analisar as concordâncias brutas e ajustadas por chance (estatística Kappa) dos resultados desses testes;

3 – Analisar as associações existentes entre os títulos de cargas virais (PCR Taqman em tempo real) e achados histológicos (fibrose hepática), ajustando por variáveis clínicas e laboratoriais selecionadas, na população alvo;

ARTIGO 1***CONCORDÂNCIA ENTRE DUAS TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DO HBVDNA EM PORTADORES DE INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS B DA HEPATITE HBeAg NEGATIVO E SUAS IMPLICAÇÕES NA DECISÃO DE TRATAR***

Autoria: Marcelo Abrahão Costa *, Elisabeth Carmen Duarte **, Marcella Ramos Tavares Abrahão Costa [¥], José Persival Rico [‡], Columbano Junqueira Neto*, Francisco José Dutra Souto [†]

Instituições : * Unidade de Hepatologia e Gastroenterologia – Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF); [†] Faculdade de Ciências Médica – Universidade Federal do Mato Grosso; [¥] Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS); [‡] Laboratório Diagnóstico; ** Pós Graduação em Ciências Médicas – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB);

Endereço para correspondência: SHLS 716 Conjunto L, Torre 2, sala 102/104, Centro Clínico Sul, Brasília – DF, 70.390-700, telefone: (61)3346.5041, fax: (61)3445.3217, email: costamarcelo@yahoo.com

RESUMO

INTRODUÇÃO: Para a infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) HBeAg negativo, a aplicabilidade clínica da quantificação do HBVDNA (carga viral) ficou mais clara nos últimos cinco anos, principalmente quanto ao diagnóstico, à evolução e ao tratamento da infecção, influenciando, sobremaneira, a decisão de tratar.

OBJETIVOS: Analisar a concordância dos títulos de carga viral quantificados por dois métodos distintos de biologia molecular e estimar as associações existentes entre carga viral e achados histológicos, ajustando por variáveis clínicas e laboratoriais selecionadas.

MÉTODOS: Portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo foram estudados quanto às suas características clínicas, laboratoriais, ecográficas e histológicas. Análises de correlação entre essas variáveis e as cargas virais – quantificadas com Amplicor (AMPL) e Taqman (TQM) foram realizadas. As concordâncias brutas e ajustadas por chance (índice Kappa) entre cargas virais obtidas pelas técnicas baseadas na reação de cadeia de polimerase (PCR) foram analisadas.

RESULTADOS: Avaliados 54 pacientes (homens=33, 61,1%), a média de idade foi de 41,22 anos. Consumo de etanol era nulo em 66,7% (36/54). TGO estava aumentada em 48% (26/54) dos pacientes, com média de 30,83 ui/ml. TGP apresentava-se aumentada em aproximadamente 60% (32/54) dos pacientes estudados, com valor médio de 39,17 ui/mL. Quando os dois testes foram simultâneos em amostras pareadas, a média das cargas virais aferidas pelo TQM foi superior à média daquelas aferidas pelo AMPL ($p<0,0001$). AMPL detectou cargas virais < 2.000 ui/ml em 74% dos pacientes (37/50). Para esse grupo, TQM detectou cargas virais ≥ 2.000 ui/ml em 46% (17/37) dos pacientes. As variáveis independentes associadas à fibrose foram: idade, plaquetas, bilirrubina total e carga viral TQM.

CONCLUSÃO: A concordância Kappa=0,31 entre os dois testes quantitativos de carga viral foi considerável ($p<0,0001$). Sem os resultados do teste TQM, mais da metade (54,8%) dos pacientes que tivessem sua avaliação limitada ao teste AMPL não seriam considerados candidatos a tratamento.

Palavras-chave: vírus da hepatite B; pré-core mutante; quantificação da carga viral; tratamento;

ABSTRACT

INTRODUCTION: In chronic hepatitis B virus (HBV) infected patients with hepatitis B e antigen (HBeAg) negative strand, the clinical relevance of serum HBV DNA measurement became clearer in the past five years regarding diagnosis, evolution and treatment. Starting therapy is directly influenced by quantitative evaluation of HBV viral load among other relevant variables. **AIM:** evaluate HBVDNA quantification concordance using two distinct PCR assays, Amplicor (AMPL) and Taqman (TQM), and estimate associations between viral load and biopsy findings, adjusting for clinical and laboratory variables. **METHODS:** 54 patients with HBeAg-negative chronic HBV infection were studied. Correlations between demographic, clinical, laboratory and HBVDNA variables were estimated. Serum HBV DNA quantification was obtained using two distinct assays. The concordance between these tests was estimated by Kappa index. **RESULTS:** Mean age was 41,9years, male patients predominant (61,1%). Ethanol use was absent in 36 individuals (66,7%), and less than 40g/day for all subjects enrolled. AST activity and ALT activity were abnormal at baseline in 48% (26/54) and in 60% (32/54), with mean values of 30,83 iu/ml and 39,17 iu/ml, respectively. For simultaneous quantification of HBVDNA, the mean viral load obtained with TQM assay was greater compared to AMPL assay ($p < 0,0001$). Viral load obtained with AMPL was less than 2,000 iu/ml in 74% of patients (37/50). The TQM assay was able to detect HBVDNA levels greater than 2,000 iu/ml in 46% (17/37) of patients in this group. Independent variables associated with fibrosis were: age, platelets, total bilirubin and TQM viral load. **CONCLUSION:** The concordance of 0.31 between TQM and AMPL quantitative tests estimated by Kappa was considered considerable ($p < 0,0001$). However, without simultaneous testing using TQM assay approximately half of patients with their evaluation limited to AMPL testing would not be adequately considered candidates for therapy.

Keywords: Hepatitis B virus; pre-core mutant; HBVDNA quantification; treatment;

INTRODUÇÃO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) é importante problema de saúde pública e uma das principais causas de doença hepática no mundo. Cerca de 350 milhões de portadores ativos estão permanentemente expostos ao risco de desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.^{1,2} O óbito pelo câncer de fígado ocupa a terceira posição em frequência de óbitos por neoplasias nas regiões de alta prevalência da infecção pelo HBV.³

A infecção crônica ativa é caracterizada pela presença do HBsAg positivo por mais de 6 meses, além dos títulos elevados do HBV DNA no soro, comumente acompanhados de elevação persistente ou intermitente de transaminases e achados histológicos de necroinflamação na biópsia hepática.

A evolução para formas crônicas ativas da hepatite B, para cirrose hepática e para o carcinoma hepatocelular depende de fatores virais e do hospedeiro: a idade, o grau de atividade histológica (necroinflamação e fibrose), o genótipo do HBV, o estado de portador do HBV mutante pré-core ou da região *core promoter*, e os níveis séricos persistentemente elevados de quantificação do HBV DNA.⁴

Geralmente descrita como infecção pela variante do HBV denominada mutante da região pré-core ou do *core promoter*, a hepatite B crônica HBeAg negativo é caracterizada pela presença dos marcadores HBsAg e anti-HBe, ausência do marcador HBeAg, e níveis séricos detectáveis de replicação viral – HBV DNA quantitativo presente ≥ 2.000 ui/mL. Habitualmente cursa com elevação persistente ou intermitente de TGP maior que 2x o limite superior da normalidade ($>2x$ LSN).⁵

Entretanto, aproximadamente um terço desses pacientes apresenta transaminases persistentemente normais ou flutuações dos seus respectivos valores abaixo de duas vezes o limite superior da normalidade, mesmo com aumento persistente da carga viral.⁶ Quando submetidos à biópsia hepática, podem apresentar achados histológicos significativos de necroinflamação.

Embora aparentemente saudáveis, apresentam probabilidades semelhantes de evoluir para a cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular quando comparados aos pacientes que têm elevação persistente das transaminases.^{7,8}

A investigação clínica mais detalhada e a adequada quantificação da carga viral podem auxiliar a tomada de decisão terapêutica, uma vez que sua persistente elevação ≥ 2.000 ui/mL representa importante fator preditivo positivo para o risco de uma evolução clínica desfavorável.⁹

Para uma população específica de portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo do Distrito Federal, os objetivos principais desse estudo foram: a) analisar a concordância bruta e ajustada por chance dos títulos de carga viral quantificados por dois métodos distintos de biologia molecular; b) estimar as associações existentes entre cargas virais e achados histológicos, ajustando por variáveis clínicas e laboratoriais selecionadas.

MÉTODOS

Tipo de estudo:

Trata-se de estudo transversal de concordância de testes diagnósticos, baseado em coletas de dados em registros dos prontuários do ambulatório de Hepatologia do Hospital de Base do DF e coleta de dados primários de cargas virais após quantificação do HBVDNA utilizando dois métodos distintos e pareados de biologia molecular.

População alvo:

A população alvo do estudo foi constituída pelos pacientes atendidos no ambulatório de Hepatologia do Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF), da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES/DF) no período de 1º de junho de 2008 a 31 de agosto de 2009, quando os testes diagnósticos de quantificação do HBVDNA por TQM tornaram-se disponíveis para análise pareada.

Os pacientes elegíveis foram definidos pela presença dos marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBe e ausência do marcador HBeAg (HBsAg positivo, anti-HBe positivo e HBeAg negativo). Pacientes com história de ingestão ativa de etanol $\geq$ 40g/dia, idade inferior a 18 (dezoito) anos e co-infectados com o HIV ou HCV foram excluídos do estudo.

Procedimentos de coleta de dados:

A coleta de dados do presente estudo ocorreu em duas fases: a) a recuperação de dados secundários (históricos) referentes aos achados clínicos, laboratoriais e de biópsia hepática dos pacientes elegíveis em acompanhamento no HBDF; b) a coleta concorrente (dados primários) referente aos exames de biologia molecular, feitos em uma sequência posterior ao início da pesquisa.

Dados secundários: foram resgatados de prontuários e incluem dados clínico-laboratoriais (transaminase glutâmico oxalacética – TGO, transaminase glutâmico pirúvica – TGP, plaquetas, albumina sérica, bilirrubina total e frações, tempo de protrombina, international normalized ratio – INR) e os resultados de biópsia hepática (grau de inflamação e estágio de fibrose – classificação METAVIR). Os exames laboratoriais de rotina quando ausentes no prontuário foram recuperados no laboratório

de análises clínicas e no banco de sangue do próprio HBDF. Nessa etapa, formulário padronizado para coleta dos dados foi preenchido a partir dos dados secundários.

Dados primários: amostras para a realização de exames para a quantificação das cargas virais foram coletadas para todos os pacientes elegíveis. Foram realizadas quantificações das cargas virais do HBV pelos métodos de reação de cadeia de polimerase (PCR) tipo Amplicor HBV Monitor Roche® (AMPL; Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg – NJ, 08876, USA), e tipo TAQMAN HBV DNA quantitativo em tempo real (TQM; Centro de Genomas, São Paulo – SP, 04025-014, Brasil). O primeiro está disponível na rede pública e o segundo na rede privada. Essas duas avaliações foram realizadas a partir de coleta única de amostra de sangue e posterior fracionamento da mesma. Além disso, os testes foram realizados de forma cega e independente (dois laboratórios de referência sem contato e conhecimento sobre os resultados anteriores ou posteriores).

As etapas de armazenamento e processamento das amostras de soro para quantificação da carga viral (HBVDNA) seguiram especificação própria dos fabricantes dos kits ^{10,11,12,13}, e são resumidas a seguir: a) coleta de 30 ml de sangue em veia periférica; b) divisão em três partes iguais de 10 mililitros (ml) em um frasco contendo gel anticoagulante e em dois frascos de bioquímica sem anticoagulante; c) centrifugação a 2000 rotações por minuto por 8 minutos do primeiro frasco; soro aliquoteado com pipeta estéril descartável, divididos em dois tubos eppendorf com 2 ml cada; uma alíquota congelada a -20°C e encaminhada ao Centro de Genomas em São Paulo (SP), para realização do teste TQM e outra alíquota armazenada como reserva técnica; d) primeira amostra de um dos tubos de bioquímica submetida ao mesmo processo de centrifugação descrito na etapa anterior e soro congelado a -20°C para controle de segurança; e) segunda amostra do segundo e último tubo de bioquímica encaminhada ao Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN/DF) para o processamento descrito a seguir: e.1) ultra centrifugação da amostra a 1500rpm por 10 minutos; e.2) transferência do soro para capela com fluxo laminar para pipetagem de 2 ml de soro, separados em 2 recipientes eppendorf de 1 ml cada – utilizando pipetas descartáveis DNase e RNase free; e.3) um dos frascos eppendorf contendo 1 ml do soro congelado para controle de segurança da amostra; o outro frasco de 1 ml encaminhado para realização da

metodologia de quantificação do HBVDNA conforme instruções do fabricante do kit AMPL, disponível na rede pública do Sistema Único de Saúde (SUS);

As amostras do soro dos pacientes submetidos à coleta de sangue foram destinadas exclusivamente para os fins descritos nesse protocolo de estudo. Ambos os testes de biologia molecular utilizados no estudo obedeceram à padronização estabelecida pela Organização Mundial de Saúde para normalização da expressão das concentrações do HBVDNA.¹⁴

Variáveis do estudo:

Bloco 1 – variáveis demográficas: gênero (0=feminino; 1=masculino), idade (referida em anos), tempo de infecção – desde o diagnóstico (em anos, declarada em entrevista),

Bloco 2 – variáveis clínicas e laboratoriais; (valores normais para TGO e TGP: até 19 unidades internacionais (ui) para o gênero feminino e até 30 ui para o gênero masculino)¹⁵ ; APRI (AST/platelet ratio index – índice da razão da aspartato aminotransferase sobre plaquetas) – estimativa dos níveis de APRI e avaliação do seu valor preditivo para os achados histológicos do grau de fibrose no tecido hepático segundo biópsia hepática, controlando fatores de confundimento (variáveis clínicas, laboratoriais e demográficas)¹⁶ ;

Bloco 3 – carga viral da hepatite B crônica (quantificação do HBVDNA), aferida pelos métodos TQM (contínua, com faixa dinâmica de detecção 50 a 10^9 ui/mL) e AMPL (contínua, com faixa dinâmica de detecção de 60 a $\geq 38 \times 10^3$ ui/mL e categorizada). Para uniformizar a classificação da variável e permitir análise de concordância entre os dois métodos, os resultados foram assim categorizados para ambos os métodos: (0) indetectável; (1) entre o limite inferior de detecção de 50 / 60 até 1.999 ui/mL; (2) 2.000 – 19.999 ui/mL; (3) 20.000 – 37.999 ui/mL; (4) ≥ 38.000 ui/mL. Do ponto de vista prático, comparação entre os métodos TQM e AMPL quanto à sua capacidade de detecção das cargas virais em níveis iguais ou superiores a 2.000 ui/mL – faixa aceita nos protocolos nacionais e internacionais para indicação de tratamento antiviral, somente foi realizada após a categorização dos resultados usando esse nível de corte. Para análises estatísticas específicas, a expressão dos níveis de quantificação do HBVDNA em $\log_{10}$ ui/mL foi utilizada com o objetivo de normalizar a distribuição das cargas virais;

Variáveis adicionais provenientes de outros dados da história médica pregressa, coletados por entrevista orientada, foram: etnia (branco, afro-descendente e pardo), via de contágio (sexual, parenteral, vertical, desconhecida), ingestão de etanol (nulo, inferior a 20g/dia, entre 20 e 40g/dia – pacientes com consumo superior a 40g/dia foram automaticamente excluídos da análise), uso prévio de drogas ilícitas (via inalatória e percutânea), transfusão prévia de sangue/hemoderivados, história de piercing/tatuagens, existência de co-morbididades (obesidade, diabetes melitus, hipertensão arterial).

Variável dependente:

Fibrose hepática avaliada por biópsia hepática percutânea avaliando atividade necroinflamatória e fibrose pela classificação METAVIR.¹⁷

Análise dos dados

Os dados coletados foram compilados em um banco de dados anotado em planilha Excel Microsoft™. O tratamento estatístico foi realizado com auxílio do software SAS 9.1.3, Cary – NC, 27513, USA e SPSS 16.0.1, SPSS Inc., Chicago – IL, 60606. Os dados foram tabulados e são apresentados em tabelas de distribuição de frequências e figuras, quando oportunas.

A análise dos dados ocorreu de duas etapas: i) Análise de concordância dos métodos de biologia molecular para quantificação das cargas virais e ii) Análise das associações das cargas virais com fibrose hepática (ajustando por fatores de confundimento).

iii) Concordância dos métodos de aferição de cargas virais:

A análise de concordância dos resultados quantitativos obtidos para a carga viral a partir dos dois testes de biologia molecular utilizados nesse estudo (Amplicor HBV Monitor Roche® e TAQMAN HBV DNA quantitativo em tempo real) foi baseada em concordância bruta e ajustada por chance (índice Kappa), a partir dos resultados pareados categorizados dos pacientes estudados.

O Índice Kappa foi assim classificado: $Kappa=0$, ausência de concordância; $0 < Kappa < 0,20$, concordância pobre; $0,21 < Kappa < 0,40$, concordância considerável/discreta; $0,41 < Kappa < 0,60$, concordância moderada; $0,61 < Kappa < 0,80$, concordância substancial; $0,81 < Kappa < 1,0$, concordância excelente.¹⁸

Para todos os índices Kappa estimados foram calculados os respectivos intervalos com 95% de confiança e nível de significância estatístico (considerado o limite de significância de $p < 0,05$).

iv) Associações das cargas virais com fibrose hepática (ajustando por variáveis selecionadas):

Inicialmente foi estimada e analisada matriz de correlação das variáveis de interesse para avaliar o nível de colinearidade entre elas. Posteriormente, foram avaliadas as associações brutas entre as variáveis de interesse (cargas virais e demais variáveis selecionadas) e fibrose hepática em análises de regressão linear univariada.

Finalmente, modelo de regressão linear multivariada foi utilizado a fim de avaliar a associação independente entre cargas virais e fibrose hepática (contínua), enquanto ajustada por variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais. Nessa etapa, a seleção das variáveis seguiu as seguintes etapas:

- a) As associações entre fibrose hepática e o bloco 1 de variáveis (sexo, idade e tempo de infecção) foram avaliadas em regressão linear multivariada. Variáveis relevantes do bloco 1 foram mantidas no modelo final. A seleção dessas variáveis relevantes foi feita por “método backwards” de seleção de variáveis usando nível de significância de $p < 0,08$ para não exclusão das variáveis.
- b) As associações entre fibrose hepática e cada uma das demais variáveis dos blocos 2 (variáveis clínicas e laboratoriais selecionadas) e 3 (cargas virais aferidas por dois métodos) foram avaliadas, enquanto ajustadas pelas variáveis do bloco 1 fixadas em todos os modelos dessa etapa. As variáveis que resultaram relevantes nessa etapa ($p < 0,10$) foram mantidas para a etapa analítica seguinte e as demais descartadas (manualmente).
- c) Modelo completo para aferir as associações independentes entre fibrose hepática e variáveis relevantes do bloco 2 (variáveis clínicas e laboratoriais selecionadas

na etapa anterior) e bloco 3 (carga viral aferida pelos dois métodos selecionada na etapa anterior) foram avaliadas, enquanto ajustadas pelas variáveis do bloco 1 fixadas em todos os modelos. Variáveis relevantes dos blocos 2 e 3 foram mantidas no modelo final. A seleção dessas variáveis relevantes foi feita por “método backwards” de seleção de variáveis usando nível de significância de $p < 0,08$ para não exclusão das variáveis. Os dois métodos de cargas virais foram avaliados separadamente em todos os modelos de regressão multivariada.

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido (protocolo no. 16/2008) e aprovado em 28 de maio de 2008 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), seguindo a Resolução 196/96 que dispõe sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, emanada pelo Conselho Nacional de Saúde. Todos os participantes consentiram sua participação com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

RESULTADOS

1. Características demográficas e epidemiológicas da população estudada:

Foram identificados cinquenta e quatro pacientes portadores de infecção crônica pelo vírus B da hepatite, HBeAg negativo e anti-HBe positivo durante o período do estudo, com predominância do sexo masculino (n=33, 61,1%) (Tabela 1). A média de idade dos pacientes foi de 41,22 ($\pm 1,53$ DP; limites de 24 a 72) anos. Quanto à cor da pele foram identificados dezenove pacientes brancos (35,2%), quatorze afro descendentes (25,9%) e vinte e um pardos (38,9%). A forma de contágio mais frequentemente referida foi a sexual, citada por 77,8% (n=42) dos casos. A transmissão vertical foi referida por 14,8% (n=8) dos pacientes e outros quatro (7,4%) desconheciam a forma de aquisição da infecção. Não houve relatos de exposição a instrumentos perfuro-cortantes sabidamente contaminados, drogas ilícitas (parenteral ou inalatória), transfusões de sangue e hemoderivados, procedimentos de piercing e tatuagem. A média do tempo de infecção foi de 12,21 ($\pm 1,95$ DP; limites de 0 a 46) anos, entretanto esse dado não estava disponível para 22% (n=12) dos pacientes.

As médias de peso e altura dos pacientes correspondiam a $71,84 \pm 1,74$ (47 – 102) kilogramas e $167,0 (\pm 1,3$ DP; limites de 150 a 180) centímetros, respectivamente. O índice de massa corporal (IMC) médio foi de $25,7 (\pm 0,53$ DP; limites de 19,4 a 33,9) kg/m^2 . Apenas 15% (n=7) dos pacientes apresentavam $30 < \text{IMC} < 35 \text{ kg/m}^2$, sendo classificados como portadores de obesidade grau I (Tabela 1). Nenhum paciente apresentava $\text{IMC} > 35 \text{ kg/m}^2$. As informações referentes a peso, altura e IMC não estavam disponíveis em 13% (n=7) dos pacientes.

Quanto às co-morbidades, um paciente apresentava hipertensão arterial controlada por anti-hipertensivo e outro era portador de diabetes não insulino-dependente compensado. A ausência do consumo de etanol foi relatada por 66,7% (n=36) dos pacientes. Uso esporádico foi relatado por percentuais mais discretos de pacientes: 22,2% (n=12) com consumo inferior a 20g/dia e 11,1% (n=6) entre 20 e 40g/dia (Tabela 1).

2. Características clínicas e laboratoriais da população estudada:

A TGO estava aumentada em 48% (26/54) dos pacientes avaliados, com valor médio de 30,83 [$\pm$ 3,8 desvios padrões (DP); limites de 12 a 211] ui/ml (Tabela 1). A TGO era maior que 19 ui/ml em 71,4% (15/21) dos pacientes do gênero feminino, e maior que 30 ui/ml em 33,3% (11/33) dos pacientes do gênero masculino avaliados. As diferenças entre as médias dos valores aumentados de TGO para os gêneros apresentaram significância estatística ($p=0,0063$).

A TGP se apresentava aumentada em aproximadamente 60% (32/54) dos pacientes estudados, com valor médio de 39,17 ($\pm$ 5,46 DP; limites de 9 a 291) ui/ml (Tabela 1). Os valores séricos relatados para essa variável eram maiores que o considerado normal em 71,5% (15/21) dos pacientes do gênero feminino e em 51,5% (17/33) dos pacientes do gênero masculino avaliados. Para a TGP, as diferenças entre as médias dos valores aumentados para os gêneros não apresentaram significância estatística ($p=0,15$).

Nos pacientes avaliados ($n=45$), a albumina sérica apresentava níveis médios de 4,38 ($\pm$ 0,06 DP; limites de 3 a 5) g/dl. A média do tempo de protrombina era de 13,60 ($\pm$ 0,15 DP; limites de 11 a 16) segundos, com um INR médio de 1,14 ($\pm$ 0,01 DP; limites de 0,9 a 1,38). A média da contagem de plaquetas foi de 221 ($\pm$ 7,31 DP; limites de 105 a 337) $\times 10^3$ céls/mm³ (dados não apresentados). Trombocitopenia (contagem de plaquetas $< 140 \times 10^3$ céls/mm³) foi identificada em apenas dois dos quarenta e oito pacientes que tinham a variável aferida. O índice APRI (AST/platelet ratio index = índice da razão de AST/plaquetas) apresentou valores médios de 0,66 ($\pm$ 0,12 DP; limites de 0,23 a 6,70), entre quarenta e oito pacientes avaliados para esse indicador.

Seguindo a classificação METAVIR os dados de biópsia hepática quanto à atividade da doença (atividade da inflamação = A) e fibrose hepática (fibrose = F) estavam disponíveis para 63% ($n=34$) dos pacientes estudados (Tabela 1). A maioria apresentava baixa atividade inflamatória e pouca fibrose. Nove (26,5%) pacientes biopsiados apresentavam METAVIR $F \geq 2$ e três (8,8%) apresentavam $F=4$, compatível com o diagnóstico de cirrose à microscopia de alta resolução. Quanto à necroinflamação, onze (32,4%) pacientes biopsiados apresentavam METAVIR $A \geq 2$.

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais de portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo (n= 54), Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF), Brasília – DF, 2009

	Média ± desvio padrão (limites mínimos e máximos)	nº de pacientes/total (%)
Idade (anos)	41,22 ± 1,53 (24 – 72)	
Gênero, masculino		33/54 (61%)
Tempo de infecção (anos)	12,21 ± 1,95 (0 – 46)	
Transmissão e contágio ^a		
Vertical		8/54 (14,8%)
Sexual		42/54 (77,8%)
Desconhecida ^b		4/54 (7,4%)
Cofatores para doença hepática		
Obesidade (IMC>30) ^c		7/47 (14,9%)
Diabetes		1/54 (1,8%)
Etanol > 40g/dia		0/54 (0%)
TGO maior que valor normal ^{d†}		26/54(48%)
gênero feminino (n=21)		15/21 (71,4%)
gênero masculino (n=33)		11/33 (33,3%)
TGP maior que valor normal ^{d#}		32/54 (59,2%)
gênero feminino (n=21)		15/21 (71,4%)
gênero masculino (n=33)		17/33 (51,5%)
Achados histológicos METAVIR ^e		
Atividade <2		23/34(67,6%)
Atividade ≥2		11/34 (32,4%)
Fibrose <2		25/34 (73,5%)
Fibrose ≥2		9/34 (26,5%)
Fibrose =4		3/34 (8,82%)

^a determinação da provável forma de transmissão através de questionário orientado

^b não houve relatos de exposição a instrumentos perfuro-cortantes, a transfusões de sangue e hemoderivados, a piercing e tatuagem

^c dados insuficientes para cálculo do IMC em 7 indivíduos

^d valor normal das transaminases por gênero: masculino < 30ui, feminino <19ui

^e biópsia hepática não realizada em 20 indivíduos

[†] a diferença das proporções de homens e mulheres com valores de TGO acima dos limites normais foi estatisticamente significativa (p<0,01)

[#] não houve diferença significativa das proporções de homens e mulheres com valores de TGP acima dos limites normais (p=0,15)

3. Quantificação dos títulos de cargas virais por dois testes de biologia molecular:

A carga viral obtida pela quantificação do HBVDNA dos pacientes estudados (n=54) foi estimada pelos testes TAQMAN (TQM) em 87,0% (n=47) dos pacientes e AMPLICOR (AMPL) em 92,6% (n=50) dos pacientes. Foram obtidos resultados pareados para os dois testes em 80,0% (n=43) dos pacientes

O exame de quantificação do HBVDNA pelo método TQM identificou níveis detectáveis de carga viral em 76,6% (36/47) dos pacientes avaliados. A distribuição dos pacientes segundo categorias de cargas virais mensuradas por esse método foi assim: indetectável = 23,4% pacientes; entre o limite inferior de detecção de 50 até 1.999 ui/ml = 6,4%; entre 2.000 e 19.999 ui/ml = 27,7%; entre 20.000 e 99.999 ui/ml = 17%; entre 100.000 e 999.999 ui/ml = 12,8%; $\geq 1.000.000$ ui/ml = 12,8%.

A transformação logarítmica dos valores de cargas virais, para normalizar sua distribuição, resultou na média correspondente de 3,71 ($\pm 0,36$ DP; limites de 0 a 9) $\log_{10}$ ui/ml. Após a exclusão de dois pacientes com resultados extremos (“outliers”) de quantificação de cargas virais ($>10^9$ ui/ml ou $>1.000.000.000$ ui/ml), a mediana da carga viral TQM foi de 13.782 (Q1=486, Q3=58.395) ui/ml. A transformação logarítmica desses valores de cargas virais, resultou na média correspondente de 3,48 ($\pm 0,33$ DP; limites de 0 a 8) $\log_{10}$ ui/ml (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação do HBVDNA por dois métodos distintos de biologia molecular, em portadores de hepatite B crônica HBeAg negativos (n= 54), HBDF, Brasília – DF, 2009

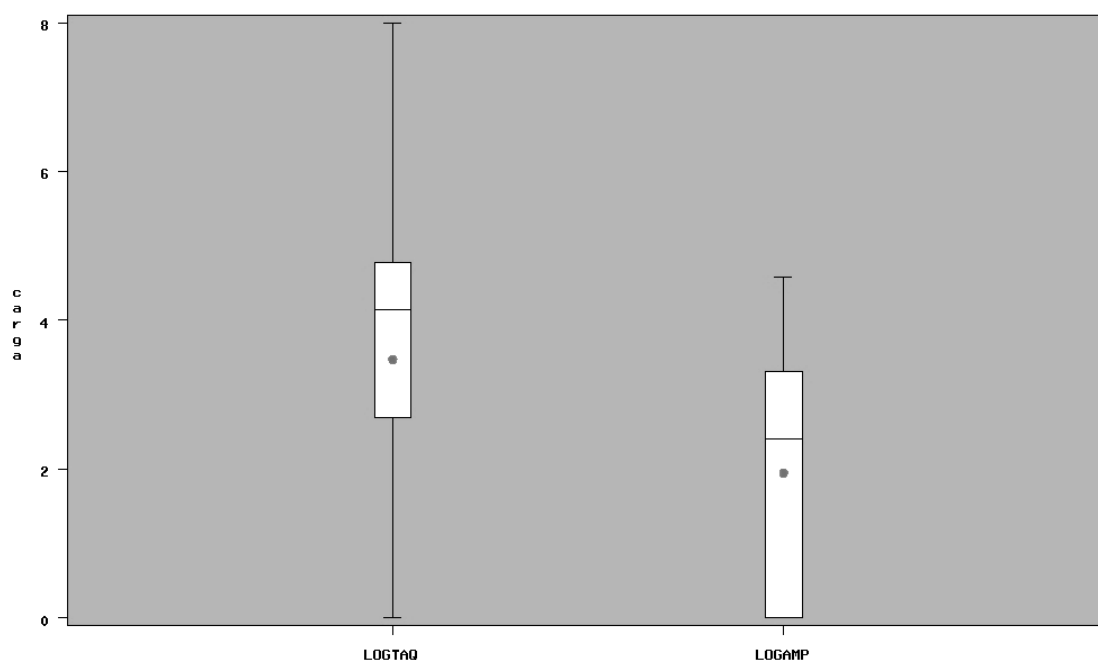
Estatística estimada	AMPLICOR (n=50)	TAQMAN (n=45)*
HBV DNA ≥ 2.000 ui/ml	13/50 (26%)	33/47 (70,2%)
Mediana (ui/ml)	253	13.782
1º quartil (ui/ml)	0	486
3º quartil (ui/ml)	1910	58.395
Estatística estimada	AMPLICOR ($\log_{10}$ ui/ml) (n=50)	TAQMAN ($\log_{10}$ ui/ml) (n=45)*
Limites (mínimo – máximo)	0 – 4,58	0 – 8,00
Média $\pm$ desvio padrão	2,00 $\pm$ 0,24	3,48 $\pm$ 0,33
Variância	2,88	5,07

* duas observações extremas identificadas nos resultados de TAQMAN ($>10^9$ ui/mL ou $>1.000.000.000$ ui/ml) foram excluídas

Dos pacientes submetidos à quantificação do HBVDNA pelo método AMPL, apenas 62% (31/50) obtiveram níveis detectáveis de carga viral. Os pacientes avaliados por esse método foram assim distribuídos quanto às categorias de seus resultados de cargas virais: indetectável = 38%; entre o limite inferior de detecção de 60 a 1.999 ui/ml = 36%; entre 2.000 e 19.999 ui/ml = 18%; entre 20.000 e 37.999 ui/ml = 2%; ≥ 38.000 ui/ml = 6%. A mediana da carga viral foi de 253 (Q1=0, Q3=1910) ui/ml, com uma média correspondente de $2 (\pm 0,24 \text{ DP}; \text{limites de } 0 \text{ a } 4,58) \log_{10} \text{ ui/ml}$ (Tabela 2).

Analisando as distribuições das cargas virais em $\log_{10} \text{ ui/mL}$ obtidas pelos testes AMPL e TQM, observa-se maior dispersão das cargas virais pelo teste TQM quando comparadas àquelas aferidas pelo AMPL ($p < 0.0001$) (Figura 1). Além disso, o 1º quartil, a média, a mediana e o 3º quartil das cargas virais são sistematicamente superiores quando aferidas pelo teste TQM do que quando avaliadas pelo teste AMPL.

Figura 1. Distribuição (média, mediana e quartis) das cargas virais expressas em $\log_{10} \text{ ui/mL}$, aferidas pelos métodos TAQMAN ($n=45^*$) e AMPLICOR ($n=50$) em portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo ($n= 54$), HBDF, Brasília – DF, 2009.^a



^a diferença significativa ($p < 0,0001$) entre as médias (destacadas por pontos) das cargas virais ($\log_{10} \text{ ui/ml}$) pelos métodos TAQMAN [$\text{LOGTAQ} = 3,48 (\pm 0,33 \text{ DP}; \text{limites de } 0 \text{ a } 8)$] e AMPLICOR [$\text{LOGAMP} = 2,00 (\pm 0,24 \text{ DP}; \text{limites: } 0 \text{ a } 4,58)$].

* duas observações extremas identificadas nos resultados de TAQMAN ($>10^9 \text{ ui/mL}$ ou $>1.000.000.000 \text{ ui/mL}$) foram excluídas

4. Análise de concordância dos resultados de quantificação da carga viral por meio de dois testes de biologia molecular:

Para a análise de concordância dos resultados de quantificação da carga viral apenas os pacientes com resultados pareados (exames colhidos no mesmo dia e hora) para os dois testes (n=43), TQM e AMPL, foram considerados. Como referido na metodologia, não houve influência do resultado de um teste sobre outro, pois os laboratórios que realizaram a quantificação do HBVDNA desconheciam o desenho do estudo e a aplicação dos exames pareados.

Aproximadamente 67% (n=29/43) do total dos pacientes submetidos ao teste TQM apresentavam níveis de cargas virais ≥ 2.000 ui/ml, enquanto apenas 18% (n=12/43) apresentavam esses níveis significativos quando a detecção da carga viral fora obtida através do teste AMPL (Tabela 3). A maior proporção de pacientes com quantificação da carga viral ≥ 2.000 ui/ml quando utilizado o teste TQM comparada ao teste AMPL foi estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).

Importante destacar que dos 31 pacientes que obtiveram resultados de cargas virais menores que 2.000 ui/mL pelo teste AMPL, 54,8% (17/31) apresentaram cargas virais clinicamente significativas (≥ 2.000 ui/mL) quando submetidos ao teste TQM (Tabela 3).

Para os quarenta e três pacientes submetidos aos testes AMPL e TQM simultaneamente, biópsias hepáticas estavam disponíveis para análise em 62,8% (n=27) dos casos. Para esses pacientes biopsiados, foram detectados níveis de cargas virais clinicamente significativas (≥ 2.000 ui/ml) em 37% (10/27) e em 92,6% (25/27) das amostras analisadas pela metodologia AMPL e TQM, respectivamente (dados não apresentados).

Além disso, dos 17 pacientes biopsiados que obtiveram resultados de cargas virais inferiores a 2.000 ui/ml pelo teste AMPL, 88,2% (15/17) apresentaram cargas virais clinicamente significativas (≥ 2.000 ui/ml) quando submetidos ao teste TQM.

A análise de concordância das cargas virais foi realizada para um total de 43 pacientes que haviam realizado os dois exames simultaneamente (TQM e AMPL) e foi baseada nas seguintes categorias comuns a ambos os métodos (Tabela 3): (0) indetectável; (1)

entre o limite inferior de detecção de 50/60 até 1.999 ui/ml; (2) entre 2.000 e 19.999 ui/ml; (3) entre 20.000 e 37.999 ui/ml e (4) ≥ 38.000 ui/ml. Também foram consideradas as categorias: (0) carga viral menor que 2.000 ui/ml e (1) ≥ 2.000 ui/ml.

Tabela 3. Distribuição dos pacientes portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo por faixas categorizadas de cargas virais aferidas pelos métodos simultâneos TAQMAN e AMPLICOR. Brasília – DF, 2009

Taqman Faixa (ui/ml)	Amplicor					Total
	Indetectável	60 -- 1.999	2.000 -- 19.999	20.000 -- 37.999	≥ 38.000	
Indetectável	11	0	0	0	0	11
50 -- 1.999	1	2	0	0	0	3
2.000 -- 19.999	0	8	3	0	0	11
20.000 -- 37.999	1	2	2	0	0	5
≥ 38.000	3	3	3	1	3	13
Total	16	15	8	1	3	43

Para as cinco categorias de quantificação das cargas virais (0 - 4), a análise de concordância/discordância entre os testes TQM e AMPL foi realizada pelo índice Kappa (Tabela 4).

Para a categoria (0) de carga viral, a concordância bruta (Cb) e a ajustada por chance (Índice Kappa=K) entre TQM e AMPL foram de Cb=25,6% e de K=73,4% ($p < 0,0001$), respectivamente, indicando concordância substancial. Para categoria (1), observou-se concordância bruta (Cb=4,6%) e Kappa (K=12,0%; $p=0,23$) discretas. De modo semelhante, essa análise se aplica a categoria (2), com Cb=7,0% e K=12,8% ($p=0,39$) consistentemente discretas. Importante ressaltar que para categoria (3) de carga viral, o valor do Kappa resultou negativo (K=-4,0%; $p=0,71$; Cb=0%), indicando que a concordância dos dois testes foi pobre, pior que a concordância esperada ao acaso apenas. Para a categoria (4), houve alguma concordância além do acaso, porém novamente com valores apenas consideráveis (K=29,5%; $p=0,0064$; Cb=7,0%). Ao analisarmos as cinco categorias concomitantemente, os resultados da análise de concordância (Cb=44,2; K=31%) indicam que há concordância considerável entre os métodos de biologia molecular TQM e AMPL ($p < 0,0001$).

O valor do coeficiente Kappa obtido para as categorias binárias de cargas virais, foi 31,5%. Esse valor sugeriu concordância considerável entre os testes TQM e AMPL

avaliados. Através do teste da hipótese nula $K = 0$, obteve-se $p=0,0046$, indicando que o Índice Kappa é estatisticamente diferente (maior) que zero.

Tabela 4. Concordância bruta e ajustada por chance (coeficiente Kappa) para cargas virais aferidas pelos métodos Taqman e Amplicor segundo categorias selecionadas por interesse clínico em portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo atendidos no HBDF, Brasília – DF, 2009

Faixa da carga viral (ui/mL)	Concordância bruta (Cb)	Kappa			Valor de p
		(K)	IC 95%		
(0) Indetectável	25,58	0.7342	0.5231	0.9453	< 0.0001
(1) 50 – 1999	4,65	0.1199	-0.1046	0.3444	0.2311
(2) 2000 – 19999	6,98	0.1279	-0.1896	0.4454	0.3918
(3) 20000 – 37999	0,00	-0.0403	-0.1080	0.0273	0.7136
(4) >= 38000	6,98	0.2951	0.0236	0.5666	0.0064
Total geral	44,19	0.3102	0.1593	0.4610	< 0.0001
< 2000	32,558	0,3149	0.1304	0.4994	0.0046
>= 2000	27,907				

5. Correlações entre títulos de cargas virais e achados clínicos e laboratoriais selecionados da população estudada:

As correlações entre variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais para os portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo variaram principalmente entre ausentes a moderadas (Tabela 5). As cargas virais aferidas pelos métodos TQM e AMPL apresentaram correlação positiva e estatisticamente significativa ($r=0,79$, $p<0,01$). De maneira geral, em relação às cargas virais, observaram-se as seguintes correlações estatisticamente significativas ($p<0,05$): bilirrubina total com as cargas virais aferidas pelo método TQM ($r=0,33$) e pelo método AMPL ($r=0,48$) apresentaram moderada correlação positiva, assim como fibrose com as cargas virais aferidas pelo método AMPL ($r=0,38$). A fibrose apresentou, ainda, correlação positiva com a idade ($r=0,43$, $p<0,05$), com o APRI ($r=0,39$, $p<0,05$), com a bilirrubina total ($r=0,68$, $p<0,01$) e com atividade ($r=0,54$, $p<0,01$); e correlação inversa com as plaquetas ($r=-0,62$, $p<0,01$).

Tabela 5. Matriz de correlação entre variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais selecionadas para portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo, HBDF, Brasília – DF, 2009

Variável	Sexo	Idade	Tempo de infecção	IMC	Carga viral Taqman [#]	Carga viral Amplicor [#]	Plaquetas	AST	ALT	APRI	Albumina	Bilirrubina total	Tempo de protrombina	Fibrose
Idade	0,103													
Tempo de infecção	0,169	-0,209												
IMC	0,281 [*]	0,054	0,166											
Carga viral Taqman [#]	-0,002	-0,138	0,280	0,273										
Carga viral Amplicor [#]	-0,042	0,069	0,036	0,069	0,787 ^{**}									
Plaquetas	0,224	-0,152	-0,211	0,268 [*]	-0,250	-0,233								
AST	-0,115	0,261	-0,075	0,127	0,202	0,135	-0,375 ^{**}							
ALT	-0,186	0,200	-0,113	0,112	0,153	0,105	-0,364 ^{**}	0,934 ^{**}						
APRI	0,029	0,300 [*]	-0,009	0,126	0,180	0,160	-0,460 ^{**}	0,969 ^{**}	0,890 ^{**}					
Albumina	-0,335 [*]	-0,015	-0,202	-0,085	0,065	0,291	-0,043	-0,032	0,352 [*]	-0,103				
Bilirrubina total	-0,238	-0,040	0,076	-0,079	0,326 [*]	0,476 ^{**}	-0,489 ^{**}	0,274	0,260	0,292	0,386 [*]			
Tempo de protrombina	-0,061	0,015	0,326	-0,105	0,226	-0,037	-0,400 ^{**}	0,115	0,022	0,186	-0,005	0,365 [*]		
Fibrose	-0,094	0,435 [*]	0,182	0,114	0,235	0,378 [*]	-0,619 ^{**}	0,316	0,289	0,392 [*]	0,073	0,685 ^{**}	0,231	
Atividade	0,095	0,231	-0,125	-0,065	-0,025	0,215	-0,336	0,263	0,312	0,312	0,325	0,367	0,050	0,537 ^{**}

*p<0,05 (2-tailed), **p<0,01 (2-tailed), # cargas virais expressas em log₁₀ ui/mL

6. Associações existentes entre os títulos de cargas virais e fibrose, ajustando por variáveis clínicas e laboratoriais selecionadas, na população alvo:

Como descrito, para análise das variáveis que independentemente estão associadas à fibrose, dois modelos de análise de regressão linear foram estudados: modelo “1” contendo as cargas virais aferidas pelo método TQM e modelo “2” contendo as cargas virais aferidas pelo método AMPL. Em ambos os modelos, as cargas virais foram expressas em log₁₀ ui/mL e consideradas como “variável independente”.

Inicialmente, modelos de regressão linear univariada foram estimados para todas as variáveis de interesse, a saber: idade, sexo, tempo de infecção, carga viral aferida pelo TQM, carga viral aferida pelo AMPL, plaquetas, bilirrubina total, atividade (A1-A4) Metavir, TGP, TGP, APRI, albumina, tempo de protrombina, creatinina sérica e IMC.

Devido ao pequeno número de indivíduos (n=27 a 25) disponível para as análises multivariadas, o nível de significância estatística de $p < 0,08$ foi aceito.

As variáveis que se associaram significativamente a fibrose ($p < 0,08$) na análise bruta foram: idade ($\beta = 0,05$, $p = 0,01$); plaquetas ($\beta = 0,01$, $p < 0,001$); bilirrubina total ($\beta = 4,14$, $p < 0,001$); atividade ($\beta = 1,15$, $p = 0,001$); APRI ($\beta = 0,45$, $p = 0,022$) e carga viral AMPL ($\beta = 0,33$, $p = 0,039$) (Tabela 6, modelos univariados). A idade se destacou como a variável demográfica com maior significância estatística. Essa variável, foi, então, usada para ajustar as demais variáveis laboratoriais e histológicas nos demais modelos de regressão multivariada.

Tabela 6. Análise regressão linear univariada e multivariada entre fibrose (variável dependente) e variáveis demográficas, laboratoriais e clínicas selecionadas em portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo, HBDF, Brasília – DF, 2009*

Variável (Unidade)	Modelos Univariados		Modelo Multivariado 1 (n=25)				Modelo Multivariado 2 (n=27)			
	Beta	p	Beta	IC 95%		p*	Beta	IC 95%		p*
Idade (anos)	0,048	0,010	0,051	0,024	0,078	0,001	0,039	0,011	0,067	0,009
Gênero	-0,249	0,596	-	-	-	-	-	-	-	-
Tempo Infecção (anos)	0,016	0,363	-	-	-	-	-	-	-	-
Plaquetas (células/mm ³)	0,015	<0,001	-0,007	-0,014	0,000	0,038	-0,008	-0,015	0,000	0,039
Bilirrubina Total (mg/dl)	4,145	<0,001	1,689	-0,132	3,511	0,067	2,791	1,022	4,560	0,003
Atividade (A1-A4) Metavir	1,155	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-
TGO (ui/mL)	0,012	0,069	-	-	-	-	-	-	-	-
TGP (ui/mL)	0,008	0,097	-	-	-	-	-	-	-	-
APRI	0,447	0,022	-	-	-	-	-	-	-	-
Albumina (g/dL)	0,200	0,705	-	-	-	-	-	-	-	-
Protrombina (segundos)	0,259	0,236	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatinina (mg/dl)	-0,347	0,787	-	-	-	-	-	-	-	-
IMC	0,022	0,520	-	-	-	-	-	-	-	-
Carga Viral TQM	0,235	0,202	0,186	-0,006	0,379	0,057	<u>Nao incluída</u>			
Carga Viral AMPL	0,333	0,039	<u>Nao incluída</u>				-	-	-	-

*Variáveis independentes associadas significativamente com a fibrose. O valor de $p < 0,08$ foi aceito para análise de significância estatística devido ao pequeno número de indivíduos disponível para análise multivariada 1 e 2 (n=25 e 27), respectivamente.

No modelo de regressão linear multivariada 1 (onde a variável carga viral aferida pelo TQM foi incluída), idade ($\beta = 0,05$, $p = 0,001$), plaquetas ($\beta = -0,007$, $p = 0,038$) e bilirrubina total ($\beta = 1,69$, $p = 0,067$) foram variáveis independentes que se associaram significativamente com a fibrose. Nesse modelo, a carga viral aferida pelo método de TQM apresentou significância estatística marginal ($\beta = 0,186$, $p = 0,057$) como variável independente associada com a fibrose entre os pacientes portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo estudados (Tabela 6).

No modelo de regressão linear multivariada 2 (onde a variável carga viral aferida pelo AMPL foi incluída), as mesmas variáveis mantiveram-se associadas à fibrose [idade ($\beta=0,04$, $p=0,009$), plaquetas ($\beta=-0,008$, $p=0,04$) e bilirrubina total ($\beta=2,79$, $p=0,003$)] exceto pela carga viral. Nesse modelo, a carga viral aferida pelo método AMPL não apresentou associação significativa com a fibrose para os pacientes portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo estudados e foi, portanto, retirada do modelo estatístico (Tabela 6).

Reavaliando o modelo de regressão linear multivariada após exclusão de dois indivíduos com cargas virais superiores a $9 \log_{10}$ ui/mL quantificadas pela metodologia TQM, considerados “outliers”, idade, plaquetas e bilirrubina total, foram mantidas como variáveis independentes que impactaram significativamente na fibrose. Entretanto, a carga viral TQM não mais atingiu significância estatística (Tabela 7).

Tabela 7. Análise regressão linear univariada e multivariada para carga viral TAQMAN expressa em $\log_{10}$ ui/mL, após exclusão de duas observações extremas (“outliers”), em portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo, HBDF, Brasília – DF, 2009

Variável (unidade)	Modelo Univariado		Modelo multivariado (n=23)			
	BETA	p	B	IC 95%		p*
Idade (anos)	0,036	0,067	0,033	0,004	0,062	0,029
Gênero	-0,567	0,207	-	-	-	-
Tempo Infecção (anos)	0,016	0,363	-	-	-	-
Carga viral TQM	0,095	0,521	-	-	-	-
Plaquetas (células/mm ³)	-0,014	<0,001	-0,007	-0,014	0,000	0,054
Bilirrubina Total (mg/dL)	3,808	<0,001	2,839	1,095	4,583	0,003
Atividade (A1-A4) Metavir	1,050	0,004	-	-	-	-
TGO (ui/mL)	0,009	0,154	-	-	-	-
TGP (ui/mL)	0,007	0,126	-	-	-	-
APRI	0,327	0,096	-	-	-	-
Albumina (g/dL)	0,025	0,966	-	-	-	-
Protrombina (segundos)	0,232	0,211	-	-	-	-
Creatinina (mg/dL)	1,084	0,517	-	-	-	-
IMC	0,019	0,564	-	-	-	-

* variáveis independentes que impactam significativamente na fibrose. O valor de $p<0,08$ foi aceito para análise de significância estatística devido ao baixo número de indivíduos disponível para análise.

DISCUSSÃO

1. Relevância da população estudada

Esse é o primeiro estudo com pacientes portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo do DF que avaliou a concordância entre a quantificação da carga viral (HBVDNA) aferida por meio de duas técnicas de reação de cadeia da polimerase (PCR), a saber: Amplicor HBV Monitor Roche® (AMPL) – realizado na rede pública por meio do Laboratório Central (LACEN) da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES-DF), e TAQMAN em tempo real (TQM) preparada em laboratório da rede privada do DF e encaminhado para São Paulo.

2. Motivação para o estudo de pacientes portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo e da concordância entre dois testes de biologia molecular

O primeiro relato consistente de marcadores sorológicos do HBV em população de indivíduos doadores de sangue sintomáticos na região geoeconômica no DF mostrou prevalência de 0,55% do HBsAg.¹⁹ Entre os voluntários, 15,2% eram portadores HBeAg positivo e 73,2% HBeAg negativo.

Recentemente, o Inquérito de Prevalência de Base Populacional dos Marcadores Sorológicos das Hepatites A, B e C nas capitais do Brasil, estimou a prevalência dos marcadores sorológicos do HBV para as algumas macro-regiões da federação.²⁰ Para o DF a prevalência estimada do anti-HBc e do HBsAg para faixas etárias de 10 a 19 anos e 20 a 69 anos, foi de 8,3% e 1,1%, e de 0,4% e 0,2%, respectivamente.

Em 2007, no início da implementação dos exames de quantificação do HBVDNA via LACEN/SES-DF, a população de portadores de hepatite B crônica acompanhada no ambulatório de referência do Hospital de Base do DF (HBDF), recebeu resultados persistentemente baixos ou indetectáveis de cargas virais, a despeito da presença de marcadores claros de atividade da doença: transaminases flutuantes ou persistentemente aumentadas, e achados histológicos de necroinflamação e/ou fibrose na biópsia hepática

(comunicação pessoal). A identificação desses achados, combinada a uma ampla revisão da literatura pertinente, motivou a realização do presente estudo.

3. Principais resultados das análises de concordância

Para analisar a confiabilidade dos resultados de cargas virais (AMPL) fornecidos pelo LACEN/SES-DF, o presente estudo avaliou a concordância dos resultados relatados após o pareamento de nova quantificação do HBVDNA pelo método TQM em laboratório da rede privada, com especial interesse nos relatos iniciais de indetectabilidade ou baixas quantificações da viremia do HBV nos portadores de infecção crônica pela forma HBeAg negativo.

4. Principais aspectos que influenciam a indicação de tratamento da hepatite B crônica HBeAg negativo e a avaliação da eficácia terapêutica: transaminases, achados histológicos e cargas virais

O portador de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo será considerado candidato ao tratamento quando apresentar TGP flutuante ou persistentemente elevada, acompanhada de achados histológicos de necroinflamação/fibrose e carga viral detectável ≥ 2.000 ui/mL.^{21, 22} Portanto, destaca-se a seguir, a relevância do monitoramento dos valores da TGP, da observância dos achados histológicos em biopsia hepática relevantes quando disponíveis, e da quantificação da carga viral por metodologia de biologia molecular adequada.

4.1. Transaminase glutâmico pirúvica (TGP)

No presente estudo optamos por considerar valores de normalidade das transaminases como aqueles referidos por Prati e colaboradores.¹⁵ A estratégia de otimizar valores de referência para as transaminases, visando indicação de tratamento para a hepatite B crônica, é preconizada pelas diretrizes terapêuticas internacionais.^{21, 22}

Poucos estudos avaliaram adequadamente o impacto na prática clínica da adoção dos novos valores de referência da TGP para classificação dos pacientes para tratamento. El-Zayadi e colaboradores observaram uma redução no número de pacientes que

preenchiam critérios para indicação de biópsia hepática quando a TGP obedecia aos novos valores de referência – de 25% para 21,2% da população portadora de HBV.²³

Analisando o comportamento das transaminases para a população do presente estudo, houve uma maior prevalência do aumento da TGP (60%) quando comparado com a TGO (48%). A maior frequência de elevação da TGO em níveis estatisticamente significativos para o gênero feminino diverge do observado por Pítton e colaboradores, que descreveu maior prevalência dessa alteração bioquímica para o gênero masculino.²⁴

Ainda que o papel da TGP flutuante ou persistentemente elevada seja considerado relevante para a instituição do tratamento em paciente portador de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo, o presente estudo não foi capaz de demonstrar associação significativa entre marcadores de atividade da doença (TGO e TGP) e fibrose, mensurada pela biópsia. Inicialmente uma associação bruta marginalmente não significativa ($p=0,069$ para AST e $p=0,097$ para TGP), perdeu significância nos modelos ajustados. Isso pode ter ocorrido devido ao baixo poder estatístico da análise ($n= 27$ e 25), ou devido a flutuações naturais das medidas de ALT ao longo do acompanhamento.

4.2. Achados histológicos de necroinflamação/fibrose

A avaliação histopatológica do tecido hepático através da biópsia hepática é considerada a forma mais específica de avaliar os danos resultantes da infecção crônica pelo HBV, possibilitando a graduação da atividade necroinflamatória, o estadiamento da fibrose e a detecção de eventuais doenças associadas.²⁵ Mesmo não havendo consenso quanto à indicação universal desse procedimento invasivo, que pode apresentar complicações (dor, sangramento, coleperitônio, hematoma subcapsular e hipotensão arterial, entre outras) em até 1% dos pacientes, a biópsia hepática é rotineiramente empregada em pacientes com elevações persistentes ou flutuantes da TGP. Mesmo em pacientes com TGP persistentemente normal, Lai e colaboradores demonstraram que até 37% deles apresentavam achados significativos de atividade da doença à biópsia hepática, fortalecendo a indicação de tratamento. A maioria apresentava idade superior a 40 anos e TGP próxima à normalidade.²⁶

Em reunião de consenso coordenada pela Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH), a indicação de biópsia hepática para portadores de infecção crônica pelo HBV só obteve 48% de aceitação entre os especialistas consultados, não sendo consenso biopsiar todo paciente nesse grupo.²⁷ Especificamente para pacientes portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo, com transaminases persistentemente normais e níveis séricos elevados de HBV DNA acima de 2.000 ui/mL, os especialistas foram consensuais em afirmar que a biópsia hepática deve ser realizada, preferencialmente por via percutânea, com ou sem o auxílio da ultrassonografia.

No presente estudo, mesmo com a média de idade de 41,9 anos, e na vigência de TGP normal em apenas 40% dos indivíduos estudados (29,5% das mulheres e 49,5% dos homens), apenas 63% dos pacientes foram submetidos à biópsia hepática diagnóstica. Objetivamente, achados histológicos clinicamente significativos de fibrose ($F \geq 2$), pela classificação METAVIR estavam presentes em 35% (12/34) dos pacientes biopsiados, sugerindo que na população fonte de pacientes com indicação de biópsia, mais de um terço deles apresentam achados clinicamente significativos de doença histologicamente ativa, a despeito da normalidade da TGP. Torna-se difícil generalizar esses resultados para pacientes não biopsiados devido ao possível viés de indicação do procedimento.

Por ser método considerado padrão-ouro por sua alta especificidade para estimar a intensidade (necro-inflamação) e a severidade (fibrose) da doença, que são resultantes diretas do tempo de exposição à infecção pelo HBV, a biópsia hepática é habitualmente indicada para casos que preencham critérios claros para o procedimento – TGP flutuante ou persistentemente elevada, acompanhada de níveis detectáveis de carga viral ≥ 2.000 ui/mL.

Como também não é isenta de vieses, a maior dificuldade em considerar as informações disponíveis pelo método reside nos possíveis erros de aferição ou de classificação dos achados histológicos. Quando realizada em apenas um lobo hepático pela via percutânea guiada ou não por ecografia pode haver discrepância quanto ao estadiamento da doença comparativamente com o outro lobo hepático não avaliado. Mesmo quando a biópsia é realizada em ambos lobos – por via laparoscópica, podem existir divergências importantes quanto à necroinflamação e fibrose em 24% e 33% dos pacientes, respectivamente.²⁸

Por apresentar estas limitações, e devido à probabilidade de falsos negativos (sugerindo baixa sensibilidade), faz-se necessário agregar parâmetros complementares que norteiem a tomada de decisão terapêutica nos casos de pacientes portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo, especialmente através do uso de metodologia de quantificação do HBVDNA sensível e precisa.

4.3. Cargas virais

4.3.1. Relevância das cargas virais para apoio à decisão terapêutica e monitoramento da eficácia terapêutica

Além de ser considerada fundamental para a indicação de tratamento do portador de hepatite B crônica HBeAg negativo a carga viral realizada por metodologia confiável de biologia molecular apresenta aplicabilidade clínica adicional.^{21, 22}

As diretrizes terapêuticas das variadas sociedades nacionais e internacionais para o estudo das doenças do fígado, incluindo a Sociedade Brasileira de Hepatologia, preconizam que a eficácia da terapia antiviral para a hepatite B crônica deve ser avaliada através de marcadores sorológicos e determinação dos níveis séricos das transaminases e da carga viral do HBV. Ainda, essas sociedades são consensuais ao afirmar que o monitoramento da viremia através da quantificação do HBVDNA no soro ou plasma é a forma mais direta e confiável de avaliar a resposta favorável a determinado tratamento.

Entretanto, a determinação da carga viral como parâmetro para indicação terapêutica no período pré-tratamento eventualmente pode ser questionada, uma vez que os portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo habitualmente cursam com menor viremia do que os pacientes HBeAg positivo. Não obstante, Papatheodoridis e colaboradores demonstraram que indivíduos com carga viral superior a 20.000ui/mL apresentavam frequentemente elevação da TGP.²⁹ Nesse grupo, aproximadamente 85% dos pacientes tiveram a confirmação da indicação do tratamento após realização de biópsia hepática, pois apresentavam achados clinicamente significativos de fibrose (F≥2). Os mesmos autores demonstraram que mesmo nos indivíduos com viremia

<2.000ui/mL, mas apresentando TGP persistentemente elevada, a indicação para o tratamento seria confirmada em 68% dos submetidos à biópsia, afirmando que a quantificação da carga viral não pode ser considerada isoladamente no contexto de acompanhamento e tratamento dos portadores de hepatite B crônica.

A queda rápida e sustentada dos níveis de carga viral em pacientes que estão em tratamento antiviral demonstrou ser fator preditivo de resultado favorável e sustentado ao final do mesmo.³⁰⁻³⁵ A quantificação absoluta e contínua dos níveis de HBVDNA pode prever, ainda, o desenvolvimento de resistência aos nucleos(t)ídeos análogos.³⁶ A emergência de resistência parece mais prevalente em não respondedores aos antivirais orais com manutenção de níveis detectáveis de carga viral após 24 ou 48 semanas de introdução da droga.³⁷⁻³⁹

Assim, os testes quantitativos para a determinação da carga viral do HBV constituem ferramenta indispensável para indicar e monitorar, juntamente com outros marcadores sorológicos e bioquímicos, o tratamento da hepatite B crônica. Muito importante para essa etapa do acompanhamento clínico é a confiabilidade e segurança dos métodos utilizados de biologia molecular e sua capacidade de fornecer resultados em valores absolutos dentro de uma escala de ampla linearidade.

4.3.2. Cargas virais aferidas pelos métodos AMPL e TQM

O método AMPL de quantificação do HBVDNA por PCR vem sendo amplamente utilizado na rede pública de laboratórios oficiais no Brasil. Validado para utilização exclusiva com plasma ou soro humano, separados com anticoagulante, quando aplicado a outro tipo de amostra pode dar origem a resultados falsos negativos ou falsos positivos. A obtenção de resultados fidedignos está dependente da execução de procedimentos adequados de coleta, transporte, armazenamento e processamento das amostras. A detecção do HBVDNA depende, ainda, do número de partículas virais presentes na amostra, e pode ser afetada pelos métodos de coleta utilizados e por fatores inerentes ao próprio paciente (idade, presença de sintomas ou estágio da infecção).

Embora raras, as mutações dentro da região altamente conservada do genoma viral coberta pelos iniciadores e/ou sonda do Teste AMPLICOR HBV Monitor podem resultar na subquantificação ou na não detecção do vírus.

O método TQM de quantificação do HBVDNA por PCR vem sendo usado na rede privada do Brasil, para detecção do vírus da Hepatite B (HBV) circulante. A metodologia TQM foi utilizada no presente estudo valendo-se da reação de cadeia de polimerase com detecção simultânea por fluorescência gerada a partir da atividade “5’-Exonuclease” da Taq DNA polimerase sobre sondas Tipo TaqMan – FAM . A quantificação é realizada utilizando-se curva padrão de DNA e analisada por regressão logarítmica.^{10,11}

É considerado marcador mais sensível de replicação viral em portadores de hepatite B crônica, nos casos de positividade isolada para o anti-HBc (anti-HBs e HBsAg negativos) e também para a detecção de alguns mutantes que apresentam importantes modificações no HBsAg e no HBeAg, fazendo com que não sejam detectados pelos métodos imunodiagnósticos. Ainda, pode ser usado como marcador de resposta ao tratamento antiviral da doença.¹²

A análise pareada comparando os testes baseados na metodologia TQM em relação ao AMPL em pacientes portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo mostrou diferenças significativas (estatística e clinicamente). Resumidamente, os resultados do presente estudo indicaram maior positividade da quantificação de cargas virais aferidas pelo método TQM (67% HBVDNA ≥ 2.000 ui/ml) quando comparada ao teste AMPL (18% HBVDNA ≥ 2.000 ui/ml). Além disso, os resultados da quantificação de cargas virais aferidas pelo método TQM indicam maior habilidade discriminativa acima do limite 38.000ui/ml, variando de 0 a 1.000.000.000 ui/ml (ou de 0 a 9,00 $\log_{10}$ ui/ml), enquanto que o método AMPL varia de 0 a um limite máximo de 38.000 ui/ml (ou de 0 a 4,58 $\log_{10}$ ui/ml). Como consequência, e considerando 4 categorias de cargas virais, foi estimada concordância bruta de apenas 44,2% e ajustada por chance (Kappa) de 31,0% (IC95%: 15,9% a 46,1%) entre os dois testes, quando aplicados pareados, na população de estudo.

4.3.3. Importância da capacidade dos testes em discriminar indivíduos apresentando carga viral em níveis clinicamente significativos HBV DNA ≥ 2.000 ui/ml

Com a crescente sensibilidade dos testes de biologia molecular para quantificação do HBVDNA, pacientes que previamente foram classificados como portadores inativos da doença devido ao uso de testes menos sensíveis, serão adequadamente reclassificados com portadores de doença crônica ativa (HBVDNA ≥ 2.000 ui/ml), podendo, então serem considerados reais candidatos à terapêutica.⁴⁰

4.3.4. Importância em discriminar cargas virais acima do limite de 38.000ui/ml imposto pela metodologia AMPL

Uma das dificuldades na prática clínica diária de se confiar na quantificação da carga viral estimada pelo método AMPL reside na interrupção da quantificação da carga viral acima do limite máximo de 38.000 ui/ml. A incapacidade do método em quantificar a carga viral acima desse limite superior de detecção é crítica para a decisão terapêutica uma vez que o acompanhamento da resposta virológica aos antivirais disponíveis para o tratamento da infecção crônica pelo HBV fica prejudicado, sobremaneira nos casos em que se utilizam os análogos nucleos(t)ídeos orais (ANs) que, atualmente, representam a primeira escolha para o tratamento dos portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo.

No presente estudo, o método TQM de quantificação do HBVDNA por PCR apresentou detectabilidade até o nível máximo de 9 log₁₀ ui/ml (ou 100.000.000 ui/ml). A falta de linearidade do teste AMPL pode sugerir limitação importante para sua ampla aplicação na prática clínica diária, com uso restrito ao diagnóstico de replicação viral, por vezes impreciso – como demonstrado na presente coorte. O método TQM facilita, inclusive, o acompanhamento criterioso da resposta virológica aos antivirais, uma vez que a quantificação repetida do HBVDNA durante eventual tratamento forneceria valores absolutos de viremia. Sua aplicabilidade não seria restrita, por isso, ao pré-tratamento quando se avalia a replicação viral e a candidatura do portador de hepatite B crônica à terapia.

Chen e colaboradores avaliaram a evolução natural da hepatite B crônica demonstrando que uma carga viral alta no início do acompanhamento clínico, está claramente associada à maior prevalência de cirrose hepática, de descompensação da cirrose e da complicação pelo carcinoma hepatocelular no longo prazo, justificando a necessidade da quantificação da viremia em valores absolutos por metodologia sensível desde o início do acompanhamento dessa população específica de pacientes.^{7,8}

Kohmoto e colaboradores demonstraram que o acompanhamento do tratamento de pacientes portadores de hepatite B crônica com a metodologia TQM com PCR em tempo real é superior a outros métodos de quantificação do HBVDNA como o AMPL, a amplificação mediada por transcrição (TMA), e DNA de cadeia ramificada (bdNA).⁴¹ Na presença de correlação significativa entre os métodos avaliados, demonstraram que todas as alíquotas de soro disponíveis avaliadas pelo método TQM apresentavam níveis detectáveis do HBVDNA. Todavia, a carga viral estava indetectável em 9%, 14% e 18% das alíquotas submetidas aos três outros testes estudados, respectivamente. Concluíram, portanto, que havia nítida vantagem em se usar a metodologia TQM em tempo real para monitoramento da infecção e detecção precoce de variantes resistentes ao tratamento.

A experiência clínica tem mostrado que a resposta terapêutica da hepatite B crônica aos antivirais pode variar em função dos níveis iniciais de carga viral pré-tratamento. A adequada quantificação do HBVDNA pode direcionar, inclusive, a indicação da alfapeginterferona ou dos nucleos(t)ídeos análogos para o tratamento da enfermidade. Pacientes com viremias até 7 log₁₀ ui/ml tendem a apresentar resposta favorável ao uso da alfapeginterferona, enquanto aqueles com viremias mais elevadas apresentam melhor resposta aos antivirais orais.⁴²⁻⁴⁴ Nessa situação, os valores absolutos de cargas virais podem influenciar diretamente a escolha do antiviral a ser utilizado para parcela específica de uma dada população de pacientes com hepatite B crônica HBeAg negativo.

Além disso, o adequado monitoramento da redução dos níveis de HBVDNA no soro permite o acompanhamento da resposta virológica durante o tratamento da hepatite B crônica. Iniciada a terapia com alfapeginterferona, a redução da carga viral a níveis inferiores à 20.000ui/ml na 12ª semana pode ser considerada preditiva de uma maior

chance de resposta sustentada ao tratamento.^{45,46} Ainda, permite a detecção precoce do surgimento de resistência viral, em especial quando aplicado sistematicamente no primeiro semestre ou primeiro ano de tratamento.⁴⁷

Mesmo para os estudos que avaliaram taxas de resistência viral aos análogos núcleos(t)ídeos orais, a quantificação do HBVDNA em valores lineares absolutos por testes de biologia molecular em tempo real PCR demonstraram diferenças claras entre aqueles que têm cargas virais detectáveis na semana 48 de tratamento quando comparados aos portadores de cargas virais indetectáveis.^{48,49} Quando uma população de pacientes em tratamento atinge o fim do primeiro ano de terapia e apresenta HBVDNA inferior a 200 ui/ml, apenas 4% desenvolverá cepas resistentes aos antivirais. Se o HBVDNA apresenta níveis detectáveis entre 200-200.000 ui/ml, 26% dos pacientes desenvolve resistência. E, quando a carga viral apresenta níveis superiores a 200.000 ui/ml na 48ª semana de tratamento, a resistência ao antiviral pode se manifestar em até 67% dos casos, demonstrando que é recomendável o uso de testes que apresentem linearidade nos seus resultados e não apenas cortes convencionados de titulação como o teste AMPL utilizado na rede SUS do DF.

4.3.5. Associações entre fibrose e cargas virais e outras variáveis explicativas

No presente estudo, em portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo, foi observada associação estatisticamente significativa e independente entre idade e fibrose ($p=0,001$), e entre plaquetas e fibrose ($p=0,038$). Além disso, bilirrubina total ($p=0,067$) e cargas virais aferidas pelo método TQM ($p=0,057$) apresentaram associações marginais com fibrose.

A hepatite B não pode ser adequadamente classificada com confiabilidade baseando-se apenas em aferições isoladas de variáveis que se correlacionam com atividade da doença e fibrose, mas em testagem seriada das aminotransferases e periódica quantificação do HBVDNA, particularmente para portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo. A dosagem isolada de TGP dentro dos parâmetros de normalidade é geralmente indicativa de doença inativa (portador inativo), ou da fase de imunotolerância e pode afetar sobremaneira a decisão pela biópsia hepática ou pelo tratamento.²⁵

Os valores absolutos da TGP parecem ser mais importantes do que a relação existente com os valores de normalidade de um determinado centro, pois os valores distribuídos próximos aos limites superiores das referências atuais de normalidade podem estar associados a risco aumentado de dano histológico e progressão da doença.⁵⁰

Porque o tempo de infecção em pacientes diagnosticados com hepatite B crônica é de difícil aferição, uma vez que poucos se recordam de episódio agudo ou do período de exposição ao HBV, fatores associados à linha de tempo como idade do paciente e tempo (em anos) desde o diagnóstico sorológico são substitutos eventuais que buscam melhor caracterizar essa variável. Algumas variáveis, entre elas a idade do paciente e o tempo de infecção podem modificar, ainda, o risco de evolução para o carcinoma hepatocelular nessa população específica de portadores de hepatite B crônica.⁵¹

Particularmente, testes laboratoriais na visita inicial podem corroborar as estimativas do tempo de infecção, pois sofrem alterações dos seus valores dentro da evolução natural da doença. Aminotransferases, bilirrubina total e frações, proteína total, albumina, creatinina, contagem de plaquetas, tempo de protrombina e alfafetoproteína podem, direta ou indiretamente, ter valor preditivo para doença avançada ou descompensação hepática. Habitualmente, as variáveis que apresentam correlação positiva com fibrose são as provas laboratoriais que estimam função hepática residual: baixa albumina sérica, tempo de protrombina alargado, hiperbilirrubinemia e trombocitopenia.⁵²

Trombocitopenia na avaliação laboratorial inicial ou piora da contagem plaquetária ao longo do acompanhamento dos pacientes com hepatite B crônica podem apresentar maior sensibilidade como marcadores de progressão da doença e da fibrose quando comparados a outras variáveis de aferição única. Ainda, a contagem plaquetária pode ser associada a outras variáveis para composição de ferramentas não-invasivas (marcadores não-invasivos) a fim de estimar a extensão da doença e fibrose como a fórmula APRI=AST to platelet ratio index ($[\text{AST}/\text{limite superior da normalidade}] \div [\text{contagem plaquetária}/1000] \times 100$, onde $\text{AST}=\text{TGO}$).⁵³ Ainda que esse índice apresente moderada acurácia em estimar e prever fibrose em uma aferição única torna-se útil na monitorização longitudinal da progressão da doença.

A associação marginal encontrada entre as cargas virais aferidas pelo método TQM e fibrose, pode reforçar a idéia de maior utilidade da quantificação do HBVDNA pela metodologia TQM do que pela metodologia AMPL.

Em conclusão, o presente estudo encontrou diferença substancial entre as quantificações do HBVDNA pelos métodos AMPL e TQM, com grande vantagem de discernimento para esta última. Nossos resultados apontam que a atual metodologia empregada no atendimento público do DF fornece informações limitadas ao paciente e ao profissional de saúde responsável pelo seu atendimento, impedindo decisões terapêuticas melhor embasadas.

REFERÊNCIAS

1. Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 47-58.
2. McMahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2005; 25(Suppl 1): 3-8.
3. Manno M, Cammà C, Schepis F, Bassi F, Gelmini R, Giannini F, Miselli F, Grottola A, Ferretti I, Vecchi C, De Palma M, Villa E. Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: morbidity and mortality after 30 years. *Gastroenterology* 2004; 127(3): 756-63.
4. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2006; 43: S173-181.
5. Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *Journal Viral Hepat* 2000; 4: 258-67.
6. Manesis EK, Papatheodoridis GV, Sevastianos V, Cholongitas E, Papaioannou C, Hadziyannis SJ. Significance of hepatitis B viremia levels determined by a quantitative polymerase chain reaction assay in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(10): 2261-7.
7. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006; 130: 678-686.
8. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73.
9. Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Perez RM, Ceci L, Pannain VL, Nogueira CM, Segadas-Soares JA, Coelho HS. HBV-DNA levels in HBsAg-positive blood donors and its relationship with liver histology. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41(2):194-8.
10. Mitsunaga S, Fujimura K, Matsumoto C, Hirakawa S, Nakajima K, Tadakoro K, Juji T – High Throughput HBV DNA and HCV RNA detection system using a nucleic acid purification robot and real-time detection PCR: its application to analysis of transfusion hepatitis. *Transfusion* 2002; 42:100-106.
11. Lindh M, Hannoun C, Horal P, Krogsgaard K - Interpreted Study Group. Virological response to interferon therapy of chronic hepatitis B as measured by a highly sensitive assay. *J Viral Hepat*. 2001; 8(5): 349-57.
12. Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H - Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol*. 2001; 64(3): 312-9.
13. COBAS® AMPLICOR® HBV MONITOR Test, Revision 6.0, 8/2009, Roche Diagnostics, Roche Diagnostica Brasil Ltda.
14. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 2001; 80: 63-71
15. Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med*. 2002; 137: 1-9.

16. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518-526
17. Scheuer PJ, Standish RA, Dhillon AP. Scoring of chronic hepatitis. *Clin Liver Dis* 2002;6:335-347.
18. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159-174.
19. Campos AR, Campos MVS, Carvalho MB, Giordano MGNE, Amazonas SS. Prevalência de marcadores sorológicos do vírus da hepatite B em doadores de sangue em Brasília. In: *Anais do XXXIV Congresso Brasileiro de Gastroenterologia e da X Semana Brasileira do Ap. Digestivo*, Goiânia, 1996.
20. Leila M. M. B. Pereira, Celina M. T. Martelli, Edgar Merchán-Hamann, Ulisses R. Montarroyos, Maria C. Braga, Maria L. C. de Lima, Maria R. A. Cardoso, Marília D. Turchi, Marcelo A Costa. Population Based Multicentric Survey of Hepatitis B Infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009; 81: 240-247.
21. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45(2): 507-39.
22. Keefe EB, Dieterich DT, Han SHB, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: 2008 Update. *Clin Gastroenterol and Hepatol* 2008; 6: 1285-1286.
23. El-Zayadi AR, Badran HM, Saied A, Shawky S, Attia Mel-D, Zalata K. Evaluation of liver biopsy in Egyptian HBeAg-negative chronic hepatitis B patients at initial presentation: implications for therapy. *American Journal of Gastroenterology* 2009; 104(4): 906-11.
24. Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F, Khalil L, Delattre J, Pelissier E, Sansonetti N, Opolon P. Factors associated with serum alanine transaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors, and for patients with chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. *Hepatology* 1998; 27(5): 1213-9.
25. Rotman Y, Brown TA, Hoofnagle JH. Evaluation of the Patient with Hepatitis B. *Hepatology* 2009; 49(5): suppl.
26. Lai M, Hyatt BJ, Nasser I, Curry M, Afdhal NH. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic hepatitis B infection. *Journal of Hepatology* 2007; 47: 760-7.
27. Consenso SBH sobre condutas nas hepatites virais B e C: Hepatite B.; GED 2005; 24: 1.
28. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, Feng ZZ, Reddy KR, Schiff ER. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97(10): 2614-8
29. Papatheodoridis GV, Manesis EK, Manolakopoulos S, Elefsiniotis IS, Goulis J, Giannousis J, Bilalis A, Kafiri G, Tzourmakliotis D, Archimandritis AJ. *Hepatology* 2008; 48(5): 1451-9.
30. Hoofnagle, J.H. Alfa-interferon therapy of chronic hepatitis B. Current status and recommendations. *Hepatology* 1990; 11: S100-S107.
31. Perez, V., Tanno, H., Villamil, F. et al. Recombinant interferon alfa-2b following prednisone withdrawal in the treatment of chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1990; 11: S113-S117.

32. Lai, C.-L., Ching, C.-K., Tung, S.K.-M. et al. Lamivudine is effective in suppressing Hepatitis B Virus DNA in Chinese Hepatitis B surface antigen carriers: A placebo-controlled trial. *Hepatology* 1997; 25: 241-244.
33. Nagata, I., Colucci, G., Gregorio, G.V. et al. The role of HBV DNA quantitative PCR in monitoring the response to interferon treatment in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 1999; 30: 965-969.
34. Hadziyannis, S.J., Manesis, E.K., and Papakonstantinou, A. Oral ganciclovir treatment in chronic hepatitis B virus infection: a pilot study. *Journal of Hepatology* 1999; 31: 210-214.
35. Marcellin, P., Chang, T.-T., Lim, S.G. et al. Adefovir Dipivoxil for the treatment of Hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine* 2003; 348: 808-816.
36. Puchhammer-Stöckl, E., Mandl, C.W., Kletzmayer, J. et al. Monitoring the virus load can predict the emergence of drug-resistant hepatitis B virus strains in renal transplant patients during lamivudine therapy. *Journal of Infectious Diseases* 2000; 181: 2063-2066.
37. Souto et al. Long-term use of lamivudine for treating chronic hepatitis B in the State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(1): 18-24.
38. Schiff ER, Lai CL, Hadziyannis S, et al. Adefovir dipivoxil study 435 International Investigators Group. *Hepatology* 2003; 38(6):1419-27.
39. Liaw YF, Gane E, Leung N, et al. 2-Year GLOBE Trial Results: Telbivudine Is Superior to Lamivudine in Patients With Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology*. 2009 Feb; 136(2): 486-95.
40. Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology* 2008;134:405–415.
41. Kohmoto M, Enomoto M, Yano Y, et al. Detection of serum hepatitis B virus DNA by real-time quantitative polymerase chain reaction (Taqman PCR) during lamivudine treatment: comparison with three other assays. *Hepatol Res* 2003; 26(2): 125-133.
42. Perrillo RP, Schiff ER, Davis GL, Bodenheimer HC, Lindsay K, Payne J, et al. A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1990; 323: 295-301.
43. Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A metaanalysis. *Ann Intern Med* 1993; 119: 312-323.
44. Zoulim F, Perrillo R. Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy. *J Hepatol* 2008; 48 (Suppl.1): S2-S19.
45. Bonino F, Marcellin P, Lau GK, Hadziyannis S, Jin R, Piratvisuth T, et al. Predicting response to peginterferon alpha- 2a, lamivudine and the two combined for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Gut* 2007; 56: 699-705.
46. Fried MW, Piratvisuth T, Lau GKK, Marcellin P, Chow WC, Cooksley G, et al. HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAgpositive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008; 47:428-434.

47. Hadziyannis S, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2673-2681.
48. Locarnini S, Qi X, Arterburn S, Snow A, Brosgart CL, Currie G, et al. Incidence and predictors of emergence of adefovir resistant HBV during four years of adefovir dipivoxil (ADV) therapy for patients with chronic hepatitis B (CHB) (abstract). *J Hepatol* 2005; 42 (suppl. 2): A36.
49. Qi X, Snow A, Thibault V, Zhu Y, Curtis M, Hadziyannis S, et al. Long-term incidence of adefovir dipivoxil (ADV) resistance in chronic hepatitis B (CHB) patients after 144 weeks of therapy (abstract). *J Hepatol* 2004; 40 (suppl. 2): A57.
50. Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, Wong WM, Chan AO, et al. Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications. *Gut* 2005; 54:1610-1614.
51. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208-1236.
52. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B: natural history and treatment. *Semin Liver Dis* 2006;26:130-141.
53. Al-Mohri H, Murphy T, Lu Y, Lalonde RG, Klein MB. Evaluating liver fibrosis progression and the impact of antiretroviral therapy in HIV and hepatitis C coinfection using a noninvasive marker. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 44:463-469.

LIMITAÇÕES

Apesar da adoção de cuidados metodológicos relevantes, tais como análises multivariadas para ajuste de fatores selecionados, avaliação da concordância dos testes ajustada por chance, entre outros, alguns limites devem ser observados e discutidos para o present estudo.

1. Erros (viés) de aferição:

Cargas virais: no presente estudo a quantificação do HBVDNA foi realizada uma única vez, com o objetivo principal de avaliar e documentar eventual concordância entre uma metodologia amplamente utilizada no Sistema Único de Saúde (AMPL) e outra metodologia amplamente utilizada na rede laboratorial privada (TQM) no Brasil. Devido à natureza altamente dinâmica da hepatite B crônica HBeAg negativo, há recomendação formal de se realizar quantificações seriadas de carga viral durante prazo suficiente, antes da decisão pela biópsia hepática ou pelo tratamento antiviral. Portanto, erros de aferição em ambas as técnicas (AMPL e TQM) não podem ser completamente descartados e devem ser abordados em estudos futuros de validação dessas técnicas aferidas em uma única avaliação.

Fibrose hepática: limitações próprias da técnica da biópsia, da qualidade do fragmento obtido e da variação inter-observador podem, ainda, ter produzido erros de aferição e potencialmente ter prejudicado a identificação de associações nos modelos multivariados.

Erros de informação não diferenciais (i.e. erros na classificação da fibrose independente dos valores das cargas virais) tendem a subestimar as associações de interesse e podem justificar ausência de associações biologicamente plausíveis do presente estudo. Porém, não é esperado que esse tipo de erro produza as associações significativas observadas no presente estudo.

2. Erros (viés) de seleção:

A fraca associação entre as cargas virais e o achado de fibrose em biópsias hepáticas observada nesse estudo, pode ser resultado do tipo de população alvo estudada. Importante lembrar que os indivíduos incluídos no presente estudo são provenientes de demanda pré-selecionada de pacientes (viés de demanda) com laudos de biópsias disponível para análise (viés de indicação). Esses processos seletivos de pacientes podem distorcer (em geral enfraquecer) as associações existentes entre as variáveis de interesse – supondo que biópsias foram realizadas para pacientes com indicação ao procedimento (aumento flutuante ou persistente de transaminases, carga viral aumentada, achados laboratoriais de doença hepática antiga ou avançada), embora diversos mecanismos atuem na triagem e pré-seleção que definem as demandas de serviços de referência como o utilizado nesse estudo. Portanto, o estudo foi realizado em um grupo de pacientes relativamente selecionados.

3. Erros de temporalidade:

Ainda, também a fraca associação observada entre as cargas virais e o achado de fibrose em biópsias hepáticas, pode ser resultado do delineamento transversal do estudo, que ignora a temporalidade dos eventos sob análise, limitando a aferição da história pregressa do paciente. Por exemplo, torna-se impossível avaliar se altas cargas virais aferidas atualmente (prevalentes) são eventos incidentes recentes ou históricos persistentes. Ademais, esse tipo de análise seccional ignora o lapso de tempo necessário para que a persistência de cargas virais elevadas possa influenciar desfechos histológicos e a fibrose hepática futuros.

4. Precisão e tamanho amostral:

Uma das principais limitações do estudo talvez resida no pequeno número de pacientes estudados disponíveis, especialmente para as análises multivariadas, conferindo baixo poder estatístico às avaliações aqui relatadas. Um delineamento prospectivo, incluindo número de indivíduos suficientes a serem acompanhados por tempo suficiente para observação seriada das variáveis descritas poderia favorecer não apenas a acurácia na observação dos eventos de interesse, como o poder estatístico das associações de interesse.

CONCLUSÕES / RECOMENDAÇÕES

Dentre as informações obtidas no presente estudo, uma das mais relevantes foi a de que sem os resultados do teste TQM mais de 50% dos pacientes com cargas virais <2.000 ui/ml que tivessem sua avaliação limitada à metodologia AMPL, não seriam considerados candidatos a tratamento ou biópsia hepática.

Uma classificação clínica equivocada como portadores de hepatite B crônica inativa, inviabilizaria o diagnóstico correto, adiaria a necessária avaliação específica com vistas ao tratamento e poderia gerar complicações importantes no médio prazo.

O poder discriminatório do método AMPL para doença clinicamente ativa passível de intervenção diagnóstica e terapêutica nesse grupo de pacientes se mostrou consistentemente baixo.

Conseguindo quantificar a carga viral em mais de 50% daqueles pacientes originalmente classificados como portadores inativos ou com baixa atividade da doença pelo método AMPL, o exame TQM permitiu a efetiva reavaliação e reclassificação da elegibilidade ao tratamento dos portadores de hepatite B crônica estudados.

Sabendo que nem todos os pacientes com hepatite B crônica apresentam aminotransferases persistentemente elevadas, em particular pacientes com a forma clínica mutante pré-core (HBeAg negativo) – que apresentam transaminases intermitentemente normais, estudos apropriados de acompanhamento longitudinal de longo prazo são cruciais para melhor determinação do papel desse marcador bioquímico na indicação ao tratamento.

Níveis séricos de HBVDNA estimados por métodos quantitativos sensíveis e confiáveis devem ter uso criterioso para a adequada diferenciação entre pacientes com hepatite B crônica HBeAg negativo e portadores inativos. Sua quantificação é fundamental para o diagnóstico, a decisão de tratar e o monitoramento da resposta ao tratamento da enfermidade e da resistência aos antivirais. O uso das metodologias de quantificação

baseadas em tempo real está amparado na literatura e no presente estudo devido à maior sensibilidade, especificidade, acurácia e linearidade.^{22,23,24,25}

Sendo a viremia habitualmente mais baixa nos portadores de hepatite B crônica HBeAg negativo clinicamente ativa, as diretrizes terapêuticas sugerem a utilização de níveis de HBVDNA ≥ 2.000 ui/ml como referência para indicação de tratamento. Esta recomendação atinge consenso nas mais variadas associações para o estudo das enfermidades do fígado que discutem e publicam as diretrizes de acompanhamento e tratamento para essa população específica de pacientes.²⁴

Mesmo uma quantificação isolada do HBVDNA, com metodologia adequada e suficientemente sensível, parece superar tanto os marcadores bioquímicos como sorológicos de doença para a classificação clínica precisa dos portadores da infecção crônica pelo HBV na forma HBeAg negativo. Manesis e colaboradores, entretanto, frisam que devido às peculiaridades intrínsecas à própria doença, com níveis mais baixos de carga viral ou flutuações intermitentes da mesma, uma única avaliação bioquímica, sorológica e quantitativa do DNA nem sempre é suficiente para o diagnóstico e a discussão de tratamento.⁶

Em resumo, para este estudo em portadores de infecção crônica pelo HBV HBeAg negativo, o teste TQM quantificou um número maior de cargas virais acima dos limites considerados adequados para decisão terapêutica, permitindo ainda discriminar níveis absolutos mais expressivos que o teste AMPL. Além disso, a associação marginal ($p=0,057$) entre cargas virais aferidas por TQM com fibrose, ainda que em um contexto de baixo poder estatístico, reforça a hipótese de que a quantificação do HBVDNA por essa metodologia possui maior poder de discriminação para diagnosticar e detectar

²² Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Laperche S, Pawlotsky JM. Performance of the Cobas AmpliPrep/ Cobas TaqMan real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1716–1723

²³ Thibault V, Pichoud C, Mullen C, Rhoads J, Smith JB, Bitbol A, et al. Characterization of a new sensitive PCR assay for quantification of viral DNA isolated from patients with hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol* 2007;45:3948–3953.

²⁴ Stelzl E, Muller Z, Marth E, Kessler HH. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by automated sample preparation and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:2445–2449

²⁵ Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology* 2008;134:405–415

²⁴ EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. European Association for the Study of the Liver. *Journal of Hepatology* 50 (2009) 227–242

replicação viral ativa quando comparada aos resultados obtidos com o teste AMPL. Esses achados podem indicar um favorecimento pela escolha do TQM sobre o AMPL, em função da sua aparente superioridade em discriminar os pacientes e apoiar mais claramente o monitoramento das cargas virais durante o curso terapêutico.

ANEXOS



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 016/2008

Título: "Associações entre a carga viral do vírus de Hepatite B-HBV DNA quantitativo por PCR em tempo real e achados clínicos laboratoriais e histológicos em portadores de Hepatite B crônica HBeAg negativo".

Pesquisador responsável: Marcelo Abrahão Costa

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es).

Data de entrada: 04/03/2008

Proposição do(a) relator(a)

(x) Aprovação

() Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 25/04/2008

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 28/05/2008

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 28/05/2008, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 29 de maio de 2008.

Prof.^a Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UnB

Anexo — Questionário

CARGA VIRAL – HBV DNA QUANTITATIVO EM PORTADORES HBV

Paciente # _____

PREENCHIMENTO DA FICHA: ____/____/____ DIAGNÓSTICO DO PACIENTE: ____/____/____ Médico responsável: _____ Serviço: _____

NOME: _____ REGISTRO: _____

SEXO: _____ DATA NASC: _____ RAÇA: _____ NATURALIDADE: _____

ESCOLARIDADE: _____ ESTADO CIVIL: _____ PROFISSÃO: _____

ENDEREÇO: _____ TELEFONE: _____

DADOS CLÍNICOS: **Contágio** ☐ 1 sexo ☐ 2 transfusão ☐ 3 UDI ☐ 4 vertical ☐ 5 desconhecido
☐ tempo estimado de infecção : _____

Drogas ilícitas ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM Quais: _____

Tempo de uso : _____

Etilismo ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM ☐ 2 < 20 g/dia ☐ 3 > 20 g/dia

Duração : _____ Tipo: _____

Transfusão ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM data: _____

Diabetes ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM **Obesidade** ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM

Piercing ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM data: _____

Dislipidemia ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM **HAS** ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM

Tattoo ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM data: _____

Medicamentos ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM Quais: _____

Tempo de uso : _____

História familiar de doenças metabólicas ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM

Quais: _____

Outros _____

EXAME FÍSICO:

• Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ CC: _____

• AR: _____ • ACV: _____

• Abdome: _____

• Sinais

periféricos de hepatopatia crônica ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM

Quais: _____

EXAMES DE IMAGEM:• US ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM _____• TC ☐ 0 NÃO ☐ 1 SIM _____

EXS LABORATORIO					
HBVDNA RT PCR TAQMAN					
HBVDNA SES					
Ativ necroinfl (1/2/3/4)					
Fibrose (1/2/3/4)					
AntiHCV					
Leucócitos					
Hemoglob /Hemat	/	/	/	/	/
Plaquetas					
TGO					
TGP					
Fosf Alk					
Gama GT					
Prot Tot					
Albumina / gama globulina	/	/	/	/	/
Bili Tot / Bili Dir	/	/	/	/	/
Ferritina / Sat. transferrina	/	/	/	/	/
TAP / PT	/	/	/	/	/
INR					
Col Tot / TGC	/	/	/	/	/
HDL / LDL	/	/	/	/	/
glicemia / insulina	/	/	/	/	/
Uréia / creatinina	/	/	/	/	/
Alfafetoproteína AFP					
Cobre sérico					
Ceruloplasmina					
T3 livre / T4 livre					
TSH					
FAN					
ASMA / AMA	/	/	/	/	/

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)